

44
2eje.

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



" ESTUDIO POR WESTERN BLOT DE LA
RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN HUMANOS
CON BRUCELOSIS Y VACUNADOS, HACIA
ALGUNOS CONSTITUYENTES DE
BRUCELLA"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
TAIS **NOPAL** GUERRERO

DIRECTORES DE TESIS

DRA: AHIDE LOPEZ MERINO

QFI: ANDREA BECERRIL OSNAYA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Estudio por Western blot de la respuesta inmune humoral
en humanos con brucelosis y vacunados, hacia algunos
constituyentes de Brucella.

que presenta lo pasante: Tafa Nopal Guerrero

con número de cuenta: 8312271-0 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga .

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 2 de Febrero de 1994

PRESIDENTE M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL Q.F.I. Andrea Becerril Osaya

SECRETARIO Q.F.B. Marcela Hernández Vargas

PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Victor Manuel Zendejas Buitrón

SEGUNDO SUPLENTE M.V.Z. Enrique Salas Téllez

**ESTE TRABAJO FUE ELABORADO EN EL INSTITUTO NACIONAL DE
DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS,
EN EL LABORATORIO DE BRUCELOSIS BAJO LA DIRECCION DE LA DRA.
AHIDE LOPEZ MERINO Y CON EL ASESORAMIENTO DE LA QFI ANDREA
BECERRIL OSNAYA**

*'En el laberinto de la vida no sabemos si el camino tomado es el adecuado
para lograr nuestras metas; tal vez sea el más largo y difícil,
tal vez sea el corto pero no feliz. ¿Quién lo puede saber?
Nada nos asegura la vida, por eso hay que saber disfrutarla
para que en el ocaso
no veamos tiempo perdido sino tiempo vivido.*

*A mis padres:
Por que por ustedes he logrado
una de mis mayores metas como persona,
profesionista y como mujer;
por que ustedes estuvieron en los puntos cruciales de mi existir; y
por que ustedes me dieron lo más importante y bello que puede existir,
'la vida'.*

Gracias.

*A mis hermanos:
Ustedes son el complemento de la familia y forman parte de mí,
hemos vivido muchas cosas juntos; y espero que eso pueda seguir.*

*A todos aquellos que en algún momento de mi vida coincidieron en el mismo punto que yo, y
formaron parte de mi vida Gracias.*

*A ti Paty por todo el apoyo recibido
y que espero seguir contando con él, quisiera contar contigo toda la vida;
por que tu sabes que cuentas conmigo en las buenas y en las malas.*

*Gracias a todos mis amigos del INDRÉ, que supieron comprenderme y me aceptaron como soy,
y que me apoyaron en los momentos difíciles en la realización de este trabajo.*

Al laboratorio de Brucelosis, Producción de Sueros y Enterobacterias.

*Un agradecimiento muy especial al Dr. Mora, Lili, Alberto y Alex por su asesoramiento en las
computadoras que fué un gran dolor de cabeza.*

*A ustedes muchachas y chicos de la escuela que pude convivir con ustedes en forma más
profunda y descubrimos realmente como somos:*

Club de Mickey Mouse, Sobreviviendo, Un solo nombre y anexos.

INDICE

Página

1.0 INTRODUCCION	1
2.0 GENERALIDADES	3
2.1 Historia	3
2.2 Fuentes de infección	3
2.3 Vias de transmisión	4
2.4 Morfología y Ultraestructura	5
2.5 Componentes antigénicos	7
2.6 Importancia biológica de los,antígenos de <i>Brucella</i>	10
2.7 Patogenicidad	12
2.8 Aspectos clínicos	13
2.8.1. Forma Aguda	14
2.8.2. Forma crónica	14
2.9 Respuesta Inmunológica a <i>Brucella</i>	15
2.9.1.Inmunidad Celular	15
2.9.2.Inmunidad Humoral	16
2.10 Diagnóstico	17
2.10.1. Western blot (IET)	18
3.0 JUSTIFICACION DEL ESTUDIO	20
4.0 OBJETIVOS	21
5.0 MATERIAL Y METODOS	22
6.0 RESULTADOS	39
7.0 DISCUSION	71
8.0 CONCLUSIONES	83
9.0 APENDICE	84
10.0 BIBLIOGRAFIA	90

INDICE DE FIGURAS

	Página
FIG. 1. PARED CELULAR DE <i>Brucella</i>	6
FIG. 2. ESTRUCTURA DEL LIPOPOLISACARIDO EN FASE LISA Y RUGOSA	6
FIG. 3. VISTA FRONTAL Y LATERAL DE UN GEL Y SUS COMPONENTES	35
FIG. 4. CAMARA DE ELECTROFORESIS Y COLOCACION DE MUESTRAS	35
FIG. 5. CURVA PATRON DE PROTEINAS	40
FIG. 6. CURVA DE CALIBRACION PARA MARCADORES DE PESO MOLECULAR.	46
FIG. 7. SEPARACIONES ELECTROFORETICAS DE LOS ANTIGENOS PROTEICOS	47
FIG. 8. SEPARACIONES ELECTROFORETICAS DE LOS ANTIGENOS LPS	47
FIG. 9. PERFIL DE INMUNOGLOBULINAS PARCIALES DE INDIVIDUOS CON BRUCELOSIS AGUDA.	49
FIG. 10. CORRELACION DEL TITULO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES CON EL PATRON OBTENIDO EN LA IET. CASO AGUDO J.S.C.	50
FIG. 11. CORRELACION DEL TITULO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES CON EL PATRON OBTENIDO EN LA IET. CASO AGUDO I.M.	51
FIG. 12. CORRELACION DEL TITULO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES CON EL PATRON OBTENIDO EN LA IET. CASO AGUDO C.C.L.	52

FIG. 13. CORRELACION DEL TITULO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES CON EL PATRON OBTENIDO EN LA IET. CASO AGUDO M.L.	53
FIG. 14. PERFIL DE INMUNOGLOBULINAS PARCIALES DE INDIVIDUOS CON BRUCELOSIS CRONICA	56
FIG. 15. CORRELACION DEL TITULO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES CON EL PATRON OBTENIDO EN LA IET. CASO CRONICO A.T.S.	57
FIG. 16. CORRELACION DEL TITULO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES CON EL PATRON OBTENIDO EN LA IET. CASO CRONICO A.M.	58
FIG. 17. CORRELACION DEL TITULO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES CON EL PATRON OBTENIDO EN LA IET. CASO CRONICO M.A.H.	59
FIG. 18. PERFIL DE INMUNOGLOBULINAS PARCIALES DE INDIVIDUOS VACUNADOS.	61
FIG. 19. CORRELACION DEL TITULO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES CON EL PATRON OBTENIDO EN LA IET. VACUNADOS CASO A.M.C.	62
FIG. 20. CORRELACION DEL TITULO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES CON EL PATRON OBTENIDO EN LA IET. VACUNADOS. CASO A.L.	63
FIG. 21. CORRELACION DEL TITULO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES CON EL PATRON OBTENIDO EN LA IET. VACUNADOS. CASO X.C.B.	64
FIG. 22a y 22b. ESQUEMAS DE LOS PATRONES OBTENIDOS EN LA IET DEL GRUPO DE CONVIVIENTES	67

FIG. 23. ESQUEMAS DE LOS PATRONES OBTENIDOS EN LA IET DEL GRUPO DE REACCION CRUZADA	69
FIG. 24. REACCION QUIMICA QUE SE LLEVA A CABO EN LA CUANTIFICACION DE PROTEINAS	84
FIG. 25. ESTRUCTURA QUIMICA DEL ACIDO BICINCONINICO	84
FIG. 26. VENTAJAS DE LAS ELECTROFORESIS PAGE-SDS	87
FIG. 27. SISTEMA DE ELECTROTRANSFERENCIA	88

Las abreviaturas utilizadas en las gráficas para nombrar los casos estudiados, corresponden a la primer letra del nombre y apellidos de las personas.

INDICE DE CUADROS

Página

CUADRO 1. CURVA ESTANDAR DE PROTEINAS	31
CUADRO 2. GELES DE POLIACRILAMIDA PARA PROTEINAS	33
CUADRO 3. GELES DE POLIACRILAMIDA PARA LPS	33
CUADRO 4. VOLUMENES DE ANTIGENOS UTILIZADOS EN LA ELECTROFORESIS.	34
CUADRO 5. DENSIDADES OPTICAS Y CONCENTRACIONES DE PROTEINAS DE LOS RCM.	39
CUADRO 6. DENSIDADES OPTICAS DE LA CURVA ESTANDAR DE PROTEINAS	40
CUADRO 7. BANDAS PROTEICAS DE LOS RCM Y PESOS MOLECULARES APROXIMADOS	45
CUADRO 8. MOVILIDADES RELATIVAS (RF) DE LOS MARCADORES DE PESO MOLECULAR	46
CUADRO 9. DATOS CLINICOS Y SEROLOGICOS DEL GRUPO DE INDIVIDUOS CON BRUCELOSIS AGUDA	49
CUADRO 10. DATOS CLINICOS Y SEROLOGICOS DEL GRUPO DE INDIVIDUOS CON BRUCELOSIS CRONICA	55
CUADRO 11. DATOS CLINICOS Y SEROLOGICOS DEL GRUPO DE INDIVIDUOS VACUNADOS	62
CUADRO 12. DATOS CLINICOS Y SEROLOGICOS DEL GRUPO DE INDIVIDUOS CONVIVIENTES	67
CUADRO 13. DATOS CLINICOS Y SEROLOGICOS DEL GRUPO DE INDIVIDUOS CON REACCION CRUZADA (COLERA)	69

ABREVIATURAS

A-B = Acrilamida-Bisacrilamida

Ac = Anticuerpos

Ag = Antígeno

Ag-Ac = Antígeno anticuerpo

AgNO₃ = Nitrato de plata

ATA = Aglutinación estándar para *B. abortus*

ATM = Aglutinación estándar para *B. melitensis*

CIE = Contraimmunoelectroforesis

D.O = Densidad óptica

DTT = Ditioneitol

Dx = Diagnóstico

EDTA = Ac. etilendiaminotetracético

ELISA = Ensayo Inmuno Enzimático

IET= Inmunoelectrotransferencia

Ig = Inmunoglobulinas

Kda = Kilodaltons

KDO = Ac. 2-ceto-3-desoxioctulosónico

LB = Linfocito B

LPS = Lipopolisacárido

LPS-BA = Lipopolisacárido de *B. abortus*

LPS-BM = Lipopolisacárido de *B. melitensis*

LPS-R = Lipopolisacárido en fase rugosa

LPS-S = Lipopolisacárido liso

LT = Linfocito T

M= Molar

mA = miliampers

2-ME = 2-mercaptoetanol

MEA = Aglutinación en presencia de mercaptoetanol para *B. abortus*

MEM = Aglutinación en presencia de mercaptoetanol para *B. melitensis*

µm = micrómetros

mM = milimolar

NC = Nitrocelulosa

P.I. = Fracción insoluble en fenol

P.M = Peso molecular

PME = Proteínas de membrana externa

PMN = Polimorfonucleares

RB = Rosa de Bengala

RCM = Extracto salino proteico

RIA = Radioinmunoensayo

Rf = Movilidades relativas

RPM = Revoluciones por minuto

SDS = Dodecilsulfato de sodio

SDS-PAGE = Electroforesis en geles de poliacrilamida-Dodecil sulfato de sodio

V = Volts

W = Watts

RESUMEN

Las pruebas de Rosa de Bengala, aglutinación en microplaca y aglutinación en microplaca con 2-mercaptoetanol son las técnicas aplicadas en el diagnóstico de la brucelosis en la actualidad; teniendo como antígeno la célula completa. Recientemente se ha tratado de implantar el uso de fracciones celulares en sistemas inmunoenzimáticos como la IET para estudiar la respuesta inmune hacia éstos antígenos ya que se ha observado que las pruebas convencionales no son específicas.

Se estandarizó la técnica de IET para las fracciones proteicas y LPS de *B. abortus* y *B. melitensis*, trabajándose con los siguientes grupos de individuos:

- a) Con brucelosis aguda (4 personas), b) Con brucelosis crónica (3 personas),
- c) Vacunados (3), d) Convivientes (4), e) Reacción cruzada con *V. cholerae* (3) y
- f) Grupo control negativo (3).

El patrón electroforético del RCM-99s presentó 13 bandas bien definidas e intensas con la tinción de AgNO₃, mientras que en el patrón del RCM-M16 de 11 bandas solo una presentó ésta característica. Comparten 9 proteínas con pesos moleculares muy semejantes. El LPS no presentó el patrón electroforético común en la mayoría de las enterobacterias, ya que tienen una "cadena O" más corta y menos definida.

El mayor reconocimiento antigénico obtenido en los 2 grupos de brucelosis y convivientes fué hacia la molécula del LPS. El cultivo positivo en un individuo no incrementa la respuesta inmune hacia los antígenos bacterianos. El grupo de vacunados no indicó haber tenido una respuesta de anticuerpos significativa hacia un antígeno determinado, ni tampoco presentó reacción a la vacuna.

La reacción cruzada con *V. cholerae* es nula en la técnica de IET ya que de las 3 personas estudiadas ninguna presentó reconocimiento antigénico y el grupo control negativo no presentó indicios de reacción positiva, lo que nos indica que la técnica utilizada es específica.

1.0 INTRODUCCION

La Brucelosis conocida como: fiebre ondulante, fiebre del mediterráneo, fiebre de malta o enfermedad de Bang, es una de las zoonosis más severas transmisibles al hombre. Es causada por bacterias gram negativas del género *Brucella*. Las especies que se han identificado como responsables de la infección humana son: *B. abortus* (ganado vacuno), *B. melitensis* (cabras) y *B. suis* (cerdos). Mientras que *B. canis* (perros) y *B. ovis* (ovejas) se han reportado esporádicamente. La brucelosis no es contagiosa (15, 16, 24).

Las especies del género *Brucella* pueden originar procesos agudos, crónicos o una infección inaparente; la cronicidad está influenciada por la capacidad que tienen estas bacterias para multiplicarse en los fagocitos, ya que se ha señalado al LPS como posible responsable de la evasión de muerte bacteriana por acción fagocitaria (29). El escaso conocimiento de la enfermedad y su sintomatología no definida provoca confusiones lo que trae como resultado la mayoría de las veces un tratamiento y un diagnóstico inadecuado. Con frecuencia la infección es subclínica o tiene respuestas variadas en el huésped. El diagnóstico en humanos es generalmente difícil para establecer, se ha basado comúnmente en la detección y/o cuantificación de anticuerpos antibrucela en suero por pruebas de aglutinación, precipitación, fijación de complemento, ELISA e Inmunoelctrotransferencia (IET) (10, 19, 24, 31, 39, 51).

Los anticuerpos antibrucela son inicialmente indicadores de la infección, su estudio por lo tanto es necesario para un seguimiento clínico. Hasta ahora no se sabe exactamente que papel juegan los anticuerpos en la respuesta inmune por lo que se ha hecho necesario realizar estudios de ésta respuesta en los pacientes, hacia la bacteria y no solo a los LPS, sino a otros antígenos que no

tengan el inconveniente de la reacción cruzada (13,37). Una preparación de LPS o proteínas puede ser separado en muchos fragmentos por la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de Dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). La mayoría de los polímeros biológicos poseen carga eléctrica y por lo tanto son capaces de migrar bajo la influencia de un campo eléctrico. La SDS-PAGE, ha resultado ser una herramienta útil para la separación y caracterización de estas moléculas. Su análisis por este método puede visualizarse con técnicas de Tinción de Plata (11, 12). Una forma de transferir estas bandas o partes a nitrocelulosa se ha descrito por Towbin y otros (43, 44) donde se unen las bandas covalentemente a los grupos reactivos del papel, quedando así inmovilizadas y expuestas en la superficie para reaccionar con los anticuerpos correspondientes. El patrón obtenido sobre la nitrocelulosa es una copia del patrón de separación obtenido en el gel. Esto nos permite realizar un estudio con mayor detalle de la interacción posible entre anticuerpos y antígenos (19, 25, 34, 47).

En el aspecto de protección en humanos hacia la bacteria, aún no se tiene algo en concreto. Se ha observado que la prevalencia de brucelosis en sujetos vacunados ha disminuido, pero no se tiene aún una exacta estimación de los efectos benéficos de la vacuna (36).

2.0 GENERALIDADES

2.1 HISTORIA

En 1861 J.A. Marston, describió el primer caso de brucelosis humana, refiriendo sus propios síntomas cuando trabajaba como cirujano en el British Army Medical Service en la isla de Malta (16).

En 1887 la especie bacteriana causante de la enfermedad fué aislada por vez primera por el cirujano David Bruce, en bazos de soldados británicos infectados en la isla de Malta. Bang aisló en 1895 el segundo microorganismo a partir de ganado vacuno afectado por abortos infecciosos, mientras que en 1914 un tercer microorganismo fué cultivado en E.U., a partir de un feto prematuro de cerdo. Para 1918 Evans dilucidó que los 3 microorganismos tenían relación entre sí por lo que los agrupó en un género aparte denominado *Brucella* (15).

En México fué Pláceres el primero en aislar este género en 1921 en el Estado de Puebla, a pesar de que, desde antes se tenían noticias de la enfermedad. En 1939 se realizó el 1er. Congreso Nacional de Fiebre de Malta y en 1946 la Primera Reunión Interamericana de Brucelosis las cuales tuvieron en Maximiliano Ruiz Castañeda su principal promotor. Este notable investigador Mexicano aportó elementos primordiales para el aislamiento, diagnóstico y tratamiento de la brucelosis humana, además de fundar el 1er. laboratorio de estudio e investigación de este padecimiento (29).

2.2 FUENTES DE INFECCION

Los microorganismos pueden ser esparcidos en las secreciones y excreciones de animales infectados, como vacas, cabras y cerdos. Las bacterias pueden estar presentes en la sangre, nódos linfáticos, ubres, órgano reproductor y otros tejidos (24, 51).

La carne cruda contiene restos de tejido linfático y sangre de res infectada por lo

que pueden contener organismos viables (24). La fuente de infección más importante de *B. abortus* son las vacas y por consiguiente la leche y sus derivados como queso fresco, mantequilla, helados (16).

2.3 VIAS DE TRANSMISION

Las principales vias de transmisión pueden ser:

a) Contacto directo de piel (con abrazones) o conjuntiva; con secreciones, excreciones o tejidos de animales infectados (51). Entre las personas de alto riesgo se encuentran los encargados de matar cerdos (que pueden estar infectados con *B. suis*) así como los veterinarios y las familias de los ganaderos (16).

b) Inhalación de aerosoles infecciosos. En los laboratorios, ésta es la vía de transmisión más frecuente (16). *Brucella* penetra por la mucosa del tracto respiratorio superior o por pulmón. En estas 2 anteriores vias de transmisión, se observa una relación directa con la ocupación del individuo; por lo que se puede decir que la brucelosis es una enfermedad profesional u ocupacional (29).

c) Vía digestiva. Por ingestión de tejidos, alimentos o fluidos de animales que contengan el microorganismo. El riesgo es grande en gente que ingiere leche no pasteurizada o queso fresco, personas con aclorhidria y en pacientes con úlceras pépticas tratadas con una dieta de leche no pasteurizada (ya que no cuentan con un pH ácido en el estómago) (16, 24).

d) Otras vias.

Vacunas: Los veterinarios pueden ser infectados por inoculación accidental con la vacuna de *B. abortus* cepa 19 viva, durante las campañas de vacunación animal (16).

Transmisión interhumana: Esta vía es muy rara, ya que solo se han reportado dos casos de infección por transfusión sanguínea (51); además los donadores para transplantes de médula ósea y otros órganos del sistema retículo endotelial significan un serio problema (29).

Via placentaria: Las brucelas podrían ser transmitidas de una mujer embarazada con brucelosis activa, a su producto a través de placenta, aunque aún no se ha podido comprobar (29).

2.4 MORFOLOGIA Y ULTRAESTRUCTURA

Es un cocobacilo Gram negativo, inmóvil, no esporulado y de tamaño pequeño (0.6-1.5µm por 0.5-0.8µm), dispuesto en pares o cadenas cortas, no presenta pili ni cápsula. Sus colonias son pequeñas, redondeadas, convexas, lisas, de aspecto húmedo y translúcidas (15, 51).

La envoltura celular de *Brucella* presenta: Una membrana plasmática interna, un espacio periplasmático, una capa intermedia de peptidoglican y una membrana externa (29).

La membrana externa celular está compuesta de una línea externa de proteína-LPS y fosfolípidos. Las cadenas de polisacárido son expuestas mientras que los componentes lipídicos están próximos a la línea de peptidoglican los cuales forman la mayor parte de la pared celular. Estos consisten de un complejo fuertemente entrelazado de glucosamina, ácidos murámico, glutámico, diaminopimélico y alanina asociado covalentemente con lipoproteínas. El espacio periplásmico separa la línea de peptidoglican de la membrana celular (2). Las proteínas de la matriz y las proteínas porinas penetran la línea de peptidoglican a intervalos irregulares y están parcialmente expuestas a la superficie celular (20) Fig. 1.

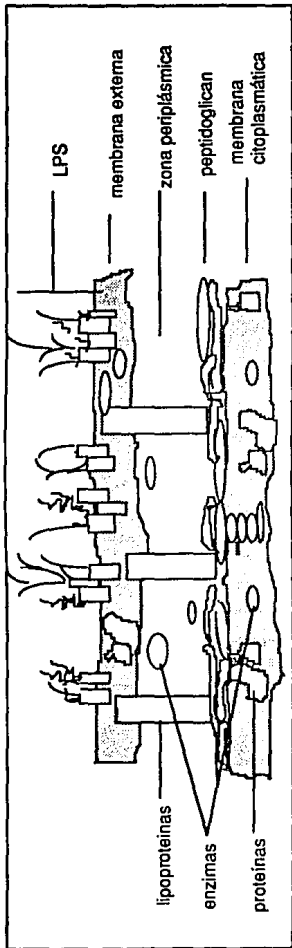


FIG. 1. PARED CELULAR DE *Brucella* (12).

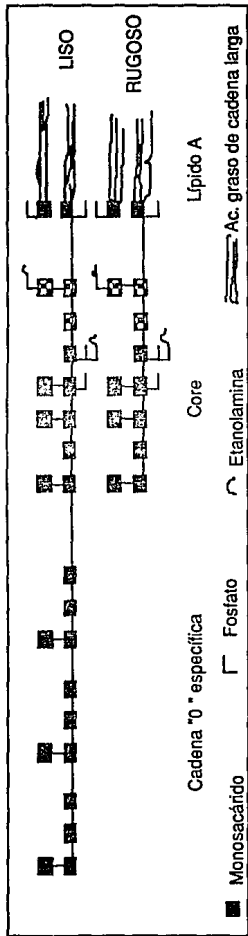


FIG. 2. LPS EN FASE LISA Y RUGOSA (12).

2.5 COMPONENTES ANTIGENICOS.

Entre los numerosos compuestos presentes en la pared celular se encuentran: fosfolípidos, proteínas y el LPS (12) de los cuales en éste trabajo son de interés los 2 últimos.

Antígenos de Superficie:

LIPOPOLISACARIDO:

Como en otras bacterias Gram negativas, el LPS es la molécula más abundante (del 2.5%-3% del peso seco bacteriano). Es de carácter ácido anfipático y se conoce como una endotoxina, ya que es un producto tóxico que está íntimamente unido a la célula. Puede extraerse de células intactas y por hidrólisis ácida separarse en un lípido A (que mantiene su toxicidad) y un polisacárido (del que depende la especificidad antigénica) (15, 50).

El LPS se sintetiza en la membrana citoplasmática de la bacteria y de ahí es transportado hacia la membrana externa donde, junto con proteínas, forman la porción más exterior (12) orientación que facilita la inducción de anticuerpos dirigidos contra el "antígeno O" y el oligosacárido central, que son de gran valor diagnóstico de la brucelosis y en la identificación serológica de *Brucella* (11, 29). Si en la pared celular el LPS se encuentra intacto, hay mayor estabilidad y protección contra el efecto de algunos antibióticos, sustancias nocivas, detergentes, así como a los mecanismos de defensa del huésped durante las infecciones. En la fase R de la bacteria estas propiedades se pierden o disminuyen (12, 33).

El LPS está compuesto de una cadena polisacárida ("Antígeno O" específico), un polisacárido central y el llamado Lípido A (51). Contiene los antígenos A y M que están presentes en todas las brucelas lisas en proporciones que dependen de la especie. Así se reconocían especies con A dominante y con M dominante

que tradicionalmente han sido considerados como una característica diferencial entre las especies de *Brucella* (7, 29). Esencialmente se han establecido como homopolímeros de residuos de 4,6-didesoxi-4-formamido-D-manopiranosil. El antígeno M es un polímero lineal formado por unidades repetitivas de pentasacáridos integrados por un azúcar ligada por enlace α -1, 3 y cuatro por unión α -1, 2. Mientras que el antígeno A está constituido por una cadena lineal con enlaces α -1, 2 esencialmente (6, 7, 8, 17, 30, 51).

El LPS-rugoso (LPS-R) contiene un antígeno "R" que se considera como equivalente a los determinantes antigénicos "A" y "M" encontrados en las células lisas (13). El LPS-R difiere del LPS-S en que carece de quinovosamina (24).

a) Lípido A: Es la parte más interna de la estructura lipopolisacárida. Se sugiere que es similar en el LPS R y S. Su composición es distinta de los LPS de Enterobacterias en su contenido de ácidos: laúrico, mirfístico, palmítico y β -hidroximirfístico que están ausentes en *Brucella*. El lípido A en *Brucella* está constituido principalmente por ácido palmítico, esteárico y por lo menos otros 6 ácidos grasos saturados e insaturados de cadena larga impartiendo las propiedades hidrofóbicas a la molécula. Los azúcares encontrados son: glucosa, manosa, quinovosamina y glucosamina, estos forman el extremo hidrofílico de la molécula (2, 13). Está unido al oligosacárido core por medio del Ac. 2-ceto-3-desoxioctulosónico (KDO) probablemente a través de su carbono 6 (2, 51). En el LPS de *Brucella* la mayoría de las actividades biológicas están asociadas al lípido A y es responsable de muchas de las propiedades inmunoestimuladoras no específicas (4, 23, 29).

b) Core: El oligosacárido core consiste de una cadena corta de glucosa, manosa y residuos de quinovosamina. En muchas variantes R quinovosamina está ausente, sugiriendo que es la terminal glicosídica del core (51).

c) Cadena "O": No se sabe si las cepas R contienen una cadena "O", pero en el caso de cepas S éste consiste de un homopolímero lineal de N-formilperosamina (4-formamido-4,6-didesoxi-D-manosa) unido por sus átomos C₁ y C₂ (enlace α -1, 2). La longitud de la cadena "O" es variable y puede ir de 30 hasta más de 100 residuos de amino-glucosa (9, 10, 51). La estructura del LPS en su fase S y R se puede apreciar en la Fig. 2.

POLISACARIDOS :

Polisacárido B: Otro componente polisacárido ha sido aislado de cepas no lisas de *B. melitensis* B115. Este ha sido designado "Polisacárido B", poli B o PB y muestra una relación serológica hacia haptenos nativos producidos por degradación de LPS liso (51). Es un carbohidrato de bajo peso molecular. Es un polímero cíclico que contiene entre 17 y 24 residuos de glucosa, asociados a una pequeña cantidad de cadena "O" libre y degradado parcialmente. Aparentemente existe en todas las especies de *Brucella* y en forma pura no muestra ser antigénico. Probablemente las reacciones serológicas que se le han atribuido se deban a la presencia de polisacárido O contaminante de las preparaciones (8, 29).

PROTEINAS :

Estrechamente asociadas con la pared celular de *Brucella* están las PME. En forma general los estudios han reportado 3 grupos mayores de PME: Grupo 1= 88-94 Kda; Grupo 2= 35-40 Kda; Grupo 3= 25-30 Kda. La función del primer grupo no es conocido mientras que la función del segundo (aparentemente trímeros en su estado nativo) es de porinas. En el caso de *B. melitensis* la proporción de las proteínas de 25-27 Kda con respecto al grupo de 36-38 Kda es mayor, además predomina una proteína de 48 Kda (38, 51). Para *B. abortus* el gpo. 2 y 3 es el que se encuentra en mayor concentración (48). Se cree que algunas PME juegan un papel importante en la estimulación de inmunidad protectora a *Brucella* (32, 51).

Antígenos internos:

Los antígenos internos comprenden muchas proteínas y glicoproteínas con algunos carbohidratos y pequeños polipéptidos de 16-18 Kda. Los últimos son probablemente más importante por el papel que juegan en preparaciones de Ag intradérmico (51). Dentro de estos antígenos se incluyen diversos extractos obtenidos por numerosos métodos que van desde la simple extracción con agua, solución salina o reguladores, hasta el rompimiento celular (29).

Otro antígeno proteico fué caracterizado por Bhongbhat y col. (1970), que presentaba una actividad alérgica y fué denominado "Brucelina". Fué aislado de un extracto salino de *Brucella melitensis* determinándosele un P.M aproximado de 30 Kda. Otra preparación con actividad similar fué obtenida de la cepa rugosa *B. melitensis* B115. La fracción responsable de la actividad contiene de 12 a 20 constituyentes con P.M. de 12-50 Kda. Fracciones proteicas aisladas de células atenuadas y virulentas de *B. abortus* tratadas con solución salina hipertónica, contenían polipéptidos de 14 y 51 Kda, algunos de los cuales fueron localizados en la superficie y aparentemente podían existir en múltiples formas como dímeros o trímeros (13).

2.6 IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LOS ANTÍGENOS DE BRUCELLA

Utilidad en el diagnóstico serológico

La célula completa ha sido el antígeno más empleado y en forma reciente se inició el uso de fracciones celulares, como el LPS y fracciones proteicas.

a) CELULAS ENTERAS. Se han utilizado en las siguientes pruebas de diagnóstico.

- Aglutinación lenta en tubo.
- Aglutinación lenta en tubo en presencia de 2- mercaptoetanol.
- Prueba de Coombs.
- Prueba de fijación de complemento.

- Aglutinación en placa (Huddleson y Rosa de Bengala).

- ELISA y RIA.

b) LPS. Se considera el componente celular antigénico más importante en las pruebas de aglutinación, por lo que es un elemento de elección primaria por su naturaleza inmunodominante.

- Inmunodifusión.

- ELISA.

Con respecto a la reacción cruzada serológica del LPS de *Brucella*, se han hecho estudios en los que se ha comprobado que diversos géneros bacterianos como: *V. cholerae*, *Yersinia enterocolitica* serotipo 0:9, *E. coli*, *Pseudomona maltophilia*, *Pasteurella* y varios tipos de *Salmonella*, además de *Leptospiras*; presentan ésta característica serológica (37).

c) ANTIGENOS PROTEICOS. Debido a la reacción cruzada presentada por el LPS, se empezaron a estudiar las fracciones proteicas.

- CIE. Se utilizó un antígeno proteico de la cepa *B. melitensis* B115.

- ELISA. El antígeno proteico de *B. abortus* 99s dió resultados que correlacionaron con los que se obtuvieron en pruebas de Aglutinación en tubo y R.B. Por último las PME de la cepa lisa de *B. melitensis* identificaron anticuerpos producidos en infecciones de cepas lisas de: *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, además de la especie rugosa *B. canis* (13).

Uso como vacunas:

La vacunación humana solo se aplica en grupos muy específicos como: veterinarios, ganaderos y trabajadores de mataderos, que tienen un alto riesgo de contraer la infección (16).

En 1952 en la exURSS se inmunizaron trabajadores expuestos a la infección por *B. melitensis* con una vacuna viva conocida con B.A 19-BA. Esta es usada sólo cuando hay un alto riesgo de exposición (24). Las autoridades de Salud Pública

en E.U han eliminado el empleo de las vacunas actuales debido a su posible acción patógena en el hombre (15). En 1962 se estudió en el ratón el poder inmunizante de varias fracciones celulares: bacterias muertas con éter, paredes celulares y extractos bacterianos acuosos; de los cuales el que dió mejores resultados fué el extracto acuoso.

En 1967 Rooux y cols. aislaron una fracción inmunogénica conteniendo peptidoglicana e insoluble en fenol (PI). Esta fracción proporcionaba protección en el ratón y actualmente es utilizada en humanos dando buenos resultados. Años después López Merino y cols. por tratamiento enzimático de PI obtuvieron una nueva fracción mucho más purificada la cual llamaron 4 A, ésta inducía una mayor protección en el ratón (13).

Posteriormente en 1980, Dubray y Bézard aislaron 3 grupos de proteínas de la pared celular de *B. abortus* que actuaban como protección contra una cepa virulenta de *B. abortus*. En general se han utilizado bacterias vivas de virulencia reducida que han tenido como inconveniente el riesgo de contraer la infección y / o producir reacciones de hipersensibilidad. Esta vacuna estimula la producción de anticuerpos anti-LPS-S los cuales son difíciles de distinguir de los desarrollados durante la infección natural (11).

2.7 PATOGENICIDAD

La patogenicidad de *Brucella* en el hombre varía con su especie.

- B. melitensis*. Mayor invasividad. Severos efectos tóxicos. Puede causar aborto en animales hembra pero en mujeres aún no se ha comprobado.
- B. abortus*. Menor invasividad. Enfermedad moderada o asintomática. Produce granulomas sin necrosis o supuración.
- B. suis*. Bastante invasiva. Produce necrosis focal y supuración en huesos,

bazo, hígado y nodos linfáticos. Tiende a producir una evolución crónica de la enfermedad.

B. canis. En hombre causa bacteremia, linfopenia, esplenomegalia y una enfermedad moderada (16).

El LPS en las cepas lisas tienen una gran importancia como factor de virulencia. Las brucelas de tipo liso se multiplican con facilidad en el interior de monocitos no inmunes, mientras que las cepas de tipo rugoso (que carecen de virulencia); no lo pueden hacer (15, 16, 51).

Los mecanismos por los que la brucela sobrevive dentro de las células implican uno o varios componentes de envoltura celular de alto peso molecular, siendo el LPS uno de los principales responsables de la inhibición del estallido oxidativo y por lo tanto del mecanismo de destrucción intracelular (muerte) de fagocitos parasitados por *Brucella*. El material de la pared celular no es degradado rápidamente por los fagocitos, lo que posiblemente induce la formación de granulomas en el hospedador. Varias cepas de *Brucella spp.* son capaces de producir y liberar enzimas como catalasa y una super óxido dismutasa dependiente de Cu-Zn (41, 51) .

Brucella presenta 2 mecanismos adicionales de protección contra la muerte intracelular en el fagocito: la hidrofobicidad de su membrana externa y la carencia de sitios de unión para proteínas catiónicas (29) .

2.8 ASPECTOS CLINICOS

Brucella es un parásito intracelular obligado capaz de originar procesos agudos, crónicos y también una infección inaparente: la cronicidad depende de su capacidad para multiplicarse en el interior de las células fagocíticas (15).

El período de incubación de la brucelosis humana es largo y a menudo abarca varias semanas (15), puede variar dependiendo de la virulencia del microorganismo, vía de entrada y la dosis infectante. Varios autores coinciden al considerar un

período de incubación de 1-3 semanas, o hasta meses (29).

Los síntomas suelen iniciarse de una manera insidiosa, con malestar, fiebre, laxitud, mialgia y sudoraciones. La fiebre se eleva por la tarde y puede ser remitente (especialmente cuando el organismo causal es *B. melitensis*). Frecuentemente se produce bacteremia. La brucelosis humana puede ser una enfermedad febril aguda o recurrente, crónica o una infección subclínica (15) dependiendo de la respuesta inmune celular del huésped y de la capacidad del agente para evadir los mecanismos intracelulares para su destrucción (29).

2.8.1 Forma aguda:

Se presenta generalmente fiebre alta e intermitente, en tarde y noche. Cefalea intensa en región frontal y occipital, diaforesis profusa. Síntomas musculares y osteoarticulares. Otros signos que suelen encontrarse son hepato y esplenomegalia. Puede ocurrir la muerte como resultado de extrema toxemia y trombopenia (15, 24, 29).

El diagnóstico se basa en la presencia de los síntomas clínicos, un título de aglutinación en prueba estándar en tubo de 1:160 o más. En caso activo de brucelosis, se espera que éste título permanezca a las 4-6 semanas del inicio de la enfermedad. El título puede alcanzar su máximo en 2-3 semanas y entonces gradualmente declinar (16). En la mayoría de los casos hay cultivo positivo en las 1as. muestras. Los 1os. anticuerpos que aparecen en la brucelosis aguda son IgM, cerca de la 2a. o 3a. semana aparecen IgG. Después del diagnóstico generalmente las inmunoglobulinas de tipo IgM están presentes (16).

2.8.1 Forma crónica:

El concepto de brucelosis crónica como una enfermedad incluye: ansiedad y depresión en gente sin previo episodio agudo y sólo una evidencia serológica de infección. Para algunos autores un período evolutivo prolongado es la

característica que permitiría el Dx. ; según Spink, éste período debe prolongarse por más de un año. Para otros investigadores una evolución mayor de 3 meses sería suficiente (29).

Los hemocultivos son generalmente negativos, pero hay infecciones localizadas (abscesos). Sus manifestaciones más comunes son: fiebre poco intensa en la mayoría de los casos, granulomas óseos, abscesos, síndrome depresivo, nerviosismo, hepatoesplenomegalia, bronquitis, anemia hemolítica (16, 29).

En ésta fase se desarrollan anticuerpos no aglutinantes de las clases IgG e IgA por lo que generalmente se observan títulos bajos, especialmente en casos crónicos con abscesos localizados (16,35).

2.9 RESPUESTA INMUNOLOGICA A BRUCELLA

La infección con *Brucella* en el hombre induce una respuesta inmune compleja e involucra el desarrollo y participación de mediadores efectores tanto humorales como celulares. La magnitud y duración de estas respuestas se ven influenciadas por: virulencia de la cepa infectante, inóculo, edad, sexo, especie, estado inmune del hospedador y embarazo (24). La resistencia adquirida de modo natural a la brucelosis es sólo relativa, ya que la reinfección es frecuente, y la presencia de anticuerpos circulantes no asegura la inmunidad ni evita la bacteremia (15).

2.9.1 Inmunidad Celular:

La inmunidad celular es probablemente más protectora que la inmunidad humoral en la brucelosis, las inmunoglobulinas circulantes específicas son producidas por los LB, pero los LT son los responsables de la mediación de la inmunidad celular (16).

En la brucelosis natural los microorganismos penetran por heridas cutáneas, conjuntiva o conducto gastrointestinal. Los PMN son las primeras células en acercarse al punto de infección debido a factores quimiotácticos celulares. Las

bacterias se adhieren a la célula para después ser envueltas y finalmente formar el fagosoma, las cepas virulentas y no virulentas de *Brucella* son igualmente susceptibles a la ingestión por PMN. *Brucella* presenta mecanismos de evasión de muerte intracelular en el fagocito como ya se indicó anteriormente (ver patogenicidad).

A pesar de que los PMN son las células fagocíticas mejor capacitadas para la eliminación de parásitos, se consideran de muy baja eficiencia en la eliminación de *Brucella* ; por el contrario, las bacterias que se hayan en el interior son transportadas al torrente sanguíneo vía linfática; diseminándose posteriormente al hígado, bazo y médula ósea, produciendo manifestaciones clínicas que pueden seguir un curso agudo con tendencia a la cronicidad o bien pueden presentarse infecciones inaparentes (13, 15, 29).

2.9.2 Inmunidad Humoral:

Los anticuerpos aparecen en forma temprana en el curso de la infección y pueden persistir meses o años, suelen ser detectables junto con los primeros signos y síntomas de la enfermedad. Los anticuerpos son producidos contra varios constituyentes de la bacteria, especialmente componentes de superficie como LPS (15, 29). La función de las inmunoglobulinas de suero y anticuerpos específicos producidos en la brucelosis es incierto (16).

La respuesta primaria involucra IgM alcanzando su nivel más alto a las 4 semanas y por pocos días es la única inmunoglobulina presente como se demuestra por la reducción de actividad aglutinante de sueros después del tratamiento con mercaptoetanol. Después el título de IgG aumenta y predomina, disminuyendo con el tratamiento hasta casi desaparecer totalmente, por lo que es considerada como marcador de la infección activa. Mientras que la IgM alcanza niveles altos

que bajan con la evolución de la enfermedad aunque pueden persistir por varios años. La IgG es fijadora de complemento mientras que la IgM no lo es (aunque ambas sean aglutinantes), por lo tanto en el estado temprano de la enfermedad la reacción de fijación de complemento es frecuentemente negativo (13, 24). Más tarde aparece IgA y recientemente se ha reportado la presencia de IgE, con una cinética intermedia entre IgM e IgG (3, 26, 29). Bradstreet et. al. observó que las IgM persisten en la fase tardía de la enfermedad y en la infección subclínica (51).

2.10 DIAGNOSTICO

El Dx. está dado por la combinación de los datos clínicos y epidemiológicos; el establecimiento de un diagnóstico definitivo de brucelosis requiere el cultivo del microorganismo a partir de sangre, médula ósea, biopsia de ganglio linfático, tejido granulomatoso, pus, orina o fluido cerebro espinal (15, 13). Los exámenes empleados para el diagnóstico serológico se basan en la detección y titulación de anticuerpos en muestras de suero por Aglutinación, Precipitación, Fijación de complemento y más recientemente se han introducido las técnicas de ELISA, DOT-ELISA, IET; utilizando antígenos crudos o purificados (5, 10, 13, 29, 46, 47).

Las pruebas de rutina que se realizan actualmente para el diagnóstico serológico de ésta enfermedad en el Laboratorio de Brucelosis del Indre son:

Rosa de Bengala, Aglutinación en microplaca para *B. abortus* y *B. melitensis* y Aglutinación en microplaca con 2- ME para *B. abortus* y *B. melitensis* (37, 46).

El diagnóstico clínico es frecuentemente difícil de establecer sobre todo en las formas subclínicas y crónicas de la enfermedad, en las cuales los síntomas no son específicos y la única prueba definitiva para establecer el Dx. de brucelosis es el aislamiento del agente etiológico; ésto no siempre es posible debido a las difíciles condiciones de crecimiento de este microorganismo (10, 18, 46). Los resultados

de las pruebas convencionales no son siempre fáciles de interpretar, debido a que no son específicos y es necesario por lo menos 2 pruebas para establecer un Dx.; esto hace necesario el desarrollo de nuevos métodos y la búsqueda de otros antígenos (13).

Los procedimientos serológicos comunes se basan en la detección de anticuerpos anti-LPS, los cuales son inducidos específicamente contra la "cadena O" y permanecen en niveles altos aún después de la recuperación. Actualmente se ha enfocado el estudio hacia determinadas fracciones celulares como PME y extractos proteicos, ya que estos también tienen características inmunogénicas; evitando así reacciones indeseadas o inespecíficas (2, 10, 11, 19, 48). Lo mismo ha pasado con los antígenos utilizados para protección, ya que se ha realizado una búsqueda de fracciones celulares protectoras con bajo índice de toxicidad y que proporcionen una protección duradera (13, 38, 48).

2.10.1 Western blot (Inmunolectrotransferencia) :

Una técnica importante para el estudio de nuevos antígenos es el Western Blot o IET; la cual actualmente es una combinación de 3 técnicas analíticas (1):

a) Electroforesis. Un paso inicial importante para el estudio de macromoléculas, es la purificación; y una de las formas más utilizadas para separar y visualizar proteínas y LPS es la PAGE-SDS. Es rápida, sensible y capaz de una alta resolución. Para visualizar la separación del antígeno se realiza subsecuentemente de la electroforesis, una tinción que puede ser con Azul de Coomassie o con la técnica de AgN03, que es mucho más sensible (34, 42). Tsai y Frasch desarrollaron un procedimiento de alta sensibilidad para teñir LPS bacterianos ya que estos no se tiñen con Azul de Coomassie (17, 22, 27, 45).

b) Electrotransferencia. La transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa (NC) es realizada con ayuda de corriente eléctrica y es conocida como "Western

blotting " mientras que para el LPS es llamada Inmunoelctrotransferencia. En ésta técnica, el patrón de bandas en la membrana de NC es una réplica exacta del patrón en el gel original (41).

c) **Inmunoensayo.** Es de tipo enzimático para detectar anticuerpos en muestras de suero problema (1, 43). Anticuerpos conjugados a enzimas son usados para detectar antígenos si la NC es incubada con un sustrato cromogénico, formando un producto insoluble que precipita en el sitio de reacción y permanece unido a la NC (41, 44).

Con la IET se logra identificar aquellos componentes celulares de *Brucella* que son capaces de estimular la respuesta inmune humoral, durante la infección activa, con lo que se facilita el control y erradicación de la enfermedad (13).

3.0 JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

A la brucelosis como enfermedad en nuestro país no se le ha dado la importancia necesaria reflejándose en la poca información y conocimiento de ésta, provocando un diagnóstico incierto. Lo anterior aunado a la sintomatología no definida de la brucelosis provoca confusiones con otras enfermedades como: Salmonelosis y Tuberculosis; por lo que muchas veces se da un tratamiento inadecuado hasta el punto de provocar que una brucelosis aguda se vuelva crónica.

Del género *Brucella* las especies *B. abortus* y *B. melitensis* son las que más frecuentemente se han identificado como causantes de brucelosis humana (16). El diagnóstico de brucelosis en humanos es difícil, por lo tanto se basa en la cuantificación de anticuerpos Anti-LPS, los cuales permanecen aún después de la convalecencia de la enfermedad (8). Hasta ahora no se sabe exactamente el papel que juegan estos anticuerpos en la protección inmune, por lo que se ha hecho necesario realizar estudios de la respuesta inmune humoral que tienen los pacientes hacia otros antígenos bacterianos ya que también tienen características inmunogénicas (2). La dificultad de estos estudios radica en el aislamiento, purificación e identificación de antígenos específicos que constituyen la membrana externa de las brucelas y que pudieran ser útiles como reactivos para diagnóstico o vacunas (13).

Por lo anterior se hace necesario el estudio de la respuesta inmune humoral que inducen los antígenos proteicos y LPS de estas cepas en personas vacunadas y con brucelosis; con el fin de conocer cuál de ellos es el responsable en mayor proporción de esta respuesta en el humano aumentando así los conocimientos que hasta ahora se tienen del control y diagnóstico de la enfermedad.

4.0 OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la respuesta inmune humoral hacia algunos antígenos de tipo proteico y LPS de *Brucella* en humanos con brucelosis y vacunados, por medio de la técnica de Inmunolectrotransferencia (IET).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Estandarización de la técnicas de Electroforesis en geles de Poliacrilamida (SDS-PAGE) e Inmunolectrotransferencia (IET) para los siguientes antígenos:

a) Antígeno proteico salino de las cepas *B. abortus* y *B. melitensis*.

b) LPS de las cepas *B. abortus* y *B. melitensis*.

- Determinar el perfil proteico o lipopolisacárido de cada uno de los antígenos.

- Identificar los componentes hacia los que hay producción de anticuerpos y caracterizar cada grupo de individuos estudiados en base al patrón obtenido en la IET.

- Distinguir con ayuda de una cepa rugosa (*B. abortus* RB51), qué tipo de antígeno es el responsable en su mayoría de la respuesta inmune humoral en los sueros estudiados.

- Concluir si los resultados obtenidos pueden ser de ayuda en el estudio del control y diagnóstico de la enfermedad.

5.0 MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLOGICO

ANTIGENO PROTEICO SALINO

Los extractos salinos proteicos (RCM) se obtuvieron a partir de células formalinizadas de *B. abortus* cepa 99-S y de *B. melitensis* cepa M-16 respectivamente, las cuales se colocaron con balotines de vidrio en agitación constante durante 16 hrs. Se les realizó una centrifugación y el sobrenadante es lo que se trabajó como RCM.

LIPOPOLISACARIDOS (LPS)

Fueron obtenidos por el método de Cherwonogrodzky (9), el cuál es una extracción con fenol de las cepas de *B. abortus* 99-S y *B. melitensis* M-16. El LPS fué purificado con proteasas y posteriormente se dializó en una solución de PBS pH 7.0. Por último se liofilizó. Para trabajarlos se resuspendieron con una mezcla de agua destilada-SDS, para tenerlos a una concentración de 5.7 µg/µl y 5 µg/µl respectivamente.

ANTIGENO SONICADO

Células completas de la cepa *B. abortus* RB51 (entidad rugosa que carece de LPS) resuspendidas en solución salina, se sometieron al sonicador a 8 intensidades /s durante 3 minutos .

Los RCM, los LPS y el sonicado fueron proporcionados ya preparados y purificados por el Laboratorio de Brucelosis del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.

GRUPOS DE SUEROS DE PERSONAS QUE SE ESTUDIARON

a) Agudos: Títulos altos en Aglutinación estandar ($> 1:320$) y Mercurioetanol ($> 1:80$). Con síntomas agudos en la 1a. o 2a. muestra. Evolución no mayor a 3 meses. Se estudiaron 4 casos, 3 de ellos con cultivo positivo (1 a *B. abortus* 2 de *B. melitensis*). Todos estaban en tratamiento con antibióticos cuando se les confirmó la enfermedad. El caso M.L. observó un periodo más prolongado de enfermedad ya que su tratamiento inicial no fue el adecuado. Todos presentaron síntomas característicos de la enfermedad, antes del establecimiento del diagnóstico.

b) Crónicos: Títulos en Aglutinación estandar de ($< 1:80$) y Mercurioetanol ($< 1:40$). Sintomatología persistente con molestias localizadas (cadera, articulaciones, huesos, cefaleas nocturnas). Se estudiaron 3 casos, uno de ellos presentó cultivo positivo a *B. melitensis* y en diferentes fechas mostraron una reactivación de la enfermedad. El caso A.M. en todas las muestras registradas reportó un título alto, mientras que el caso A.T.S. y M.A.H. presentaron títulos de anticuerpos bajos a pesar de que se le aisló al caso A.T.S. la bacteria.

c) Vacunados: No indicaban haber tenido brucelosis, no eran de área endémica y no había reacción a pruebas convencionales antes de recibir la vacuna (fracción PI). La vacuna fue aplicada por lo menos 4 años anteriores al presente estudio. Se trabajaron con 3 casos que tuvieron contacto directo con la bacteria (posterior a la vacuna) por requerimientos de trabajo en laboratorio. Los A. M. C. Y X.C.B. no presentaron respuesta hacia la vacuna y solo cuando tenían algún contacto con la bacteria tenían ligeras molestias (temperatura, dolor muscular) y se detectaba un aumento ligero de títulos. El otro caso (A.L.) mostró un cuadro clínico muy semejante al de la fase aguda de la enfermedad, a los pocos días de aplicarse la vacuna, el cual declinó a los 15 días. 2 años después presentó por segunda vez

la sintomatología ya mencionada y los títulos se incrementaron ligeramente.

d) Convivientes: Personas de área endémica. Positivos o negativos a pruebas convencionales. Se trabajó con una familia (6 miembros) del Edo. de Puebla. Solo se consiguieron muestras de 4 de ellos, de los cuales sólo 1 presentó al momento del muestreo síntomas clínicos sospechosos de brucelosis y 2 indicaron haberla padecido. Ninguno presentó cultivo positivo. Viven en condiciones insalubres y de extrema pobreza. Conviven directamente con bovinos y caprinos. Ingestión de leche bronca y derivados.

e) Reacción cruzada a *V. cholerae*: Personas que dan pruebas positivas a *V. cholerae* y negativas a *Brucella* o que dan positivo a las dos bacterias. Se seleccionaron 3 personas las cuales tuvieron una de las siguientes características:

- 1) Título alto de Ac's. vibriocidas y título bajo de Ac. antibrucela (Caso 1).
- 2) Títulos bajos de Ac's en los dos casos (Caso 2).
- 3) Títulos en Ac's vibriocidas y negativo (títulos menores de 1:80 son los que se consideran negativos en el Laboratorio de brucelosis del INDRE) a brucela.

f) Grupo control negativo: Personas clínicamente sanas. Dentro de la historia clínica no indicaban haber tenido brucelosis. No eran de área endémica. No hubo reacción con las pruebas convencionales (Rosa de Bengala, Aglutinación estandar y Mercaptoetanol). Se trabajaron con 3 casos y una sola muestra de cada caso.

CONJUGADO

Se utilizó un anticuerpo polivalente antihumano obtenido en cabra, conjugado a peroxidasa (Cappel).

BLOQUEADORES

Leche descremada en polvo Sveltes 5%

Gelatina 3%

Albúmina sérica bovina 3%

MARCADORES DE PESO MOLECULAR

Se utilizaron marcadores de peso molecular Sigma Chemical Company que incluían las siguientes proteínas:

Proteína	Peso molecular
Albúmina sérica bovina	66,000
Albúmina de huevo	45,000
Pepsina	34,700
Tripsinógeno	24,000
β -Lactoglobulina	18,400
Lisozima	14,300

EQUIPO

Cámara de Electroforesis y Electrotransferencia HOEFFER - SCIENTIFIC

Fuente de Poder BIO - RAD

Agitador magnético

Potenciómetro

Espectrofotómetro

Agitador Hematológico

Shaker con control de temperatura

MATERIAL

Nitrocelulosa Micron Separations Inc. (MSI) con un poro de 0.22 μm .

Nitrocelulosa BIO-RAD 0.45 μm y Nitrocelulosa Schleicher & Schuell 0.45 μm .

Papel Filtro para Inmunoelectrotransferencia, Quick Draw Blotting Paper. SIGMA.

Almohadillas Scotch-Brite

Micropipetas Gilson de 1000, 200 y 20 μl .

Puntas para micropipetas

REACTIVOS

Agarosa

Tricina

Acido acético

Acido cítrico

Acetato de Sodio

Formaldehído (HCHO)

Nitrato de plata (AgNO_3)

Cloruro de Sodio (NaCl)

Azul de bromofenol

Agua oxigenada (H_2O_2)

3-amino-9-etilcarbazolona

Colorante Rojo Ponceau "S"

Carbonato de Sodio (Na_2CO_3)

Dodecil sulfato de sodio (SDS)

Etilendiaminotetraacético (EDTA)

Tris-Hidroximetil-amino-metano

Tris (Hidroximetil)-aminometano-hidroclorhídrico

N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamino (TEMED)

Glicina

Tween-20

Etanol

Acrilamida

2-propanol

Acido peryódico

Ferricianuro de potasio

Metanol

2-mercaptoetanol (2-ME)

Hidróxido de sodio (NaOH)

Acido clorhídrico (HCl)

Tiosulfato de sodio anhidro

Hidróxido de amonio (NH_4OH)

N,N-dimetilformamida

N,N'-metilen-bis-acrilamida

Ditiotreitól (DTT)

SOLUCIONES

ELECTROFORESIS PARA LPS

A) Acrilamida-Bisacrilamida concentración 5 /13.5 %.

30 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida se disolvieron en agua destilada e inmediatamente se llevaron al aforo de 100 ml, se filtró a través de papel whatman no.1 y se guardó en frasco ámbar (solución sensible a la luz) a 4°C.

B) Persulfato de amonio 10%.

Se pesaron 0.1 g de persulfato de amonio y se disolvieron en 100 µl de agua destilada (la preparación debe ser justo antes de utilizarlo ya que se descompone).

C) Regulador del gel concentrador Tris 0.5 M pH 6.8

6 g de Tris se disolvieron en agua destilada, el pH se ajustó con HCl 1 M y se llevó al aforo de 100 ml con agua destilada. Se filtró a través de papel whatman no.1 y se guardó a 4°C.

D) Regulador del gel separador Tris 3.0 M pH 8.8

36.3 g de Tris se disolvieron en agua destilada, el pH se ajustó con HCl 1M y se llevó al aforo de 100 ml. Se filtró por papel whatman no.1 y se guardó a 4°C.

E) Regulador de cámara Tris 0.25 M, Glicina 1.92 M, SDS 1% pH 8.3

Se disolvieron 30.3 g de Tris, 144 g de glicina y 10 g de SDS en agua destilada, se ajustó el pH con HCl 1 M y se llevó al aforo de 1lt. con agua destilada. De esta solución se hizo una dilución 1:10 para su uso. Se almacenó a 4°C.

F) Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%.

10 g de SDS se disolvieron en 100 ml de agua destilada. Se guardó a 37°C.

G) Agarosa 1% en regulador de cámara diluido 1:10 preparar justo antes de usarse.

H) Regulador de muestra Tris-HCl 0.1 M pH 6.8

1.21 g de Tris-HCl, 2 g de SDS y 20 g de sacarosa se disolvieron con agua destilada, se agregó 1 ml de 2-ME y 1 mg de azul de bromofenol, se ajustó el pH y se llevó a un volumen final de 100 ml con agua destilada.

ELECTROFORESIS PARA PROTEINAS POR EL METODO SDS-TRICINA (28)

A) Acrilamida-Bisacrilamida 49.5 % T/6 % C.

46.5 g de acrilamida y 2.9 g de bisacrilamida se disolvieron en agua destilada, se aforaron a 100 ml. Se filtró a través de papel whatman no.1.

B) Acrilamida-Bisacrilamida 49.5 % T/3 % C.

Se pesaron 48.0 g de acrilamida y 1.5 g de bisacrilamida, se siguió el mismo procedimiento que la anterior solución; y las dos se protegieron de la luz.

C) Regulador del gel Tris 3.0 M, 0.3% SDS pH 8.45

18.2 g de tris y 0.15 g de SDS se disolvieron en agua destilada, se ajustó el pH con HCl 1 M y se llevó al aforo de 50 ml.

D) Regulador del ánodo Tris-HCl 0.2 M pH 8.9

1.6 g de Tris-HCl se disolvieron en agua destilada, se ajustó el pH con HCl 1 M y se llevó al aforo de 50 ml.

E) Regulador del cátodo Tris-HCl 0.1 M, Tricina 0.1 M, SDS 0.1 % pH 8.25

1.6 g de Tris-HCl, 1.8 g de Tricina y 0.1 g de SDS se disolvieron en agua destilada, se ajustó el pH y se llevó al aforo de 100 ml.

D) Regulador de muestra.

Fué preparado por la mezcla de 5.9 ml de Tris-HCl 0.06 M, EDTA 1 mM, SDS 2 %, 0.8 ml de 2-ME y 0.4 ml de solución saturada de azul de bromofenol.

Todas las soluciones se guardaron a una temperatura de 4°C.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

A) Regulador de transferencia Tris 25mM, Glicina 192mM, Metanol 20%, pH 8.3

6.06 g de tris y 28.8 g de glicina se disolvieron en agua destilada, se agregaron 400 ml de metanol, se ajustó el pH y se llevó a un volumen final de 2 lts con agua destilada. Se mantuvo a 4°C.

B) Colorante de Rojo Ponceau "S"

0.5 g de Rojo Ponceau "S" se disolvieron en una mezcla de 98.5 ml de agua destilada con 1 ml de ácido acético.

INMUNOENSAYO

A) Tris Buffer Salino pH 7.5 (TBS)

2.9 g de tris y 29.2 g de NaCl se disolvieron en agua destilada, se ajustó el pH y se llevó a un volumen final de un litro, se guardó a 4°C.

B) TBS-Tween 20 al 0.05 % (TBS-T)

A 100 ml de la solución A se le agregaron 50 µl de Tween 20.

C) Solución bloqueadora al 5 % en TBS-T

5 g de leche descremada en polvo Sveltes se disolvieron en 100 ml de solución B

D) Regulador de acetatos 0.05M pH=5.0

27.2 g de acetato de sodio se disolvieron en agua destilada, se agregaron 11.5 ml de ácido acético, se ajustó el pH y se llevó a un volumen final de 1lt. Guardar a 4°C

G) Solución reveladora

i) 12 mg de 3-amino-9-etilcarbazolona se disolvieron en 2.5 ml de N,N-dimetilformamida.

ii) 50 µl de H₂O₂ se agregaron a 50 ml de regulador de acetatos pH 5.0.

Todas estas soluciones se prepararon al momento excepto A y D.

TINCION DE PLATA PARA LPS

1) Solución fijadora Propanol 25 %, Acido acético 7 %, Agua destilada 68 %.

2) Solución de oxidación (solución 0.7 % de ácido peryódico en solución 1).

3) Reactivo de tinción.

A 28ml NaOH 0.1 N se le adicionó 1 ml de NH₄OH 29.4 % y 5 ml de AgNO₃ al 20 % con agitación constante. Terminada ésta mezcla se le agregaron 115 ml de agua destilada.

4) Solución reveladora.

Se disolvieron 5 mg de ácido cítrico en 100 ml de agua destilada y se le agregaron 50 µl de formaldehído.

5) Solución de Ac. acético 7 %.

TINCION DE PLATA PARA PROTEINAS.

1) Solución fijadora 1.

Metanol 45 %, Ac. acético 12 %, agua destilada 43 %.

2) Solución fijadora 2.

Etanol 10 %, Ac. acético 5 %, agua destilada 85 %.

3) Solución de glutaraldehído al 10 %.

Se mezclaron 20 ml de glutaraldehído al 25 % con 30 ml de agua destilada.

4) Solución stock DTT 200 µg/ml.

20 mg de DTT se disolvieron en 100 ml de agua destilada. Se guardó a 4°C. Antes de usarse, ésta solución se diluyó a 1:40 con agua destilada para tener una concentración de 5 µg/ml.

5) Solución de AgNO₃ 0.012 M. Se guardó a temperatura ambiente.

6) Solución reveladora de Na₂CO₃ 0.28 M con 500 µl formaldehído por litro.

7) Solución de Acido acético al 1 %.

8) Reductor de Farmer.

Solución A: 37.5 g Ferricianuro de Potasio en 500 ml de agua destilada.

Solución B: 120 g de Tiosulfato de Sodio Anhidro en 500ml de agua destilada.

Al momento de usarse se mezclaron 2.5 ml de A con 10 ml de B y se llevó a un volumen final de 250 ml con agua destilada.

Todas las soluciones se prepararon antes de usarse excepto 4, 5 y 8.

METODOS

CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE PIERCE BCA

Preparación de la muestra:

De cada antígeno se realizaron diluciones 1:5, 1:10, 1:25 y 1:50 por duplicado utilizando como diluyente agua destilada.

Preparación de la curva estandar:

Se preparó la curva estandar por duplicado, diluyendo la solución stock BCA, Pierce como lo indica la siguiente tabla.

Cuadro 1. Curva estandar de proteínas.

Volumen de albúmina estándar (2mg/ml)	Volumen de H ₂ O destilada	Concentración final del estándar
10 µl	90 µl	200 µg/ml
20 µl	80 µl	400 µg/ml
30 µl	70 µl	600 µg/ml
40 µl	60 µl	800 µg/ml
50 µl	50 µl	1000 µg/ml
60 µl	40 µl	1200 µg/ml

Realización del ensayo:

- 1) El reactivo de trabajo se preparó con la mezcla de 50 partes de la solución A y 1 parte de la solución B.
- 2) A 100 µl de cada estandar, de cada una de las diluciones de las muestras y del blanco (consistente de agua destilada) se les agregó 2ml del reactivo de trabajo agitando inmediatamente.
- 3) Se incubaron en un baño de agua a 37°C durante 2 hrs.
- 4) Después de la incubación se dejó que igualaran la temperatura ambiente y se midió su densidad óptica a 562nm.

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE).

- 1) Se lavaron los vidrios con agua destilada, se secaron perfectamente y se limpiaron con metanol al 70%.
- 2) Se montaron en la cámara de electroforésis en el siguiente orden:
 - a) 1 Vidrio de teflón
 - b) 2 Separadores
 - c) 1 Vidrio transparentey se fijaron con la ayuda de pinzas especiales (Fig.3).
- 3) Se selló la base de la cámara con agarosa 1%.
- 4) Se prepararon por separado las mezclas del gel separador y del gel concentrador (cuadros 2 y 3), sin agregar TEMED ni persulfato de amonio (iniciadores de la polimerización) hasta que fueran utilizadas.
- 5) Se agregó a la mezcla del gel separador (previa homogenización) los iniciadores de la polimerización y la solución se vació entre los dos vidrios lentamente para evitar la formación de burbujas. Inmediatamente se le adicionó una capa de agua destilada en la parte superior para evitar el contacto con el aire permitiendo una polimerización adecuada.
- 6) Se lavó con agua destilada la superficie del gel y se agregaron los iniciadores de la polimerización a la mezcla del gel concentrador el cuál se adicionó sobre el gel separador, se introdujo el peine y se esperó a la polimerización completa.
- 7) Se retiró el peine y se lavaron los pozos con agua destilada.
- 8) Se colocó la cámara en la base y se agregó el regulador de cámara 1:10. En el método SDS - Tricina se colocaba en la base de la cámara el regulador del ánodo y en la parte superior el regulador del cátodo. Fig. 3 y 4.
- 9) Se agregó en los pozos el volumen de muestra requerido. Cuadro 4
- 10) Se cuidó de que el regulador de cámara quedara en contacto con los electrodos y se conectó la cámara a la fuente de poder indicándose las condiciones de voltaje y amperaje requeridas.
- 11) Se realizó el corrimiento de la electroforesis hasta que el colorante azul de bromofenol llegara a la línea de agarosa y estuviera por salir del gel.

GELES DE POLIACRILAMIDA - DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE)

Cuadro 2. Gel para electroforesis de proteínas por el metodo Tricina-SDS (28).

Soluciones	gel separador	gel concentrador
	12% T/6% C	4% T/3% C
Acrilamida-Bisacrilamida 49.5% T/6% C	2.3 ml	-
Acrilamida-Bisacrilamida 49.5% T/3% C	-	0.3 ml
Regulador del gel	2.3 ml	0.9 ml
Glicerol	0.9 ml	-
Agua destilada	3.5 ml	2.7 ml
Persulfato de amonio 10 %	3.2 μ l	4.72 μ l
TEMED	38.6 μ l	47 μ l

Cuadro 3. Gel para electroforesis de LPS por el método de Laemmli (17)

Soluciones	gel separador 12 %	gel concentrador 5 %
Acrilamida-Bisacrilamida	3.0 ml	0.68 ml
Agua destilada	3.1 ml	2.8 ml
Regulador del gel separador	0.94 ml	-
Regulador del gel concentrador	-	0.48 ml
Persulfato de amonio 10 %	56 μ l	32 μ l
TEMED	4 μ l	2 μ l
Urea(concentración final en el gel 4 M)	1.8 g	-

PREPARACION DE MUESTRAS PARA LA ELECTROFORESIS

Se alicuotaba el volumen de antígeno o marcador de peso molecular necesario por pozo en conos eppendorf de 500 μ l y después se colocaban en agua hirviendo durante 5 minutos, en el siguiente cuadro se resumen las cantidades a utilizar de cada muestra así como la cantidad de buffer de muestra necesario por cono.

Cuadro 4. Volúmenes de muestra utilizados en la electroforesis.

Muestra	Buffer de muestra
10 μ l marcador de PM	10 μ l buffer para proteínas
10 μ l RCM-BA diluido 1:7.6	10 μ l buffer para proteínas
10 μ l de RCM-BM diluido 1.43	10 μ l buffer para proteínas
10 μ l de sonicated RB51 sin diluir	10 μ l buffer para proteínas
3.5 μ l LPS BA	15 μ l buffer para LPS
3 μ l de LPS BM	15 μ l buffer para LPS

REPRESENTACION DE UN GEL Y CAMARA DE ELECTROFORESIS

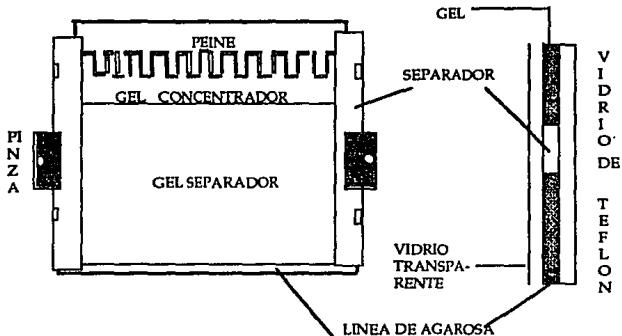


Figura 3. Vista frontal y lateral de un gel y sus componentes (1).

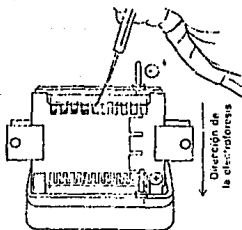


Figura 4. Cámara de electroforesis y colocación de las muestras. Los complejos SDS-proteína están cargados negativamente por lo tanto migran hacia el ánodo situado en el fondo de la cámara (42)

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

1) Electroforesis del gel por procedimiento previo.

2) Se removió el gel de las placas de vidrio. Se cortó el gel concentrador y la línea de agarosa.

3) Se preparó el cassette o sandwich con los siguientes elementos prehumedecidos con regulador de transferencia colocandolos sobre la cara blanca (cátodo) del cassette en el siguiente orden :

a) 1 almohadilla de Scotch-brite

b) 1 cuadro de papel filtro

c) la hoja de nitrocelulosa

d) el gel

e) 1 cuadro de papel filtro

f) 1 almohadilla de Scotch-brite

se cerró el cassette y se insertó en la cámara de transferencia llena de regulador de transferencia de tal modo que la nitrocelulosa se encontrara del lado del ánodo (apéndice figura 27).

5) Se tapó la cámara de transferencia y se conectó a la fuente de poder programada con las condiciones siguientes:

Voltaje constante: 30V 300mA 60 W tiempo: 2.5hrs. 4°C

7) Terminada la transferencia se apagó la fuente de poder y se desconectó la cámara. Se abrió el cassette y se rectificó la transferencia cortando una tira de la hoja de nitrocelulosa colocándola en el colorante Rojo Ponceau "S" durante 5 min. Se lavó con agua destilada y se marcó con un lápiz las bandas que aparecieran, además se teñía el gel con Nitrato de plata.

8) Se guardó la hoja de nitrocelulosa seca en papel aluminio a 4°C hasta su uso.

INMUNOENSAYO

- 1) La hoja de nitrocelulosa fué cortada en tiras correspondientes a los pozos o líneas. Se colocaron en soln. bloqueadora por 1hr con agitación constante.
- 2) Se lavaron las tiras 3 veces por 2 min c/u con TBS-T.
- 3) Se diluyó el anticuerpo primario (suero del paciente) en TBS a una dilución 1:20 y se puso en contacto con las tiras durante 1 hr en agitación constante.
- 4) Enjuagar como en el paso 2.
- 5) Se preparó el conjugado polivalente antihumano producido en cabra en una dilución 1: 21000 en TBS y se enfrentó a las tiras durante 1 hr en agitación constante.
- 6) Se realizaron lavados como en el paso 2.
- 7) Se mezclaron las soluciones i) y ii) de la solución reveladora y se sumergieron las tiras hasta aparición de bandas.
- 8) Se detuvo la reacción con agua destilada y se secaron las tiras.

Todo el proceso se llevó a cabo a 37°C.

TINCION DE PLATA PARA LIPOPOLISACARIDOS (45)

- 1) Se dejó el gel toda la noche con soln. fijadora.
- 2) Se oxidó el LPS durante 5min. con la solución de ácido peryódico.
- 3) Inmediatamente después se llevaron a cabo 8 lavados de 15 min. cada uno.
- 4) Pasado este tiempo se transfirió el gel al reactivo de tinción por espacio de 10 min.
- 5) Se enjuagó el gel 3 veces por espacio de 30 min. con agua destilada y se colocó en solución reveladora.
- 6) Cuando aparecieron las bandas se detuvo la reacción con soln. de ácido acético 7% durante 1hr.

TINCION DE PLATA PARA PROTEINAS (34)

- 1) Una vez realizada la electroforesis se fijaron las proteínas en el gel de poliacrilamida, dejándolo toda la noche en la solución fijadora 1.
- 2) Se hicieron 3 lavados de 10 min. cada uno con la solución fijadora 2.
- 3) El gel fué colocado en solución de glutaraldehído al 10% durante 30 min.
- 4) Se lavó el gel con agua destilada 3 veces de 10 min cada una.
- 5) Inmediatamente después se colocó en solución DTT 5 μg / ml por media hora.
- 6) Se cambió a la solución de AgNO_3 0.012 M durante 30 min.
- 7) Después de esto se procedió a realizar un rápido lavado (30seg) con agua destilada y 2 lavados también rápidos con soln. Na_2CO_3 / HCHO.
- 8) El revelado se hizo con la solución anterior hasta aparición de bandas.
- 9) Después de esto se mantuvo el gel durante 1hr en soln. de ácido acético 1%.
- 10) Se les hizo el tratamiento con el reductor de Farmer's durante 45 seg. e inmediatamente se les realizaron enjuagues rápidos y vigorosos con agua destilada 10 veces.

Realizar todo el procedimiento a temperatura ambiente y agitación constante (~70 RPM).

6.0 RESULTADOS

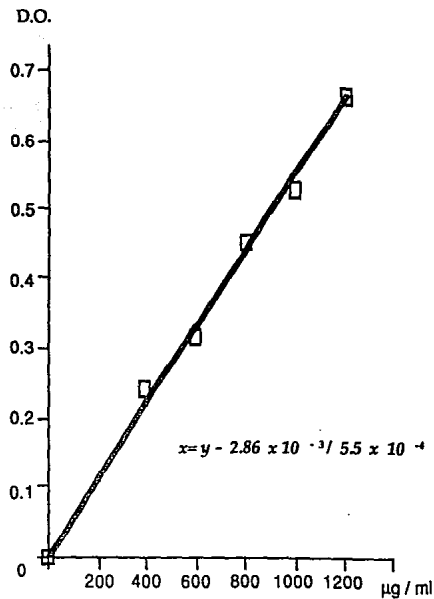
DETERMINACION DE PROTEINAS

La curva patrón de proteínas obtenida se representa en la figura 5 y el cuadro 6.

La concentración de proteínas de las muestras estudiadas fueron las siguientes:

Cuadro 5. Densidades ópticas y concentraciones proteicas de los RCM.

Muestra		Abs.	Concentración directa	Concentración directa x dilución	Concentración final
RCM-99s sól.					
D I L U C I O N	1:50	.178	323.3 µg/ml	16165 µg/ml	
	1:25	.320	581.0 µg/ml	14525 µg/ml	
	1:10	.770	1390 µg/ml	13900 µg/ml	
	1:5	1.120	punto fuera de	la curva patrón	14.86 µg/µl
RCM-99s líq.					
D I L U C I O N	1:50	-	-	-	
	1:25	.054	Punto fuera de	la curva patrón	
	1:10	.319	580 µg/ml	5800 µg/ml	
	1:5	.546	992 µg/ml	4960 µg/ml	5.38 µg/µl
RCM-M16					
D I L U C I O N	1:50	.068	Punto fuera de	la curva patrón	
	1:25	.219	398 µg/ml	9950 µg/ml	
	1:10	.632	1149 µg/ml	11490 µg/ml	
	1:5	1.074	Punto fuera de	la curva patrón	10.7 µg/µl
RB-51					
D I L U C I O N	1:5	.482	874 µg/ml	4373.1 µg/ml	
	1:10	.227	411.6 µg/ml	4116 µg/ml	4.2 µg/µl



Cuadro 6. Densidades ópticas de las soluciones estandar de proteínas.

Conc. est µg / ml	Abs.
0	0
200	.10
400	.24
600	.32
800	.45
1000	.53
1200	.68

FIGURA 5. CURVA PATRON DE PROTEINAS. Según la ley de Beer la D.O correspondiente al estandar de 200 µg/µl queda fuera de la zona lineal de la curva.

ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE ELECTROFORESIS

Se realizó el corrimiento de cada uno de los antígenos en geles de diferentes concentraciones de Acrilamida-Bisacrilamida, desde 10% hasta 15% en el gel separador y de 5% en el gel concentrador; según el método de Laemmli (27, 38, 48, 49). Además del antígeno se colocaban los marcadores de P.M. para visualizar el peso molecular aproximado de las fracciones proteicas que se obtuvieran. Simultáneamente se variaban las condiciones de corrimiento modificando la corriente, llevandola desde 12 mA hasta 60 mA por gel. Después de cada corrimiento se teñían los geles con Nitrato de plata para apreciar el perfil electroforético de los antígenos.

Se encontró que la concentración adecuada de acrilamida-bisacrilamida para la óptima separación de bandas de los antígenos RCM 99s y RB51 era de 13.5 %. Mientras que para el antígeno RCM M-16 se observaba un barrido el cual a pesar de aumentar el porcentaje de Acrilamida-bisacrilamida del gel separador y de bajar la corriente, no se definían bandas. Pensando en que la causa probable fuese la presencia de un lipopolisacárido presente en el RCM-M16, se le adicionó cloroformo en una relación 1:1 colocándolo posteriormente en una mezcla acetona-hielo seco. Después de ésto se centrifugó a 12000 RPM por 10 min. La parte acuosa se sometió a una electroforesis observandose que no se obtenía un bandeo.

Tomando en cuenta lo anterior se utilizó el método de Tricina- SDS (28) para obtener una mayor resolución y claridad de las fracciones proteicas. Se probaron concentraciones de A-B en el gel separador de 12%, 14% y 16% (mientras que la del gel concentrador se mantuvo constantemente en 4%), dándonos como resultado que el % adecuado era el de 12%, para éste sistema.

Para el LPS se realizó también un tamiz de geles con el método de Laemmli con UREA 4M (17, 22, 31) que abarcó concentraciones de 7 % hasta 15 % variandose

además las condiciones de mA de una corriente de 5 mA hasta 30 mA por gel. Se colocaban las muestras de los 2 LPS, los marcadores de PM y LPS de *E. coli* 0:26: B6 y *Salmonella minnesota* como una fuente de comparación. Se determinó que la concentración óptima de A-B del gel separador fué del 12 %.

Al mismo tiempo se fueron buscando las concentraciones óptimas de los antígenos que permitieran ver con claridad el patrón electroforético ésto se apreciaba cuando se teñían los geles, como ya se mencionó anteriormente.

Las condiciones óptimas para la técnica de electroforesis por consiguiente fueron:

Antígeno	% de Gel sep.	Sistema	µg Ag/pozo	mA/gel
RCM 99s sól.	12%	Tricina-SDS	20	45
RCM M-16	12%	Tricina-SDS	25	40
Sonicado RB51	12%	Tricina-SDS	42	45
LPS B.A.	12%	Laemmli-UREA	20	15
LPS B.M.	12%	Laemmli-UREA	15	15

ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE ELECTROTRANSFERENCIA

Una vez determinadas las condiciones adecuadas para la electroforesis se empezó a estudiar el tiempo y el voltaje necesarios para permitir una buena transferencia de los antígenos. Para ésto se realizaba la electroforesis (con las condiciones ya estandarizadas) y después la transferencia a diferentes tiempos y voltajes. La manipulación de éstos 2 parámetros abarcó en primer instancia 16 hrs 60 V, los cuales resultaron buenos pero consumía mucho tiempo por lo que se fue disminuyendo hasta llegar a las 2:30 hrs a 60 V, sin que afectara los resultados.

Una tira de nitrocelulosa ya transferida se teñía con Rojo Ponceau y la presencia de bandas nos indicaba que el antígeno se había transferido, por último se sometían los geles a una tinción con Nitrato de plata, si no se observaban los antígenos en el gel era indicativo de que se habían transferido en su mayoría a

la nitrocelulosa. Al obtener resultados positivos se reafirmó que la cantidad de antígeno indicada en la realización de la electroforesis era adecuada también para la transferencia. Cabe hacer mención de que el Rojo Ponceau no detecta LPS solo moléculas de tipo proteico.

Al percatarnos de que el voltaje propuesto no era utilizado en su totalidad tambien se fué desminuyendo hasta llegar a los 30 V, siendo validas estas condiciones (30V, 2.5 hrs.) tanto para protefnas como para LPS.

ESTANDARIZACION DEL INMUNOENSAYO

Las variables a estudiar fueron las siguientes:

- Dilución del anticuerpo 1o. (suero del paciente)
- Dilución del anticuerpo 2o. (conjugado polivalente antihumano)
- Bloqueadores.
- Tipo de Nitrocelulosa.

Tomando como referencia condiciones utilizadas en otros trabajos (17, 25, 44) se realizó el ensayo con las siguientes condiciones:

- Tiempo de incubación de la tira de nitrocelulosa en cada paso (1.5 h).
- Lavados: 3 de 5 minutos c/u
- Bloqueador : gelatina 3 %
- Dilución del suero: 1:50

variando en primer lugar la dilución del conjugado utilizado: 1:5000, 1:10000, 1:20000, 1:25000 y 1:30000. Se trabajaron con sueros con títulos de anticuerpos bajos (1:80) y sueros con títulos altos (1:1280) con el fin de observar si ésto afectaba de alguna forma la apreciación de bandas que pudiesen aparecer; así mismo se colocaba en cada revelado 1 tira control negativo (no se ponía en contacto con ningún suero) para detectar reacciones inespecíficas.

Se observó que la dilución del conjugado en la que no se observaba coloración inespecífica (la tira control negativo no se tefía) era de 1:20000, pero las tiras de

nitrocelulosa que se enfrentaban a sueros con título bajo no presentaban una buena definición de color por lo que el paso siguiente fué variar la dilución de los sueros.

Se manejaron las diluciones: 1:50, 1:30, 1:25 y 1:20 de los sueros y se encontró que la dilución 1:20 permitía ver con mayor claridad el reconocimiento antigénico en los sueros de títulos bajos. Una vez determinadas las diluciones adecuadas de trabajo tanto para el conjugado como para los sueros se procedió a probar diferentes bloqueadores ya que la preparación de la gelatina presentaba el inconveniente de que no se disolvía totalmente en el TBS-T y al transcurrir el ensayo se volvía muy densa hasta casi gelificarse debido a la temperatura en que se realizaba el ensayo (37°C).

Se probaron como bloqueadores la albúmina sérica bovina 3%, Leche en polvo descremada 5% y Gelatina 3%, determinando que el mejor bloqueador era la leche en polvo ya que la albúmina sérica bovina daba un fondo rosado y la leche impartía mejor contraste de las bandas con respecto al fondo de la NC, además de que no presentaba el inconveniente de insolubilidad y gelificación.

Se contaba con 3 tipos de NC: 2 con un poro de $0.45\mu\text{m}$ y marca diferente (BIO-RAD y Schleicher & Schuell) y 1 de $0.22\mu\text{m}$ (MSI). Al realizar ensayos con las 3 no se observó diferencia alguna en los resultados por lo que se podía utilizar cualquiera de ellas.

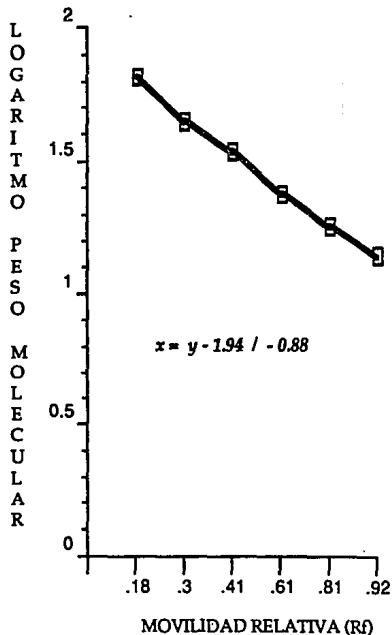
Durante la estandarización de la técnica también se variaron los tiempos de incubación y de lavados reduciendo a los primeros hasta a 1hr y haciendo 3 lavados de 2 min. c/u respectivamente, permitiendo una disminución del consumo de tiempo del ensayo.

DETERMINACION DE LOS PERFILES PROTEICOS

Las movilidades relativas (Rf) de los marcadores de PM obtenidas en la electroforesis se pueden ver en el cuadro 8, relacionándolas con el logaritmo del PM nos resulta la figura 6. Con la recta obtenida en ésta gráfica se calcularon los pesos moleculares correspondientes a las bandas separadas en la electroforesis de los antígenos proteicos estudiados como se resumen en el siguiente cuadro:

Cuadro 7. Bandas proteicas de los RCM y sus pesos moleculares aproximados.

Antígeno					
RCM-99s			RCM-M16		
Banda No.	Rf	PM (Kda)	Banda No.	Rf	PM (Kda)
	-	-	1	0.1	70.8
	-	-	2	0.16	63
1	0.24	53.7	3	0.26	52.5
2	0.3	47.9	4	0.3	47.9
3	0.36	42.7	5	0.34	44.7
4	0.42	38	-	-	-
5	0.44	36.3	-	-	-
6	0.5	31.6	6	0.48	33.9
7	0.56	28.8	7	0.54	29.5
8	0.62	25.1	8	0.6	26.3
9	0.66	23.4	9	0.64	24.5
10	0.7	21.9	-	-	-
11	0.8	17.8	10	0.78	18.6
12	0.86	15.8	-	-	-
13	0.88	15.2	11	0.88	15.2



Cuadro 8. Rf de los marcadores de peso molecular.

Rf	Logaritmo de P.M.	P.M. (Kda)
.18	1.82	66
.32	1.65	45
.42	1.54	34.7
.66	1.38	24
.80	1.26	18.4
.92	1.15	14.3

FIGURA 6. CURVA DE CALIBRACION PARA MARCADORES DE PESO MOLECULAR. El Rf de muchas proteínas en geles de poliacrilamida es proporcional al logaritmo de sus pesos moleculares (42).

PATRONES ELECTROFORÉTICOS DE LOS 4 ANTIGENOS ESTUDIADOS

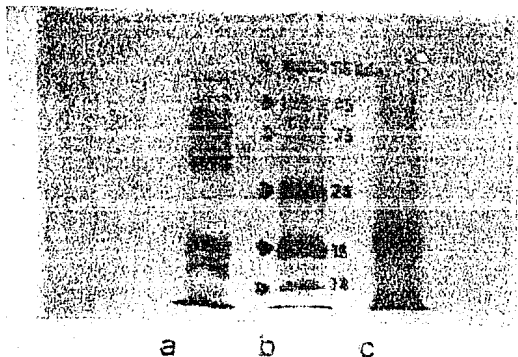


Figura 7. Corrimiento electroforético de a) RCM-BA, b) Marcador de peso molecular y c) RCM-BM.

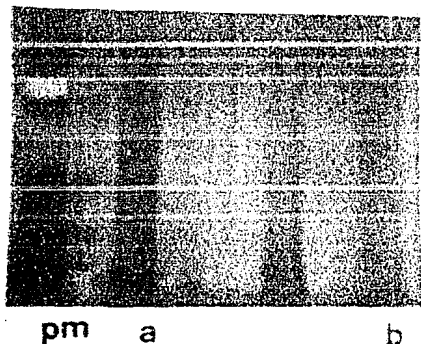


Figura 8. Corrimiento electroforético de los LPS de a) *B. abortus* y b) *B. melitensis*

En las páginas siguientes se presentan cuadros en donde se indican los datos clínicos y serológicos de los grupos de individuos a estudiar, gráficas de los títulos de anticuerpos monoméricos y totales presentes en las diferentes muestras tomadas de estas personas durante la evolución de la enfermedad y los esquemas de los patrones obtenidos en la IET con los 4 antígenos estudiados.

**CUADRO 9.GRUPO DE INDIVIDUOS CON BRUCELOSIS AGUDA
DATOS CLINICOS Y SEROLOGICOS**

CASO	FECHA	ATA	MEA	ATM	MEM	OBSERVACIONES
J.S.C.	11 II 93	1:320	1:160	1:640	1:160	Edad : 52 años Sexo: Masculino Cultivo positivo en la 1er. muestra con <u>B. melitensis</u>
	5 IV 93	1:80	1:80	1:160	1:160	
	20 IV 93	1:80	1:40	1:160	1:80	
	4 V 93	1:40	1:40	1:40	1:40	
	17 VI 93	1:40	1:20	1:80	1:20	
C.C.L.	23 III 93	1:2560	1:1280	1:5120	1:2560	Edad: 11 años Sexo Femenino Cultivo positivo en la 1er. muestra con <u>B. melitensis</u> Fiebres nocturnas 1 mes antes del estudio mes de Feb- Mar 93
	22 IV 93	1:320	1:160	1:640	1:320	
	6 VI 93	1:80	1:40	1:80	1:20	
	20 VII 93	1:80	1:40	1:160	1:80	
	4 VIII 93	1:80	1:80	1:160	1:160	
L.M.	31 VIII 92	1:160	1:40	1:80	1:20	Edad : 34 años Sexo : Femenino Cultivo negativo. Mialgias severas, artralgias y fiebre Tratamiento a partir de la 2a. muestra. Infección por aerosoles en el laboratorio.
	10 IX 92	1:160	1:40	1:80	-	
	28 IX 92	1:80	1:80	1:80	1:80	
	14 X 92	1:80	1:40	1:40	1:20	
	21 I 93	1:80	1:20	1:40	-	
M.L.	12 VIII 92	1:160	1:40	1:320	1:20	Edad: 28 años Sexo: Femenino Cultivo positivo de <u>B. abortus</u> en la 2a. muestra Dolores articulares en brazo
	14 VIII 92	1:320	1:80	1:320	1:20	
	10 IX 92	1:160	1:40	1:160	-	
	15 IX 92	1:160	1:40	1:160	-	
	2 X 92	1:80	1:20	1:80	1:20	
	4 XI 92	1:160	1:40	1:80	No deter.	
	9 II 93	1:80	1:20	1:40	-	
	16 III 93	1:40	-	1:20	-	

ATA: Aglutinación en microplaca para B. abortus
ATM: Aglutinación en microplaca para B. melitensis.
Determinan Ac's totales

MEA: Aglutinación en microplaca con 2-ME para B. abortus.
MEM: Aglutinación en microplaca con 2-ME para B. melitensis.
Determinan Ac's no poliméricos

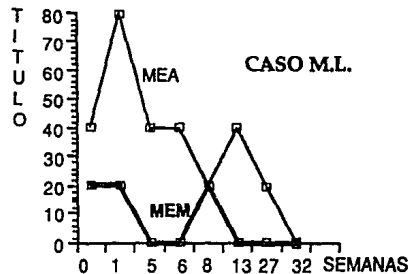
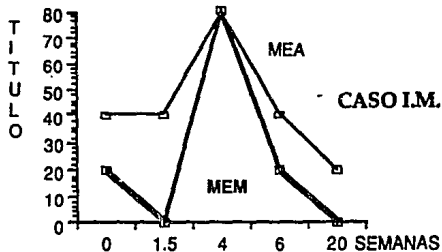
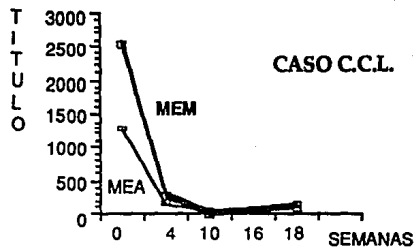
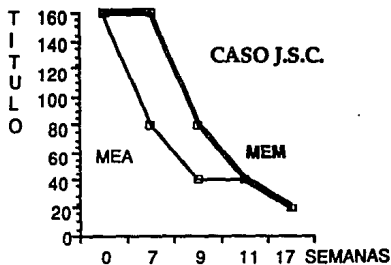
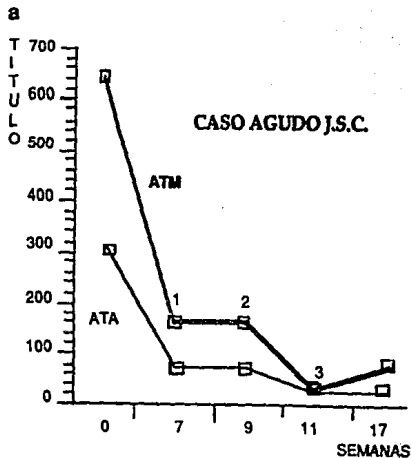


FIGURA 9. PERFIL DE INMUNOGLOBULINAS MONOMERICAS. INDIVIDUOS CON BRUCELOSIS AGUDA. El 2-ME rompe enlaces disulfuro de la inmunoglobulina polimérica IgM, por lo tanto el título determinado en las pruebas MEA y MEM corresponden a las inmunoglobulinas monoméricas (IgG en su mayoría).



b

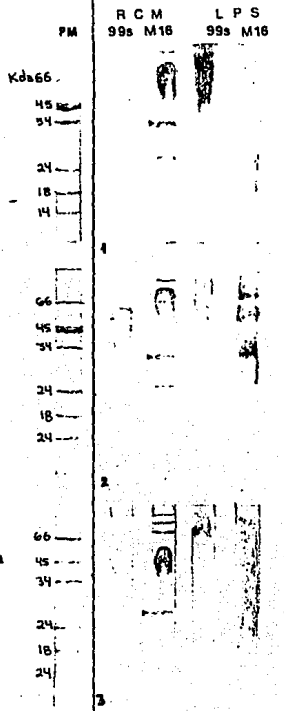


FIGURA 10. CORRELACION DEL TITULO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES CON EL PATRON OBTENIDO EN LA IET.
 a) Títulos obtenidos en las pruebas de ATA y ATM durante la evolución de la enfermedad (1, 2 y 3, muestras sometidas a IET).
 b) Esquema del patrón obtenido en la IET con los 4 antígenos estudiados.

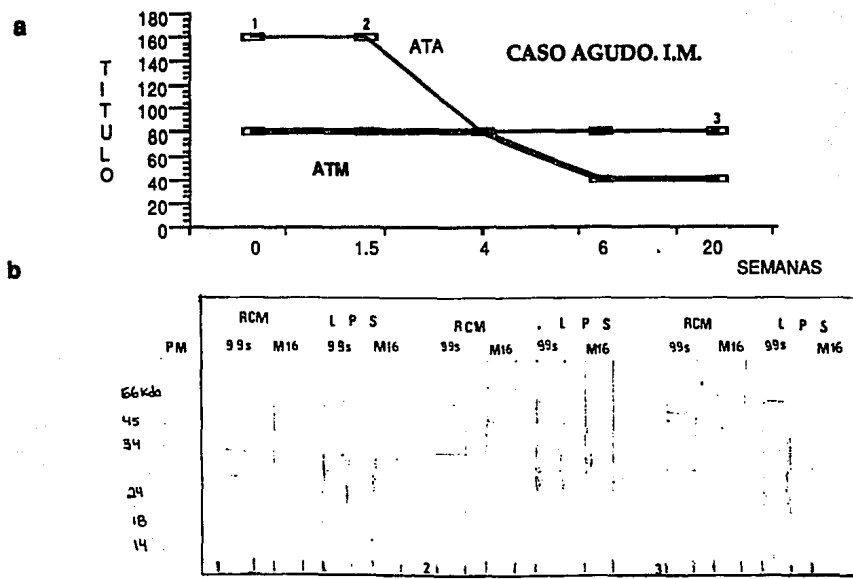


FIGURA 11. CORRELACION DEL TITULO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES CON EL PATRON OBTENIDO EN LA IET. a) Titulos obtenidos en las pruebas de ATA y ATM durante la evolución de la enfermedad (1, 2 y 3, muestras sometidas a IET). b) Esquema del patrón obtenido en la IET con los 4 antígenos estudiados.

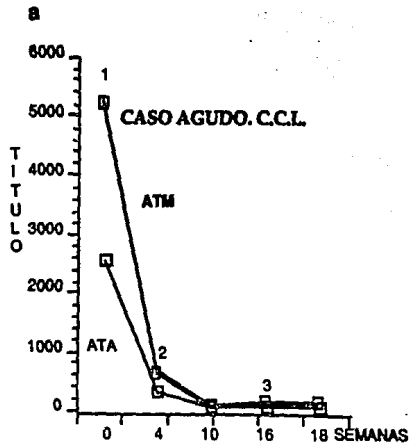
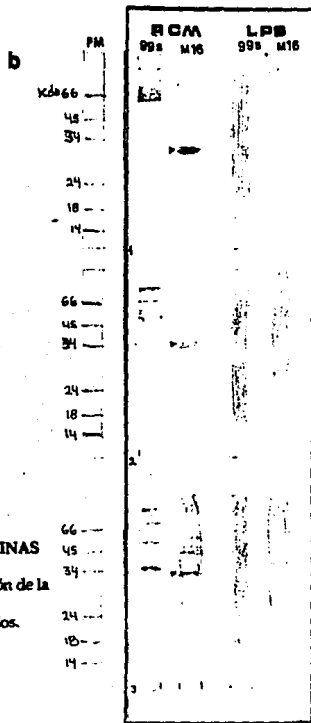
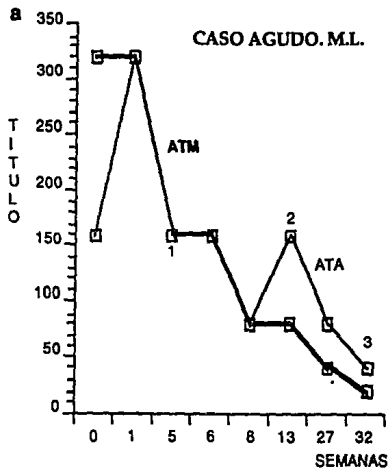


FIGURA 12. CORRELACION DEL TITULO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES CON EL PATRON OBTENIDO EN LA IET.

a) Títulos obtenidos en las pruebas de ATA y ATM durante la evolución de la enfermedad (1, 2 y 3, muestras sometidas a IET).

b) Esquema del patrón obtenido en la IET con los 4 antígenos estudiados.





b

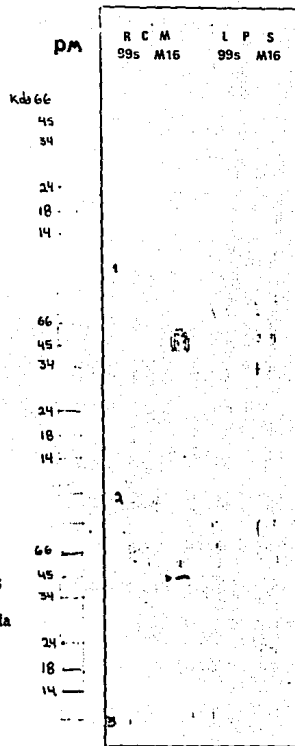


FIGURA 13. CORRELACION DEL TITULO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES CON EL PATRON OBTENIDO EN LA IET.
 a) Títulos obtenidos en las pruebas de ATA y ATM durante la evolución de la enfermedad (1, 2 y 3, muestras sometidas a IET).
 b) Esquema del patrón obtenido en la IET con los 4 antígenos estudiados.

**CUADRO 10.GRUPO DE INDIVIDUOS CON BRUCELOSIS CRONICA
DATOS CLINICOS Y SEROLOGICOS**

CASO	FECHA	ATA	MEA	ATM	MEM	OBSERVACIONES
M.A.H.	31 X 90	1:20	-	1:80	1:40	Edad: 49 años Sexo: Femenino Contagio por consumo de queso fresco. No presentó cultivo positivo
	6 XII 90	1:40	-	1:160	-	
	8 I 91	1:40	-	1:80	-	
	14 II 91	1:40	-	1:80	-	
	21 VI 91	-	-	-	-	
	20 VII 91	1:20	-	1:40	-	
	18 IX 91	1:40	-	1:40	-	
	30 X 91	1:20	-	1:40	-	
	29 XII 91	1:20	-	1:40	-	
	14 I 92	1:40	-	1:40	-	
	7 IV 92	1:20	-	1:40	-	
	3 VI 92	-	-	-	-	
	14 I 93	1:20	-	1:40	-	
	A.M.	15 VI 90	1:320	1:160	1:320	
20 VII 90		1:320	1:40	1:320	1:40	
7 VIII 90		1:640	-	1:640	-	
12 IX 90		1:320	-	1:320	-	
26 IX 90		1:40	1:40	1:40	1:40	
17 X 90		1:320	1:320	1:160	1:160	
5 XI 90		1:320	1:320	1:320	1:320	
12 XI 90		1:320	1:320	1:320	1:320	
11 II 91		1:640	-	1:640	-	
22 III 91		1:20	-	1:20	-	
15 IV 91		1:640	-	1:640	-	
21 IV 91		1:640	-	1:320	-	

ATA: Aglutinación en microplaca para B. abortus

ATM: Aglutinación en microplaca para B. melitensis.

Determinan anticuerpos totales

MEA: Aglutinación en microplaca con 2-ME para B. abortus

MEM: Aglutinación en microplaca con 2-ME para B. melitensis.

Determinan anticuerpos monoméricos

**TABLA 10. GRUPO DE INDIVIDUOS CON BRUCELOSIS CRONICA
(CONTINUACION)
DATOS CLINICOS Y SEROLOGICOS**

CASO	FECHA	ATA	MEA	ATM	MEM	OBSERVACIONES
A.T.S.	12 IX 91	1:80	1:40	1:80	1:40	<p style="text-align: center;">Edad: 24 años Sexo: Femenino</p> <p>Cultivo positivo de <i>B. melitensis</i> en la 4a. muestra</p> <p>Fiebres nocturnas, dolores de cabeza. Infección accidental por ingestión de queso, anteriormente no presentaba cuadro clínico de brucelosis.</p> <p>Presentó una tendencia ondulante con respecto a los títulos reportados acompañados de molestias menores (fiebre, dolor de huesos).</p>
	1 X 91	1:160	1:40	1:160	1:40	
	14 X 91	1:160	1:20	1:80	1:40	
	13 XI 91	1:80	1:20	1:80	1:20	
	11 XII 91	1:80	1:40	1:80	1:40	
	8 I 92	1:80	1:20	1:80	1:40	
	29 I 92	1:40	1:20	1:40	1:20	
	27 II 92	1:80	1:20	1:80	1:20	
	19 III 92	1:80	-	1:40	-	
	30 IV 92	1:80	1:20	1:80	1:20	
	24 VI 92	1:40	1:20	1:40	1:20	
	17 VIII 92	1:20	-	1:20	-	
	5 XI 92	1:40	1:20	1:40	-	
	19 XI 92	1:20	-	1:40	-	
	11 XII 92	1:40	1:20	1:40	1:20	
	8 I 93	1:40	1:20	1:40	-	
	22 I 93	1:40	-	1:20	-	
29 VII 93	1:40	-	1:40	-		

ATA: Aglutinación en microplaca para *B. abortus*

ATM: Aglutinación en microplaca para *B. melitensis*.

Determinan anticuerpos totales

MEA: Aglutinación en microplaca con 2-ME para *B. abortus*

MEM: Aglutinación en microplaca con 2-ME para *B. melitensis*.

Determinan anticuerpos monoméricos

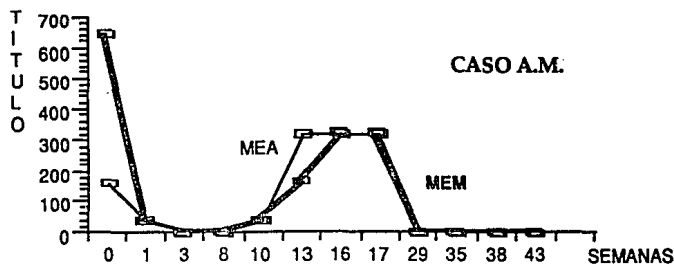
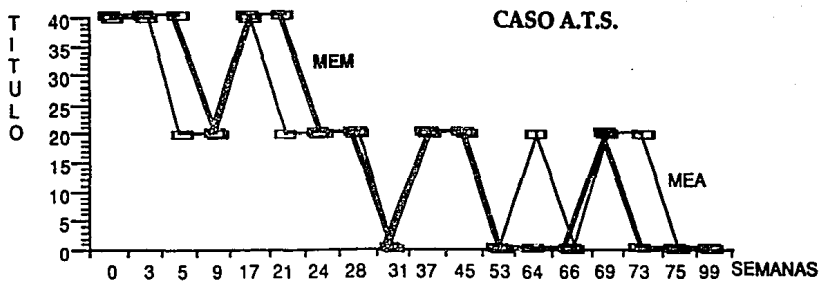
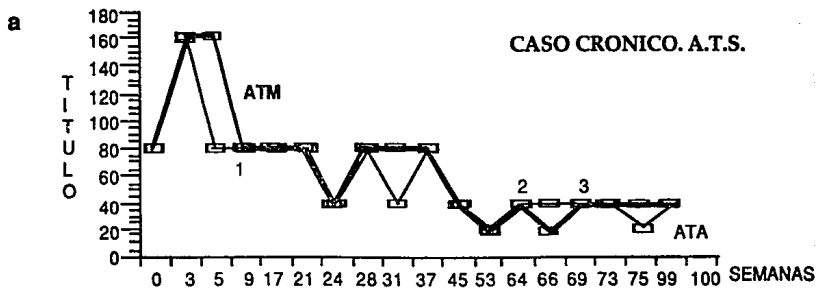


FIGURA 14. PERFIL DE INMUNOGLOBULINAS MONOMERICAS INDIVIDUOS CON BRUCELOSIS CRONICA. El 2-ME rompe enlaces disulfuro de la inmunoglobulina polimérica IgM, por lo tanto el título determinado en las pruebas MEA y MEM corresponden a las inmunoglobulinas monoméricas (IgG en su mayoría).



b

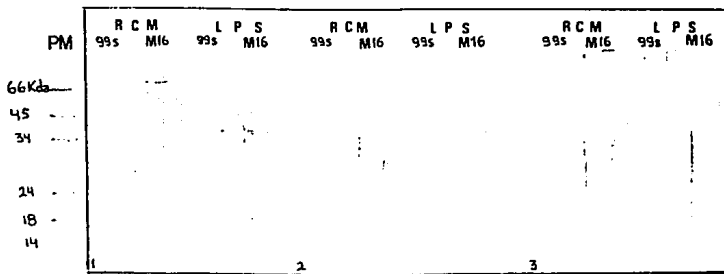
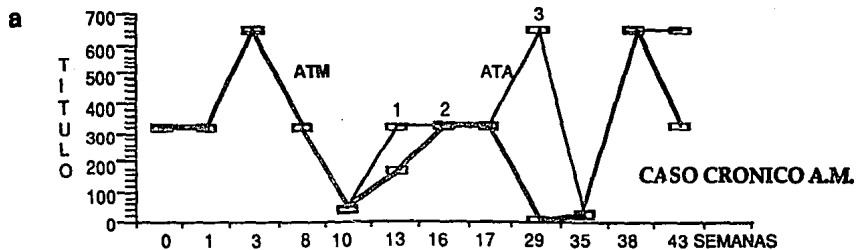


FIGURA 15. CORRELACION DEL TITULO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES CON EL PATRON OBTENIDO EN LA IET. a) Títulos obtenidos en las pruebas de ATA y ATM durante la evolución de la enfermedad (1, 2 y 3, muestras sometidas a IET). b) Esquema del patrón obtenido en la IET con los 4 antígenos estudiados.



b

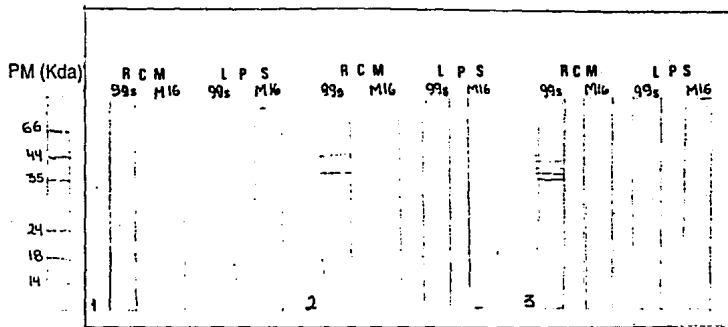
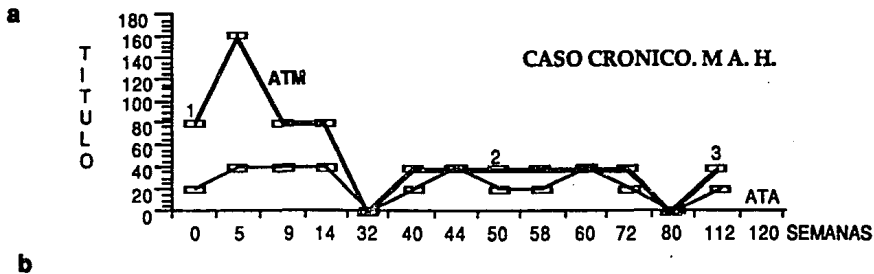


FIGURA 16. CORRELACION DEL TITULO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES CON EL PATRON OBTENIDO EN LA IET. a) Títulos obtenidos en las pruebas de ATA y ATM durante la evolución de la enfermedad (1, 2 y 3, muestras sometidas a IET). b) Esquema del patrón obtenido en la IET con los 4 antígenos estudiados.



b

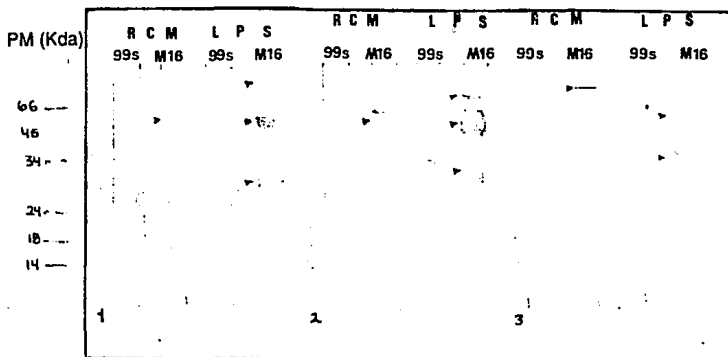


FIGURA 17. CORRELACION DEL TITULO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES CON EL PATRON OBTENIDO EN LA IET. a) Títulos obtenidos en las pruebas de ATA y ATM durante la evolución de la enfermedad (1, 2 y 3, muestras sometidas a IET). **b)** Esquema del patrón obtenido en la IET con los 4 antígenos estudiados.

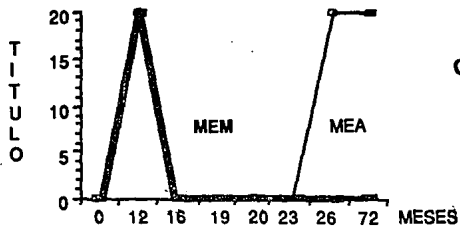
**CUADRO 11. GRUPO DE INDIVIDUOS VACUNADOS
DATOS CLINICOS Y SEROLOGICOS**

CASO	FECHA	ATA	MEA	ATM	MEM	OBSERVACIONES
A.M.C.	3 X 89	1:40	ND	1:40	ND	Edad: 24 años Sexo: Femenino La vacuna fué intramuscular, consistente de 2 dosis Presentó ligero aumento de temperatura cuando se aplicó la vacuna. Presentó fiebres nocturnas y aumento ligero del título de anticuerpos cuando tenía contacto directo con la bacteria, después de haber sido vacunada.
	3 X 90	1:20	1:20	1:20	1:20	
	23 I 91	1:40	-	1:40	-	
	5 IV 91	1:40	ND	1:20	ND	
	25 IV 91	1:80	-	1:40	-	
	18 VI 91	-	ND	-	ND	
	23 IX 91	1:80	1:20	1:80	-	
11 VIII 93	1:80	1:20	1:40	-		
A.L.	3 X 89	1:320	1:80	1:320	1:40	Edad: 25 años Sexo: Femenino En la 1er. dosis presentó aumento ligero de temperatura; a la 2a. dosis presentó sintomatología exacerbada (dolor abdominal y muscular), inflamación en el lugar de aplicación de la vacuna. Posteriormente tuvo contacto con la bacteria sin presentar alteraciones. Dejó de tener contacto con la bacteria 3 años después de aplicada la vacuna.
	13 XI 89	1:160	1:40	1:80	1:20	
	15 II 90	1:80	1:40	1:80	1:40	
	19 III 90	1:80	1:20	1:40	-	
	23 V 90	1:40	1:20	1:40	1:20	
	1 XII 92	1:40	-	1:40	-	
	15 I 93	1:40	1:40	1:40	1:20	
3 III 93	1:120	-	-	-		
X.C.B.	3 X 89	1:40	ND	1:40	ND	Edad: 24 años Sexo: Femenino Presentó un ligero aumento de temperatura y anticuerpos después de aplicarse la vacuna. Tenía contacto con la bacteria en periodos pequeños, presentando elevación del título.
	15 II 90	1:20	-	1:20	-	
	25 VI 90	1:80	1:80	1:40	-	
	23 I 91	1:20	-	-	-	
	5 IV 91	1:40	ND	1:20	ND	
26 IV 91	1:20	-	-	-		

ATA: Aglutinación en microplaca para B. abortus
ATM: Aglutinación en microplaca para B. melitensis.
Determinan anticuerpos totales.

ND: No determinado

MEA: Aglutinación en microplaca con 2-ME para B. abortus
MEM: Aglutinación en microplaca con 2-ME para B. melitensis.
Determinan anticuerpos monoméricos



CASO A.L.

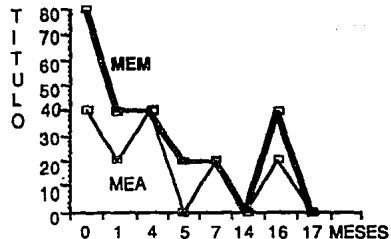


FIGURA 18. PERFIL DE INMUNOGLOBULINAS MONOMERICAS INDIVIDUOS VACUNADOS. El 2-ME rompe enlaces disulfuro de la inmunoglobulina polimérica IgM, por lo tanto el título determinado en estas pruebas corresponden a las inmunoglobulinas monoméricas (IgG en su mayoría).

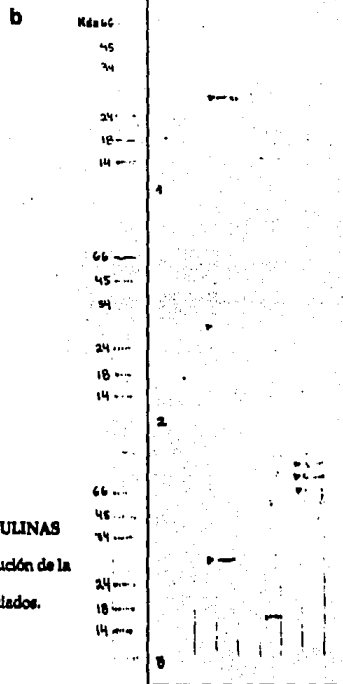
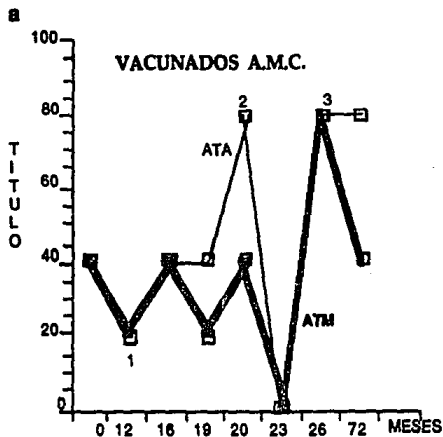
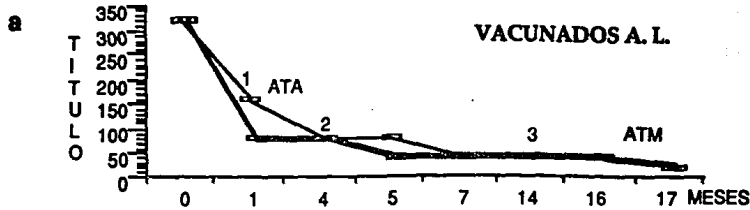


FIGURA 16. CORRELACION DEL TITULO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES CON EL PATRON OBTENIDO EN LA IET.

a) Titulos obtenidos en las pruebas de ATA y ATM durante la evolucion de la enfermedad (1, 2 y 3, muestras sometidas a IET).

b) Esquema del patron obtenido en la IET con los 4 antigenos estudiados.



b

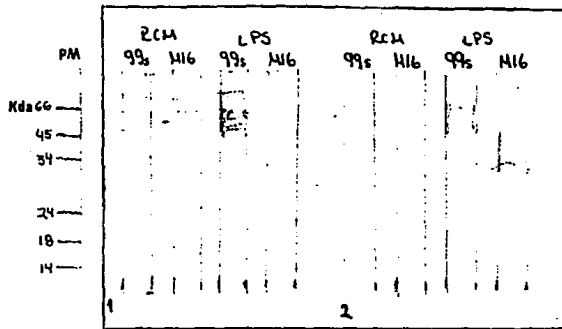


FIGURA 20. CORRELACION DEL TITULO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES CON EL PATRON OBTENIDO EN LA IET. a) Títulos obtenidos en las pruebas de ATA y ATM durante la evolución de la enfermedad (1, 2 y 3, muestras sometidas a IET). b) Esquema del patrón obtenido en la IET con los 4 antígenos estudiados.

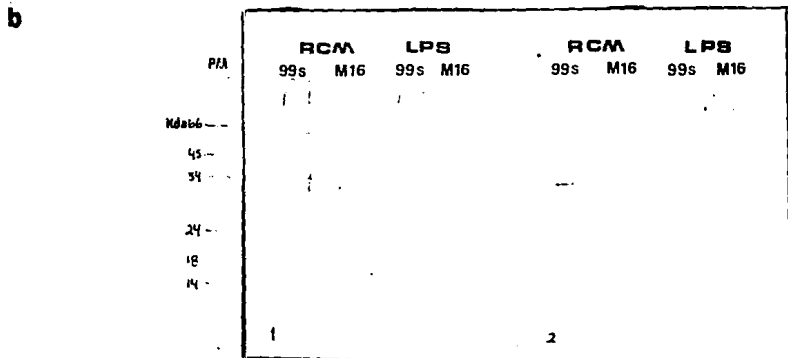
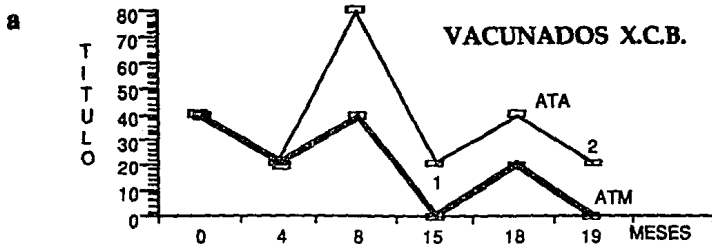


FIGURA 21. CORRELACION DEL TITULO DE INMUNOGLOBULINAS TOTALES CON EL PATRON OBTENIDO EN LA IET. a) Titulos obtenidos en las pruebas de ATA y ATM durante la evolución de la enfermedad (1, 2 y 3, muestras sometidas a IET). b) Esquema del patrón obtenido en la IET con los 4 antígenos estudiados.

**CUADRO 12. GRUPO DE INDIVIDUOS CONVIVIENTES
DATOS CLINICOS Y SEROLOGICOS**

CASO	ATA	MEA	ATM	MEM	OBSERVACIONES
A	-	-	-	-	Edad: 35 Sexo: Masculino Antecedentes de brucelosis. Orquitis. Consumo de queso, requesón y helados frescos.
B	1:40	-	1:40	1:40	Edad: 13 años Sexo : Femenino Fiebres y sudor nocturnos, diarrea. Padeció tifoidea Consumo de leche, helados, mantequilla frescos. Presuntiva brucelosis, pero no fué cultivo positivo.
C	1:320	1:40	1:80	1:40	Edad : 16 años Sexo: Masculino. Fiebre, cefalea y anorexia. Sudoración nocturna. Ingestión de leche y mantequilla frescos. Se le diagnosticó brucelosis anteriormente.
D	-	-	-	-	Edad : 18 años Sexo : Masculino Anorexia, adelgazamiento. Consumo de queso y requeson.

ATA: Aglutinación en microplaca para B. abortus
 ATM: Aglutinación en microplaca para B. melitensis.
 Determinan anticuerpos totales

MEA: Aglutinación en microplaca con 2- ME para B. abortus
 MEM: Aglutinación en microplaca con 2-ME para B. melitensis.
 Determinan anticuerpos monoméricos

INDIVIDUOS CONVIVIENTES

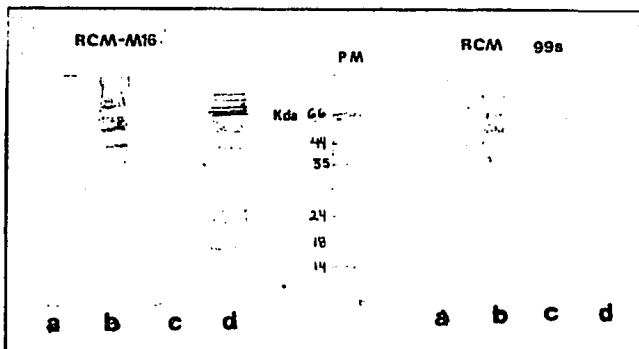


Figura 22a. Esquema de los patrones obtenidos en la IET contra los RCM. Las letras A, B, C y D indican el individuo estudiado.

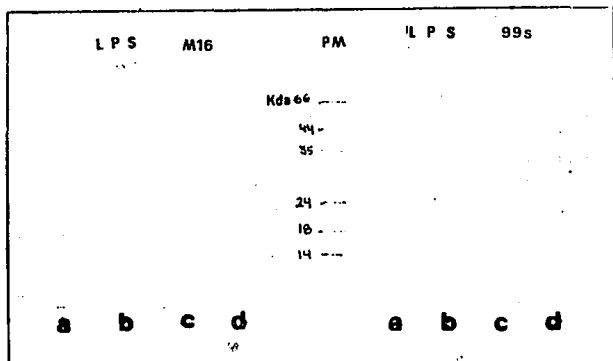


Figura 22b. Esquema obtenido en la IET contra LPS. Las letras A, B, C y D indican el individuo estudiado.

**CUADRO 13. GRUPO DE INDIVIDUOS CON REACCION CRUZADA
(COLERA)
DATOS CLINICOS Y SEROLOGICOS**

CASO	R.B.	ATA	MEA	ATM	MEM	OGAWA	INABA
1	-	1:40	-	1:40	-	1:2560	1:5120
2	-	-	-	1:20	-	1:80	1:160
3	-	-	-	1:20	-	1:1280	1:640

ATA: Aglutinación en microplaca para B. abortus

ATM: Aglutinación en microplaca para B. melitensis

MEA: Aglutinación en microplaca con 2-ME para B. abortus

MEM: Aglutinación en microplaca con 2-ME para B. melitensis

RB: Rosa de Bengala

INABA: Anticuerpos Vibriocidas contra V. cholerae serotipo Inaba

OGAWA: Anticuerpos Vibriocidas contra V. cholerae serotipo Ogawa

Determinan anticuerpos totales

Determinan anticuerpos totales

Determinan anticuerpos monoméricos

Determinan anticuerpos monoméricos

INDIVIDUOS DE REACCION CRUZADA (V. cholerae)

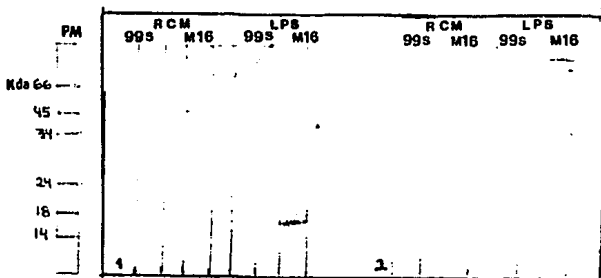


Figura 23. Esquema obtenido en la IET contra los 4 antígenos estudiados. El número 1 y 2 indican el individuo estudiado.

7.0 DISCUSION

La electroforesis en geles de poliacrilamida se ha convertido en una herramienta útil en los laboratorios para analizar y purificar proteínas (43), pero también ha sido de gran ayuda en el estudio de la estructura del LPS (27). Tanto las proteínas como los LPS poseen cargas eléctricas dándoles la capacidad de migrar bajo la influencia de un campo eléctrico, por lo tanto un LPS se puede separar en muchas fracciones con ayuda de ésta técnica.

Las condiciones de mA utilizadas en los primeros ensayos de electroforesis eran altas (60 mA) para las dimensiones del gel (7 por 8 cm) lo que provocaba un calentamiento del mismo, además de una disparidad en el corrimiento. La resistencia al flujo de la corriente es función de la concentración del medio (A-B) y del tampon a utilizar, lo que determinará la corriente y por lo tanto el calentamiento generado por un voltaje determinado. El tamaño de poro del gel formado por el entrecruzamiento de la A-B disminuye al aumentar la concentración de la misma. Al usar mayor concentración de A-B se tenía una mayor resistencia del medio y mayor producción de calor. Por lo anterior era importante que se variara la concentración de A-B en los geles y la corriente aplicada.

Para determinar el porcentaje de A-B se buscó que la distribución de los diferentes fracciones del antígeno en el gel estuviera bien proporcionado, es decir que las bandas de todos los pesos moleculares se distribuyeran adecuadamente en la superficie del gel utilizando como patrón los marcadores de PM. También si el patrón electroforético se observaba completo ya que si se dejaba correr más tiempo del necesario algunas fracciones proteicas de bajo PM se salían del gel. Una disminución en la corriente eléctrica, así como una concentración mayor (13.5%) de A-B; permitía una mejor distribución de las proteínas en el gel, ya que los poros son más cerrados y por lo tanto las partículas pueden ir acomodándose con mejor eficacia.

Aún así el patrón electroforético del RCM-16 no se lograba visualizar en la misma forma que los otros. Estudios anteriores indican que hay presencia de complejos LPS-Proteínas en extractos celulares lo que sugiere una fuerte interacción entre ellos (13, 19), ésta interacción puede subsistir aún cuando el extracto se purifique con proteasas, el barrido observado en el RCM-16 podría deberse a la presencia de estos complejos, en el RCM los cuales no permiten una resolución adecuada (21).

Shagger y Von Jagow (1987) describieron el sistema SDS-PAGE- tricina donde se utiliza en lugar de glicina la tricina en el buffer del cátodo, lo que aumenta la resolución particularmente de proteínas menores de 20 Kda y LPS en geles de formato pequeño (28); por lo que se tomó en cuenta para realizar ensayos con cada uno de los antígenos, resultando que la concentración óptima para los RCM es de 12%.

En el caso de los LPS, en diferentes estudios se ha observado que el aumentar la concentración de A-B en el gel separador, ayuda a tener una mayor resolución de los perfiles del LPS (22) sobre todo en la zona de la cadena O, ésta cadena al ser rica en azúcares es poco teñida por el azul de coomasie (34, 45) pero sí por la tinción de plata (17, 22, 27, 45) lo que nos ayudó a visualizar el corrimiento electroforético de ésta molécula.

PATRONES ELECTROFORETICOS

a) RCM 99s

El perfil electroforético puede observarse en la fig. 7 así como su PM aparente en el cuadro 7. De las 13 fracciones proteicas obtenidas, 10 son las que se encuentran en mayor concentración ya que son bastante visibles con la tinción de plata; mientras que 3 apenas se pudieron detectar (25.1, 23.4 y 21.9 Kda respectivamente). En la parte superior del gel por encima de la proteína de 53.7 Kda (banda 1) se pueden distinguir algunas proteínas que por su baja concentración y cercanía no se pudieron identificar. Santos, Vestreat y Winter (1984) reportan proteínas de membrana externa en 49 cepas

de *B. abortus* y las clasifican en 3 grupos; pero las que predominan en todas las cepas y que se encuentran en mayor concentración son de 40 Kda y 30 Kda respectivamente. (38, 48, 49). El perfil electroforético obtenido en éste estudio presentó proteínas que se acercan a estos valores:

banda 3 PM 42.66

banda 4 PM 38.02

banda 6 PM 31.6

banda 7 PM 28.84

aunque no podemos concluir que sean las mismas que ellos reportaron ya que por el método de obtención del extracto proteico no solo se tienen PME sino otras proteínas que constituyen la pared celular aunque en menor concentración. Para poder afirmar que son las mismas proteínas es necesario aplicar otras técnicas más específicas de purificación para aislarlas y estudiarlas individualmente.

b) RCM-16

La característica principal en su patrón electroforético es la presencia de una proteína de PM bajo (18.6 Kda) en una alta concentración por lo que se puede apreciar en la tinción de plata (Fig. 7c, banda 10). Aunque en algunos corrimientos electroforéticos se alcanzan a percibir 2 bandas en vez de una, debido a su alta concentración y gran cercanía, generalmente sólo se ve una fracción.

El perfil general se diferencia en 2 grupos o secciones; uno con proteínas de menor concentración y que por lo tanto no se distinguen fácilmente, que tienen PM con un intervalo de 70.8-29.5 Kda (parte superior del gel) y el otro de 18.6 -15.2 Kda en el que está la proteína de 18.6 Kda (cuadro 7) antes mencionada.

Santos, Verstrete y col. (1984) reportan en *B. melitensis* M-16 los 3 grupos de PME encontrados en *B. abortus* además de una proteína de peso molecular de 48 Kda, a la cual le han adjudicado la actividad de porina. Si se observa la fig. 7c se destaca

perfectamente la banda No. 4 con un PM aproximado de 47.86 Kda. muy cercana a la proteína reportada por Santos (38).

Los perfiles electroforéticos de *B. abortus* 99s y de *B. melitensis* M-16 son diferentes en cuanto a número y concentración de proteínas ya que mientras el primero tiene 13 bandas bien definidas y concentradas, el último tiene solo una (PM=18.6) con ésta característica y otras de PM mayores a 24 Kda pero de baja concentración y poco perceptibles (en algunos corrimientos no se visualizaban). La membrana externa celular de *Brucella* consiste de una línea externa de Proteína-LPS y forman la porción más exterior (2, 12). El extracto salino proteico por su forma de obtención contiene estos elementos superficiales de la pared celular. El problema que implicó el realizar la separación adecuada del antígeno proteico de *B. melitensis* sugiere que los complejos proteína-LPS podrían ser más fuertes que en *B. abortus*, ya que ambos extractos fueron purificados con proteasas y en *B. abortus* no se presentó éste problema.

c) LPS

En la electroforesis para LPS el SDS probablemente se une a la región del lípido A (27, 45); se ha reportado un comportamiento similar en el campo electroforético al de las proteínas pero sus características de migración dependen de su tamaño y no de su carga (21) por lo cual para identificar los componentes desconocidos de un LPS se compara su localización con el componente correspondiente a un LPS-S de estructura conocida tal como *S. typhimurium* o *E. coli* 0111:BA (17, 45).

El perfil electroforético del LPS de *Brucella* no presentó el patrón característico en forma de "escalera de mano" (con unidades repetitivas de la cadena O) observado en corrimientos realizados junto con con *E. coli*. O: 26: B6 y *E. coli* 127: B8, en ésta investigación.

La composición y el número de azúcares de la cadena "O" afecta la movilidad electroforética del LPS y esto produce las diferencias en los perfiles obtenidos de los LPS de *E. coli* y *Brucella*. Hitchcock & Brown (22) proponen que la movilidad se incrementa

conforme la longitud de la cadena O disminuye si bien también influye la concentración de A-B utilizada. Para *B. abortus* se tiene un corrimiento hasta la distancia en la que migra el marcador de PM de 14 Kda, mientras que el LPS de *B. melitensis* migra sólo hasta donde se localiza el marcador de PM de 24 Kda.

En *B. abortus* se observan 2 bandas poco perceptibles en la parte superior (PM > de 66 Kda poco definida) y una banda gruesa con un PM = 66 Kda.

En *B. melitensis* se observan 5 bandas de PM alto y la correspondiente a un PM de 66 Kda es la más gruesa y la que tiene mejor definición. Con la tinción de AgNO₃ esta banda se observa de diferente color a las demás (es mucho más café), lo que nos hizo pensar que se podría tratar de una proteína fuertemente unida al LPS en forma de complejos ya que se ha reportado que muchas veces persiste la presencia de complejos Proteína-LPS, aún si se les realiza una purificación con proteasas y por lo tanto comigran al someterlos a la SDS-PAGE (13, 17, 22, 49). Esto se confirmó al aplicar por separado las tinciones de AgNO₃ para proteínas y Azul de coomasie (ya se mencionó anteriormente que no tinte LPS) al LPS-M16 y ver que ésta banda era la única visible en los corrimientos. Lo anterior apoya los resultados obtenidos con el RCM-16.

PATRONES DE RECONOCIMIENTO ANTIGENICO OBTENIDOS EN LA IET

Los patrones obtenidos en la IET para cada grupo se relacionaron con las gráficas de los títulos de anticuerpos obtenidos en 4 pruebas diferentes:

- a) aglutinación en microplaca para *B. abortus*
- b) aglutinación en microplaca para *B. melitensis*
- c) aglutinación con 2- ME para *B. abortus*
- d) aglutinación con 2- ME para *B. melitensis*

Las pruebas a y b nos da el título de inmunoglobulinas totales (IgM, IgG y tal vez IgA) ya que hay una aglutinación de todas ellas; mientras que las pruebas c y d solo nos indica el título de IgG (se sospecha que también involucra IgA aunque en muy bajo

grado) ya que la presencia del 2-ME rompe enlaces disulfuro de las IgM impidiendo que tengan su actividad aglutinante.

a) Grupo de brucelosis aguda

De los 4 casos estudiados 1 reportó cultivo negativo, 2 positivos a *B. melitensis* y 1 a *B. abortus*. Comparando las gráficas de títulos de Ac totales y parciales (Fig. 9 a la 13) podemos ver que los Ac's que se producen en mayor proporción al inicio de la enfermedad son las IgM seguidas de las IgG y conforme se recupera el paciente éstas últimas tienden a desaparecer, éste comportamiento concuerda con lo que reportan otros autores (13, 29).

En todas las gráficas el título de los anticuerpos reportados en la 1er. muestra está arriba de 1:80 esto se debe a que la muestra es obtenida generalmente cuando se presentan los síntomas clínicos y para entonces ya hubo una respuesta inmune (16).

Los títulos altos de Ac's de este grupo se detectan entre 1 y 4 semanas para después disminuir y desaparecer. El título bajo de IgG indica que la enfermedad no está activa después de este intervalo. El caso C.C.L. presentó mayor intensidad en la IET en las 3 muestras con los 4 antígenos que los otros 3 casos, esto puede deberse a que presenta títulos bastante más altos (1:5120 para *B. melitensis* y 1:2560 para *B. abortus*). El proceso infeccioso fué bastante intenso ya que a la 4a. semana disminuyeron notablemente el título de anticuerpos, pero a pesar de esto la intensidad del color de las bandas no disminuyó.

El reconocimiento Ag-Ac en la IET con los RCM se localizó en la parte superior con las bandas de alto peso molecular excepto el caso C.C.L. En el caso ML el reconocimiento hacia el RCM-99s y RCM- BM fué igual en intensidad (ligera coloración); pero presentan mayor reconocimiento hacia LPS. En los casos J.S.C y C.C.L reconocen las bandas proteicas del RCM-99s de 53.7 a 38.02 Kda (bandas 1 a la 4) y para *B. melitensis* la banda de 47.9 Kda (banda 4). Para el caso I.M el reconocimiento para

RCM-16 es de las 4 bandas de mayor PM y para *B. abortus* las bandas de 53.7, 36.3 y 23.4 Kda.

En todos los casos el reconocimiento fue mayor hacia los LPS aún en el caso I.M en el que el cultivo bacteriano fué negativo. La respuesta encontrada es dirigida hacia la parte caracterizada como cadena O pero del LPS- BM ya que ni siquiera en el caso M.L en el que la infección se debió a *B. abortus* hubo mayor respuesta hacia esa entidad, esto es interesante ya que los títulos reportados para las Ig totales en el caso M.L son semejantes hacia las 2 entidades mientras que en las Ig monoméricas (en su mayoría IgG) se ve una preferencia hacia *B. abortus*, solo que los títulos son muy bajos con respecto a los Ac's totales lo que nos indica que las IgM son las que incrementan los títulos, esto se ve apoyado por el conocimiento de que el LPS activa la producción de IgM. Hay que tomar en cuenta que el caso M.L había tenido contacto con el género *Brucella* por cuestiones laborales desde antes de la infección, por lo tanto es probable que haya existido una respuesta inmune previa a la enfermedad.

Bradstreet et al. observaron que la IgM persiste en una infección subclínica. Títulos bajos de IgG algunas veces han sido detectados en pacientes previamente expuestos a brucela, en la ausencia de signos clínicos de infección (51). Además se ha visto que sujetos de riesgo laboral (veterinarios, químicos) tienen un aumento en los títulos de anticuerpos pero no manifestaciones clínicas de brucelosis lo que sugiere una infección de bajo nivel (39). Por lo tanto un título de 1:160 o 1:320 sugiere brucelosis cuando se acompaña de un curso clínico compatible en un paciente con una historia de exposición potencial, pero tienen menor significado diagnóstico en grupos respectivamente expuestos a *Brucella* (1).

En los 4 casos la primer muestra con respecto a la 3a. tiene un mayor reconocimiento indicado por una mayor intensidad de color. Esto va de acuerdo con la declinación de los títulos de anticuerpos. Por último, en ninguno de los casos después de la decaída de títulos de IgG se observan títulos altos para indicar una enfermedad activa (16) lo que sugiere que los tratamientos aplicados fueron apropiados y no se prolongó la en-

fermedad ya que en promedio a las 10 semanas (2 1/2 meses) la presencia de IgG era mínima.

Con lo anterior se puede deducir que:

a).- La mayor respuesta de Ac's lo provocan los LPS y las inmunoglobulinas presentes en mayor proporción son las IgM, esto puede relacionarse con el hecho de que el LPS activa preferentemente la producción de estos anticuerpos.

b).- En la respuesta hacia los RCM es predominante la identificación hacia proteínas de peso molecular mayor a pesar de que se encuentran en menor concentración que las de bajo peso molecular otras, esto nos indica que la concentración de las fracciones proteicas o LPS del antígeno no influyen en su antigenicidad.

b) Grupo de Brucelosis crónica

La característica principal que tiene este grupo es la poca intensidad de las bandas reconocidas para todos los Ag's en las 3 muestras de cada caso. Esto va de acuerdo con los títulos relativamente bajos que constantemente se presentaron durante el curso de la enfermedad (con excepción al caso A.M en el que en algunas muestras presenta un título de 1: 640). A pesar de lo anterior la afinidad que presentó hacia los Ag's fué mínima ya que solo reconoció en la 2a y 3a muestra las proteínas 1 y 2 del RCM-99s (53.7 y 47.86 Kda respectivamente). El caso anterior (A.M) y el caso M.A.H no reportaron cultivo positivo y el caso A.T.S fué cultivo positivo a *B. melitensis* pero al igual que en el grupo de individuos agudos se ve que el cultivo positivo o negativo no influye en la intensidad o mayor reconocimiento de bandas.

El caso M.A.H reconoció las proteínas 3, 4, 5 del RCM-16 en la 1a. y 2a. muestra y en la 3a. muestra las proteínas 1 y 2, mientras en los LPS no hubo diferencia en los reconocimientos ya sea en intensidad o en su perfil general, ya que se veía reconocimiento hacia toda la estructura del LPS.

En cuanto a los títulos de inmunoglobulinas totales y monoméricas para las dos cepas

de brucela su comportamiento fue muy semejante excepto para el caso M.A.H que tuvo mayores títulos de anticuerpos totales para *B. melitensis* pero no hubo respuesta para Ig parciales; ni para *B. abortus*. Esto es debido a que la IgM puede persistir con o sin la presencia de anticuerpos IgG. El aumento o disminución de la respuesta inmune puede ser detectada aún si no correlaciona con las manifestaciones clínicas (39). Han reportado que la brucelosis crónica está asociada generalmente con títulos bajos de IgG (18,51).

En el caso AM y MAH se observaron recaídas ya que hubo un aumento de título de anticuerpos (tanto totales como monoméricas), aunque para muchos pacientes en una recaída tienen un aumento de títulos de IgG pero no cambian sus títulos de IgM (51). Otros autores han encontrado que en las recaídas se observan aumentos de IgM e IgG. Pellicer y col. (35) encontraron que la recaída está asociada con un aumento de títulos de IgG e IgA pero no de IgM. Esto último está de acuerdo a nuestros resultados ya que hay aumento de las 2 Ig. En el caso A.T.S los títulos de anticuerpos se presentan en títulos bajos a lo largo de 1 año sin que se presente un aumento significativo de título. Estos títulos de anticuerpos pueden existir durante años sin que haya una infección declarada (15).

c) Grupo de vacunados

La vacuna utilizada fué la fracción PI, ésta fracción fué obtenida de la extracción con fenol de células deslipadas. Desde 1967 se han hecho experimentos en poblaciones humanas expuestas a la fracción PI, encontrándose que hay un drástico decrecimiento en la prevalencia de brucelosis en humanos; pero el mecanismo por el cuál la vacunación ha tenido un efecto benéfico no se ha determinado. En humano induce un bajo pero significativo aumento de títulos de anticuerpos anti-brucela encontrándose IgG, IgM e IgE (39).

Cuando se empezó a utilizar ésta vacuna su ventaja era el estar libre de LPS-S, pero se

encontró que la respuesta serológica en animales a pruebas dependientes de LPS-S tiene función protectora (14, 36).

En los 3 casos estudiados se observa un comportamiento de producción de anticuerpos semejante hacia *B. abortus* y *B. melitensis* y en general son títulos menores de 1:80. El caso A.L es el que presentó sintomatología aguda después de la aplicación de la vacuna (dolor de huesos, sudoraciones nocturnas) y un título de anticuerpos totales alto (1:320) tanto para *B. abortus* como para *B. melitensis*, curiosamente tuvo una menor respuesta en las tiras de NC si las comparamos con las de los otros 2 casos.

El reconocimiento hacia fracciones proteicas de *B. abortus* se dirigen más frecuentemente a las bandas 1, 2, 3 y solo el caso X.C.B hacia las proteínas 5, 6, 7. Para *B. melitensis* coinciden en el reconocimiento hacia las bandas 1-5 y el caso A.M.C a la banda 8. Para el LPS el caso A.M.C y X.C.B conforme transcurre la respuesta inmunológica se da la respuesta contra el LPS ya que hasta la tercera muestra dió positividad. El caso A.L da reacción contra la región de alto peso molecular del LPS en la fase principal de la reacción y en la última muestra no se tiene reconocimiento hacia antígeno alguno, coincidiendo con el hecho de que el título de anticuerpos totales es bajo (1:40) y no hay respuesta contra IgG.

En forma general la respuesta de IgG fué muy baja y la respuesta mayoritaria puede decirse que fué de IgM. Es importante mencionar que al transcurso del tiempo hay producción de IgM pero no de IgG esto nos indica que la enfermedad no está en proceso activo y que la IgM se produce en forma constante pero baja. No se puede asegurar que este grupo tuviera una respuesta preferente hacia algún antígeno en particular, pero según los títulos reportados la respuesta inmunogénica no se estimuló en gran parte por la aplicación de la vacuna.

d) Grupo de convivientes

Solo los casos B y D presentaron respuestas hacia los antígenos; y en forma mayoritaria a los de tipo protefco, ya que en el reconocimiento de LPS la intensidad es muy baja. El caso B no reporta título de anticuerpos con las pruebas serológicas de rutina, pero sí presenta reconocimiento hacia el RCM-16 y RCM-99s y en bandas de peso molecular tanto alto como bajo. Los títulos bajos en este grupo de personas indican que solo tienen una pequeña estimulación inmunogénica ante el desafío de la bacteria. El rebaño con el que está en contacto este grupo presentó una respuesta positiva hacia las pruebas confirmativas de la presencia de brucela por lo que estas personas han tenido contacto constante con los antígenos brucelares, y estos desafíos estimularon anticuerpos de memoria y tal vez de protección para que no tuvieran un cuadro clínico severo. Esto también puede estar afectado por la eficacia del sistema inmune de cada persona para atacar a la brucela, el inóculo y la edad (24); aunque la resistencia adquirida de modo natural a la brucelosis es sólo relativa, ya que la reinfección es frecuente y la presencia de anticuerpos circulantes no asegura la inmunidad ni evita la bacteremia (15).

e) Grupo de reacción cruzada

Se presentó en forma mínima un reconocimiento antigénico hacia los LPS. Lo anterior indica que ésta técnica es más específica con respecto a las serológicas ya mencionadas, ya que presentó en la IET una respuesta muy baja. En otros trabajos ya han reportado que las reacciones cruzadas serológicas presentes en cepas lisas de *Brucella* y *V. cholerae* se deben a determinantes antigénicos comunes que se encuentran en sus respectivos LPS (36, 37). Pero en este trabajo a pesar de que se estudiaron personas con títulos altos a *V. cholerae* (caso 1) no presentaron una reacción significativa en la NC hacia los antígenos estudiados. Estas personas también tuvieron reconocimiento hacia brucela pero en títulos bajos por lo que no podemos decir que padezcan la enfermedad ya que tampoco tuvieron cultivo positivo; ésto tal vez se deba a que tuvieron un fugaz

contacto con la bacteria sin desarrollar la enfermedad ya que el inóculo tal vez fué pequeño y por lo tanto estimularon anticuerpos que en estos casos y de acuerdo a los cuadros correspondientes son de tipo IgM ya que las pruebas de MEA y MEM resultaron negativas. Otra posible explicación para los títulos obtenidos contra *Brucella* es el siguiente: el LPS estimula preferentemente la producción de anticuerpos de tipo IgM los cuales son poco afines para el reconocimiento antigénico, por lo tanto, en un determinado momento puede reconocer algún antígeno semejante a los de *V. cholerae*, a diferencia de la IgG, los cuales son más afines hacia el antígeno

f) Grupo de control negativo

No hubo reconocimiento hacia ningún antígeno por parte de los sueros negativos trabajados, lo que descarta la posibilidad de una respuesta inespecífica de la técnica.

Como algo adicional para este estudio, algunos sueros de los que se trabajaron se enfrentaron a un sonicado de la cepa RB51 (cepa *B. abortus* de tipo rugoso) la cual carece de LPS. Lo anterior con el fin de aclarar si la respuesta positiva se debe a las proteínas o los LPS. Se escogieron 5 sueros que tuvieran reconocimiento mayoritario hacia proteínas (RCM), si daban reacción positiva indicaba que el LPS no influyó grandemente con la respuesta inmunológica y si daba negativa que no existía reacción hacia proteínas.

Se presentó solo una pequeña respuesta hacia el antígeno en 2 sueros de los 5 estudiados lo que no es significativo como para concluir que la respuesta involucre solo proteínas.

8.0 CONCLUSIONES

- Las condiciones óptimas encontradas para cada uno de los antígenos en la técnica de electroforesis son las siguientes:

Antígeno	µg/pozo	% A-B	Sistema	Corriente/gel
RCM-99S	20	12	Tricina-SDS	45 mA
RCM-M16	25	12	Tricina-SDS	45 mA
LPS-BA	20	12	Laemmli	15 mA
LPS-BM	5	12	Laemmli	15 mA
Sonicado RB51	42	12	Laemmli	45 mA

Las condiciones encontradas para la electrotransferencia son válidas para todos los antígenos: 30 v 300 mA 60 W T' = 2.5 h. 4°C

- Los RCM de las cepas *B. abortus* 99s y *B. melitensis* M-16 comparten 9 bandas proteicas con semejantes P.M., dividiendose en 3 grupos: 54-43 Kda (3 bandas); 34-23 (4 bandas); y 19-15 (2 bandas). Pero la concentración proteica de la cepa *B. abortus* es mayor con respecto a *B. melitensis* ya que la única banda bien definida es la de 18.6 Kda. Los antígenos LPS no presentan el patrón electroforético característico en forma de "escalera", observado en corrimientos electroforéticos de otras gram negativas.

- El grupo de individuos con brucelosis aguda presenta una mayor respuesta inmunológica (principalmente IgM) hacia el LPS, y contra proteínas de alto peso molecular (54-48 Kda).

- El grupo de individuos con brucelosis crónica se caracteriza por una respuesta inmune baja en general ya que sus títulos serológicos durante el periodo evolutivo de la enfermedad no se modificaron significativamente; tanto para LPS como para proteínas.

- Convivientes. los resultados parecen indicar que el contacto constante y prolongado (en dosis menores) con los antígenos brucelares, no son capaces de desarrollar la enfermedad en la mayoría de las veces y solo activan en forma ligera la producción de anticuerpos los cuales podrían servir como protección.

- En los vacunados no se puede concluir si la vacuna indujo la producción de anticuerpos en particular hacia algún antígeno, además de que los anticuerpos no se produjeron en una concentración significativa.

- La reacción cruzada con *V. cholerae* presentada en los sueros trabajados puede considerarse nula en la técnica de IET (Western blot).

- El aporte del LPS hacia la producción de respuesta inmune en los individuos estudiados es mayor con respecto a las proteínas.

- Los resultados obtenidos apoyan el conocimiento de que el LPS es un factor importante en la producción de una respuesta inmune por lo que es necesario continuar con el estudio de la respuesta que involucre al LPS. La técnica de IET en este estudio no presentó inespecificidad por lo que podría ser una nueva alternativa como prueba de rutina en el laboratorio.

9.0 APENDICE

Determinación de proteínas por el método de PIERCE-BCA

El reactivo de ensayo de Pierce- BCA es altamente sensible para la cuantificación espectrofotométrica de proteínas. Este sistema combina la reacción de proteínas con el ión Cu^{+2} en medio alcalino produciendo un ión Cu^{+1} el cual reacciona selectivamente con el ácido bicinconírico (BCA). El producto de reacción púrpura formado por la interacción de 2 moléculas de BCA con 1 ión cuproso (Cu^{+1}) es soluble en agua y exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm.

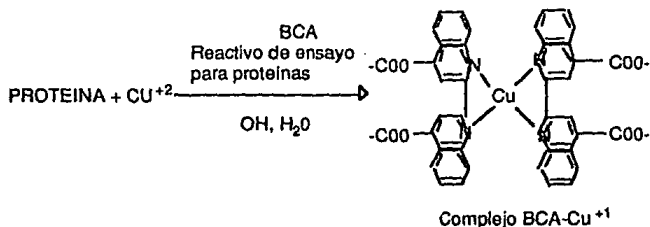


Figura 24. Representación de la reacción química que se lleva a cabo en la cuantificación de proteínas.

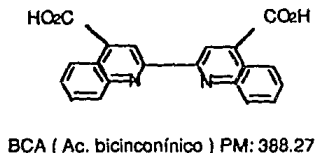


Figura 25. Estructura química del ácido bicinconírico

El diagnóstico serológico de rutina en el laboratorio de brucelosis del INDRE, abarca: RB, ATA, ATM, MEA y MEM.

Todas estas pruebas detectan anticuerpos contra LPS y utilizan como antígeno extractos celulares. El criterio para determinar si son positivas es la presencia de una reacción de aglutinación.

La aglutinación es una reacción inmunológica entre antígenos y anticuerpos, siendo el antígeno particulado lo que facilita la visibilidad de la unión Ag-Ac al formarse agregados microscópicos. Con la ayuda de esta reacción se puede estimar el título de Ac's por medio de diluciones (37).

Aglutinación en microplaca para *B. abortus* y *B. melitensis* (ATA y ATM)

Se emplea como antígeno la célula completa. La aglutinación se debe a anticuerpos IgM e IgG, pudiendo contribuir las IgA. Un título elevado constituye un indicio de infección, los títulos bajos o reacción negativa no la excluyen, ya que en infecciones localizadas y procesos en fase crónica los títulos son bajos y hasta negativos. En el laboratorio de Brucelosis, el título que se considera como indicativo de enfermedad es de >1:160 (tomando en cuenta que una 2a. muestra será mayor en título) (13, 29, 37).

Aglutinación en microplaca con 2-mercaptoetanol para *B. abortus* y *B. melitensis* (MEA, MEM)

Es una prueba semejante a la anterior variando solo en la presencia del 2- ME, el cual es un agente reductor capaz de inhibir la actividad aglutinante de las IgM rompiendo sus enlaces disulfuro. Por lo tanto ésta prueba determina en su mayoría IgG. La positividad es indicadora de una infección activa y estaría dada por IgG e IgA (13, 37).

Rosa de Bengala (RB)

Es más de tipo cualitativo. Ha suplido a la prueba de Huddleson ya que ésta última daba falsos positivos. Detecta IgM e IgG. Utiliza como antígeno una suspensión de *B. abortus* 1119s, que se tinte con el colorante Rosa de Bengala. Por medio de ésta prueba no se puede saber si la infección es reciente o pasada y no cuantifica Ac's contra antígenos de brucela, por lo tanto se procede a realizar pruebas complementarias como son las de ATA Y ATM (5, 13, 37).

Electroforesis

Las proteínas pueden separarse muy bien según sus pesos moleculares utilizando electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), en condiciones desnaturalizantes. La mezcla de proteínas se disuelve en un medio con SDS (detergente aniónico que rompe las interacciones no covalentes en las proteínas nativas), también se añade 2-ME o DTT para reducir los puentes disulfuro y así se pierde definitivamente la estructura primaria (42).

Los aniones de SDS se unen a la cadena principal a razón de 1 molécula de SDS por c/2 aminoácidos, lo que da al complejo SDS-Proteína una carga negativa aproximadamente proporcional a la masa de la proteína. Al ser la carga negativa (adquirida por la fijación del SDS) muy superior a la carga propia de la proteína nativa, ésta carga se considera despreciable.

Las proteínas pequeñas se desplazan más rápidamente a través del gel que las grandes, las cuales permanecen arriba, cerca del punto de aplicación de la muestra. El desplazamiento de la mayoría de las cadenas polipeptídicas es proporcional al logaritmo de su masa (algunas proteínas ricas en azúcares migran de forma anómala (42).

Las separaciones electroforéticas se realizan casi siempre sobre geles de poliacrilamida por 3 razones principales:

- Los geles suprimen las corrientes de convección producidas por pequeños gradientes de temperatura, favoreciendo una separación más efectiva.

- Son químicamente inertes y se forman con facilidad mediante polimerización de la acrilamida. Escogiendo distintas concentraciones de acrilamida y metil bisacrilamida (reactivo que realiza enlaces cruzados) se pueden conseguir tamaños de poro controlados. Fig. 26 a.

Los geles sirven de tamices moleculares que potencializan la separación. Las moléculas más pequeñas que los poros del gel se desplazan fácilmente a través de él; las moléculas mayores que los poros permanecen casi inmóviles. Las de tamaño intermedio se desplazan con diversos grados de dificultad (42) Fig. 26 b.

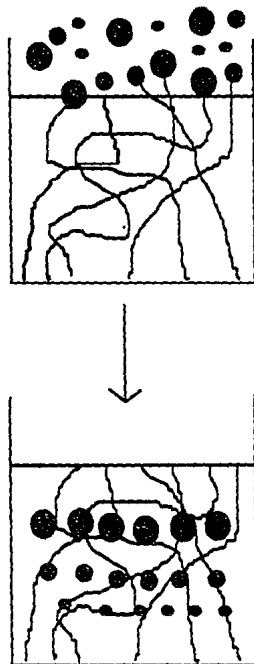
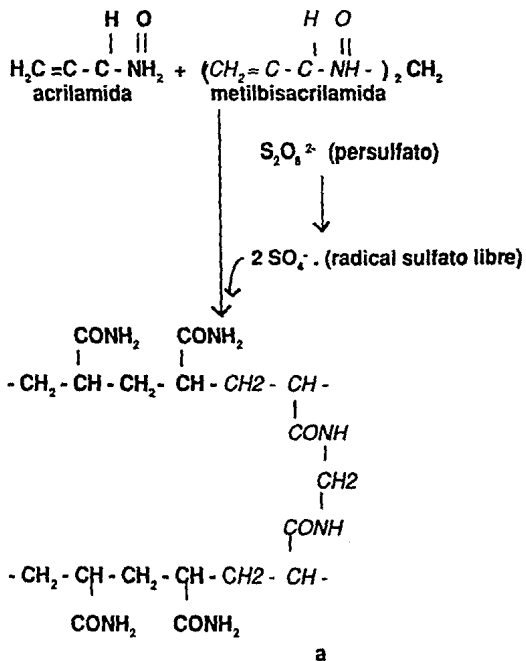


Figura 26. Las separaciones en gel de acrilamida-bisacrilamida tiene como ventajas a) El tamaño del poro puede controlarse de acuerdo a la concentración utilizada de acrilamida-bisacrilamida y b) Son tamices moleculares que potencializan la separación (42).

Western Blot o inmunoelectrotransferencia

Ha sido reconocida como una herramienta útil no solo para investigación sino también como técnica de rutina en el serodiagnóstico de una enfermedad. La técnica es tan sensible como el inmunoensayo enzimático estándar, pero es más específico. Esta gran especificidad es obtenida debido a la visualización directa de la reacción antígeno-anticuerpo con antígenos conocidos aislados del agente infeccioso. La IET es una combinación de 3 pasos:

- Separación de los componentes antigénicos por electroforesis.
- Electrotransferencia del ligando separado por electroforesis Fig. 27 y
- El inmunoensayo para la identificación de la reactividad con el ligando.

La IET es principalmente una técnica cualitativa. El análisis de los resultados es hecho en base a 2 criterios:

- La presencia de una banda específica, de un patrón específico o de un número mínimo de bandas de pesos moleculares.
- La intensidad de la tinción de las bandas, puede ser visualmente o con un densitómetro.

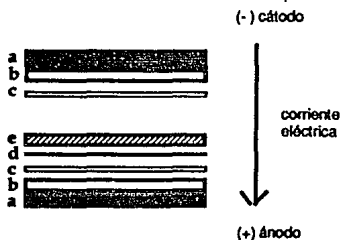


Figura 27. Esquema del cassette de IET. El flujo de corriente va del cátodo (-) al ánodo (+). a) Tapa del cassette; b) almohadilla de Scotch brite; c) Papel filtro; d) hoja de NC y e) gel (1).

Tinción de plata para LPS y proteínas en geles de poliacrilamida.

El AgNO_3 del componente principal de la tinción es también usado para tefir azúcares; sugiriendo que ésta tinción puede usarse para detectar LPS después de electroforesis en gel, con ácido peryódico, seguido de un tratamiento con AgNO_3 amoniacal y subsecuentemente un desarrollo de color con una solución de ácido cítrico-formalina. El ácido peryódico incrementa la sensibilidad de la tinción 5 veces más que si no se usara. El fundamento aún no se tiene claro pero se cree que el lípido A del LPS es el componente reactivo en ésta tinción.

Lo anterior indica que la presencia de cis-glicoles sensibles a peryodato en el core y la cadena lateral polisacárida de la molécula favorecen la tinción. Un LPS hidrolizado en forma ácida no es tefido presumiblemente por que se pierden partículas de Ac. 3-desoxi-D-manooctulosónico (KDO) (27, 45).

10. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Balows, A. & Hansler, W. J. Manual of clinical microbiology. 9a. edition. American Society for Microbiology. Washington 1991. pags.: 93-98, 460, 461.
- 2.- Berman, D.T. & Kurtz, R. S. Relationship of Biological Activities to Structures of *Brucella abortus* Endotoxin and LPS. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. (138): 98-101. 1987.
- 3.- Bienestock and Begus, A. D. Mucosal immunology. Immunol. (41): 249-263. 1980.
- 4.- Brade, L; Brandenburg, K; Kuhn, H; Kusumoto, S; Macher, I; Rietschel, E. & Brade, H. The immunogenicity and Antigenicity of Lipid A are influenced by Its Physicochemical State and Environment. Infect. Immun. 55 (11): 2636-2644. 1987.
- 5.- Buchanan, T. M. & Faber, L. C. 2-Mercaptoethanol *Brucella* Agglutination Test: Usefulness for predicting Recovery from Brucellosis. J. Clin. Microbiol. 11 (6): 691-693. 1980.
- 6.- Bundle, D. R.; Cherwonogrodzky, J. W.; Caroff, M. & Perry, M. B. The Lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *B. melitensis*. Ann. Inst. Pasteur/ Microbiol. (138): 92-98. 1987.
- 7.- Bundle, D. R.; Cherwonogrodzky, J. W.; Gidney, M. J.; Meikle, Peter J.; Perry, M. B. & Peters, T. Definition of *Brucella* A and M Epitopes by Monoclonal typing reagents and Synthetic Oligosaccharides. Infect. Immun. 57(9): 2829-2836. 1989.
- 8.- Bundle, D. R.; Cherwonogrodzky, J. W. & Perry, M. B. Characterization of *Brucella* polysaccharide B. Infect. Immun. 56 (5): 1101-1106. 1988.
- 9.- Bundle, D. R. & Perry M. B. Structure and Serology of the *Brucella abortus* O-antigen. Biochem. Society Trans. (13): 980-982. 1985.
- 10.- Caroff, M.; Bundle, D. R.; Perry, M.; Cherwonogrodzky, J. W. & Duncan, J. R. Antigenic S-Type Lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3. Infect. Immun. 46 (2): 384-388. 1984.
- 11.- Cross, A. S.; Sidberry, H. & Sadoff, J.C. The Human Antibody Response During Natural Bacteremic Infection with Gram-Negative Bacilli against Lipopolysaccharide

- Core Determinants. J. Infect. Dis. 160 (2): 225-236. 1989.
- 12.- Cruz, R. y Calderón, E. Pared Celular de Bacterias Gram negativas. Infectologia (11): 675-682. 1982.
- 13.- Delgado, D. Estructura y propiedades biológicas de algunos antígenos de Brucella. ENBC. Tesis Doctoral. México 1987.
- 14.- Dubray, G. Protective Antigens in Brucellosis. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. (138): 84-87. 1987.
- 15.- Dulbecco, D. Tratado de Microbiología. SALVAT. Barcelona, España 1988. pags. : 838-842.
- 16.- Evans, A. S. & Feldman, H. A. Bacterial infections of Humans Epidemiology and Control. Plenum Medical Book Company. New York and London 1982. Cap. 6. pags: 119-139.
- 17.- Garin-Bastuji, B.; Bowden, R. A.; Dubray, G. & Limet, J. N. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Immunoblotting Analysis of Smooth-Lipopolysaccharide Heterogeneity among *Brucella* Biovars Related to A and M Specificities. J. Clinical Microbiol. 28 (10): 2169-2174. 1990.
- 18.- Gell, P. G. H. Clínica inmunológica. 2a ed. Edit. Salvat. Barcelona 1980.
- 19.- Goldbaum, F. A.; Rubbi, C. P.; Wallach, J. C.; Miguel, E.; Baldi, P. C. and Fossati, C. A. Differentiation between Active and inactive Human Brucellosis by Measuring Antiprotein Humoral Immune Responses. J. Clin. Microbiol. 30 (3): 604-607. 1992.
- 20.- Hernández V., R. Ma. Proteínas de la Membrana Externa de las Bacterias Gram negativas. Infectologia (8): 371-378. 1983.
- 21.- Hitchcock, P. Aberrant Migration of Lipopolysaccharide in Sodium Dodecyl Sulfate/Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Eur. J. Biochem. 133: 685-688. 1983.
- 22.- Hitchcock, P. J. & Brown, T. M. Morphological Heterogeneity Among Salmonella Lipopolysaccharide Chemotypes in Silver-Stained Polyacrylamide Gels. J. Bacteriol. 154 (1): 269-277. 1983.

- 23.- Izzul, S.; Morrison, D. C.; Curry, B. & Dixon, F. J. Effect of Lipid A-Associated protein and Lipid A in the expression of Lipopolysaccharide Activity. I. Immunological activity. Immunol. 40 (1-3): 473-482. 1980.
- 24.- Joint Food and Agricultura Organization. Word Health Organization, Expert Committe on Brucellosis. Sixth Report. WHO/Report. Series No. 740. Geneva, 1986.
- 25.- Jongh-Leuvenink, J. De; Breede, R. J. W.; Marcelis, J. H.; Bos, M. De & Verhoef, J. Detection of Antibodies against Lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella* R and S Strains by Immunoblotting. Infect. Immun. 50 (3): 716-720. 1985.
- 26.- Kerr, W. R.; Payne, D. J. H.; Robertson, L. & Coombs, R. R. A. Immunoglobulin Class of *Brucella* Antibodies in Human Sera. Immunol. (13): 223-225. 1967.
- 27.- Kropinsky, A. M.; Berry, D. & Greenberg, E. P. The basis of Silver Staining of Bacterial Lipopolysaccharides in Polyacrylamide Gels. Curr. Microbiol. 13: 29-31. 1986.
- 28.- Lesse, A. J.; Campagnari, A. A.; Bittner, W. E. & Apicella, M. A. Increased Resolution of Lipopolysaccharides and Lipooligosaccharides utilizing Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. J. immunol. Meth. 126 (1): 109-117. 1990.
- 29.- Lopez M.; A. Brucellosis: Avances y perspectivas. INDRE # 6 S.S.A. México, 1991.
- 30.- Meikle, P. J.; perry, M. B.; Cherwonogrodzky, J. W. and Bundle, D. R. Fine Structure of A y M Antigens from *Brucella* biovars. Infect. Immun. 57 (9): 2820-2828. 1989.
- 31.- Moreno, E.; Borowiak, D. & Mayer, H. *Brucella* Lipopolysaccharides and Polysaccharides. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. (138): 102-105. 1987.
- 32.- Moriyón, I.; Gamazo, C. & Díaz, R. Properties of the Outer Membrane of *Brucella*. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. (138): 89-91. 1987.
- 33.- Morrison, D. C. & Ulevitch, R. J. The effects of bacterial Endotoxins on Host Mediation Systems. Am. J. Pathol. 93 (2): 527-537. 1978.

- 34.- Morrissey, J. H. Silver Stain for Proteins in Polyacrylamide Gels: A Modified Procedure with Enhanced Uniform Sensitivity. Anal. Biochem. (117): 307-310. 1981.
- 35.- Pellicer, T.; Ariza, J.; Fo, A.; Pallares R. & Gudiol F. Specific Antibodies detected during Relapse of Human Brucellosis. J. Infect. Dis. 157 (5): 918-924. 1988.
- 36.- Plommet, M.; Serre, A. & Fensterbank, R. Vaccines, Baccination in Brucellosis. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. (138): 117-121. 1987.
- 37.- Ruiz, R., R. Investigación de reacciones cruzadas a *Brucella* en sueros de pacientes con *V. cholerae*. Tesis de Licenciatura. UNAM. México 1993.
- 38.- Santos, J. M.; Verstrete, D. R.; Pereyra, V. Y. & Winter, A. J. Outer Membrane Proteins from Rough. Stains of Four *Brucella* Species. Infect. Immun. 46 (1): 188-194. 1984.
- 39.- Serre, A.; Bascoul, s.; Vendrell, J. P. & Cannat, A. Human Immune Response to *Brucella* infection. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. (138): 113-117. 1987.
- 40.- Stott, D. I. Immunoblotting and dot blotting. J. Immunol. Meth. 119 (1-2): 153-187. 1989.
- 41.- Sriranganathan, N.; Baoye, S. M.; Schurig, G. & Misra, H. Superoxide dismutases of virulent and avirulent strains of *Brucella abortus*. Vet. Microbiol. 26: 359-366. 1991.
- 42.- Stryer, L. Bioquímica. Tomo I. 3a. ed. Reverté, S. A. Barcelona 1988. pp: 43-47.
- 43.- Towbin, H. & Gordon, J. Immunoblotting and Dot Immunobinding Current Status and Outlook. J. Immunol. Meth. 72 (2): 313-340. 1984.
- 44.- Towbin, H.; Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76 (9): 4850-4854. 1979.
- 45.- Tsai, Chao-Ming & Frasch, C. E. A Sensitive Silver Stain for Detecting Lipopolysaccharides in Polyacrylamide Gels. Anal. Biochem. (119): 115-119. 1982.
- 46.- Valle, V., J. G.; Inmunoensayo Enzimático en papel de nitrocelulosa (DOT-ELISA) como Método Diagnóstico en la Brucelosis Humana. Tesis Licenciatura. UNAM. México 1992.

- 47.- Van Dam, Alje P.; Van den Brink, Heleen G. & Smmenk, R. J. T. Technical Problems Concerning the use of Immunoblots for the detection of Antinuclear Antibodies. J. Immunol. Meth. (129): 63-70. 1990.
- 48.- Verstreate, D. R. & Winter, J. Comparison of Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis Profiles and Antigenic Relatedness Among Outer Membrane Proteins of 49 *Brucella abortus* Strains. Infect. Immun. 40 (1): 182-187. 1984.
- 49.- Winter, A. J. Outer Membrane Proteins of *Brucella*. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. (138): 87-89. 1987.
- 50.- Yeh, Hung-Yueh & Jacobs, D. M. Characterization of Lipopolysaccharide fractions and their interactions with Cells and Model Membranes. J. Bacteriol. 174 (1): 336-341. 1992.
- 51.- Young, E. J. & Carvel, M. J. Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects. Boca Raton, FLA.: CRC PRESS, INC. 1989.