



37
29.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

**DESARROLLO Y ESTANDARIZACIÓN DE UN
INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO INDIRECTO COMO
MÉTODO DE DIAGNÓSTICO PARA LA BRUCELOSIS
CAPRINA UTILIZANDO PROTEÍNAS DE LA
MEMBRANA EXTERNA DE *Brucella melitensis*.**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
PRESENTADA POR
DANIEL MARTÍNEZ GÓMEZ**

ASESORES:

**MVZ, M. Sc., Ph. D. ALFREDO SAHAGÚN RUIZ
MVZ, M. en C. EDGAR ALFONSECA SILVA
MVZ, M. Sc., Ph. D. FRANCISCO SUAREZ GÜEMES
MVZ, Dr. EFREN DÍAZ APARICIO**



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MÉXICO, D.F., 1998

263994



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

ESCEPTICISMO

Dios de la controversia
concédeme el olvido
de la mentiras en las que pude creer,

otórgame el perdón
por las verdades que sostengo
a las que quizás un giro de la Tierra
vuelva falsas,

¿Se sabrá algo para siempre?
Nada se abraza como siempre,
alma abrasada desde siempre.
Si abras vacías habrás visto...

Ida Vitale

A MI PADRES ANTONIA Y FRANCISCO

A MIS HERMANOS

PATY

ANA

FRANCISCO

MIRIAM

FABY

GRACIAS POR SU APOYO INCONDICIONAL

A MI SOBRINA

ELISEL

*A LA MEMORIA
DE MIS ABUELOS*

JOSE GÓMEZ

JOSE GARCÍA

AGRADECIMIENTOS

Dr. Roberto A. Cervantes O. por su confianza y gran apoyo

Dr. Antonio Verdugo R. por su ayuda incondicional

Mis asesores: Alfredo Sahagún R., Edgar Alfonseca S, Efrén Díaz A. y Francisco Suárez Güemes por su lecciones y paciencia

Mi jurado: Dr. Alejandro de la Peña M., Dra. Rosa Elena Miranda M., Dr. Abel Trujillo G.

A mis amigos del Departamento de Microbiología e Inmunología: Cristina, Carolina, Ruth, Mirna, María Elena, Rigoberto, Rocío, Jesús, Hugo, Elvia, Josefina, Xóchitl, Francis, Marino, Armando, Alejandro, Ana Laura, Mayra, Rosa, Elba, Beatriz, Olivia, Héctor, Estela, Estrella, Arturo, Ina, Paty, Lirio, Gilberto, Sonia, Grissel, Laura y Alberto

A mis amigos de Divulgación: Dr. Gómez Garavito, Enrique, Jorge y Nidia.

Resumen

Se realizaron extracciones de proteínas de la membrana externa de una cepa de campo de *Brucella melitensis*, y se utilizaron como antígeno para desarrollar y estandarizar un ELISA Indirecto, utilizando 30 sueros de animales positivos con aislamiento bacteriológico y 42 sueros de animales negativos provenientes de una hato libre, también fueron evaluados sueros de animales vacunados con *Brucella melitensis* Rev1 dosis reducida y completa, *Brucella abortus* RB51 y *Brucella abortus* S2308::Tn5. Los resultados indican que el ELISA con 2µg/ml de antígeno, con una dilución de suero de 1/1250, tiene una especificidad y sensibilidad del 100%, entre animales positivos y negativos, para los animales vacunados, se encontró una especificidad de: 100, 77, 57 y 83% respectivamente. También se realizó un análisis de *Western Blot*, con los sueros mencionados; en los sueros de los animales positivos se observó una zona de reacción que va de los 25 a los 80 Kda, junto con otras bandas de 89, 45 y 17 Kda las cuales no fueron observadas en los sueros de los animales negativos.

INDICE

INTRODUCCIÓN	pag.
• Epidemiología de la brucelosis.....	1
• Composición antigénica de <i>Brucella</i>	1
• Estudios Moleculares.....	3
• Patogenia de la brucelosis.....	4
• Control de la brucelosis.....	6
HIPÓTESIS y OBJETIVOS.....	12
MATERIAL Y MÉTODOS	
• Sueros.....	13
• Realización de la Prueba Rosa de Bengala.....	13
• Cultivo de bacterias.....	13
• Obtención de preparaciones de proteínas de la membrana externa (prPME).....	13
• Hidrólisis de las Proteínas de Membrana Externa de <i>B. melitensis</i>	14
• Cuantificación de proteína.....	14
• Geles de Poli(acrilamida con Duodecil Sulfato de Sodio (SDS PAGE).....	14
• Inmunoelectrotransferencia tipo Western Blot (WB).....	15
• Unión del antígeno a la fase sólida.....	15
• Tratamiento de desnaturalización parcial del antígeno previo a su fijación en las placas.....	15
• Titulación del suero y antígeno.....	16
• Titulación del conjugado.....	16
• Realización de la Técnica de ELISA.....	16
• Análisis de resultados.....	16
RESULTADOS	
• Resultados en la prueba RB.....	18
• Separación electroforética de las prPME de <i>B. melitensis</i>	19
• Cuantificación de proteínas.....	19
• Inmunoelectrotransferencia tipo Western Blot.....	20
• Estandarización de la Técnica de ELISA.....	20
• Prueba de U de Mann Whitney.....	22
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES.....	32
BIBLIOGRAFÍA.....	33

INTRODUCCIÓN

EPIDEMIOLOGÍA DE LA BRUCELOSIS

La brucelosis ha permanecido, desde la descripción del agente etiológico en 1887 hecha por Bruce, hasta la fecha, como una de las zoonosis más importantes a nivel mundial.¹ La enfermedad es producida por bacterias del género *Brucella*, en animales domésticos y silvestres.² Seis especies integran este género: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* y *B. neotomae*. Esta clasificación está basada en pruebas bioquímicas, patogenicidad, y hospedador afectado, sin embargo estudios recientes de secuenciación de ADN de estas bacterias (16S y 35S RNA) han mostrado homología en todas las especies, por lo que Halling³ propuso a *B. melitensis* como la única especie, considerando las demás como sus biovariedades. Por otra parte el reciente aislamiento de *Brucella* reportado a partir de mamíferos marinos ha extendido su rango de distribución ecológica.⁴

Brucella melitensis es considerada el principal agente etiológico de la brucelosis en cabras, mientras que *B. abortus* lo es en bovinos,^{1, 5, 6} sin embargo, se ha observado en algunos países que han logrado erradicar la brucelosis por *B. abortus* en el ganado bovino, que *B. melitensis* infecta a bovinos, colocándose como agente etiológico de brucelosis bovina y la vacunación con *B. abortus* S19 en ganado bovino, no protege en forma efectiva contra *B. melitensis*.¹ Además la vacunación contra la brucelosis bovina no es una práctica muy común en la ganadería de países en vías desarrollo.

En la brucelosis humana, *B. melitensis* es la especie más comúnmente aislada (85%). La prevención de esta enfermedad depende del control de las infecciones por *Brucella* en los animales domésticos y silvestres.^{7, 8, 9}

COMPOSICIÓN ANTIGÉNICA DE *Brucella*

Las bacterias del género *Brucella* tienen forma de cocobacilos pequeños (0.5-0.7 μm x 0.6-1.5 μm), no muestran agrupación definida, son Gram negativos, son inmóviles, no poseen flagelos, no tienen cápsula y no esporulan. Son microorganismos quimiorganotrofos aerobios, que crecen en medios enriquecidos y selectivos en el primoaislamiento, como en el agar Farrel. Algunos biotipos de *B. abortus* (biotipos 1, 2, 3 y 4) y *B. ovis* requieren de una atmósfera con 5-10% de CO_2 .^{2, 10, 11}

La envoltura celular de *Brucella* consta de una membrana citoplasmática y una membrana externa, separadas por el espacio periplásmico que contiene el peptidoglucano (PG) y otros componentes como enzimas. En *B. abortus* se han identificado una Cu/Zn superóxido dismutasa y una catalasa.^{12, 13} El PG

juega un papel importante en la estructura de *Brucella* al conferirle una mayor resistencia a la desintegración física. Observaciones mediante microscopía electrónica mostraron una mayor interacción de este con la membrana externa de *Brucella*, a la observada en *Escherichia coli*. También mostraron que mientras la inactivación por calor en *B. abortus* causa un colapso en la membrana interna, la membrana externa permanece con su forma, a pesar de la liberación de importantes cantidades de lipopolisacárido (LPS) y otros materiales, lo que sugiere que la interacción del PG con la membrana externa confiere a esta última una rigidez mayor, en comparación con otras bacterias Gram negativas.¹²

La membrana externa de *Brucella* contiene LPS, el cual está compuesto por el lípido A; ácidos grasos como la fosfatidilcolina, que es el más abundante (37% del total de fosfolípidos) en *B. melitensis* y *B. abortus* seguido de fosfatidiletanolamina (33%), cardiolipina (20%) y fosfatidilglicerol (10%);^{11, 12} una región núcleo (compuesta de glucosa, manosa y quinovosamina) y la cadena O, la cual es un homopolímero de aproximadamente 100 residuos de 4 amino-4,6-dideoximanosa. Las diferencias en la unión de los residuos forman los distintos epitopos en el LPS, así el epitopo tipo A dominante, está determinado por cinco residuos consecutivos unidos por enlaces alfa 1-2, mientras que el tipo M dominante, está determinado por cuatro residuos consecutivos donde se incluye un enlace alfa 1-3,¹ aunque se reportan cepas las cuales muestran epitopos A y M.¹³ Debido a la presencia de 4 amino-4-6 dideoximanosa, existe una reacción cruzada con el LPS de: *Escherichia hermanni*, *E. coli* O:157, *Salmonella* O:30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio cholera* O:1, y *Yersinia enterocolitica* O:9.^{1, 12, 14} La estructura del LPS es similar en las cepas rugosas de *Brucella*, con la diferencia de que estas carecen o tienen reducido la cadena O, por lo que su antigenicidad está determinada por la región núcleo.^{1, 12, 15} El LPS de *Brucella* es cuantitativamente y cualitativamente diferente al de las enterobacterias Gram negativas, ya que no es pirógeno, no activa al sistema del complemento a nivel significativo y es muy débil como mitógeno de células B murinas.^{11, 16}

Otro antígeno descrito a partir de cepas lisas de *Brucella* es el hapteno nativo. Este polisacárido hapténico, fue descrito originalmente en pruebas de inmunoprecipitación de extractos de cepas lisas de *Brucella*, está relacionado serológicamente con un componente presente sólo en las cepas rugosas de *B. melitensis* 115 denominado originalmente polisacárido B.¹⁷ El hapteno nativo y el polisacárido ha sido sujeto de controversia ya que algunos autores han identificado al polisacárido B como glucanos cíclicos periplásmicos en *B. melitensis* 16M y otras cepas lisas de *Brucella*, mientras que otros como una cadena O y región núcleo, resultante de la hidrólisis hipotética del LPS durante su extracción,¹ sin embargo Moriyón¹² afirma que la existencia de una cadena O ligada o no a los polisacáridos de la región núcleo-lípido de la

membrana externa de varias bacterias Gram negativas, es común y ocurre como resultado de una variación en la reacción de polimerización de la región núcleo y el lípido A.

En la membrana externa de *Brucella* existen proteínas (PME), las cuales han sido identificadas y clasificadas, así existen proteínas mayoritarias con pesos moleculares que van desde los 25-27 y 31/34 a 36/38 kDa llamadas proteínas del grupo 3 y grupo 2 respectivamente, estas se encuentran ligadas fuertemente al PG.¹⁸ Las proteínas del grupo 3 eran consideradas la contra parte en *Brucella* de OmpA de *E. coli* sin embargo, en estudios recientes de clonación y secuenciación del gen que codifica para la proteína mayoritaria de 25 kDa de *B. abortus*, concluyó que esta proteína no pertenece a la familia de OmpA.¹⁶ Las proteínas del grupo 2 han sido identificadas como porinas, y se ha descrito que estas PME en *B. abortus* S19, *B. canis* y *B. abortus* 1119-3 poseen poros relativamente mas amplios que las PME de *B. melitensis* B115 y *B. abortus* 45/20.¹⁹ Esta diferencia en el diámetro de los poros puede explicar la diferente sensibilidad a los colorantes mostrada por las diferentes especies del género *Brucella*.¹⁹ Las proteínas de 31 a 34 kDa son más abundantes en *B. melitensis* que en *B. abortus*.^{18 20 21} Otras proteínas con pesos moleculares distintos que han sido identificadas como proteínas minoritarias tienen pesos de 10 16.5, 19 y 89 kDa. La proteína de 89 kDa pertenece a las proteínas del grupo minoritario 1 cuyo peso molecular es de 88-94 kDa.^{18, 20, 21} Por otro lado Gomez-Miguel y Moriyón²² describieron una lipoproteína covalentemente ligada al PG, como una proteína mayoritaria, con un peso de 8 kDa.

ESTUDIOS MOLECULARES

En la actualidad se tienen identificados algunos de los genes, que codifican estas proteínas:

- *omp2a* y *omp2b* codifican para proteínas de 36 kDa que tiene una identidad del 30 al 40% con la secuencia de aminoácidos de la proteína RopA de *Rhizobium leguminosarum*. Estas proteínas al ser clonadas en *E. coli* fueron transportadas a la membrana externa y Omp2a aumentó la permeabilidad hidrofílica, lo que sugiere la formación de poros en la membrana externa. Por otra parte Omp2b formó oligómeros resistentes a la desnaturalización en presencia de SDS, lo cual es característico de porinas bacterianas. Se ha sugerido que Omp2a forma poros mayores que Omp2b.²³
- *omp25* este gen codifica para una proteína de 25 kDa, estudios de secuenciación y determinación de aminoácidos mostraron una homología insignificante con *ompA* de diferentes bacterias Gram negativas, no obstante se reportó una identidad del 43% con RopB de *Rhizobium leguminosarum*, RopB esta también asociada con el PG. Pruebas de inmunogenicidad mostraron que *omp25*, expresada en la superficie de *E. coli* produjo una fuerte respuesta inmune con altas concentraciones IgG isotipo 2a.²³

- *omp 31* codifica para una proteína que tiene una similitud del 34% con RopB de *Rhizobium leguminosarum*. Al ser expresada en *E. coli*, mostró al igual que en *B. melitensis*, múltiples bandas de 28 a 34 kDa en geles de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (SDS PAGE). La variación en el peso molecular puede deberse a la asociación que tiene con el PG en ambas bacterias. Por otra parte esta proteína formó polímeros resistentes a la desnaturalización en presencia de SDS, como otras porinas bacterianas.²³
- *omp19*, *omp16* y *omp10* codifican para proteínas de un grupo minoritario, aunque su topología no es conocida aun, se sugiere que son hidrofóbicas, con base en la predicción de su composición de aminoácidos, por lo que deben localizarse en el espacio periplásmico, jugando algún papel en la interacción de la membrana externa con el PG, sin embargo se ha demostrado que epitopos de estas proteínas están expuestos en la superficie de la célula. Por lo anterior se sugiere la existencia de lipoproteínas que pueden estar expuestas en la superficie y estar por otro lado ligadas a algunos lípidos.^{22, 23, 24}

Mediante microscopía electrónica y anticuerpos marcados, se observó que las PME con pesos moleculares de 10, 16.5, 19, 25 a 27, 31 a 34, 36 a 38 y 89 kDa están expuestas en la superficie de la bacteria, aunque la unión de los anticuerpos estuvo determinada por la longitud de la cadena O del LPS. Las proteínas de 31 a 34 kDa están más expuestas en *B. abortus* cepa rugosa, *B. melitensis* y *B. suis* que en las demás especies.^{21, 25, 26}

Por otra parte Gamazo y Moriyón²⁷ demostraron que cepas lisas y rugosas de *B. melitensis* liberan cierta cantidad de material de la membrana externa durante su crecimiento. Así se identificaron, de un medio donde creció *B. melitensis*, las proteínas mayoritarias de pesos moleculares de 25 a 30 kDa y proteínas minoritarias con pesos moleculares de 18, 22 y 84 kDa, igualmente se encontraron fosfolípidos como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y cardiolipina.

También ha podido establecerse que existen cepas de *B. melitensis* (cepa EP) que exhiben en su superficie LPS de ambos tipos, es decir son cepas con morfología lisa-rugosa, característica particular que ha sido también descrita en *Salmonella typhimurium* como cepas semirugosas.¹³

PATOGENIA DE LA BRUCELOSIS

Mecanismos de Patogenicidad

Los miembros del género *Brucella* son considerados como patógenos intracelulares capaces de sobrevivir y multiplicarse dentro de las células fagocíticas y tejidos linfoides. La persistencia de estas

bacterias dentro de las células es de suma importancia en el desarrollo de la reacción granulomatosa típica de la enfermedad.²

Las cepas de *B. melitensis* y *B. abortus* con morfología lisa son más virulentas que aquellas con morfología rugosa, ya que las bacterias lisas son capaces de sobrevivir y hasta de multiplicarse en macrófagos, a diferencia las cepas rugosas que no se reproducen y son eventualmente eliminadas.² La sobrevivencia de *Brucella* dentro de las células fagocíticas esta asociada a la composición de la pared celular de la bacteria. Se ha sugerido que *Brucella* no es capaz de estimular la producción de oxidantes necesarios para iniciar la destrucción de bacterias.^{16, 28} Por otra parte la eliminación de agentes bacterianos por fagocitosis requiere de la unión del fagosoma-lisosomas, y se ha demostrado que *Brucella* cepa lisa inhibe esta unión.¹³ Thoen y Cheville² reportaron que un extracto de *B. abortus* cepa lisa inhibía la unión del fagosoma y los lisosomas, mientras que un extracto de *B. abortus* rugosa fallo para inhibir esta fusión, al analizar ambos extractos se observaron diferencias en la cantidad de azúcares en los extractos y en la presencia de 5 monofosfato de guanosina y adenina (5GMP, 5AMP) que son los responsables de inhibir la fusión lisosoma-fagosoma en neutrófilos bovinos, Adicionalmente interfieren en la activación del sistema de la mielo-peroxidasa y la producción del factor de necrosis tumoral. Estas observaciones pueden explicar porque las mutantes en *purE* donde la producción de 5GMP y 5AMP está suprimido se comportan como cepas avirulentas.¹ Adicionalmente las cepas virulentas de *Brucella* escapan a la destrucción por los leucocitos al resistir los efectos de los sistemas oxígeno-dependientes e independientes debido a la composición de su pared. Así pues, *B. abortus* cepa lisa virulenta ha demostrado ser más resistente a la destrucción por el sistema de la mieloperoxidasa que las cepas de tipo rugoso.²

En *B. abortus* se han encontrado una Cu-Zn y una Mn superóxido dismutasa que pueden tener un papel significativo en la fase temprana de la infección intracelular.^{1, 16} ya que estas enzimas protegen a la bacteria de los efectos tóxicos de los radicales superóxido, al convertirlos en agua y oxígeno. Estas mismas enzimas han demostrado ser protectoras para otras bacterias como *Nocardia asteroides* y *Shigella flexneri* y se han sugerido como factor de virulencia para *Mycobacterium tuberculosis*. *Brucella* produce dentro de este mismo grupo de enzimas una catalasa que forma parte del sistema de defensa antioxidante de la bacteria, que la protege del efecto del oxígeno liberado por los macrófagos previo a la fagocitosis. La localización periplasmática de esta enzima sugiere un papel en la defensa de la bacteria contra el peróxido de hidrógeno exógeno en vez de la remoción del peróxido citoplasmático producido durante la respiración. Se ha observado también que la supervivencia dentro de los macrófagos esta asociada también con la síntesis de proteínas de peso molecular de 17, 24, 28, 60 y 62 kDa. La proteína de 62 kDa podría corresponder a una Hsp62 de *E. coli* y la proteína de 60 kDa a una variante ácido-inducida de esta. La proteína de 24 kDa es

también una proteína ácido-inducida y su producción se correlaciona con la supervivencia de la bacteria bajo condiciones ácidas. Las proteínas de 17 y 28 kDa son inducidas específicamente por macrófagos y se correlacionan con la supervivencia intracelular. Este tipo de proteínas han sido descritas en otras especies, como el sistema PhoP-PhoQ de *Salmonella typhimurium*.^{1,29}

Infección por *Brucella*

El establecimiento de la infección por *Brucella* comprende dos puntos importantes depende primero del número y virulencia de las bacterias y, segundo de la resistencia relativa del hospedero, determinada por los mecanismos inespecíficos y específicos de la inmunidad. Thoen y Cheville señalan que aproximadamente el 18% de las cruzas de ganado son resistentes naturales a las infecciones por *B. abortus*.²

Las bacterias del género *Brucella* penetran la mucosa de la cavidad nasal u oral, para enseguida ser transportadas dentro o fuera de las células fagocíticas a los linfonodos regionales, los cuales comienzan a agrandarse debido a la hiperplasia e inflamación. Estos cambios pueden requerir varias semanas para desarrollarse y pueden persistir por meses. Si la bacteria no se controla y elimina en los linfonodos, puede diseminarse por el organismo vía linfática y sanguínea. *Brucella* alcanza al útero via hematogena y comienza a infectar los trofoblastos de los placentomas, los trofoblastos corioalantoideos adyacentes comienzan a infectarse, ocurriendo un crecimiento masivo de la bacteria. Estas células eventualmente se rompen y ulceran la membrana corioalantoidea. La ulceración de la membrana corioalantoidea está acompañada de un proceso inflamatorio donde la bacteria alcanza el útero. La bacteria se disemina via hematogena al feto y los placentomas, el aborto puede ocurrir en este momento.^{2,30}

La capacidad para catabolizar eritrol es una característica universal del género *Brucella*, la presencia de elevadas cantidades de eritrol en el tejido uterino del ganado bovino y otras especies, incluyendo ovejas, cabra y cerdas se correlaciona con el tropismo de *Brucella*. Por otra parte extractos de fluidos fetales, placenta y córion mostraron ser estimulantes en el crecimiento de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*.¹ La cepa avirulenta de *B. abortus* 19 vacunal ha perdido la capacidad de utilizar eritrol y por lo tanto es la única cepa que es inhibida por la presencia de eritrol (1 mg/ml).¹⁶

CONTROL

En caprinos así como en otros animales domésticos, los abortos, la caída de los índices de fertilidad y otros problemas producidos por la brucelosis, hacen de esta enfermedad una de las más importantes económicamente En México la caprinocultura representó un ingreso anual en 1995 de \$673,255.040 y las

pérdidas sólo por abortos, para ese mismo año, debido a la brucelosis caprina fue de \$139,540,996 según datos de la CONETEB.

México estableció la Campaña Nacional contra la Brucelosis en agosto de 1970, y a partir de agosto de 1981, se le dio el carácter de obligatorio, general y permanente en todo el territorio nacional. En 1996 se publicó la Norma Oficial Mexicana, (NOM-EM-011-Z00-1994), que tienen por objeto establecer los procedimientos, actividades, estrategias, y técnicas para el control y eventual erradicación de la brucelosis en el ganado.^{6,31}

El programa de control de la brucelosis se basa en la vacunación de los pequeños rumiantes con la cepa lisa atenuada de *B. melitensis* Rev 1.^{2, 6, 31, 32} La Norma Oficial Mexicana establece dos tipos de vacuna dependiendo de la población objetivo: vacuna *B. melitensis* Rev 1 en dosis clásica ($1 \text{ a } 2 \times 10^9$ UFC) para aplicarse en hembras de tres a cuatro meses y dosis reducida (1×10^5 UFC) para hembras de cualquier edad, aun gestantes.⁶

Es necesario para la inducción de una respuesta inmune efectiva, duradera y protectora contra patógenos intracelulares, la vacunación con cepas vivas atenuadas o múltiples aplicaciones del antígeno inactivado indicado junto con un adyuvante para estimular los mecanismos inmunes celulares.¹³ *B. melitensis* Rev 1 es una cepa viva atenuada originada de una virulenta, esta confiere protección a ovejas y cabras contra la infección con *B. melitensis* y a borregos contra la infección con *B. ovis*. Dependiendo de la dosis administrada durante la gestación, pueden ocurrir abortos.³² Crowther, citado por Blasco³², demostró que dosis reducidas de Rev 1 (10^5 a 10^7) inducen abortos cuando son administradas subcutáneamente en ovejas durante el segundo y tercer mes de la gestación. Esta cepa fue probada en ganado bovino y los resultados indicaron que Rev 1 protege bien o mejor que *B. abortus* S19 en bovinos.¹³ Blasco³² considera a *B. melitensis* Rev 1 como la mejor vacuna disponible para la profilaxis en pequeños rumiantes, indica que las prácticas de prueba y sacrificio no son útiles ya que han fallado en el control de brucelosis, sugiere además que la vacunación completa del hato es el único método práctico que logra el control de la infección por *B. melitensis* en áreas donde la prevalencia es alta, los sistemas de manejo son extensivos y existe un bajo nivel socioeconómico. En un experimento comparativo se demostró que la vía de administración conjuntival reduce el número de abortos inducidos por la vacunación comparandola con la vía subcutánea, por lo que se ha sugerido que usando de *B. melitensis* Rev 1, dosis completas por la vía conjuntival en programas de vacunación completa del rebaño es posible reducir el número de abortos inducidos por la vacunación, confiriendo un nivel adecuado de protección contra la brucelosis en pequeños rumiantes, sin embargo un programa de vacunación completa con un método de aplicación totalmente inocuo no existe. Se han

sugerido otras cepas para la vacunación de pequeños rumiantes, como es el caso de *B. melitensis* 53H38, pero se demostró que Rev 1 confiere mayor inmunidad.¹³

Recientemente las cepas rugosas de *Brucella* han mostrado ser útiles como vacunas. Debido a que no inducen anticuerpos contra la cadena O, por tenerla incompleta, no interfieren con las pruebas serológicas. Dentro de este grupo de vacunas están *B. abortus* RB51 y *B. abortus* S2308::Tn5. La primera es una cepa rugosa estable (*rfbu-*), derivada a través de pases en medios con antibióticos (penicilina y rifampicina) de la cepa virulenta *B. abortus* S2308. La segunda es una cepa obtenida por ingeniería genética, a esta le fue introducido el transposon Tn5 que indujo que *B. abortus* 2308 cepa lisa mutara a rugosa en una forma estable, esta cepa no reacciona con anticuerpos monoclonales específicos para la cadena O del LPS.¹³ Estas vacunas inducen una protección significativa contra la infección con *B. abortus* semejante a la obtenida con *B. abortus* S19. En un estudio con un modelo murino se mostró que la inmunidad protectora inducida por la RB51 es dependiente de células T.³³ Sin embargo se requiere de mayor investigación para comprobar que esto sucede también en ovejas y cabras al ser vacunadas con RB51.¹³ Aunque, Soberón trabajando con cabras reportó un 70% de positividad en la prueba de reacción cutánea, en animales vacunados con la vacuna *B. abortus* RB51.³⁴

Aunque la cabra después de sufrir un aborto por *Brucella* aparentemente se recupera de la enfermedad y sus partos siguientes son normales, se ha demostrado que los animales quedan como portadores durante toda su vida, siendo los responsables de la perpetuación de la enfermedad en el rebaño.⁶ El uso de pruebas serológicas para el diagnóstico es también una parte importante dentro de la estrategia de control y erradicación de la brucelosis en los animales.^{2, 5, 6, 31} La brucelosis es una de las enfermedades en las que se ha desarrollado una amplia batería de pruebas diagnósticas. El aislamiento de la bacteria es la prueba inequívoca en casos positivos de la brucelosis,^{6, 8, 31} sin embargo es poco utilizada por lo laborioso y tardado que resulta el aislamiento de *Brucella spp.* Por otro lado los métodos más utilizados son los indirectos, es decir los que miden la respuesta del sistema inmune del animal, a través de la producción de anticuerpos contra *Brucella spp.*^{6, 31} Las pruebas serológicas para caprinos reconocidas por la campaña son:

- La Prueba de Tarjeta o Rosa de Bengala (RB), que utiliza como antígeno a *B. abortus* 1119-3, a una concentración celular del 3% y rosa de bengala como colorante, a un pH 3.6, para evitar las aglutinaciones inespecíficas. La sensibilidad y especificidad descritas, para esta prueba son de 79 y 100 % respectivamente.^{6, 31} En esta prueba la estructura celular que produce la reacción de los anticuerpos es el LPS, por lo que la vacunación disminuye la especificidad del RB. Jones y colaboradores citados por el Comité de brucelosis-CONASA⁶ informan que entre las cabras vacunadas subcutáneamente con la dosis completa de *B. melitensis* Rev 1 algunas continúan siendo positivas hasta 14 meses después de

la vacunación. En comparación las cabras adultas vacunadas con dosis reducidas, las reacciones en RB desaparecen a los 60 días. Así mismo Díaz Aparicio y colaboradores citados por el Comité de brucelosis-CONASA⁶ encontraron que al vacunar cabras adultas de una zona endémica con dosis reducida, los reactores posvacunales al RB desaparecieron a los 75 días. Mientras que Mancera y colaboradores citados por el Comité de brucelosis-CONASA⁶ observaron que cabras adultas vacunadas con dosis reducida de Rev 1 y mantenidas en aislamiento, los reactores a RB desaparecieron hasta los 180 días posvacunación.

- La prueba de Fijación del Complemento (FC) es una de las más confiables, por su sensibilidad y especificidad del 98%, sin embargo es laboriosa, difícil de estandarizar y no puede realizarse con sueros hemolizados o anticomplementarios.^{6, 31} En la prueba de FC se utiliza como antígeno *B. abortus* 1119 a una concentración celular de 4.5%, las inmunoglobulinas reaccionan también contra el LPS.^{6, 31, 35} En cabras vacunadas con la dosis clásica, los animales se hacen negativos hasta los seis meses posvacunación y en cabras vacunadas con dosis reducida los títulos duran entre dos y cinco meses.⁶ Es el polisacárido O (O-PS) la parte del LPS a la que se dirige la respuesta inmune humoral detectada por las pruebas serológicas anteriores.^{35, 36, 37}

Otras pruebas diagnósticas disponibles para brucelosis caprina:

- La Inmunodifusión radial inversa con hapteno nativo de *B. melitensis* 16M, en medio hipertónico (10% de NaCl) con solución de glicina ha sido evaluada en el ganado caprino, encontrándose que tiene una sensibilidad de 94.5% y una especificidad de 100%. En cabras vacunadas con dosis completa su especificidad es del 94% a los 120 días posvacunación y en cabras adultas vacunadas con dosis reducida es del 95% a los 30 días y del 100% a los 60 días. Siendo esta capacidad de diferenciar animales infectados de vacunados su principal atributo.^{6, 31}
- El Inmunoensayo enzimático (ELISA) es una prueba de reconocido valor para el diagnóstico en bovinos, en los que se han evaluado varios antígenos, mientras que en caprinos el número de trabajos es relativamente bajo. En un estudio de ELISA Indirecto (ELISA-I) utilizando como antígenos lipopolisacárido, hapteno nativo, proteínas citoplasmáticas de *B. melitensis* y como conjugado anti IgG caprino, la sensibilidad fue del 100% para el LPS y el hapteno nativo y del 96% para las proteínas. La especificidad fue del 98% para el LPS y el hapteno nativo y del 94% para las proteínas. Sin embargo en cabras vacunadas con la dosis completa a los 120 días la especificidad del ELISA con hapteno nativo y el LPS es del 17% mas baja que para la fijación del complemento y el rosa de bengala.^{6, 31} Un ELISA competitivo con anticuerpos monoclonales, resulto capaz de diferenciar cabras vacunadas de infectadas, poco tiempo después de ser inmunizadas. Esta prueba presentó solo el 66% de sensibilidad en caprinos

con aislamiento de *B. melitensis*, ya que requiere de que la infección tenga mas de 45 días para dar positivos.⁶

- El rivanol es una prueba poco estudiada en caprinos y se reporta que presenta una baja sensibilidad (88%) y una especificidad del 100%, parece ser una prueba adecuada para diferenciar animales vacunados de animales infectados, el único inconveniente que presenta, es que cuando los títulos de los sueros de animales vacunados en FC sobrepasan 1:4 - 1:16, resultan falsos positivos en rivanol.^{6,31}
- La prueba de anillo en leche para bovinos se modificó para su utilización en el diagnóstico de brucelosis en caprinos, debido a la ventaja que tiene como prueba de vigilancia epidemiológica. La prueba se realiza actualmente con un 1 ml de leche, 30 µl de antígeno, 300 µl de cloruro de sodio al 25% y 0.2 ml de crema de vaca negativa a brucelosis, incubando 1 hora en vez de 2 horas. En un estudio con caprinos vacunados se demostró que hay interferencia de anticuerpos vacunales con la prueba, sobre todo durante los primeros 30 días, mientras que a los 90 días es mínima.³⁸

La detección de anticuerpos no es siempre satisfactoria, ya que no todos los animales infectados producen niveles significativos de anticuerpos y además varias bacterias pueden producir reacciones cruzadas.³⁹ Una alternativa son las pruebas cutáneas basadas en la hipersensibilidad retardada, que es una manifestación de la inmunidad celular que refleja la respuesta de los linfocitos T y macrófagos sensibilizados frente antígenos de *Brucella*. La brucelina es el antígeno empleado en la prueba de hipersensibilidad retardada cutánea, contienen fracciones de proteína solubilizadas, responsables de la respuesta celular, este antígeno se prepara a partir de cepas rugosas para evitar la contaminación con el LPS liso. La prueba intradérmica consiste en la inyección de alérgeno proteico en la piel de los animales sospechosos. La reacción positiva se caracteriza por la aparición a las 24 horas de una zona engrosada, con eritema, que alcanza su máximo desarrollo a las 48-72 horas.^{14, 11} La inyección de mínimas cantidades de LPS liso podría causar una reacción inflamatoria, que interferiría con la interpretación de la prueba.^{11, 14} El inconveniente principal de este tipo de prueba es que los animales vacunados son positivos durante mucho tiempo.^{11, 14}

En la última década se buscó, a través de diferentes pruebas, detectar la presencia del organismo o partes del mismo, así se desarrollaron pruebas de ELISA para la detección de partes específicas de la bacteria, sin mucho éxito.⁴⁰ Adicionalmente se han desarrollado pruebas que detectan la presencia de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta prueba consiste en la detección y amplificación de segmentos específicos del ADN de la bacteria, delimitados por secuencias de nucleótidos específicos, conocidas como iniciadores, esta prueba es muy sensible. También se han desarrollado pruebas de hibridación *in situ*, en las cuales un segmento de ADN específico de la bacteria es marcado y se busca

que hibride con su homólogo en muestras clínicas.⁴⁰ Estas pruebas aun están en fase de investigación, por lo que se continua usando las pruebas serológicas para el diagnóstico de brucelosis.

El LPS utilizado como antígeno en las pruebas de diagnóstico serológico anteriores dificulta la distinción entre animales vacunados e infectados, lo que ha propiciado la investigación de nuevos antígenos que permitan hacer esta diferenciación. El uso de PME en el diagnóstico está muy difundido, pues muchos de ellas participan en el desarrollo de la respuesta inmune en contra del microorganismo, así como en la patogenia de la enfermedad, así, por ejemplo en *Yersinia pseudotuberculosis*, su virulencia esta directamente relacionada con una proteína con un peso molecular de 103 kDa (integrina), localizada en la membrana externa, esta misma proteína se utilizó en el diagnóstico a través de un ELISA, con una alta efectividad.⁴¹ Así mismo utilizando anticuerpos monoclonales contra PME en un ELISA competitivo, es posible diagnosticar aborto enzootico ovino producido por *Chlamydia psittaci* serovariedad 1 con una especificidad del 100%.⁴² Por su parte Vázquez⁴³ utilizando también preparaciones de PME en *Salmonella gallinarum* pudo diferenciar animales infectados de animales sanos. En otro estudio Barrow citado por Vázquez,⁴³ utilizando flagelina de *Salmonella montevideo* como antígeno de captura en un ELISA se pudo diferenciar la infección causada por *Salmonella enteritidis* y *Salmonella pullorum* de la infección causada por otras subespecies de *Salmonella* en pollos de engorda.

La utilización de varias proteínas en una prueba de diagnóstico podría permitirnos una sensibilidad y especificidad mayor a la obtenida con el LPS.^{21, 25, 26} El ELISA parece ser una mejor opción como prueba confirmatoria que la FC', ya que presenta menos variables y es más sencilla de realizar y estandarizar.⁴⁴

La técnica de ELISA nos permite determinar la presencia y concentración de un antígeno o un anticuerpo, mediante el uso de uno de ellos en fase sólida y el otro en solución, detectándose la formación del complejo antígeno-anticuerpo mediante un marcador enzimático. Esta técnica tiene la característica de presentar una alta sensibilidad, alta especificidad, rapidez y economía, comparable en estos aspectos a las técnicas: Inmunofluorescencia, Inmunolectroforesis y Radioinmunoensayo.^{44, 45}

Este trabajo pretende desarrollar mediante una combinación de proteínas de la membrana externa de *B. melitensis*, un inmunoensayo enzimático indirecto (ELISA-I) como prueba diagnóstica alternativa en el diagnóstico de brucelosis caprina.

HIPÓTESIS

La respuesta inmune humoral en caprinos contra *B. melitensis*, nos permitirá diagnosticar brucelosis a través de la técnica de ELISA indirecto, utilizando como antígeno de captura proteínas de la membrana externa.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y estandarizar un inmunoensayo enzimático indirecto, con proteínas de la membrana externa de *B. melitensis* (pmeELISA), como prueba para el diagnóstico de la brucelosis caprina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Obtener proteínas de la membrana externa de *B. melitensis*
- 2.- Determinar el perfil electroforético e inmunológico de las proteínas de membrana externa de *B. melitensis* obtenidas.
- 3.- Estandarizar una técnica de ELISA-indirecto, para el diagnóstico de brucelosis caprina

MATERIAL Y MÉTODOS

Sueros. Se utilizaron 30 sueros de animales positivos al aislamiento bacteriológico y 30 sueros de animales negativos a *Brucella* por las pruebas serológicas convencionales (RB y FC) provenientes de zona endémica y 28 sueros de animales vacunados proporcionados por el Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM (cuadro 1). Todos sueros de los animales vacunados fueron colectados a los 30 días posteriores a la aplicación de la vacuna.

Cuadro 1: Sueros de animales vacunados utilizados en el pmeELISA

NUMERO	TIPO DE VACUNA	DOSIS Y VÍA
7	<i>B. melitensis</i> Rev1	Reducida 1×10^5 UFC, subcutánea
9	<i>B. abortus</i> RB 51	2.5×10^8 UFC, subcutánea
6	<i>B. melitensis</i> Rev1	Completa 1×10^9 UFC, conjuntival
6	<i>B. abortus</i> S2308::Tn5	2.8×10^8 UFC subcutánea

Realización de la Prueba Rosa de Bengala. A los sueros utilizados en este estudio se les aplicó la prueba Rosa de Bengala^I como lo especifica la Norma Oficial Mexicana (NOM-EM-011-Z00-1994).

Cultivo de bacterias. Se utilizó una cepa de *B. melitensis* biotipo 1 aislada de un brote de campo en Torreón, Coahuila, obtenida del cepario del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Esta fue sembrada en agar *Brucella*^{II} y se incubó a 37°C durante 48 hrs, para obtener las bacterias de las cuales se preparó el antígeno.

Obtención de preparaciones de proteínas de la membrana externa. Los cultivos de *B. melitensis* fueron recolectados en 25 ml de una solución amortiguadora de fosfatos (1.9 mM NaH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, 154 mM NaCl) y centrifugados a 5000 x g por 15 min. recuperando el paquete celular y desechando el sobrenadante, esta operación fue repetida dos ocasiones. El paquete celular obtenido después de la última centrifugación fue suspendido en 10 ml de una solución con inhibidores de proteasas (SIP)(300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM PMSF^{III}, 0.1 mM TLCK^{IV}) y se inactivó a 65°C durante 60 min. en baño maría. Después de la inactivación se centrifugó nuevamente a 5000 x g. recuperando el paquete celular. el cual fue suspendido en 20 ml de agua bidestilada y fue sonicado^V 10 ciclos de 4.5 seg. por 9.5 seg. de descanso a una amplitud del 80%, para después centrifugar de nuevo a 5960 x g a 4°C durante 20 min. La pastilla fue recuperada y suspendida en 10 ml de SIP, con 2% de Triton X100^{VI} e incubado a 37°C durante una hora. Al finalizar el tiempo de incubación se centrifugó a 4960 x g a 4°C y se recuperó el sobrenadante.

^I Antígeno PRONABIVE

^{II} Oxoid

^{III} GIBCO BRL

^{IV} GIBCO BRL

^V Cole Parmer

^{VI} Boehringer Mannheim

el cual fue centrifugado a $48400 \times g$ durante 35 min a 4°C . La pastilla obtenida fue suspendida en 10 ml de SIP y se repitió la centrifugación por dos ocasiones más, finalmente, la pastilla fue suspendida en 100 μl de SIP y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Hidrólisis de las Proteínas de Membrana Externa de *B. melitensis*. Después de descongelar las preparaciones, se tomaron 30 μl , de pPME a las que se les agregó 1.0 ml de ácido tricloroacético al 5% y se incubaron durante 10 min en hielo. Después se centrifugó a $10000 \times g$ durante 15 min, el sobrenadante se desechó y la pastilla fue suspendida en 1 ml de Hidróxido de sodio 0.4 N, y mezclada perfectamente en un agitador, sin hacer espuma. Finalmente fueron cuantificadas.

Cuantificación de proteínas. La determinación de la concentración de proteína en las muestras, se realizó conforme al método de Bradford ⁴⁶ utilizando un lector de ELISA ^{VII} a una longitud de onda de 595 nm de la luz visible. Este método consiste básicamente en comparar la densidad óptica (DO) obtenida en una curva de calibración, preparada con albúmina sérica bovina (ASB), con la DO obtenida en la muestra problema. Este método fue ajustado para realizarse en microplacas de ELISA por lo que fue necesario estandarizar las concentraciones utilizadas en la curva de ASB, quedando a 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5 y 25 $\mu\text{g/ml}$ de ASB, estas concentraciones fueron utilizadas como curva de calibración. También se incluyó como blanco solución 0.4 NaOH, utilizada en el procedimiento de hidrólisis de las PME. Para todos los casos el volumen final de la dilución fue de 100 μl . Después de realizadas las diluciones se tomó 20 μl de cada una, se les agregó 150 μl de reactivo de Bradford (100 mg de Azul de Coomassie, 50 ml de Etanol de 95%, 100 ml de Ácido Fosfórico al 85%) y se realizó su lectura inmediatamente. Las lecturas que se obtuvieron en la curva de calibración, fueron graficadas, y el segmento más semejante a una línea fue ajustado a través de mínimos cuadrados, y se calculó su coeficiente de correlación. Estas lecturas ajustadas fueron graficadas nuevamente y se utilizaron para calcular la concentración de proteínas en la suspensión de PME.

Geles de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS PAGE). Se utilizó un aparato Mini Protean II ^{VIII}, para preparar geles de poliacrilamida. Los geles separadores fueron utilizados al 12% en 0.375 M Tris, pH 8.8 y geles concentradores fueron a 4% 0.125 M Tris, pH 6.8. Las PME fueron hervidas, previo a su separación electroforética. 5 min con solución de muestra (25 mM Tris, pH 6.8, 1% SDS, 1% Betamercapto-etanol, 15% Glicerol, 0.005% Azul de Bromofenol) La cantidad de proteína utilizada por pozo fue 8 μg de PME. Las PME de *B. melitensis* fueron separadas por electroforesis a 100 volts por 60-120 min y los geles fueron teñidos con plata o azul de Coomassie.

^{VII} Bio-Rad Modelo 3550

^{VIII} Bio-Rad Modelo 1000/1500

Inmunolectrotransferencia tipo Western Blot (WB). El análisis inmunolectroforético se realizó conforme al protocolo descrito por Towbin⁴⁷ utilizando geles de poliacrilamida al 12.5% y membranas de nitrocelulosa para la transferencia de proteínas^{IX}, con una solución de transferencia (25 mM de Tris, 192 mM Glicina, 20% v/v Alcohol Metílico). La electrotransferencia se llevó cabo a 100 volts durante una hora en un aparato Mini Trans-blot^X. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 1% durante 45 min. Estas membranas fueron cortadas en tiras de 0.5 cm de grosor y fueron enfrentadas a los sueros a una dilución 1/350 y 1/500. El conjugado^{XI} se utilizó a una dilución 1:3000. La solución de revelado que se utilizó fue el 4-cloro-naftol^{XII} y peróxido de hidrogeno (20 ml de Etanol, 60 mg de 4-Chloro-Naphtol, 100 µl de H₂O₂, 100 ml TBS).

Unión del antígeno a la fase sólida. Se utilizaron microplacas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano, para lectura colorimétrica^{XIII}. Las PME, fueron diluidas, utilizando como diluyente PBS pH 7.2 para ajustar concentraciones finales de proteínas (antígeno) de 1, 2, 3, 4 y 5 µg/ml. Se probaron dos formas de utilizar el antígeno, en la primera al antígeno no se le dio tratamiento alguno, quedando de forma nativa, en el segundo caso el antígeno fue sometido a un tratamiento de desnaturalización parcial previo a su fijación en la microplacas. Para obtener menor variación la periferia de la placa no fue utilizada. Se colocó 100 µl de cada solución de antígeno por pozo y se tapó la microplaca con plástico autoadherible dejándose incubar a temperatura ambiente toda la noche. Al día siguiente la placa se lavó tres veces con 250 µl/pozo de PBS-Tween^{XIV} (10 mM PBS, pH 7.2, 0.05% de Tween 20). Para bloquear la placa se agregó 100 µl de una solución de ASB^{XV} al 1% y se incubó a temperatura ambiente por dos horas y después se lavó tres veces con PBS-Tween. En algunas de las placas, la solución con antígeno no fue retirada, se cubrió con plástico autoadherible y se guardó a 4°C hasta su utilización, para ser utilizadas el procedimiento de bloqueo fue aplicado.

Tratamiento de desnaturalización parcial del antígeno previo a su fijación en las placas. Una alícuota de PME 50 µl, se le adicionó 1µl Betamercapto-etanol, 10 µl SDS al 10% y 39 µl SIP enseguida fue calentada por 5 min en baño maria a 96°C⁴⁸ y después se realizaron las diluciones correspondientes con PBS 7.2 y se fijaron en las placas.

^{IX} Amersham Life Science

^X Bio-Rad

^{XI} Anti IgG caprina marcada con peroxidasa PIERCE

^{XII} Research

^{XIII} Nunc-Immuno Plate Maxisorp F96

^{XIV} 17, 20 Bio-Rad Immunowash 1250

^{XV} Biochem

Titulación del suero y antígeno. Las placas fijadas a 1, 2, 3, 4, y 5 µg/ml de antígeno fueron probadas con 4 sueros positivos y negativos y se seleccionó la concentración en la cual existía una diferencia mayor en las DO entre positivos y negativos. a partir de esta selección 10 sueros, seleccionados al azar, fueron diluidos comenzando con una dilución 1/50 hasta 1/31250 y se realizó la prueba haciendo lecturas a los 15, 25, 35 y 45 min, utilizando estos resultados se realizaron gráficas y se calculó su cociente. Con estos datos se seleccionó la dilución de suero en la cual existía una diferencia mayor entre las OD y se volvió a realizar la prueba con todos los sueros para poder determinar el punto de corte, realizando lecturas a los 15, 25 y 35 min. Con estos últimos resultados se estandarizó el pmeELISA.

Titulación del conjugado. En placas de ELISA con 2, 4, 5 µg/ml de antígeno se utilizó diluciones de 1:1000, 1:1500 y 1:3000 de anti-IgG de cabra,^{xvi} diluida en PBS, con diluciones de suero 1/50 hasta 1/6250, previo a la realización de la prueba con el fin de determinar la concentración óptima de conjugado.

Realización de la Técnica de ELISA. Se colocó 100 µl del suero problema a la dilución encontrada como óptima, se cubrió la placa e incubó a 37°C por 1 hora. La placa se lavó por tres ciclos con 250 µl de PBS-Tween, en un lavador de microplacas^{xvii}. El conjugado se utilizó a la dilución 1/3000 y se colocó 100 µl por pozo (todos los pozos). La placa se cubrió e incubó a 37°C por 1 hora, durante este tiempo se preparó el sustrato con 5 µl de H₂O₂^{xviii} en 120 µl de H₂O y 5.48 g de cromógeno (Ácido 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic -ABTS-^{xix}) en 50 ml de solución de citrato (0.2M Fosfato de Sodio, 0.1M Ácido Cítrico). Se mezcló 50 ml de la solución de cromógeno y 19 µl de la solución de sustrato, esta solución se usó inmediatamente después de prepararse. Las placas se lavaron por tres ciclos con 250 µl de PBS-Tween, en un lavador de microplacas^{xx}. Se adicionó 100 µl de la solución sustrato-cromógeno en cada pozo de la placa con una micropipeta multicanal, se incubó a temperatura ambiente por 15, 25 y 35 min determinándose la DO con un lector de microplacas^{xxi}, a una longitud de onda de 405 nm, en cada tiempo. Por cada suero se realizó su duplicado en la misma placa y cada placa contó con su control negativo, positivo y blanco. Este procedimiento se realizó con todos los sueros dos veces.

Análisis de resultados. Las lecturas de DO obtenidas en el pmeELISA para cada una de las diluciones de suero; concentración y tipo de antígeno y dilución de conjugado se graficaron tomando en cuenta su media y desviación estándar. De aquí se eligió la dilución óptima de suero, de antígeno y conjugado, tomando como criterio de selección la mayor separación entre los valores de DO de sueros de animales positivos y negativos. A partir de esta dilución óptima se trabajó el pmeELISA con los sueros del estudio. El punto de

^{xvi} Pierce

^{xvii} Baker

^{xix} Sigma

^{xxi} Bio-Rad modelo 3550

corte la prueba así como su especificidad y sensibilidad fueron calculados a partir de los resultados obtenidos. Los resultados en el pmeELISA fueron analizados utilizando el estadístico U Mann Whitney, comparando los resultados de positivos y negativos.⁴⁹

Los resultados observados en el WB se utilizaron para determinar hacia cuales antígenos se dirige la respuesta inmune humoral específica en animales positivos y a cuales reaccionan de manera inespecífica los animales negativos, ya que el ELISA solo lo permite evaluar una reacción con el antígeno en forma global.

RESULTADOS

Resultados en la prueba RB. En el cuadro 2 se muestra la especificidad obtenida con los diferentes grupos de sueros y el cuadro 5 muestra los resultados obtenidos por cada suero en el pmeELISA. Al realizar la prueba RB, con los diferentes grupos de sueros (positivos, negativos y vacunados) se obtuvieron diferentes resultados, que pueden observarse en el cuadro 1, así cuando vemos 100% de especificidad en RB, en los animales positivos quiere decir que los 31 sueros positivos aglutinaron, lo que se interpreta como una reacción positiva, para el caso del 11.12% de los 45 sueros negativos, se refiere al hecho de que 5 sueros mostraron una aglutinación leve. En el caso de los animales vacunados tenemos que de los 7 vacunados con *B. melitensis* Rev1 dosis reducida 3 aglutinaron, de los 9 vacunados con RB51 sólo 1 aglutinó, de los 6 vacunados con *B. melitensis* Rev 1 dosis completa 2 aglutinaron y de los 6 vacunados con *B. abortus* s2308::Tr5 ninguno aglutinó.

Cuadro 2: muestra la especificidad en porcentaje obtenida en los diferentes grupos al aplicar la prueba Rosa de Bengala y el pmeELISA

Grupo de animales	Rosa de bengala	pmeELISA	
		Lectura a 15 min	lectura a 25 min
Positivos	100	100	100
Negativos	88.88	100	100
Vacunados			
<i>B. melitensis</i> Rev1 D.R.	57.14	71.0	57.0
<i>B. abortus</i> RB51	88.88	77.0	77.0
<i>B. melitensis</i> Rev1 D.C.	66.6	83.0	100
<i>B. abortus</i> S2308::Tr5	100	83.0	83.0

Separación electroforética de las proteínas de membrana externa de *B. melitensis*. Al realizar el corrimiento electroforético de las PME se observaron 53 bandas de proteínas, las cuales han sido divididas en 20 grupos de bandas (Figura 1). Las proteínas contenidas dentro del grupo 6, 8 y 12 fueron bandas más evidentes en comparación con otras

Los 20 grupos o bandas encontrados fueron:

	peso molecular aprox.
Banda 1	mayor a 97.4
Banda 2	mayor a 97.4
Banda 3	mayor a 97.4
Banda 4	85 kDa
Banda 5	69 kDa
Grupo 6	de 58 a 66 kDa
Grupo 7	de 54 a 57 kDa
Grupo 8	de 45 a 51 kDa
	a) 49 kDa
	b) 47 kDa
	c) 46 kDa
Banda 9	de 43 kDa
Banda 10	de 41 kDa
Banda 11	de 39 a 36 kDa
Banda 12	de 35 a 27 kDa
	a) 35 a 31 kDa
	b) 30 a 27 kDa
Banda 13	26 kDa
Banda 14	25 kDa
Banda 15	23 kDa
Banda 16	22 kDa
Banda 17	21
Banda 18	18 a 20 kDa
Banda 19	16 kDa
Banda 20	compuesta de 2 bandas menores a 14.4 kDa

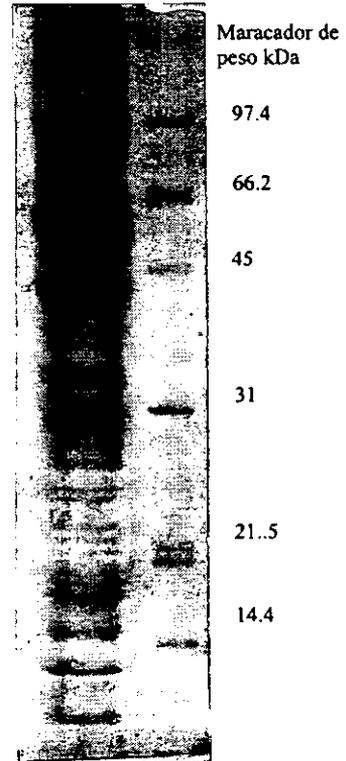


Figura 1: Perfil electroforético de las PME

Cuantificación de proteínas. La concentración de proteína en las PME para ambos casos fue de 1.3 mg/ml.

Inmunoelctrotransferencia tipo Western Blot. Al realizar el WB se observaron diferentes bandas, que variaron según los grupos de animales, el cuadro 3 muestra el perfil de bandas. Característicamente en todos los animales positivos se apreció una zona oscura que va de los 25 a los 80 kDa, la cual puede corresponder a una reacción contra LPS liso, esta misma zona no apareció en los animales vacunados con las cepas rugosas. Así mismo se observaron algunas bandas que aparecen en mayor proporción en los animales positivos, que en los negativos, estas bandas tuvieron un peso molecular aproximado de 90-95, 76, 67-70 y 60 kDa.

En las bandas mayores a 104 kDa se encontró una banda doble, la cual apareció en el 100% de los positivos y 33% de los negativos. En las bandas menores de 19.4 se observó una en 30% de los positivos y 20% de los negativos.

Cuadro 3:

Porcentaje de frecuencia de cada una de las bandas vistas en el WB con los diferentes grupos de sueros

bandas kDa/ Grupo de anim.	90-95	76	67-70	60	53-56	48	40-43	35	30	23-25	16-19
POSITIVOS	90	93	90	90	80	69	87.5	20	18.3	57.1	26.5
NEGATIVOS	8.3	28.4	14.8	35	8.3	8.3	33	0	0	26	0
VACUNADOS											
<i>B. melitensis</i> Rev1 D.R.	60	100	80	80	40	0	100	20	20	0	0
<i>B. abortus</i> RB 51	40	100	80	100	80	0	100	20	20	0	40
<i>B. melitensis</i> Rev1 D.C.	20	40	0	0	20	0	43	100	20	0	0
<i>B. abortus</i> SZ08:Tr5	0	20	20	40	20	0	100	100	0	0	80

Estandarización de la Técnica de ELISA. En la primer etapa de estandarización, donde se evaluó al antígeno, los resultados mostraron que el antígeno desnaturalizado es mejor en la diferenciación de animales positivos y negativos, de igual forma se apreció que las concentraciones óptimas de antígeno estaban entre 1, 2 y 3 µg/ml, por lo que se prepararon placas de ELISA con antígeno desnaturalizado a las concentraciones antes mencionadas y se probaron con un grupo de 5 sueros de animales positivos y 5 de negativos, este experimento mostró que la concentración de 2 µg/ml fue la óptima, a diluciones de suero de 1/1250 y 1/6250. Para definir la dilución mas adecuada se realizó el pmeELISA con 2µg de antígeno desnaturalizado utilizando todos los sueros, en ambas diluciones, este ensayo fue repetido dos veces para poder establecer la variabilidad de una placa a otra. De igual forma cada dilución contó con su duplicado en la misma placa. Los resultados de este ensayo indicaron que la dilución de suero 1/1250 fue la mas indicada.

Los resultados en la estandarización del conjugado mostraron que la dilución 1/3000 de anti IgG caprina, permitía una diferencia mayor entre positivos y negativos.

El pmeELISA quedó estandarizado con una concentración de 2µg/ml de antígeno desnaturalizado, con una dilución de suero 1/1250 (figura 3), con un tiempo de lectura de 15 y 25 min. Para establecer el punto de corte se tomó como base la desviación estándar encontrada en cada grupo, tomando dos desviaciones a partir de la media, así el punto de corte quedó establecido para la lectura a los 15 min $A_{405} = 0.4346$ y $A_{405} = 0.6108$ para la lectura a los 25 min (Figura 2 y 4). Con estas constantes el ensayo tuvo una sensibilidad y especificidad del 100%, entre animales positivos y negativos en ambos tiempos de lectura (cuadro 4).

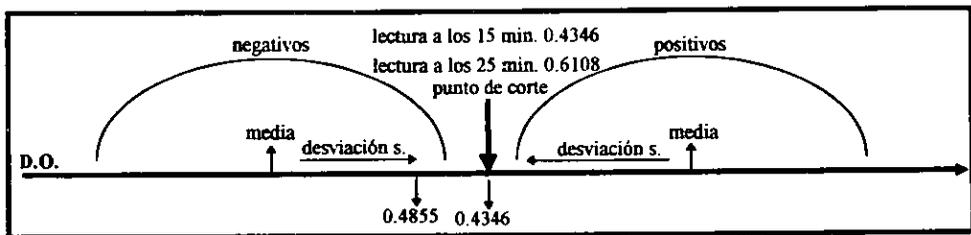


Figura 2: muestra el punto de corte en el pmeELISA en ambos casos se tomó el valor mas bajo para establecer el punto de corte con el fin de obtener una sensibilidad mayor.

Para el caso de los animales vacunados se obtuvo una especificidad de: 83% para los animales vacunados con *B. melitensis* Rev1 dosis completa, cuando la lectura se realizó a los 15 min y del 100% cuando se realizó a los 25 min de igual forma la especificidad en los animales vacunados con *B. melitensis* Rev 1 dosis reducida fue del 71% a los 15 min y de 57% a los 25 min, para el grupo vacunado con *B. abortus* RB51 fue de 77% en ambos tiempos y 83% para el grupo vacunado con *B. abortus* S2308::Tn5 también en ambos tiempos de lectura (figura 5). La sensibilidad y especificidad fueron calculadas utilizando la fórmula de Rielgeman (cuadro 4).⁵⁰

	<i>ENFERMOS</i>	<i>SANOS</i>
<i>POSITIVOS</i>	32	0
<i>NEGATIVOS</i>	0	43
<i>TOTAL</i>	32	43

$$SENSIBILIDAD = 32 / 32 = 100\%$$

$$ESPECIFICIDAD = 43 / 43 = 100\%$$

Cuadro 4: muestra el número de animales sanos y enfermos diagnosticados a través del pmeELISA la forma en que se calculó la sensibilidad y especificidad de la pmeELISA a los 15 y 25 min

Prueba de U de Mann Whitney. La Z calculada con una $p=0.01$ $\alpha=0.9920$, demostró para cada caso una distribución de frecuencias relativas diferentes en las dos poblaciones comparadas. lo que indica que una está desplazada hacia la derecha de la otra es decir, la media de los negativos abarca un intervalo diferente al de los positivos .

Poblaciones comparadas	Z calculado	
	15 min	25 min
Positivos-Negativos	-2.89	-2.89

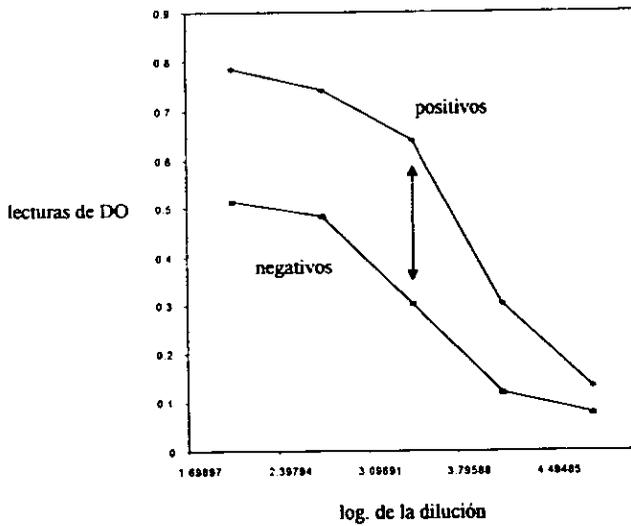


Figura 3: Muestra los valores obtenidos con un grupo de sueros positivos y negativos. la dilución 1/1250 expresada como logaritmo (3.09691), es donde se obtiene una diferencia mayor entre positivos y negativos (flecha). la placa fue fijada a 2µg/ml de antígeno desnaturalizado y la lectura se realizó a los 15 minutos.

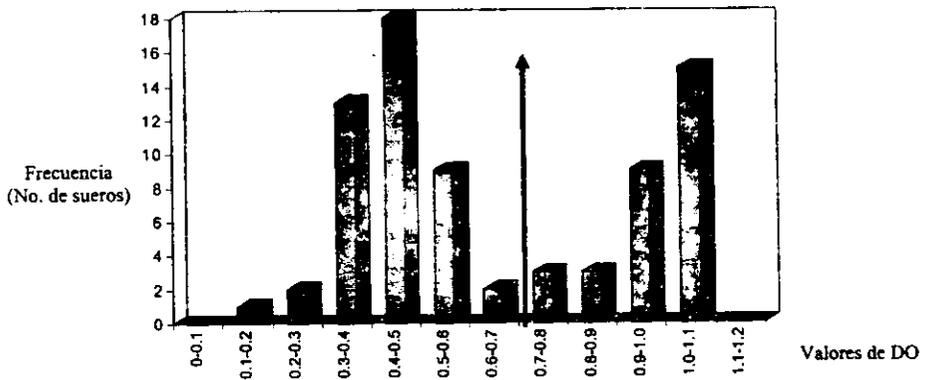
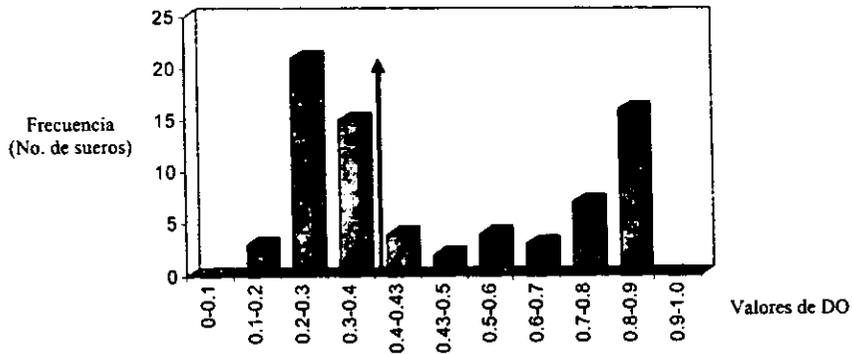


Figura 4: Muestra las frecuencias de DO obtenidas en los sueros de animales positivos y negativos, con lecturas a los 15 minutos (arriba) y 25 minutos (abajo), la flecha indica el punto de corte de la prueba.

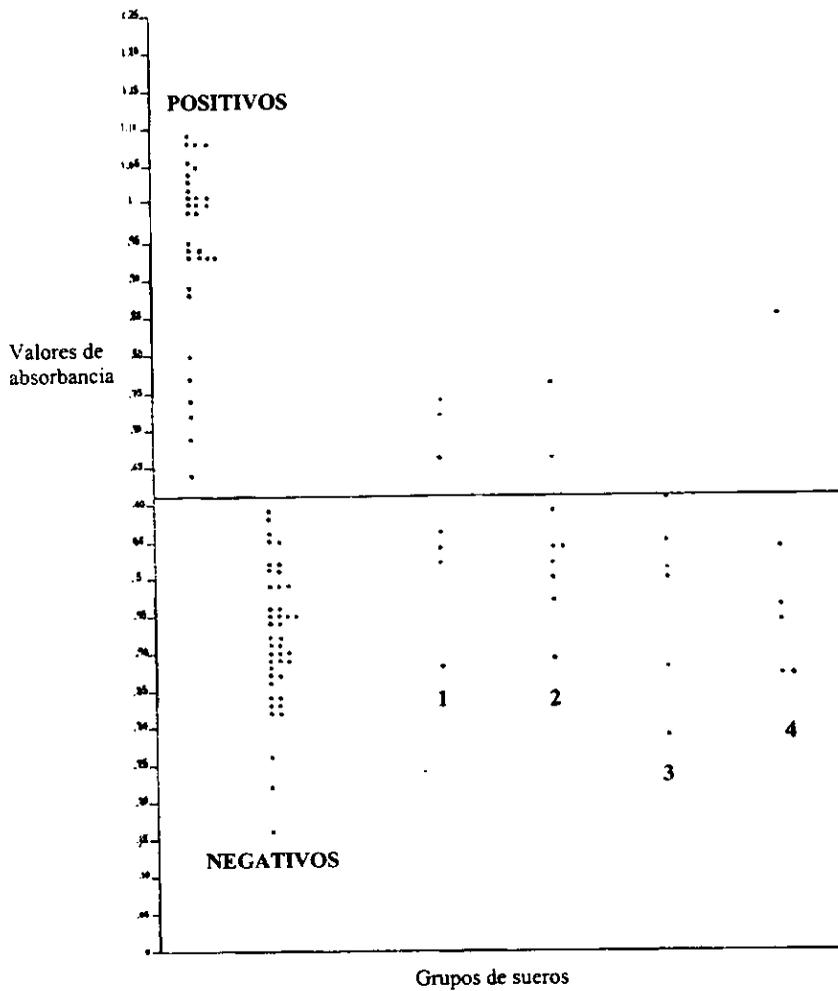


Figura 5: Muestra los diferentes valores de densidad óptica obtenidos en el pmeELISA, con los diferentes grupos de sueros, la línea indica el punto de corte del ensayo (A405= 0.6108).
 1= Animales vacunados con *B. melitensis* Rev1 dosis reducida via subcutánea
 2= Animales vacunados con *B. abortus* RB51
 3= Animales vacunados con *B. melitensis* Rev1 dosis completa vía conjuntival
 4= Animales vacunados con *B. abortus* S2308::Tn5

Cuadro 5: Valores obtenidos en el pmeELISA, con 2µg/ml de antígeno desnaturalizado fijado en las placas, con una dilución 1/1250, se muestra también los resultados obtenidos en la prueba Rosa de Bengala (antígeno BIVE).

Tipo / Numero del suero	15 m	25 m	R.B.	Resultados con los diferentes punto de corte	
				0.4346	0.6108
POSITIVO					
100	0.8287	1.56	+	+	+
101	0.8117	1.0305	+	+	+
102	0.519	0.7467	+	+	+
103	0.6437	0.9305	+	+	+
104	0.662	0.9377	-+	+	+
105	0.84	1.0285	+	+	+
106	0.824	1.0895	+	+	+
107	0.6472	0.886	+	+	+
108	0.8247	1.0837	+	+	+
109	0.88	1.0437	+	+	+
110	0.8367	1.0075	+	+	+
111	0.819	1.0057	+	+	+
112	0.8167	1.0855	+	+	+
113	0.4417	0.6495	+	+	+
114	0.8242	1.0927	+	+	+
115	0.7385	0.8995	+	+	+
116	0.76	0.9465	+	+	+
117	0.8632	1.0577	+	+	+
118	0.85	0.9982	+	+	+
119	0.743	0.9577	+	+	+
120	0.5692	0.8075	+	+	+
121	0.5135	0.726	+	+	+
122	0.8127	1.0185	+	+	+
123	0.4657	0.6925	+	+	+
124	0.8057	1.0095	+	+	+
125	0.747	0.98	+	+	+
126	0.7702	0.934	+	+	+
127	0.764	0.9362	+	+	+
128	0.5715	0.7767	+	+	+
129	0.885	1.0185	+	+	+
130	0.8582	1.0175	+	+	+
131	0.7902	0.9405	+	+	+

NEGATIVOS					
1	0.2327	0.3747	-	-	-
2	0.361	0.5147	-	-	-
3	0.4267	0.5985	-	-	-
4	0.2097	0.3477	-	-	-
5	0.2647	0.4552	-	-	-
6	0.2375	0.412	?	-	-
7	0.3282	0.5572	-	-	-
8	0.3532	0.5655	-	-	-
9	0.2847	0.4687	-	-	-
10	0.3365	0.4807	-	-	-
11	0.2775	0.3905	?	-	-
12	0.2797	0.404	-	-	-
13	0.3982	0.581	-	-	-
14	0.2795	0.4267	-	-	-
15	0.286	0.4422	-	-	-
16	0.3917	0.557	?	-	-
17	0.3182	0.4137	-	-	-
18	0.302	0.464	-	-	-
19	0.1997	0.3355	-	-	-
20	0.2697	0.4487	-	-	-
21	0.2457	0.3965	-	-	-
23	0.3205	0.4842	-	-	-
24	0.115	0.1622	-	-	-
25	0.3062	0.4087	-	-	-
26	0.2635	0.3302	-	-	-
27	0.4132	0.513	-	-	-
28	0.287	0.4	-	-	-
29	0.4252	0.5252	-	-	-
30	0.348	0.4592	-	-	-
31	0.3202	0.4547	-	-	-
32	0.2385	0.3282	-	-	-
33	0.2727	0.3672	-	-	-
35	0.171	0.2225	-	-	-
36	0.2652	0.3492	-	-	-
37	0.231	0.3245	-	-	-
38	0.2865	0.3797	-	-	-
39	0.2007	0.2637	?	-	-
40	0.3567	0.4802	-	-	-
41	0.2965	0.393	-	-	-
42	0.3542	0.4572	-	-	-
43	0.281	0.3815	-	-	-
44	0.3205	0.427	-	-	-
45	0.4075	0.529	?	-	-

VACUNADOS					
<i>B. melitensis</i> , dosis completa					
88	0.4562	0.61	+	+	-
89	0.2055	0.2972	-	-	-
90	0.3657	0.558	+	-	-
91	0.2625	0.3882	-	-	-
92	0.3322	0.5097	-	-	-
93	0.3192	0.5122	-	-	-
<i>B. melitensis</i> , dosis reducida					
72	0.3482	0.529	-	-	-
73	0.4847	0.7277	-	+	+
74	0.3267	0.54	+	-	-
75	0.2597	0.388	-	-	-
76	0.4495	0.665	-	+	+
77	0.3557	0.5687	+	-	-
78	0.5357	0.7462	+	+	+
<i>B. abortus</i> RB51					
79	0.3295	0.475	-	-	-
80	0.5172	0.7607	-	+	+
81	0.3012	0.5035	-	-	-
82	0.3852	0.5477	-	-	-
83	0.3877	0.5287	+	-	-
84	0.3562	0.5415	-	-	-
85	0.42	0.5962	-	-	-
86	0.4345	0.6605	-	-	+
87	0.2595	0.3925	-	-	-
<i>B. abortus</i> S2308::Tn5					
94	0.2442	0.4477	-	-	-
95	0.5912	0.851	-	+	+
96	0.256	0.3722	-	-	-
97	0.2827	0.4665	-	-	-
98	0.344	0.5407	-	-	-
99	0.242	0.377	-	-	-

+= positivo
 -= negativo
 ? = sospechoso

DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos en el ELISA con PME (pmeELISA). se pudo establecer que la sensibilidad y especificidad de la prueba es del 100%, es decir de los 30 sueros positivos evaluados todos dieron lecturas por arriba del punto de corte y de los 43 sueros negativos ninguno dio lecturas por arriba del punto de corte establecido.

De acuerdo a Malvano citado por Kurstak,⁴⁴ el punto de corte se establecio utilizando dos desviaciones estándar por arriba de la media de los negativos y por abajo de la media de los positivos. Halbert citado por Kurstak⁴⁴ propuso que un buen punto de corte. es con una media 0.15 - 0.20 y con un punto de corte de 2 a 3 veces esta medida. El punto de corte del pmeELISA de este estudio quedó establecido en $A_{405} = 0.4346$ y 0.6108, lo que coincide con la sugerencia de Halbert y Malvano.

La sensibilidad y especificidad obtenido en el pmeELISA son altas, aun comparadas con las obtenidas en otros ensayos en los que se utilizó como antígeno de captura el LPS liso. Blasco y Marin¹⁵ reportaron una sensibilidad del 100% utilizando anti IgG caprina marcada con peroxidasa, Delgado y colaboradores⁵¹ reportaron una sensibilidad y especificidad del 94.7% y 90.4% respectivamente, utilizando el mismo conjugado. Diaz³¹ utilizando proteína G marcada con peroxidasa encontró una sensibilidad del 98.2% y una especificidad del 100%. Por otra parte reportó una sensibilidad del 96% y una especificidad del 98% para proteínas citoplasmáticas, lo que nos sugiere que las proteínas son buenos antígenos para el diagnóstico, aunque es necesario aclarar en este punto que estas proteínas son citoplasmáticas diferentes a las utilizadas en el pmeELISA. Se ha demostrado a través de varios estudios la producción de anticuerpos dirigidos contra las PME, en animales infectados y vacunados, en dichos estudios se mostró que varias de estas proteínas están expuestas en la superficie de la bacteria, participando en el desarrollo de la respuesta inmune contra la bacteria,^{21, 25, 26} como lo sugiere el hecho de la alta capacidad protectora de vacunas con cepas rugosas en donde una parte de la respuesta inmune va dirigida hacia estas proteínas, y por otra parte. la baja capacidad del LPS para estimular el sistema inmune (se requiere 10 veces mas LPS de *Brucella* en comparación con *Salmonella*, para inducir la activación del complemento y la liberación de interferón).¹⁶

La sensibilidad y especificidad en el pmeELISA, están influenciadas por el método de extracción de las PME. Moriyón y Berman⁵² trabajando varios métodos de extracción PME para enterobacterias al aplicarlas a *Brucella* demostraron que la membrana externa de ésta es diferente en su estabilidad al ser enfrentada a cationes bivalentes y en su susceptibilidad a la acción de los detergentes, así por ejemplo cuando se utiliza EDTA en conjunto con Triton x100 se aumenta la liberación de LPS en *E. coli*. no así en *Brucella* donde la liberación de LPS utilizando Triton x100 con o sin EDTA. es la misma. 40% al 60%. de acuerdo a esto podemos inferir que la cantidad de LPS contenida en el antígeno de la pmeELISA es de aproximadamente el

50%, es decir que a parte de los 2 μ g/ml fijados en la placa, 1 μ g/ml extra podría ser LPS. para conocer la cantidad exacta de LPS es necesario realizar su cuantificación. De cualquier forma el conocer la concentración del LPS en el antígeno utilizado en el pmeELISA no necesariamente indicaría que esta sea la molécula dominante en el diagnóstico, pues no se descarta el papel de las proteínas e incluso una combinación de proteína-LPS, por lo que se requieren más estudios para aclarar este punto.

La cantidad y tipo de antígeno fijados a la placa influyeron en la sensibilidad y especificidad, de tal forma que a concentraciones altas (5 μ g/ml), la diferencia entre los sueros de animales positivos y negativos, expresada como cociente era mínimo, de igual forma cuando se utilizó una concentración baja (1 μ g/ml). la diferencia fue menor, en comparación con los 2 μ g/ml utilizados en el pmeELISA. El tratamiento de desnaturalización al que fue sometido el antígeno, previo a su fijación en las placas, permitió una diferencia mayor entre los sueros evaluados, este resultado puede ser explicado de dos formas: 1) en general las proteínas tienen la mayor parte de sus regiones hidrofílicas orientadas hacia afuera, mientras que los residuos más hidrofóbicos están orientados hacia adentro, la parcial desnaturalización de las proteínas expone sus regiones hidrofóbicas y permite una unión más firme del antígeno a la placa⁴⁴ y 2) cuando una proteína es parcialmente desnaturalizada, puede exponer algunos epítomos contenidos en las PME, probablemente como efecto de la desagregación de las regiones hidrofóbicas, lo que permite una exposición más abierta o amplia de epítomos, incrementando los sitios de reconocimiento de los anticuerpos.⁴⁸

Datos preliminares indican que el pmeELISA fue capaz de distinguir los animales vacunados con *B. melitensis* Rev 1 Dosis Completa vía conjuntival, de los infectados, con una especificidad y sensibilidad del 100%. Esta sensibilidad es muy alta y podría deberse al hecho de que los sueros fueron tomados a los 30 días de aplicación de la vacuna. Micusan³³ trabajando con cabras mostró que es hasta los 21 días cuando se presenta el pico de producción de inmunoglobulinas y luego decrece. También puede deberse a la vía de aplicación de la vacuna, Zygmunt³⁶ estudiando la respuesta inmune en ovejas encontró que la vía conjuntival elimina más rápido a la bacteria y su persistencia es necesaria para el desarrollo de la respuesta inmune contra las PME.

Contrario a lo que pudiera esperarse, los resultados mostraron que la sensibilidad del 100% en estos animales vacunados se obtuvo hasta los 25 minutos, debido a que el punto de corte a los 25 minutos ($A_{405}=0.6108$) es más alto que a los 15 minutos ($A_{405}=0.4346$).

Al realizar la separación de las PME mediante electroforesis, se logró observar 53 bandas de proteínas, las cuales en estudios anteriores, ya han sido descritas,^{18, 20, 16} así, de acuerdo a la clasificación utilizada para agrupar a las PME de *B. melitensis* puede decirse que la banda 4 podría agruparse dentro del grupo 1, aunque su peso es inferior, lo cual puede deberse a la aproximación al realizar el cálculo de su peso

molecular. Para el caso del grupo II encontramos que las bandas 11 y 12b se ubican dentro del rango establecido, además esta última se ve más evidente, lo que coincide con el hecho de que las bandas de 31-34 kDa son más abundantes en *B. melitensis* en comparación con *B. abortus*.^{18, 20, 21} Asimismo para el grupo III se puede afirmar que las bandas 13 y 14 se encuentran ubicadas dentro de los parámetros del grupo. De igual forma las bandas de 16.5 y 19 kDa ya han sido reportadas anteriormente.^{18, 20, 21, 23} Para el resto de las bandas no existe una referencia, sin embargo esto no quiere decir que no sean PME, lo que influye en el número de proteínas obtenidas es el método de extracción utilizado, y el tipo de detergente utilizado, por ejemplo Moriyón y Berman⁵² indicaron que el Zwittergent 316 es más efectivo para liberar PME que el Triton X100, sin embargo el método utilizado en este estudio para la extracción de PME, nos permitió obtener una cantidad más amplia de proteínas, aún que se utilizó Triton X100. Sowa y colaboradores¹⁸ describieron a la membrana externa de *Brucella* como una "estructura compleja compuesta por lo menos de 75 proteínas".

El análisis de WB mostró varias bandas similares a las descritas por otros autores. Cloeckert²⁵ trabajando con sueros de bovino y PME de *B. melitensis* encontró una respuesta en contra de las PME minoritarias 89, 10, 16.5 y 19 kDa y las PME mayoritarias de 31-34, 25-27 y 36-38 kDa. Zygmunt y colaboradores³⁵ trabajando con sueros de ovejas encontraron que estas desarrollaron respuesta contra las PME 36-38, 25-27, 31-34, 70-73, 83, 94 kDa y algunas contra una PME de 19.5 kDa, también encontró una zona inmunoreactiva de 35-70 kDa la cual correspondía al LPS liso, este mismo autor indica que aunque la respuesta inmune es variable, las PME de 31-34 y 60-73 fueron reconocidas por la mayoría de los sueros. En el WB con PME de *B. melitensis* de este estudio se observó respuesta mayor contra varias proteínas (90-95, 76, 67-70, 60, 53-56, 48, 40-43, 35, 30, 23-25 y 16-19 kDa), en comparación con los resultados obtenidos por otros autores, nosotros observamos una respuesta hacia las proteínas de 43-56 kDa y no apreciamos respuesta contra las de 36-38 kDa aunque estas si estuvieron presentes como lo muestra el análisis en SDS-PAGE de las PME. La frecuencia con que se presentaron las proteínas de 60-76 kDa fue 90% aproximadamente lo que coincide con lo descrito. El análisis de estos resultados sugiere que una combinación de proteínas en un ELISA es un método diagnóstico útil, pues, en este estudio no se observó una sola proteína que tenga la capacidad de distinguir animales infectados y vacunados. Para el caso de animales vacunados con cepas rugosas se observó que no aparecía la zona difusa de 35-70 kDa correspondiente a LPS liso.

CONCLUSIONES

1. Las PME ha demostrado ser útiles en el diagnóstico de enfermedades. El pmeELISA demostró ser una buena opción en el diagnóstico, con una alta sensibilidad y especificidad, además de ser una prueba fácil de estandarizar y realizar, que requiere cantidades pequeñas de suero y su resultado se obtiene rápidamente (3 horas).
2. El pmeELISA puede ser utilizado como prueba tamiz, ya que pueden ser diagnosticados 45 sueros por placa (cada uno con su duplicado) y puede ser interpretada fácilmente, sin que interfiera la experiencia del operador, como sucede en las pruebas de aglutinación.
3. Resultados preliminares obtenidos en este trabajo indican que animales vacunados con *B. melitensis* Rev 1 D.C. vía conjuntival, sangrados a los 30 días pueden ser diferenciados, aunque se requiere mayor investigación al respecto.

REFERENCIAS

1. Corbel JM. Brucellosis, an Overview. 1st International conference on emerging zoonoses, Jerusalem, Israel 1997.
2. Thoen EF, Cheville NF. Pathogenesis of bacterial Infections in Animals. Iowa State University Press.1993.
3. Halling SM. Brucella genetics. 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference, Chicago.1997.
4. Ross HM, Foster G, Reid RJ, Jabans KL, MacMillan AP. *Brucella* infection in sea mammals. Vet. Rec. 1994;132:359.
5. Gall. Goat Production. Londres, Inglaterra. Academia Press. 1981.
6. Comité Consultivo Nacional Salud Animal. Brucelosis: mesa de trabajo. Memoria de la Cuarta Reunión Anual del Consejo Técnico Consultivo Nacional de Salud Animal. FMVZ, UNAM 1995
7. Solomon HM, Jackson D. Rapid diagnostic of *Brucella melitensis* in blood: Some operational characteristics of the BACT/ALERT. J Clin Microbiol 1992;30:222-224.
8. Gamazo C, Vitas AI, Lopez-Goñi Y, Diaz R, Moriyón I. Factors affecting detection of *Brucella melitensis* by BACTEC NR730, a nonradiometric System for Hemocultures. J Clin Microbiol 1993;31:3200-3203.
9. Dieguez-Beltran E. Presencia de anticuerpos contra Brucella en los animales de zoológico de Chapultepec de la ciudad de México. Tesis de licenciatura , FMVZ, UNAM.1995.
10. Carter ME, Quin PJ, Markey B. Clinical Veterinary Microbiology. Londres, Inglaterra, WOLFE 1994.
11. Blasco MJ. Tratado de Veterinaria Práctica: brucelosis. Madrid, España: Luzan 1994.
12. Moriyón I. *Brucella* cell structure. 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. Chicago.1997.
13. Shuring G. *Brucella* Vaccines. 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. Chicago.1997.
14. Blasco JM, Marín C, Jimenez de Bagues M. Evaluation of allergic and serological test for diagnosis *Brucella melitensis* infection in sheep. J Clin Microbiol 1994;32: 1835-1840.
15. Blasco JM, Garin B, Marín CM, Gerbier G, Fanlo J, Jimenez P, Cau C. Efficacy of different Rose Bengal and Complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. Vet Rec 1994;134:415-420.
16. Sangari FJ, Argüero J. Molecular basis of *Brucella* Pathogenicity: an update. Microbiologia SEM. 1996;12:207-218.

17. Diaz R, Garatea P, Jones M, Moriyón I. Radial immunodiffusion test with a *Brucella* polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. *J Clin Microbiol* 1979;10:37-41.
18. Sowa BA, Kelly KA, Ficht TA, Frey M, Adams LG. SDS soluble and peptidoglycan complex of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* 1991;27: 351-369.
19. Douglas JT, Rosenberg EY, Nikaido, Versteatre DR, Winter AJ. Porins of *Brucella* species. *Infec Immun*. 1984;44:16-21.
20. Versteatre DR, Creasy MT, Caveney NT, Baldwin CL, Blab MW, Winter AJ. Outer membrane proteins of *Brucella abortus*, isolation and characterization. *Infec Immun* 1982;35:979-989.
21. Bowden RA, Cloeckaert A, Zygmunt M, Bernard S, Dubray G. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by Enzyme linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infec Immun* 1995;63: 3945-3952.
22. Gomez-Miguel M, Moriyón I. Demonstration of a peptidoglycan-linked lipoprotein and characterization of its trypsin fragment in the outer membrane of *Brucella spp*. *Infec Immun*. 1986;53:678-684.
23. Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Vizcaino N. Molecular and Immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiol lett* 1996;145:1-8.
24. Cloeckaert A. Antigenes of *Brucella*. 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference, Chicago 1997.
25. Cloeckaert A, Kerkhops P, Limet JN. Antibody response to *Brucella* outer membrane proteins in bovine Brucellosis: Immunoblot analysis and competitive Enzyme-linked Immunosorbent Assay using Monoclonal Antibodies. *J Clin Microbiol* 1992;30: 3168-3174.
26. Cloeckaert A, Wergifosse P, Dubray G, Limet JN. Identification of seven surface exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: Immunogold labeling for electron microscopy and Enzyme-linked Immunosorbent assay. *Infec Immun* 1990;58:3980-3987.
27. Gamazo C, Moriyón I. Release of outer Membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infec Immun*. 1987; 55:609-615.
28. Shuring G, Martin R, Bagchi T, Boyle S, Buhman D, Spiranganathan N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* 1991;28:171-188.
29. Jyhshiun L, Ficht TA. Protein synthesis in *Brucella abortus* induced during macrophage infection. *Infect Immun*. 1995;63:1409-1414.
30. Adams G. Pathology of brucellosis in domestic animals: A mini review", 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference, Chicago 1997.
31. Diaz A.E. Pruebas Diagnosticas de Brucelosis caprina. *Memorias del Simposium Internacional de Brucelosis caprina, Zacatecas, México*. 1995.
32. Blasco MJ. A review of the use of B melitensis rev1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev. Vet. Med*. 1997;31:275-283.

33. Jimenez de Bagues MP, Elzer PH, Jones SM, Blasco JM, Enright FM, Schuring GG, Winter AJ. Vaccination with *Brucella abortus* rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strain of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*. *Infect Immun* 1994;62:4990-4996.
34. Soberon MA, Maldonado T, Díaz AE, Hernandez AL, Suárez GF. Adult goat vaccination using *Brucella abortus* RB51. The conference of research workers in animal disease. Iowa State University. 1996.
35. Zygmunt MS, Cloeckaert A, Dudray G. *Brucella melitensis* cell envelope protein and lipopolysaccharide epitopes involved in humoral immune responses of naturally and experimentally infected sheep. *J Clin Microbiol* 1994;32:2514-2522.
36. Zygmunt MS, Debarth HSA, Cloeckaert A, Dubray G. Antibody response to *Brucella melitensis* outer membrane antigens in naturally infected Rev 1 vaccinated sheep. *Vet. Microbiol.* 1994;39:33-46.
37. Baun Z O, Bergman R, Kats E, Beider A C, Banai M. Comparative evaluation of microagglutination test and serum agglutination test as supplementary diagnostic methods for Brucellosis. *J Clin Microbiol* 1995;33:2166-2170.
38. Velázquez QF, Perez RR, Hernández AL, Pérez GR, Díaz AE. Aparición de anticuerpos contra Rev 1 *Brucella melitensis* en cabras lactantes vacunadas en la prueba modificada de anillo en leche. XXXIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Veracruz, México. 1997.
39. Romero C, Pardo M, Grillo MJ, Diaz R, Blasco J M, Lopez G. Evaluation of PCR and Indirect Enzyme-linked Immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of Brucellosis in Dairy cattle. *J Clin Microbiol* 1995;33:3198-3200.
40. Nielsen K. Diagnosis of brucellosis. 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. Chicago. 1997.
41. Kuliashova LB, Tneseva GL, Buinevich LB. The role of the outer membrane antigens of *Yersinia pseudotuberculosis* in the pathogenesis and diagnosis of pseudotuberculosis. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 1997. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
42. Salti-Montesanto V, Tsoli E, Papavassiliou P, Psarrou E, Markey BK, Jones, GE, Vreton E. Diagnosis of ovine enzootic abortion, using a competitive ELISA based on monoclonal antibodies against variable segments 1 and 2 of the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* serotype 1. *Am J Vet Res* 1997;58:228-235.
43. Vázquez NJ. Preparaciones de proteínas de la membrana externa de *Salmonella gallinarum* para el diagnóstico de la tifoidea aviar. Tesis de Maestría, FMVZ, UNAM. 1995.
44. Kurstak E. Enzyme Immunodiagnosis. Canada, Academic Press. 1986.
45. Margni RA. Inmunología e Inmunquímica. 4° edición, Buenos Aires, Argentina. Panamericana. 1989.
46. Bradford MM. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal Biochem* 1976;1:248-254.

47. Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 1979;76: 4350-4354.
48. Verdugo RA, Calva E. Denaturing treatment of *Salmonella typhi* outer membrane protein preparations for improved immunodiagnosis of Typhoid fever. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 1993(1):113-116.
49. Mendenhall W. *Introducción a la probabilidad y la estadística*. México, DF, Iberoamericana. 1987.
50. Riegelman RK, Hirsch. *Como estudiar un estudio y probar una prueba: lectura crítica de la literatura médica*., Washington, DC. Organización Panamericana de la Salud. 1992.
51. Delgado S, Fernandez M, Carmenes P. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of sheep infected and vaccinated with *Brucella melitensis*. *J Vet Diagn Invest* 1995;7:206-209.
52. Moriyón I, Berman DT. Effects of nonionic, ionic and dipolar ionic detergents and EDTA on the *Brucella* cell envelope. *J Bacteriol* 1982;152:822-828.
53. Micusan VV, Borduas G. Biological properties of goats immunoglobulins G. *Immunology* 1997;32:373-375.