

10524
51



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN.**

**DETERMINACIÓN DE VESÍCULAS DE *Actinobacillus seminis* Y
Brucella ovis MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA
DE BARRIDO Y TRANSMISIÓN.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARICRUZ REYES AGUAYO

Asesores:

**M. en C. Enrique Salas Téllez
M. en C. Alma L. Núñez del Arco**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1

2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTAÑAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

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

Determinación de vesículas de "Actinobacillus seminis" y "Brucella ovis"
mediante microscopía electrónica de barrido y transmisión.

que presenta la pasante: Maricruz Reyes Aguayo
con número de cuenta: 096585287 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Biológica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido 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, Méx. a 19 de Septiembre de 2002.

PRESIDENTE	<u>O.F.B. Martha P. Zuñiga Cruz</u>	
VOCAL	<u>M.V.Z. Mercedes E. Salgado Moreno</u>	
SECRETARIO	<u>M.en C Enrique Salas Téllez</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M. en C Sofia González Gallardo</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>O.F.B. Héctor Coss Carduño</u>	<u>H. Coss</u>

2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS:

A Dios.

Por llevarme en sus brazos en los tiempos de prueba y dolor, por aceptarme como soy, por las ilusiones que acompañaron mi nacer que son las mismas que soñaron mis padres, por haberme dado la fe y confianza para poder terminar la carrera y realizar este trabajo.

A mis Padres.

Francisco y Benita

Por ser su ilusión, esperanza, la expresión de su amor, por dar cada uno algo de si para que yo pudiera existir y moldearme para ser lo que soy ahora, por todo su apoyo moral y económico, por ser un ejemplo a seguir, por darme la confianza y oportunidad de realizar nuestro sueño, por enseñarme que el camino más difícil es el que más vale la pena, y el único que se puede voltear a ver con orgullo cuando se esta ya al final de él y por su inmenso amor GRACIAS.

A mis Hermanos:

Pepe, Bety, Jacky y Edgar

Gracias a cada uno de ellos por su cariño y apoyo, por pertenecer a esta familia, por siempre buscar el bienestar de todos, por estar siempre juntos en los problemas y satisfacciones, por compartir las ventajas y responsabilidades de pertenecer a esta familia. Por permitirme lograr este gran sueño que no tan solo es mío, si no también de ustedes.

Pakis

Por siempre ayudarme a estudiar, por ser no tan solo mi hermana si no mi gran amiga que siempre a estado dispuesta a apoyarme y escucharme cuando más lo he necesitado, gracias por tu fuerza, apoyo y comprensión.

A mi pequeño Irving:

Por ser la personita que ha venido a dar alegría a este hogar, por que simplemente con un abrazo o un beso mágico nos quitas toda tristeza, angustia y enojo y nos das las ganas de salir adelante y luchar por lo que queremos (aunque tú todavía no lo sepas).

LOS AMO.

3



A Carlos:

Gracias por todo este tiempo compartido, por permitirme conocerte, por quererme, ayudarme, apoyarme y por ser una de las personas que le dan la esencia a mi vida, por ser mi persona especial, gracias por entrar en mi vida.

A mis Amigos:

Rocío, Verónica, Juan y Arturo

Gracias por ser mis mejores amigos, por compartir siempre tristezas, preocupaciones, ilusiones, secretos, proyectos, por ayudarme, escucharme y estar conmigo siempre que los he necesitado.

A la Familia de Chio y Carlos:

Por abrirme las puertas de su hogar, por brindarme su apoyo, cariño y amistad.

Gracias, por ser parte de lo que ahora da felicidad a mi vida.

*Este peldaño que ahora alcanzo es solo uno más de los muchos
Que conforman la escalera que empecé a subir desde el día en que nací.*

AGRADECIMIENTOS:

A mi Facultad por la formación recibida.

A los profesores Enrique y Alma, por su apoyo, tiempo y dedicación, por depositar su confianza en mí, por todos sus consejos, por su amistad y calidad profesional.

A la profesora Lourdes Galván por todos sus consejos, conocimientos, ayuda, apoyo, confianza y amistad.

A la profesora Sofía por su apoyo brindado para la realización de este trabajo, por su amistad, comprensión y gran calidad humana.

A la profesora Soledad por su ayuda, consejos y su gran calidad humana.

Al profesor Odín por su gran amistad.

A los profesores Idalia Ávila, Ramón Cendejas, Antonio Sánchez y Lourdes Galván por brindarme su confianza, por su gran calidad profesional y humana.

A todos los Sinodales por el valioso tiempo dedicado en la revisión de este trabajo y por sus acertadas correcciones.

Al Laboratorio de Tecnología de Calidad de los Alimentos, en especial a la Dr. Sara E. Valdez Martínez, por brindar el apoyo necesario para la realización de este trabajo.

A todos mis Maestros que me regalaron parte de sus conocimientos y experiencias.

A todos mis Compañeros de la facultad por permitirme conocerlos y por todo el tiempo compartido en nuestro segundo hogar (FES - Cuautitlan)

A los laboratoristas Lucha y Jym por su amistad, apoyo y calidad humana.

AGRADECIMIENTOS:

Al Departamento de Microscopía Electrónica de la FES - Cuautitlan por brindar el apoyo necesario para la realización de este trabajo, gracias a la maestra Sofi, al técnico Rodolfo, a la Q.F.B. Rosario y al Dr. Eliseo.

Gracias, por las micrografías tomadas por:

Figura 6

Micrografía tomada por P.H.D. Eliseo M. Hernández Baumgarten en los laboratorios de Microscopía Electrónica de Fisiología Celular, UNAM.

Figura 7

Micrografía tomada por Tec. Rodolfo Robles Gómez. en el laboratorio L-501 de Microscopía Electrónica de FES - Cuautitlán, UNAM.

Figura 8, 9, 10 y 11

Micrografías tomadas por M. en C. Sofía González Gallardo en el laboratorio L-501 de Microscopía Electrónica de FES - Cuautitlán, UNAM.

A todos, GRACIAS.

6

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE GENERAL.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. GENERALIDADES	
2.a Funciones del epidídimo.....	3
2.b Epididimitis ovina.....	4
2.c Tabla con características de la epididimitis causada por <u>B. ovis</u> y <u>A. seminis</u>	6
2.1 <u>Actinobacillus seminis</u>	
2.1a Generalidades.....	7
2.1b Antecedentes.....	7
2.1c Diagnóstico.....	8
2.1d Tratamiento.....	10
2.1e Control y prevención.....	11
2.2 <u>Brucella ovis</u>	
2.2a Generalidades.....	12
2.2b Antecedentes.....	13
2.2c Diagnóstico.....	14
2.2d Tratamiento.....	15
2.2e Control y prevención.....	16
2.3 Vesículas	
2.3a Vesículas de membrana externa en bacterias gram negativas.....	17
2.3b Teorías de la formación de vesículas.....	18
2.3c Métodos de aislamiento, composición y actividades biológicas de vesículas.....	22
2.3d Actividad Bactericida y proteolítica de vesículas.....	25
3. OBJETIVOS.....	27
4. MATERIAL Y METODOS	
4.a Material y métodos.....	28
4.b Metodología para microscopía electrónica de barrido.....	29
4.1b Esquema del microscopio electrónico de barrido.....	33
4.c Metodología para microscopía electrónica de transmisión.....	36
4.1c Esquema del microscopio electrónico de transmisión.....	42
5. RESULTADOS	
5.a Micrografías de <u>A. seminis</u> y <u>B. ovis</u> por microscopio electrónico de barrido.....	45
5.b Micrografías de <u>A. seminis</u> y <u>B. ovis</u> por microscopio electrónico de transmisión.....	48
6. DISCUSIÓN.....	52
7. CONCLUSIONES.....	56
8. GLOSARIO.....	58
9. BIBLIOGRAFÍA.....	61

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

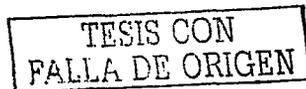
Figura 1. Representación de eventos necesarios para la formación de MVs en <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	20
Figura 2. Metodología empleada en la microscopía electrónica de barrido.....	29
Figura 3. Constitución del microscopio electrónico de barrido.....	33
Figura 4 A. Metodología empleada en la microscopía electrónica de barrido, para la obtención de suspensiones bacterianas de <u>A. seminis</u> y <u>B. ovis</u>	36
Figura 4 B. Metodología para la microscopía electrónica de barrido.....	37
Figura 5. Constitución del microscopio electrónico de transmisión.....	42
Figura 6. Micrografía electrónica tomada con el MEB (JSM-5410LV) de <u>A. seminis</u> , vista general magnificación 20.000 aumentos.....	45
Figura 7. Micrografía electrónica tomada con el MEB (SEM JSM-2SS II) de <u>B. ovis</u> , magnificación 45.000 aumentos.....	46
Figura 8. Micrografía electrónica tomada con el TEM (JEM-100S) de <u>A. seminis</u> , magnificación 40.000 aumentos.....	48
Figura 9. Micrografía electrónica tomada con el TEM (JEM-100S) de <u>A. seminis</u> , amplificada a partir de la magnificación a 40.000 aumentos.....	49
Figura 10. Micrografía electrónica tomada con el TEM (JEM-100S) de <u>B. ovis</u> , magnificación 40.000 aumentos.....	50
Figura 11. Micrografía electrónica tomada con el TEM (JEM-100S) de <u>B. ovis</u> , amplificada de la magnificación a 40.000 aumentos.....	51
Tabla1. Características de la epididimitis causada por <u>A. seminis</u> y <u>B. ovis</u>	6
Tabla. 2 Líneas para obtener el tamaño de la partícula que se este observando en el MEB.....	35
TABLA 3. Magnificación y tamaño de partículas de látex para la obtención de las medidas en μm de bacterias y vesículas.....	44
TABLA 4. Tiempos de tinción negativa y pH empleado para cada bacteria, en la microscopía electrónica de transmisión.....	47

INTRODUCCIÓN.

En el presente trabajo se realiza una recopilación de información acerca de nuevas estructuras celulares presentes en diferentes géneros de bacterias gram negativas, las cuales se conocen como vesículas de membrana externa (MVs), el fenómeno por el cual estas vesículas se forman en la membrana externa de las bacterias aun se desconoce, sin embargo se han propuesto varios modelos de formación de MVs, entre algunas características importantes de estas vesículas se consideran: Una fuente importante para la purificación y caracterización de componentes celulares ya que pueden estar formadas por lipopolisacárido, proteínas periplásmicas y de membrana externa, fosfolípidos, toxinas, enzimas y DNA, lo cual ya ha sido demostrado en algunos géneros de bacterias Gram negativas, las MVs pueden presentar diferentes actividades biológicas, bactericidas y proteolíticas.

En este trabajo se agregan dos especies a la lista de bacterias que producen MVs, las cuales son Actinobacillus seminis y Brucella ovis antes de realizar este trabajo se desconocía si A. seminis producía MVs y aunque B. ovis ya se había reportado que produce MVs, estas solo se habían observado por microscopía electrónica de transmisión y no de barrido.

Por otra parte Actinobacillus seminis y Brucella ovis producen una enfermedad conocida como epididimitis ovina que afecta a borregos machos produciendo esterilidad en este trabajo se mencionan algunas características de la enfermedad, tratamiento, control y prevención, así como las características generales de las bacterias y diagnóstico.



Por último es este trabajo se describe la metodología utilizada en la microscopía electrónica de barrido y transmisión para lograr la observación de estas estructuras celulares así como el funcionamiento de cada uno de los microscopios utilizados, también se realiza una comparación entre otras técnicas utilizadas por algunos autores en la observación de estas estructuras y algunas actividades que se han encontrado en estas estructuras en otras especies de bacterias Gram negativas.

La importancia de estas estructuras celulares también se menciona, para el caso de estas dos bacterias, podrían ser importantes en la producción de vacunas, en el diagnóstico de la enfermedad, ubicar en que parte del tejido afecta estas bacterias y poder conocer si existen receptores en las células del epidídimo.

GENERALIDADES.

Funciones del epidídimo.

El epidídimo es una parte del testículo que consta de tres partes anatómicas cabeza, cuerpo y cola.

El epidídimo realiza varias funciones como son: **absorción** esta se realiza en los segmentos inicial y medio (cabeza y cuerpo), concentra el semen absorbiendo gran parte del fluido cuando pasa a través del ducto epididimal, **secreción** se cree que esta función es necesaria para mantener la viabilidad de los espermatozoides durante el almacenamiento en la cola del epidídimo, **maduración** sirve de área de maduración para los espermatozoides, cuando los espermatozoides llegan a la cabeza del epidídimo, se encuentra en un alto grado de inmadurez como lo indica la presencia de la gota citoplásmica en el cuello, pieza media o rabo. Al pasar a través del epidídimo, esta gota emigra del cuello al rabo y se elimina lo cual lo convierte en un espermatozoide maduro este cambio morfológico representa cambios físicos y citotímicos y esta asociado con la adquisición de un aumento en capacidad de movimiento y en la habilidad de fertilización, **almacenamiento** sirve de área de almacén para espermatozoides el cual se realiza en la cola del epidídimo. **transporte** actúa como vía de transporte para los espermatozoides desde los ductos eferentes hasta el ducto deferente. La acción de transporte es por movimiento del epitelio ciliar mantenido por las contracciones de la musculatura de la pared del ducto. (6, 7, 16, 22)

Epididimitis Ovina:

La epididimitis ovina es una inflamación del epidídimo que afecta a borregos machos esta enfermedad es infecciosa, contagiosa, progresiva de curso agudo o crónico, la inflamación del epidídimo puede dar como resultado degeneración testicular e infertilidad.

Un sinónimo de la epididimitis es la orquiepididimitis infecciosa esta se produce cuando la infección alcanza a los testículos puede ser aguda o crónica, afecta las envolturas serosas de los testículos y del epidídimo, que provoca engrosamiento y adherencias de las serosas parietales, detectables clínicamente, así como lesión y obstrucción del epidídimo afectado, degeneración y atrofia del testículo y consecuente subfertilidad o esterilidad.

El diagnóstico clínico es sumamente inespecífico debido a la existencia de varias bacterias que causan epididimitis u orquiepididimitis; entre las que se encuentran Actinobacillus actinomycetemcomitans, Haemophilus spp., Corynebacterium ovis, Brucella melitensis, Brucella ovis, Actinobacillus seminis, e Histophilus ovis estas últimas dos bacterias son consideradas como parte de la microbiota permanente o transitoria de las mucosas del tracto reproductor, causando infecciones ascendentes

al epididimo y ocasionalmente al testículo y órganos sexuales accesorios, se desconocen los factores específicos que predisponen a estos órganos a la infección, existen diferentes características de la epididimitis producida por A. seminis y B. ovis (tabla 1) (4,6,7,13,16,22,27,29,31,38).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CARACTERÍSTICA	Epididimitis por <u>A. seminis</u>	Epididimitis por <u>B. ovis</u>
Sinónimos	Orquepididimitis del borrego.	Orquepididimitis infecciosa.
Hábitat	<u>Epididimitis infecciosa</u> Habitantes normales de la mucosa bucal, nasal, preputial y penéana de los ovinos machos	<u>Brucelosis Genital Ovína</u> No es flora normal, se puede encontrar en el medio ambiente, en orina, heces y fluidos biológicos de animales enfermos.
Animales que afecta	Animales jóvenes, menores de 2 años	Animales adultos y a medida que envejecen aumentan sus posibilidades de enfermar
Sintomas y Signos	Produce una enfermedad clínica o subclínica. <u>Enfermedad subclínica:</u> Solo se puede diagnosticar por cultivos de semen y/o de orina ó demostrando la presencia del agente en ambos fluidos, los animales no presentan síntomas <u>Enfermedad clínica:</u> se puede presentar en forma aguda con una intensa inflamación del escroto, el cual se encuentra aumentado de tamaño, tumefacto, caliente y doloroso. El borrego afectado está muy decaído, con elevación de temperatura rectal, con anorexia, se resiste a caminar ó lo hace con los miembros posteriores muy separados ó con rangueras y envarado	Produce una enfermedad clínica o subclínica. <u>Enfermedad subclínica:</u> Los borregos no presentan síntomas pero tienen serología positiva, estos animales tienen alteraciones seminales, aunque no son constantes, estas consisten en reducción del número y la motilidad de espermatozoides, defectos de la cola, con presencia de <u>B. ovis</u> y leucocitos
Transmisión	Puede ser congénita ó contraerse durante la lactancia ó del medio ambiente contaminado. Produce en la pubertad favorece el ascenso contraccorriente del agente, el cual es muy abundante en mucosas de borregos sano y enfermo.	Es considerada una enfermedad venérea. Los carneros se enferman montando a la misma oveja que montó un carnero enfermo en el mismo período de celo Monta a un carnero infectado, o cuando se ofitean y resoplan Herdas con tjeras en la trasquilación ó peinos contaminados con semen infectado. la ingestión de pasturas contaminadas con placentas de fetos abortados ó nacidos vivos Uso de electroyacuador en varios carneros sin guardar medidas higiénicas
Diagnóstico	Sintomatología, cultivos de semen ó orina, extendidos de semen, valoración de calidad seminal, inoculación de semen en borregos vírgenes, serología	Pruebas serológicas, examen clínico del animal, examen bacteriológico del semen
Tratamiento y Prevención	Penicilina, estreptomocina, oxitetraciclina ó sulfas Oxitetraciclina en el agua de bebida cuando aparece el primer caso	Tetraciclinas VACUNA: Una sola dosis normal de <u>B. melitensis vva</u> (Vacuna Rev 1)
Distribución Geográfica.	No hay vacunas Australia, Brasil, Argentina, Australia, Canadá, Chile, Alemania, México, Hungría, Nueva Zelanda, Perú, Rusia, África del Sur, España y los Estados Unidos de América	Argentina, Australia, Brasil, Canadá, Chile, Francia, Alemania, Hungría, México, Nueva Zelanda, Perú, Rumania, Rusia, República eslovaca, África del Sur, España, los Estados Unidos de América y Uruguay

Tabla1. Características de la epididimitis causada por A. seminis y B. ovis
(1,4,5,6,13,16,22,27,30,34,39,41,43)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Actinobacillus seminis.

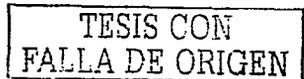
Generales:

Es un cocobacilo muy pleomórfico, gram negativo, mide $1\mu\text{m} \times 1-4\mu\text{m}$ (ancho y largo respectivamente) puede agruparse en cadenas o formando empalizadas, es inmóvil, no forma esporas, anaerobio facultativo, tiene un metabolismo fermentativo; el crecimiento óptimo ocurre cuando se incuban los cultivos en una atmósfera de 10% de CO_2 a 37°C en medios adicionados con sangre o suero, después de 24 horas las colonias son puntiformes, a las 48 hrs. son grandes y blancas de 1-2 mm de diámetro (2,4,6,23,35).

Un estudio ha demostrado que los antígenos de membrana de A. seminis, contienen hidratos de carbono y componentes lipoproteicos, en este estudio se aisló A. seminis de corderos que no presentan la enfermedad y A. seminis de corderos que si presentan la enfermedad, la primera bacteria no contiene algunas lipoproteínas y carbohidratos de membrana, que pueden ser los antígenos capaces de unirse a las células del epidídimo para iniciar la colonización del tejido esto hace suponer que puede ser un patógeno oportunista que se encuentra como flora normal y solo por ciertos factores desarrolla la enfermedad como son la presencia de proteasas las cuales son capaces de destruir el tejido permitiendo la colonización. (6).

Antecedentes de los primeros aislamientos.

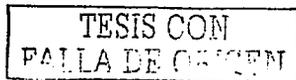
En 1902 Lignieres y Spitz describieron una enfermedad parecida a la actinomicosis, en el ganado bovino de Argentina, designaron al germen como Actinobacillus.



En Nueva Zelanda Dodd y Hartley en 1955 describieron una epididimitis supurativa en carneros causada por un organismo que se refiere como pleomórfico gram negativo, posteriormente en Australia, Baynes y Simmons en 1960 aislaron un organismo similar a partir de 3 casos de epididimitis y nombraron al agente causal como A. seminis. La infección causada por A. seminis también fue señalada por Livingston y Hardy en 1964 en los Estados Unidos de América, Clapp y Roberts en 1967 registraron el aislamiento de un organismo gram negativo no identificado de algunos de los casos anteriores. Ekdahl en 1968 en Nueva Zelanda señaló el aislamiento de A. seminis en lesiones epididimales, Watt en 1970 aisló un organismo que se asemejaba a A. seminis a partir de un borrego con epididimitis crónica en Australia occidental, en México el primer caso de epididimitis producida por A. seminis fue a partir de animales de importación procedentes de Nueva Zelanda en 1982 (6,23).

Diagnóstico.

La epididimitis causada por A. seminis se divide en subclínica y clínica, (tabla 1) la enfermedad subclínica sólo se puede diagnosticar por cultivos de semen u orina, por la demostración de los bacilos en un extendido de semen fijado y coloreado con hematoxilina-eosina en estos frotis aparecen gran número de leucocitos, lo que se considera indicador de enfermedad subclínica, aunque no se observen los bacilos gram negativos. La enfermedad clínica se diagnostica por la sintomatología, fundamentalmente por palpación escrotal, y se confirma por cultivos, frotis de semen y orina, en el frotis de semen se observan muy pocos espermatozoides con poco vigor y motilidad, muchos leucocitos neutrófilos y bacilos gram negativos.



Las pruebas de diagnóstico aplicadas para la identificación de A. seminis incluyen tanto pruebas microbiológicas como serológicas, dentro de las pruebas microbiológicas se ha propuesto que bacterias pleomórficas gram negativas que son catalasa, oxidasa, nitrato, y decarboxilación de la ornitina positivos e indol, ureasa, fosfatasa, negativos deben ser consideradas como A. seminis, dentro de las pruebas serológicas se incluye la prueba de fijación del complemento y anticuerpos fluorescentes contra A. seminis y además el sistema API-ZYM ayuda a identificar la producción de diferentes proteasas por lo que es útil para la identificación provisional, sin embargo existe un problema para la identificación de A. seminis por pruebas microbiológicas por que es difícil su aislamiento ya que al colectar la muestra otras bacterias como Histophilus ovis, Pasterella spp., que son parte de la microbiota normal del tracto reproductor también son aisladas y al momento de su cultivo se desarrollan colonias con características morfológicas semejantes a las de A. seminis y en la tinción de Gram, también son muy semejantes, por que estas bacterias también son pleomorficas gram negativas por lo que esto retarda su identificación (1,4,6,23,30,34,36).

Una prueba rápida para la identificación de A. seminis, es a través de la colección de una muestra de semen tratada por la tinción de Ziehl-Neelsen modificado (con esta tinción A. seminis se tiñe de color rojo), ya que es una técnica diferencial en donde se muestra la resistencia de una célula teñida al ser decolorada por los ácidos, esta propiedad ácido-resistente se encuentra relacionada con el alto contenido de lípidos en la pared celular, A. seminis presenta esta característica por lo que se recomienda este estudio cuando no se cuenta con el tiempo necesario, para realizar las técnicas microbiológicas, además de las pruebas serológicas que también brindan un diagnóstico rápido en la identificación de A. seminis (4,6,23,30,34,36).

Se ha diseñado una nueva técnica para diferenciar A. seminis por PCR en dos modalidades: PCR-REP (en la cual se utilizan elementos palindrómicos repetidos extragénicos) y PCR-ERIC (Elementos intergénicos intrabacterial), estos dos métodos pudieran usarse para la diferenciación de A. seminis, estudios epidemiológicos y también para la confirmación de la identidad de A. seminis (1).

Tratamiento contra A. seminis.

Todos los miembros del género Actinobacillus, son sensibles a la tetraciclina y al cloranfenicol, se ha encontrado resistencia a clindamicina (23).

El tratamiento de los casos subclínicos es generalmente exitoso, se puede utilizar penicilina 30 UI/Kg peso cada 12 hrs. por vía intramuscular o tetraciclinas de larga duración 2 mg/Kg peso cada 72 hrs. por vía intramuscular, 3 aplicaciones o sulfas 2 mg/Kg peso cada 3 días. Se puede recurrir a la terapia oral con oxitetraciclinas a razón de 200 mg. por día dados en el agua de bebida (4, 6, 38).

El tratamiento de los casos clínicos no se justifica ya que aunque el borrego supere la infección queda con lesiones de tal gravedad que esta seriamente comprometida su fertilidad y es muy difícil que la recupere. El tratamiento podría ser efectivo si la enfermedad es detectada muy precozmente antes de que se produzcan lesiones graves de la estructura de los ductos y se instale la fibrosis consecuente que bloqueará la movilización de los espermatozoides (4, 6, 22, 38).

Control y prevención.

Es difícil controlar una infección de la que no se conoce en profundidad su epidemiología y sus formas de transmisión, como prevención se pueden utilizar los antibióticos por vía oral como la ya mencionada oxitetraciclina, que permite reducir la prevalencia de la enfermedad. No existe una vacuna para prevenir la enfermedad, por lo que se recomienda separar a los animales infectados de los sanos (34,36,38).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Brucella ovis.

Generalidades.

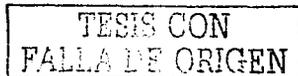
Es un cocobacilo gram negativo pequeño que mide aproximadamente 0.5-0.7 por 0.6-1.5. μm .(ancho y largo respectivamente) normalmente se encuentran individualmente, rara vez en cadenas, no contiene cápsula, es inmóvil, no forma esporas, no tiene flagelo, resisten decoloración con ácidos débiles (0.5 % de ácido acético). Son aerobios y no crecen en condiciones anaeróbicas estrictas, su crecimiento óptimo ocurre cuando se incuban los cultivos en una atmósfera de CO_2 al 10% a 37°C; ningún crecimiento ocurre debajo de 26°C, en el medio de cultivo B. ovis sólo existe en forma rugosa, esta es una diferencia con respecto a las demás especies del género Brucella esta fase rugosa es virulenta, y su espectro de huésped es mas estrecho, ya que solo infecta carneros (2,4,6,7,16,23,30,34,36,37,43,45).

En los medios sólidos, como agar brucella y Thayer – Martin modificado se desarrollan de 3-5 días colonias pequeñas, blanquecinas, redondas, convexas, rugosas y brillantes de 0.2-0.4 mm de diámetro. El crecimiento es pobre a menos que los medios se enriquezcan con sangre o suero. No hay ninguna hemólisis en sangre de bovino, ovino o de caballo. El crecimiento de organismos es inhibido por una dilución 1/100 000 de violeta de metilo pero no por una dilución 1/25 de fucsina básica. B. ovis se aglutina con una dilución 1/1000 de acriflavina y autoaglutinantes a 37°C o 56°C (2,4,6,7).

B. ovis se une con las inmunoglobulinas (IgG) y otras proteínas séricas de forma inespecífica, esto es compatible con la hipótesis que postula que las proteínas de membrana externa quedan expuestas a medida que los organismos se vuelven rugosos (23).

Antecedentes de los primeros aislamientos.

Las Brucellas se descubrieron desde 1887, cuando Bruce aisló e identificó por primera vez la Brucella melitensis. Durante muchos años el género Brucella estuvo compuesto por tres especies: Brucella abortus, Brucella suis y Brucella melitensis, posteriormente Brucella canis y en la actualidad se han agregado dos especies más en forma definitiva Brucella neotomae y Brucella ovis. Los estudios de carneros infectados naturalmente con B. ovis fueron estudiados por McGowan y Devine en 1960, ellos confirman que la fertilidad es más baja que en los animales no infectados. En un estudio realizado por McGowan y Devine en 1960 en donde infectaron 29 animales naturalmente concluyeron que el semen era definitivamente de calidad inferior en un 25 a 50% de los carneros. Cameron en 1971, sugiere que la infección con B. ovis es un factor principal en la producción de aspermia, y la existencia de motilidad reducida de espermatozoides, incluso en los carneros sin las lesiones perceptibles; él observó que la infección con B. ovis causa anomalías secundarias en los espermatozoides (anomalías de cola, cabezas libres, cambio acrosomal y gotas citoplásmicas) y anomalías primarias (cabezas anormales y cabezas de tamaño anormal), las características más importantes de la epididimitis producida por B. ovis se muestran en la tabla 1, en México el primer aislamiento fue a partir de animales importados de Estados Unidos en 1979 en el Estado de Guanajuato. (6, 23, 27, 30, 34, 36, 38, 43,45).



Diagnóstico.

Para el diagnóstico de carneros con epididimitis es necesaria la conjunción de varios procedimientos como son:

a) Obtención de la muestra

Las muestras más valiosas para la obtención de B. ovis de los animales vivos son semen, hisopos vaginales, leche y suero, para el aislamiento de B. ovis después de la necropsia, los órganos preferidos por lo que se refiere a la probabilidad de aislamiento son el epidídimo, vesículas seminales, y nodos de linfa inguinal en los carneros, y el útero, los nodos de la linfa ilíacos y supra-mamarios en las ovejas (4, 6, 13, 16, 22,30).

b) Obtención de antígenos

Cuando se colocan las células de Bruella en solución salina agregando calor se obtienen antígenos o un extracto de antígenos solubles (el método de extracción de antígeno HS), cuyo componente mayor precipita con suero cuando este contiene anticuerpos contra B. ovis, por esta razón, los extractos de HS han sido llamados antígeno específico. La caracterización química del extracto HS de B. ovis ha mostrado que es rico en lipopolisacárido rugoso (R-LPS) y proteínas del grupo 3 de la membrana externa, así los extractos de HS contienen determinantes antigénicos de LPS específico para B. ovis. Debido a su solubilidad en agua y al volumen alto de epitopes de superficie celulares del extracto HS es el mejor antígeno usado ampliamente para el diagnóstico serológico de B. ovis (6, 13, 14, 28,44).

La confirmación por el laboratorio puede ser basada en métodos directos e indirectos:

c) **Diagnóstico Directo:** Es hecho por medio del aislamiento bacteriológico de B. ovis del semen o tejidos de carneros, o las descargas vaginales y leches de ovejas, en medios de cultivo selectivos adecuados, como Agar Brucella. B. ovis puede identificarse correctamente a partir de los aislamientos por sus características de crecimiento, observación directa que usa la luz oblicuamente reflejada, tinción de Gram en la cual B. ovis es (-), catalasa (+), oxidasa (-), ureasa (-) y prueba de aglutinación de acriflavina (+). Sin embargo, la identificación definitiva debe llevarse a cabo por los laboratorios de referencia con experiencia en su identificación. Recientemente, el método que se usa es la electroforesis en gel de campo pulsante, con éste método es posible diferenciar a B. ovis de otras especies de Brucella (6, 13,23).

d) **Diagnóstico Indirecto:** Es basado en las pruebas serológicas como Inmunodifusión en agar (AGID), la prueba de fijación del complemento (CF), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), usando antígenos solubles obtenidos de la superficie de B. ovis. se están probando algunos ELISAS que usan proteínas recombinantes, y anticuerpos monoclonales. Se prefiere para el diagnóstico rutinario realizar las pruebas serológicas debido a que se puede obtener un resultado rápido a diferencia del diagnóstico bacteriológico, que requiere de varios días debido al aislamiento de la bacteria ya que B. ovis crece muy lentamente (4, 5, 6, 13, 16, 27, 30,43).

Tratamiento contra B. ovis

La recomendación universal es no tratar los carneros con lesiones clínicas, ya que las lesiones son irreversibles y de tal gravedad que el bloqueo de los ductos y la fibrosis no

se puede eliminar, aunque sean eliminados los gérmenes. Los portadores subclínicos pueden eliminar la infección por medio del tratamiento con tetraciclinas de larga acción: 10 mg/Kg de peso cada 72 hrs., por 3 a 5 aplicaciones vía intramuscular, o estreptomina 30 a 40 mg/Kg de peso cada 12 hrs. por vía intramuscular durante 7 días, las que se pueden usar solas ó combinadas (4,6,13,16).

Control y prevención

Separación de los machos jóvenes de los adultos y apareamiento de las hembras solo con estos últimos, vacunación y/o realización de pruebas serológicas y sacrificio de los positivos, la vacunación es la mejor estrategia cuando la incidencia es elevada, pruebas serológicas y sacrificio cuando la situación es crónica (6, 28, 29).

La vacunación probablemente es el medio más barato y práctico para prevenir la infección por B. ovis en las áreas con una alta incidencia de infección. Los requisitos para las vacunas y diagnóstico biológico son: Obtener cultivos jóvenes para la producción de antígenos o producción de la vacuna de los laboratorios internacionalmente reconocidos. Para la prevención de la infección por B. ovis una sola dosis normal de 10⁹ unidades formadoras de colonias de B. melitensis viva (Vacuna Rev1), probablemente es la vacuna disponible para la profilaxis de B. ovis, esta se puede administrar de dos formas hipodérmicamente (en un volumen de 1 ml) o conjuntamente (en un volumen de 25-30 µl). Puede usarse eficazmente en los carneros. Esta cepa de la vacuna debe encontrarse dentro de las normas de calidad mínimas de concentración adecuada, ausencia de disociación y virulencia residual adecuada e inmunogenicidad (13, 27, 43).

VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.

Las vesículas, son pequeñas esferas cerradas que derivan de la membrana externa por fragmentación seguida de cierre, probablemente son el resultado de la expulsión de la membrana celular, sus sinónimos son: vesículas alternativas, microvesículas, vesículas, vesículas de la membrana, vesículas de membrana externa (**MVs**) o vesículas extracelulares, se ha estudiado extensamente su composición química, propiedades biológicas, y morfología por microscopía electrónica, diferentes géneros de bacterias gram negativas producen tanto in vitro como in vivo vesículas de membrana externa (**MVs**) lo cual es un fenómeno normal, durante su formación las MVs encierran varios componentes del periplasma celular, pueden contener lipopolisacárido, proteínas periplásmicas y de membrana externa, fosfolípidos, toxinas, enzimas, fosfolípidos, DNA, factores de virulencia y componentes de pared celular, como el lipopolisacárido (LPS). Por lo tanto, las vesículas mantienen una fuente excelente de purificación subsecuente y caracterización de moléculas biológicamente activas (**11, 24, 20, 32, 40, 42, 46**).

Estas estructuras, tienen un tamaño de 20 a 500 nm, pueden unirse a la membrana celular o soltarse de la misma, las MVs se han encontrado en diferentes géneros, como Bacteroides, Pseudomonas, Actinobacillus, Escherichia, Haemophilus, Neisseria, y Bruceella; recientemente, estos últimos estudios han mostrado que las vesículas pueden soltarse de las bacterias al ambiente. Esto se ha informado en varios géneros incluyendo Bacteroides y Actinobacillus (**32**)(**46**)(**20**) (**8,9,29**).

Mientras el papel de las MVs en la patogénesis es incierto, los datos indican que estas estructuras pueden funcionar como factores de virulencia. Su tamaño pequeño podría permitirles fácilmente cruzar barreras del epitelio que son por otra parte impermeable a las células enteras. Las MVs también podrían servir como un vehículo para las toxinas y enzimas proteolíticas y podrían servir para entender la capacidad de las células bacterianas de obtener los nutrientes. Las MVs también pueden degradar los anticuerpos y así impedir la defensa inmune antibacteriana específica.

Porque estas estructuras se concentran y se purifican fácilmente, ellas pueden ser usadas para aislar moléculas específicas o ligadas que son parte de ellos, o para estudiar actividades biológicas asociadas con la membrana externa. Finalmente, es razonable pensar que estas estructuras pudieran usarse como un sistema para la entrega de sustancias como: drogas, antibióticos, u otros compuestos a células blanco en donde se produce la lesión. Es importante entender por qué y cuando se forman las vesículas y si las regiones específicas de la membrana externa son más susceptibles que otras (26,29).

Hasta el momento se desconoce si A. seminis produce vesículas de ahí la importancia de la realización de este trabajo; con lo cual se pretende obtener las primeras fotografías de las vesículas de A. seminis utilizando la microscopía electrónica de barrido y transmisión; por otra parte aunque ya se ha reportado que B. ovis produce vesículas, estas solo se han observado por microscopía electrónica de transmisión y no de barrido.

Formación de vesículas de membrana externa. (MVs)

Existen varias teorías por las cuales las MVs de bacterias gram-negativas pueden formarse:

1.-Fung en 1978 mostró que los mutantes con defectos en la lipoproteína mureina exhiben invaginación deformando la membrana externa durante la división celular, produciendo así MVs grandes (10).

2.-Wensink y Witholt en 1981, postularon que la membrana externa crece más rápidamente que la capa de peptidoglucano, el exceso del material de la membrana externa (respecto a la capa de peptidoglucano) da lugar a una protuberancia pequeña en la membrana externa, si esta protuberancia continúa creciendo da lugar a una MVs atada por sólo una cuerda de membrana externa (10).

3.- Rosenthal y Dziarski en 1994 proponen que es el resultado de la síntesis de peptidoglucano que causa una abultación en la membrana externa, la membrana se pandea y finalmente forma la MVs (32,46).

4.-Zhou Leah en 1998 menciona que el movimiento mecánico provoca que las MVs sean soltadas al medio de cultivo, es conocido que las perturbaciones en el crecimiento o en la integridad de la membrana externa refuerza su formación por ejemplo, antibióticos o falta de nutrientes puede estimular esta formación. Aparece por consiguiente un desequilibrio en la transición y crecimiento aumentando la producción de MVs diferentes antibióticos, como por ejemplo, la (gentamicina) estimula la producción de MVs en Pseudomonas aeruginosa, esta bacteria produce MVs naturalmente, pero al agregar al medio gentamicina se observa una alta producción de MVs, las cuales son más grandes (19). En la figura 2 se muestra la formación de vesículas naturales e inducidas con gentamicina.

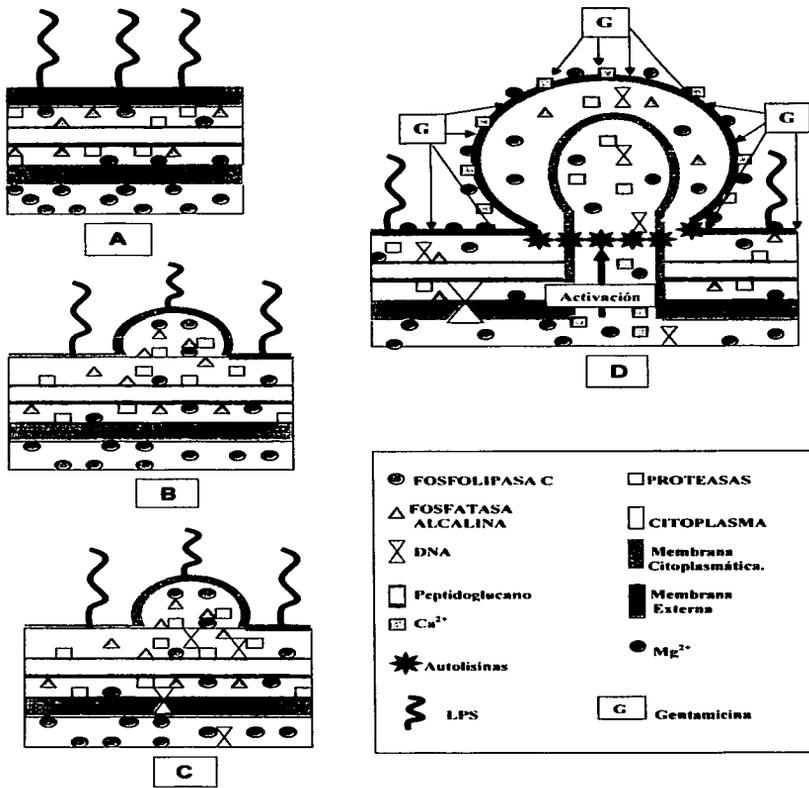


Figura 1. Representación de eventos necesarios para la formación de MVs en *Pseudomonas aeruginosa* (20).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la figura 1 se muestran las diferentes etapas necesarias para la formación de MVs, en el apartado A se esquematiza como se encuentra la membrana externa antes de que la vesiculación comience, el apartado B muestra el tipo más simple de la formación de MVs naturales más frecuente; esta MVs es comparativamente más pequeña, involucra sólo la exfoliación de la membrana externa, y atrapa sólo periplasma y sus componentes, el apartado C es una extrapolación del anterior además del atrapamiento del periplasma y sus componentes también se atrapa ADN que ha emigrado del citoplasma al periplasma lo cual es otra posibilidad para las MVs naturales, el apartado D muestra la producción de MVs al utilizar gentamicina (g-MVs), este antibiótico es un aminoglucósido el cual actúa sobre la síntesis proteica de P. aeruginosa, para que este aminoglucósido pueda efectuar su mecanismo de acción necesita primero desestabilizar la membrana externa y así penetrar a la célula para producir su muerte, primero el antibiótico desestabiliza la membrana ya que tiene propiedades catiónicas por lo que compete y cambia de sitio al Mg^{2+} y Ca^{2+} presente en la membrana externa de la bacteria, con esto se propone que gentamicina produce un mayor número de vesículas y con mayor tamaño debido a que existe una interacción carga - carga pequeña, la repulsión electrostática puede producir una gran curvatura en la membrana externa formando la g-MVs la cual estaría formada tanto por membrana externa y citoplasmática así como por constituyentes intracelulares (15,26).

Se han descubierto autolisinas en n-MVs (naturales) y g-MVs (estimuladas con gentamicina), estas autolisinas juegan papeles fisiológicos importantes en las bacterias como en el crecimiento y división celular, producción de la pared celular, formación de

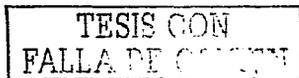
septos y hendiduras, funcionan como moléculas importantes que determinan crecimiento o lisis celular (15,26), es presunto que la unión íntima normal entre la membrana externa y peptidoglucano requiera una hidrólisis de la capa de peptidoglucano la cual es producida por autolisinas inmediatamente debajo de la MVs durante la vesiculación. Existe una ruptura del peptidoglucano durante el desarrollo de la n-MVs la cual se localiza y cierra, cuando la gentamicina desestabiliza la membrana produce la activación de autolisinas por la presencia de Mg^{2+} y Ca^{2+} intracelular, estas autolisinas pueden responder directamente a una hidrólisis localizada para liberar la vesícula cortando sus extremos que la unen a la membrana externa y al mismo tiempo se produce el cierre en la bacteria para impedir que la célula se lise, por lo tanto, la gentamicina desestabiliza la membrana externa, para que el periplasma y citoplasma puedan entrar en las MVs (19)(32)(20) (26).

Métodos de aislamiento de MVs.

Se han usado diferentes métodos para el aislamiento de MVs a partir del sobrenadante del medio de cultivo, como la precipitación con sulfato de amonio, centrifugación con sacarosa, ultracentrifugación y ultrafiltración (9)(46)(8)(21,25,29).

Composición de MVs.

Las MVs son parte de la membrana externa que se dividen de las células bacterianas que las generan por lo tanto es lógico que estas estructuras sean idénticas a la composición bacteriana.

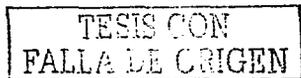


Se ha encontrado que las vesículas pueden contener polipéptidos que pueden provenir de: proteínas que son parte de las células que se concentran en el proceso de formación de vesículas, proteínas que están en el interior de la célula pueden ser envueltas, cuando brota la vesícula y proteínas que son el resultado de la acción de las proteasas (9)(29,25,38).

Muchos factores de virulencia de P. aeruginosa son componentes de superficie celular, como el lipopolisacárido (LPS) y alginata, o productos extracelulares, como proteasa alcalina, elastasa, exotóxina UN, DNasa. y LPS, varias enzimas, como la fosfolipasa C, proteasas, hemolisina, y fosfatasa alcalina, estos componentes celulares se han aislado de las vesículas (21).

Actividades biológicas de MVs.

Para producir la enfermedad, los microorganismos deben resistirse el sistema de defensa del organismo así como el acceso al órgano, colonización, y daño de los tejidos. Cada microorganismo contiene en su superficie varios factores de virulencia que determinan su patogenicidad, así se tiene que componentes de la pared celular bacteriana y MVs, pueden contribuir al proceso de patogenicidad, de hecho desde que las MVs atrapan componentes celulares, deben ser consideradas como un factor de virulencia importante. Sustancias que son biológicamente activas son concentradas en el interior y superficie de las MVs por lo cual pueden alcanzar áreas inaccesibles más fácilmente de lo que lo haría la célula bacteriana y por lo tanto difundir a través de las barreras anatómicas produciendo una respuesta inmunológica, semejante o igual a la bacteria completa y generar la enfermedad (29).



Los efectos adversos en pacientes que se encuentran en terapia de antibióticos tiene como resultado la liberación de componentes bacterianos lo cual es de gran preocupación a lo largo de esta situación, varios antibióticos pueden afectar la superficie bacteriana, sobre todo por la liberación, de endotoxinas y componentes de la pared celular de bacterias gram negativas e incrementar la producción de MVs en bacterias que las producen las cuales pueden actuar engañando al sistema inmune, el sistema inmune ataca a estas vesículas mientras que la bacteria coloniza al organismo. Estos componentes parecen ser un inductor poderoso de inflamación durante la infección **(21, 44)**.

Se conoce bien que el efecto bactericida del suero humano es de suma importancia en la defensa del organismo contra las infecciones bacterianas. La resistencia al suero humano puede ser conferida por los componentes de superficie celular como el lipopolisacárido, los polisacáridos capsulares, cromosomas y plasmidos que determinan las proteínas de la membrana externa y estar presente en las vesículas **(21,29)**.

Las vesículas inhiben completamente la actividad bactericida del suero (in vitro) cuando se usa una concentración de 0.3 mg/ml de vesículas, sin embargo hirviendo estas vesículas se previene esta inhibición; por otra parte a una alta concentración de vesículas hervidas también inhiben la actividad bactericida del suero, por lo tanto las vesículas contienen factores lábiles como estables al calor **(15)**.

Actividad bactericida de MVs .

Bacterias gram positivas y gram negativas poseen varios tipos de hidrolasas de mureína endógenas que se pegan covalentemente al peptidoglucano de la pared celular. La mayoría de estas enzimas son autolisinas, estas actúan sobre el peptidoglucano hidrolizándolo, el resultado de esta hidrólisis es la avería de la integridad celular, las autolisinas pueden encontrarse ligadas al citoplasma, membrana citoplasmática, periplasma y peptidoglucano (15, 20,29).

Las n-MVs, por bacterias gram negativas como (Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Pseudomona, Klebsiella, Morganella, Proteus, Salmonella, y Shigella), lisan muchas bacterias gram positivas (incluso Mycobacterium) y cultivos de bacterias gram negativas, se sugiere que las MVs contienen autolisinas (15,20), las bacterias sensibles a MVs tienen quimiotipos de peptidoglucano A1 α , A4 α , A1 γ , A2 α , y A4 γ , mientras que las bacterias que no son afectadas por la lisis de vesículas contienen quimiotipos A3 α , A3 β , A3 γ , A4 β , B1 α , y B1 β , para que la lisis celular pueda ocurrir las bacterias deben de contener peptidoglucano químicamente diferente ya que bacterias con un peptidoglucano similar no hay digestión de pared celular y por lo tanto no existe lisis (20,26).

En bacterias gram positivas, las MVs se atan a la superficie de la pared celular donde rompen abiertamente, mientras liberan hidrolasas de peptidoglucano para digerir el peptidoglucano subyacente de la pared, la lisis sucede en el sitio de la digestión las MVs lisan bacterias gram negativas por un mecanismo diferente. Aquí, la membrana de MVs funde en la membrana externa de la bacteria y así, introduce en el periplasma luminal volúmenes que (contienen la hidrolasa de peptidoglucano).

Una vez en el periplasma, la hidrolasa difunde alrededor del saco de ácido murámico y puede digerir en varios sitios diferentes, mientras causa la lisis en múltiples sitios (26) (29).

Es posible que otras enzimas hidrolíticas se encuentren en MVs para realizar la lisis de bacterias. Por ejemplo, proteasas, lipasas, o fosfolipasa C podrían afectar directamente la membrana plasmática de bacterias susceptibles o podrían digerir los polímeros secundarios esenciales en la pared celular (9, 15, 19, 20, 21,26).

Actividad proteolítica de MVs.

Smith en 1977 sugiere que la presencia de enzimas proteolíticas en la superficie celular bacteriana podría ser potencialmente importante en la nutrición bacteriana así como en el proceso de patogenicidad, enzimas proteolíticas localizadas en la superficie de las vesículas facilitan la digestión por ruptura de moléculas complejas originando fragmentos pequeños empleados en la nutrición de la bacteria (9, 12, 29,38).

OBJETIVO GENERAL:

Determinar la presencia de vesículas de Actinobacillus seminis y Brucella ovis, mediante microscopía electrónica de barrido y transmisión.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.-Observar las características morfológicas de las vesículas de A. seminis y B. ovis por medio de microscopía electrónica de barrido y transmisión.
- 2.-Observar la morfología del cuerpo bacteriano que presenta A. seminis y B. ovis al desarrollar las vesículas.
- 3.-Establecer tiempo de adsorción de las bacterias en la rejilla (porta muestra del TEM) y tiempo de tinción negativa con ácido fosfotúngstico, para obtener el tiempo óptimo de tinción negativa para cada bacteria, en la observación de la presencia de vesículas por microscopía electrónica de transmisión, (TEM).
- 4.-Obtener el pH óptimo empleando diferentes valores de pH's en la solución colorante de ácido fosfotúngstico, para la observación de las bacterias y determinar si presentan vesículas A. seminis y B. ovis por medio de la tinción negativa para microscopía electrónica de transmisión.

MATERIAL Y METODOS

Material Biológico:

Cepa de referencia Actinobacillus seminis ATCC 15768

Cepa de referencia Brucella ovis REO 198

Agares:

Agar Brucella (Sigma B 4534)

Agar Sangre (Sigma B 6534)

Caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Sigma B 7403)

Reactivos:

Glutaraldehído al 25% (sigma G5882)

Etanol (sigma 31,297-5)

Cinta de carbono cemento conductivo (CCC)

Membrana plástica Formvar

Ácido fosfotúngstico (sigma P4006)

Partículas látex (sigma L1398)

Aparatos e Instrumentos

Filtro para volúmenes pequeños (sigma F7510)

Secador de punto crítico (TOUSIMIS SAMDRI-780A)

Ionizador (FINE COAT JEOL ION SPUTTER JFC-1100)

Microscopio Electrónico de Barrido (SEM JSM-2SS II)

Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM JEM-100S)

METODOLOGÍA PARA MICROSCOPIA DE BARRIDO

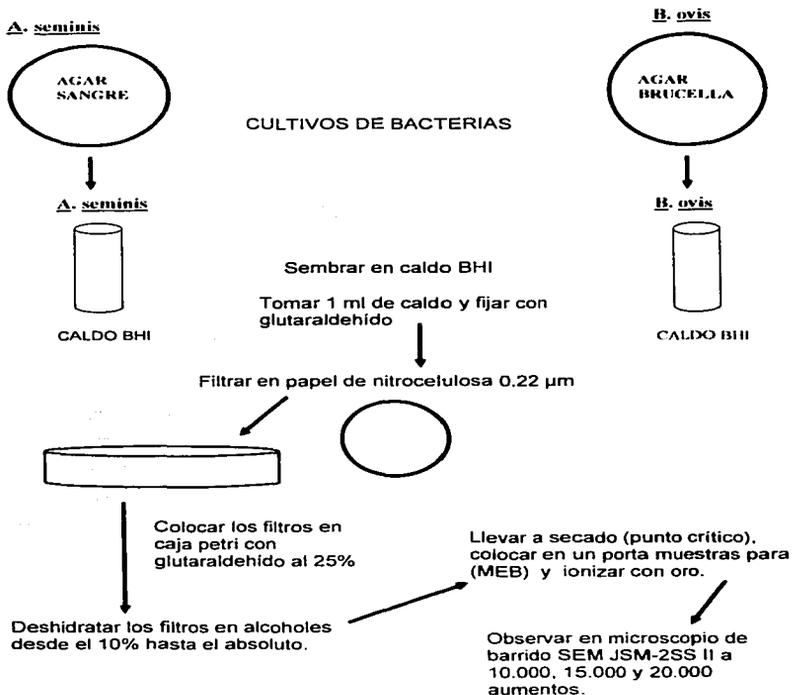


Figura. 2 Metodología empleada en la microscopía electrónica de barrido.

Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Tratamiento de bacterias:

Para la obtención de fotografías por microscopía electrónica de barrido, se muestra un diagrama de flujo en la figura 2, en este procedimiento se utilizaron cepas de A. seminis ATCC 15768 y B. ovis, REO 198 se sembraron en Agar sangre y Agar brucella respectivamente, ambas se incubaron en una atmósfera de CO₂ al 10% a 37°C, después de 3 días de incubación se observó el crecimiento en los medios de cultivo con la morfología colonial característica de cada bacteria, de estos crecimientos bacterianos se tomaron asadas de bacterias para inocular un tubo de caldo BHI para cada cepa bacteriana (a cada tubo se le inoculó con 2 asadas de bacterias), éstos se incubaron en una atmósfera de CO₂ a 37°C, los tubos inoculados se dejaron incubar por 48 horas, pasado este tiempo se homogenizaron los caldos de cultivo por inversión y se tomó 1 ml de caldo de cada tubo, agregándolo en tubos de ensaye 13x100 de rosca estériles, después se les agregó a cada uno 1 ml de glutaraldehído al 25% (sigma G5882) y se les dejó reposar por 24 hrs., pasado este tiempo se filtraron las bacterias en papel de nitrocelulosa 0.22 µm, utilizando un filtro para volúmenes pequeños (sigma F7510), una vez que las bacterias estaban contenidas en el papel, se colocaron en una caja petri la cual contenía glutaraldehído al 25% (sigma G5882), dejándose reposar por 1 hr. esto con el objetivo de fijar las células y permitir que cese la actividad biológica de la célula, así como preservar la estructura celular, mantener la integridad de la superficie y evitar cambios autolíticos, debido a que hay remoción del organismo presentándose cambios de temperatura, pH, concentración de oxígeno y nutrientes (3).

Deshidratación:

Al trabajar en un microscopio electrónico de barrido una de las características importantes de la muestra es que esta, se encuentre libre de agua, para remover agua de las bacterias contenidas en las membranas de nitrocelulosa, se utilizaron soluciones de etanol (sigma 31,297-5) a diferentes porcentajes, que iban desde etanol al 10% hasta llegar al etanol absoluto, cada membrana se dejó por 10 min. en cada solución de etanol a diferentes porcentajes, y se procede al secado a punto crítico inmediatamente (3,36).

Secado a punto crítico:

En esta técnica se utiliza CO₂ líquido y gaseoso, para realizar la remoción total del agua de la muestra, el aparato se basa en que el CO₂ a temperatura baja es líquido y a temperatura alta es gaseoso. Cuando la muestra sale deshidratada por el etanol, se coloca en el secador de punto crítico (TOUSIMIS SAMDRI-780A), ahí, la muestra se purga con CO₂ líquido hasta que el etanol haya sido reemplazado, posteriormente se sella la cámara y se calienta hasta que la temperatura llegue a 31°C, de esta forma el CO₂ líquido se evapora y la muestra queda totalmente seca (3,33).

Montaje de la muestra:

Una vez que la muestra ha sido deshidratada totalmente y secado a punto crítico, ésta se monta en un porta muestra, para esto primero al porta muestra se le pone una cinta de carbono cemento conductivo (CCC), con el fin de asegurar la muestra y permitir la colocación en el ionizador de oro.

Recubrimiento con oro:

El objetivo del baño con oro es que la muestra se vuelva conductora de corriente eléctrica y se proteja del haz de electrones esta capa de oro debe de ser suficientemente grueso como para que produzca electrones secundarios suficientes que permitan ver con buena resolución la muestra y lo suficientemente delgado para que no enmascare o tape las características superficiales de interés (33,36).

Este procedimiento se realizó con un ionizador (FINE COAT JEOL ION SPUTTER JFC-1100). Se coloca la muestra en la cámara, se selló y se programó el tiempo de recubrimiento en el cual el oro cae uniformemente y se obtiene una capa de 50 Å de grosor (el tiempo utilizado fue de 5 min.), se hace vacío y automáticamente el timer se enciende y la muestra se recubre totalmente según el tiempo programado, cuando el tiempo ha finalizado, lentamente empieza a ingresar aire a la cámara y de esta forma, la muestra está lista para colocarla y observarla en el MEB (SEM JSM-2SS II) (figura 3).

Almacenamiento:

El porta muestra con la muestra recubierta se debe evitar contaminar con grasa o polvo, para almacenar las muestras se utiliza una cámara libre de humedad para mantener la muestra totalmente seca para posterior observación (3).

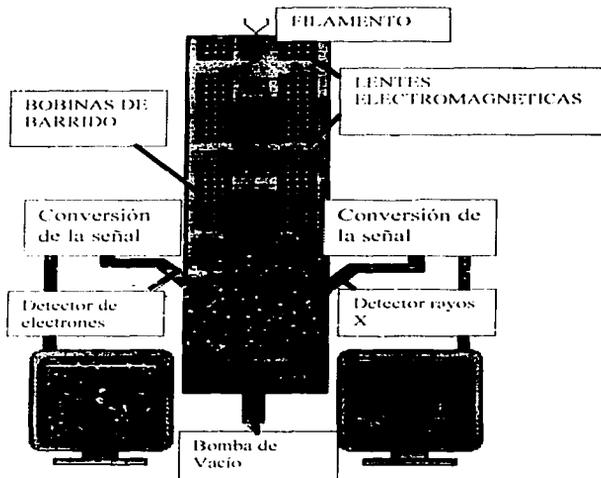


Figura3.-Constitución del microscopio electrónico de barrido (17).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Funcionamiento del microscopio electrónico de barrido (MEB).

La muestra es colocada en un pequeño espacio, al cual se le hace vacío después de cerrada la puerta. La puerta tiene tres palancas que el operador usa para: subir y bajar la muestra, rotar la muestra y acercarla o alejarla. Un haz delgado de electrones, es producido en la parte superior del microscopio por medio del calentamiento de un filamento metálico (10-30 KV), el rayo de electrones primarios sigue un recorrido a través de la columna de vacío del microscopio, con el propósito de evitar la dispersión de los electrones. El trayecto del haz de electrones es enseguida modificado por un conjunto de bobinas deflectoras que lo hacen recorrer la muestra punto por punto y a lo largo de líneas paralelas (barrido), y a su vez atraviesa las lentes condensadoras o electromagnéticas que le permiten ser reenfocado o centrado hacia la muestra. Posteriormente, el diámetro del haz de electrones puede ser modificado al pasar por las lentes objetivas que controlan la cantidad de electrones dentro de este; cuando los electrones primarios golpean la muestra, son emitidos electrones secundarios por el propio espécimen, estos electrones secundarios son atraídos por un colector donde se aceleran y se dirigen al escintilador, donde la energía cinética es convertida en puntos de mayor o de menor luminosidad, es decir, en luz visible. Esta luz es dirigida a un amplificador donde se convierte en señal eléctrica, la cual pasa a una pantalla de observación donde la imagen es formada línea por línea y punto por punto. Los circuitos que dirigen las bobinas de barrido (que obligan al haz a barrer la muestra), son las mismas que dirigen la parte de colección de electrones y que producirán la imagen.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Una vez que la imagen está en la pantalla esta se fotografía, gracias a que este equipo posee una cámara fotográfica integrada. Se tomaron fotografías de cada cepa bacteriana a diferentes aumentos como: 10.000, 15.000 y 20.000, aumentos, para la obtención de las medidas de las bacterias y vesículas el MEB nos coloca una banda dependiendo de la magnificación a la que se este trabajando (3, 17, 33,36) (tabla 2).

MAGNIFICACIÓN	MARCA DE MICRAS	LONGITUD (μm)
10X-70X		1000
100X-700X		100
1000X-7000X		10
10000x-70000		1
100000x		0.1

Tabla. 2 Líneas para obtener el tamaño de la partícula que se este observando en el MEB (33).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resolución del equipo:

El Microscopio electrónico de barrido tiene una resolución de 10 nm y una profundidad de foco de 10 nm, mucho menor que el microscopio electrónico de transmisión. La ventaja del MEB es que proporciona imágenes tridimensionales, ya que éste específicamente examina la superficie de las estructuras (36).

A. METODOLOGÍA PARA MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN.

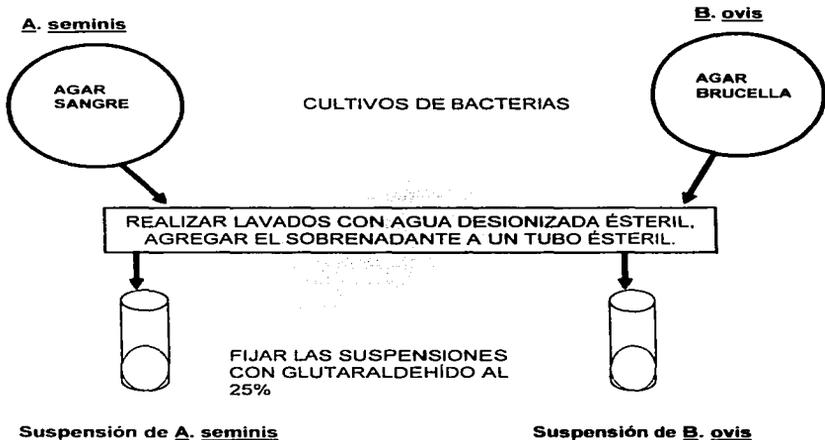


Figura. 4A metodología empleada en la microscopía electrónica de barrido, para la obtención de suspensiones bacterianas de **A. seminis** y **B. ovis**.

B. MONTAJE DE LA SUSPENSIÓN DE BACTERIAS EN LAS REJILLAS PORTAMUESTRA

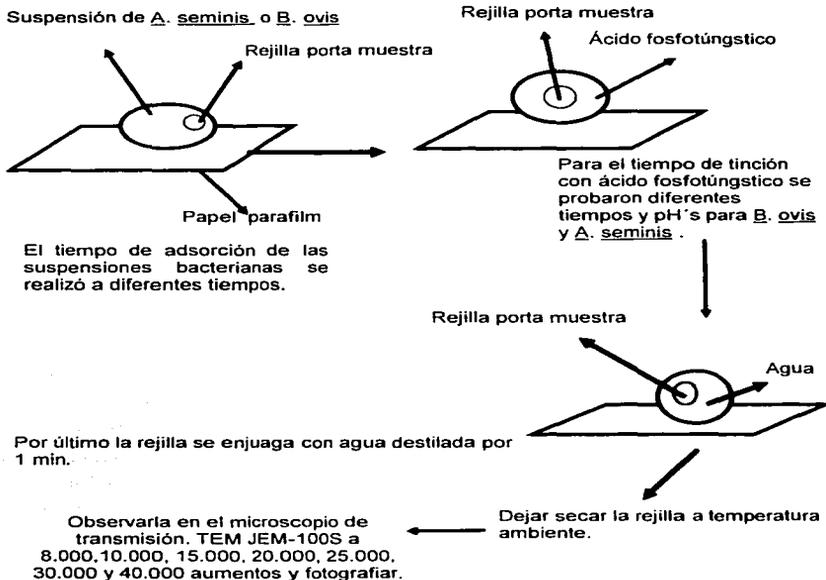


Figura. 4B Metodología para la microscopía electrónica de barrido.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Tratamiento de bacterias:

Las cepas de A. seminis ATCC 15768 y B. ovis. REO 198, se sembraron en Agar sangre y Agar brucella respectivamente. ambas se incubaron en una atmósfera de CO₂ al 10% a 37°C, después de 3 días de incubación se observó el crecimiento en los medios de cultivo con la morfología colonial característica de cada bacteria, a estos crecimientos bacterianos se les realizó un lavado con agua desionizada estéril, del sobrenadante obtenido de este lavado se tomó 1 ml, agregándolo en tubos de ensaye 13x100 de rosca estériles, después se les agregó a cada uno 1 ml de glutaraldehído al 25% (sigma G5882). Esto con el objetivo de fijar las células y permitir que cese la actividad biológica de la célula, así como preservar la estructura celular (3). Mantener la integridad de la superficie y evitar cambios autolíticos, debido a que al haber remoción del organismo se presentan cambios en temperatura, pH, concentración de oxígeno y nutrientes (figura 4A).

Preparación de muestra:

Una vez que ambas bacterias se encuentran fijas y en solución, (figura 4B) se procede a montarlas en una rejilla porta muestras especial para el microscopio electrónico de transmisión TEM JEM-100S, la cual es de cobre y esta recubierta con una membrana plástica Formvar o Parladión, estas membranas ofrecen un buen soporte estable para la muestra y además son transparentes a los electrones emitidos por el TEM (33,36).

Adsorción de muestra:

Primero se colocó una gota de las suspensiones de las bacterias en un trozo de papel parafilm, a esta gota se le colocó encima la rejilla para que adsorbiera la muestra. para realizar la adsorción se probaron diferentes tiempos, debido a que se presentó el problema de que si se dejaba mucho tiempo la rejilla se saturaba de bacterias y no se podía observar con claridad las características de cada una y por otro lado si faltaba tiempo de adsorción no había muchas células que observar y no se tenía una muestra representativa para conocer si se producían las vesículas o no. los diferentes tiempos probados para cada bacteria fueron de 1, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min. con lo cual se obtuvo el tiempo de adsorción para cada bacteria encontrando que para A. seminis el tiempo optimo de adsorción fue de 20 min. y para B. ovis el tiempo óptimo de adsorción fue de 10 min.

Tinción negativa:

El elemento activo del ácido fosfotúngstico es el tungsteno (p.m 183.92) con la especial característica de que este compuesto se asocia en cada molécula de 24 átomos de carbono del mismo. Por el gran peso molecular de este ácido las tinciones electrónicas denotan una gran resistencia al bombardeo del haz de electrones en el microscopio electrónico de transmisión, el ácido fosfotúngstico es un excelente colorante electrónico de tipo general y específicamente con selectividad para los componentes extracelulares, como mucopolisacárido y membranas basales, gránulos de secreción este ácido en general tiñe proteínas ya que es un colorante catiónico (3, 33,36).

Una vez que ha transcurrido el tiempo de adsorción en cada rejilla, estas se tratan con ácido fosfotúngstico al 25 % (sigma P4006), se coloca una gota de ácido fosfotúngstico en un trozo de papel parafilm y encima de esta gota se coloca la rejilla para que se adsorba el ácido, para realizar esta tinción se tubo que buscar el tiempo de tinción optimo y pH del ácido con el objetivo de lograr tener un buen contraste en la muestra para que permitiera observar todas las características de las bacterias y en especial la membrana externa que es en donde se forman las bacterias, de ahí el interés de tener el mejor tiempo de tinción y pH, se emplearon diferentes tiempos de tinción los cuales fueron 30 seg., 1, 2, 3, 4 min. y diferentes pH's (6, 7 y 8), para determinar en cual de ellos se observa un mejor contraste de la muestra.

Lavado:

Cuando ha pasado el tiempo de tinción, se coloca 1 gota de agua destilada en un trozo de papel parafilm y encima se le coloca la rejilla, el tiempo de enjuague para ambas muestras fue de 1 min. esto con el objetivo de retirar el exceso de ácido fosfotúngtico y para detener la reacción de tinción, después son retiradas las rejillas quitando el exceso de agua con un trozo de papel filtro y por último se dejan secar a temperatura ambiente, una vez que la muestra esta seca se puede observar en el TEM JEM-100S, las magnificaciones que se emplearon fueron a 8.000, 10.000, 15.000, 20.000, 25.000, 30.000 y 40.000 aumentos, en la figura 5 se muestra un esquema de la constitución del TEM.

Almacenamiento:

Para mantener la muestra totalmente seca para posterior observación, las rejillas se guardan en una caja porta rejillas.

El microscopio electrónico de transmisión proyecta electrones a través de una muestra para producir una imagen plana en una pantalla fluorescente de ZnS (sulfuro de zinc). La nitidez de un área particular de la imagen es proporcional al número de electrones que son transmitidos a través de la muestra (36). (Figura 5)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

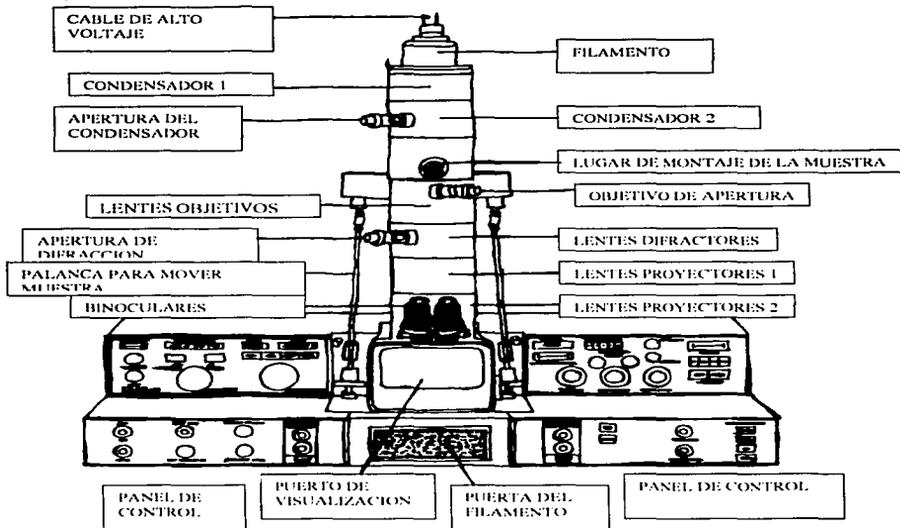


Figura 5.- Constitución del microscopio electrónico de transmisión (18).

Funcionamiento del microscopio electrónico de transmisión (TEM).

La muestra es colocada en un pequeño espacio, al cual se le hace vacío después de cerrada la compuerta. El microscopio tiene varios botones para el operador en el panel de control que le sirven para ajustar la imagen y ponerla a la magnificación deseada. Un haz delgado de electrones, es producido en la parte superior del microscopio por medio del calentamiento de un filamento metálico (10-30 KV). El rayo de electrones primarios sigue un recorrido a través de la columna de vacío del microscopio, esto, con el propósito, de evitar la dispersión de los electrones y a su vez atraviesa las lentes condensadoras o electromagnéticas que le permiten ser reenfocado o centrado hacia la muestra. Posteriormente, el diámetro del haz de electrones puede ser modificado al pasar por las lentes objetivas que controlan la cantidad de electrones dentro de este. Cuando los electrones primarios golpean la muestra, es convertida en puntos de mayor o de menor luminosidad, es decir, en luz visible. Esta luz es dirigida a un amplificador donde se convierte en señal eléctrica, la cual pasa a una pantalla de observación donde la imagen es formada línea por línea y punto por punto, para producir la imagen. Una vez que la imagen esta en la pantalla esta se fotografía, gracias a que este equipo posee una cámara fotográfica integrada. Se tomaron fotografías de cada cepa bacteriana a diferentes aumentos (3, 18, 33,36).

Para obtener las medidas de las bacterias y vesículas por microscopia electrónica de transmisión se realizó una interpolación de medidas mediante el empleo de partículas látex (sigma L1398), de diámetro establecido (0.0825 μm), estas se

fotografiaron a diferentes magnificaciones, las magnificaciones y medidas de las partículas (tabla 3), para poder obtener las medidas reales de las vesículas y bacterias; se relacionaron ambas (partículas látex y bacterias) obtenidas a la misma magnificación y por cálculos matemáticos se obtiene la medida real de bacterias y vesículas.

MAGNIFICACIÓN.	TAMANO (mm)
3000	1
4000	1.5
5000	2.0
6000	2.5
8000	3.0
10000	4.0
15000	5.0
20000	5.5
25000	6.0
30000	7.5
40000	9.5
50000	12.5

TABLA 3. Magnificación y tamaño de partículas de látex para la obtención de las medidas en μm de bacterias y vesículas.

RESULTADOS DEL MEB.

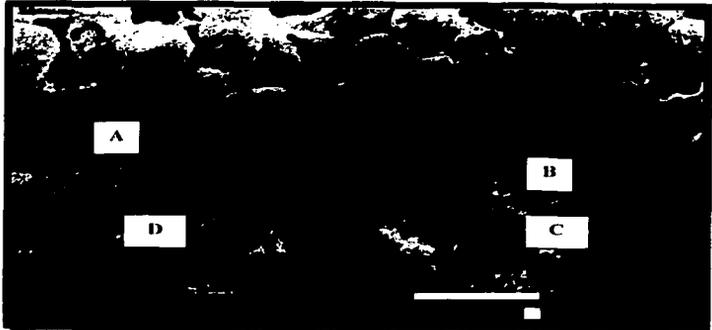


FIGURA 6. Micrografía electrónica tomada con el MEB (JSM-5410LV) de A. seminis, vista general magnificación 20.000 aumentos.

En esta micrografía se puede ver con claridad a A. seminis, con sus características morfológicas de coco bacilos muy pleomórficos, con medidas aproximadas de (0.45-1.6 μm ancho y largo respectivamente) (A) y otras más pequeñas que miden aproximadamente (0.58-0.7 μm ancho y largo respectivamente) (B), se encuentran agrupadas en cadenas y en sus superficies se está observando la formación de vesículas de membrana externa las cuales son de diferentes diámetros, estas vesículas también varían en cantidad, se ven bacterias que contienen una gran cantidad de pequeñas vesículas que van de un diámetro de 0.041-0.082 μm (C) y otras con un menor número y gran tamaño que miden aproximadamente de 0.125-0.25 μm (D).

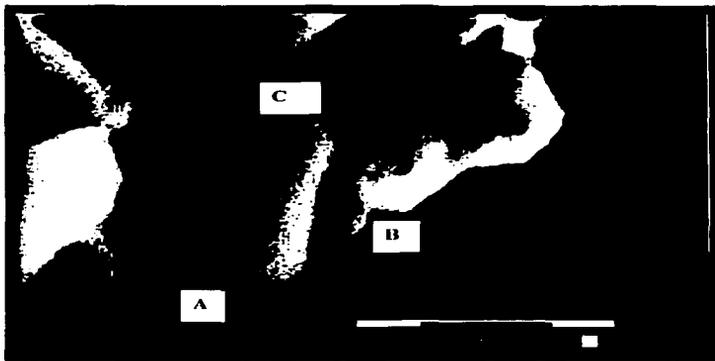


FIGURA 7. Micrografía electrónica tomada con el MEB (SEM JSM-2SS II) de B. ovis, magnificación 45,000 aumentos.

En esta micrografía se puede observar a B. ovis, con sus características morfológicas de coco bacilo pequeño, con medidas aproximadas de (0.48-1.0 μm ancho y largo respectivamente), se encuentra individualmente (**A**) y se puede apreciar que algunas se encuentran formando cadenas (**B**), en su superficie se pueden presentar la formación de vesículas de membrana externa muy pequeñas que miden aproximadamente de 0.04-0.06 μm , (**C**).

RESULTADOS DEL TEM.

Como se mencionó en la metodología se emplearon diferentes tiempos de tinción negativa y pH's de ácido fosfotúngstico, para determinar en cual de ellos se observa un mejor contraste de la muestra (tabla 4).

BACTERIA	TIEMPO DE TINCIÓN	pH del ácido fosfotúngstico
<u>A. seminis</u>	3 min.	pH 8
<u>B. ovis</u>	1min. 30seg	pH 7

TABLA 4. Tiempos de tinción negativa y pH empleado para cada bacteria, en la microscopía electrónica de transmisión.

A las condiciones que se muestran en la tabla 4 se observaron mejor las características morfológicas de las bacterias ya que al emplear pH 6 la membrana de las bacterias se deformaba y no permitía observar las características de la membrana externa, al emplear pH 7 y pH 8, las células conservaban sus características morfológicas, logrando un mejor contraste de estas.

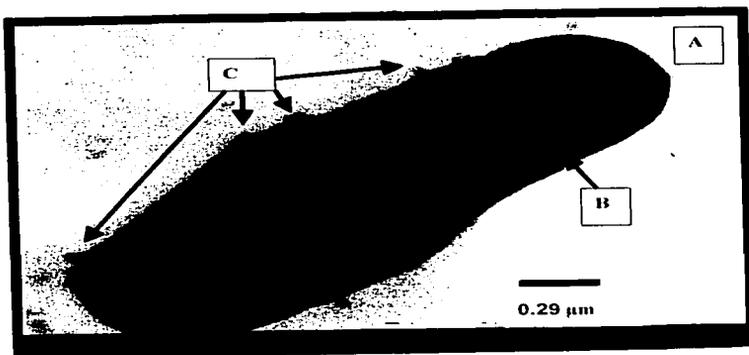


FIGURA 8. Micrografía electrónica tomada con el TEM (JEM-100S) de A. seminis, magnificación 40,000 aumentos.

En esta micrografía se puede observar a A. seminis, con sus características morfológicas de coco bacilo muy pleomórfico, (en la tabla 4 se muestra tiempo de tinción y pH de trabajo) con medidas aproximadas de (0.43-1.1 μm ancho y largo respectivamente) (A), se puede apreciar su membrana externa bien definida (B) y en ella se ven pequeñas vesículas que brotan las cuales son de diferentes diámetros, estas tienen un diámetro de 0.02-0.04 μm (C).

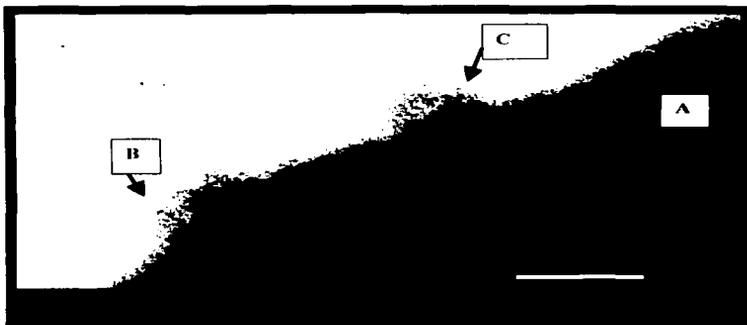


FIGURA 9. Micrografía electrónica tomada con el TEM (JEM-100S)

de A. seminis, amplificada a partir de la magnificación a 40,000 aumentos.

Esta micrografía es una ampliación de la micrografía de la figura 8 , es esta ampliación de uno de los costados de a A. seminis podemos observar con mas cercanía a las vesículas de membrana se logra observar con precisión la membrana externa, al observar dos tonalidades de grises (A) y se muestra como 2 vesículas están brotando de la misma, estas vesículas tienen un diámetro de 0.04 μm , la primera a la izquierda (B) se encuentra mas internada en la membrana externa y la segunda a la derecha se observa mas hacia afuera de la membrana (C).

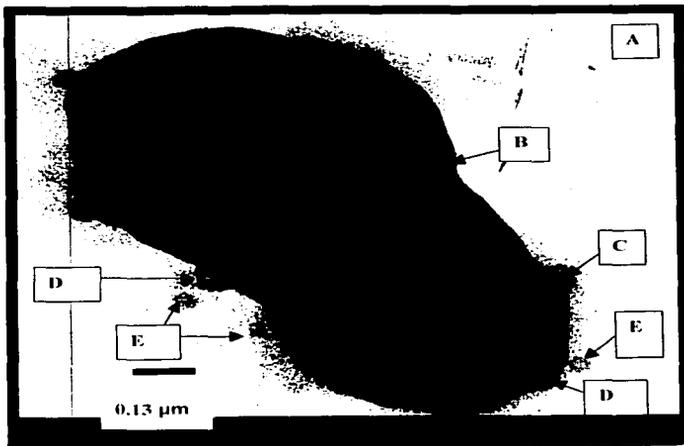


FIGURA 10. Micrografía electrónica tomada con el TEM (JEM-100S) de B. ovis , magnificación 40,000 aumentos.

En esta micrografía se puede observar a B. ovis , con sus características morfológicas de coco bacilo pequeño, (en la tabla 4 se muestra tiempo de tinción y pH de trabajo) con medidas aproximadas de (0.43-0.95 μm ancho y largo respectivamente) (A), se logra apreciar la membrana externa (B) y de ella se observan varias vesículas, algunas en formación (C), otras brotando de ella (D) y otras que ya han sido liberadas (E), estas vesículas tienen diferentes tamaños se pueden ver tanto pequeñas como otras más grandes están tienen una medida aproximada de 0.02-0.04 μm, se aprecian bien definidas algunas totalmente esféricas.

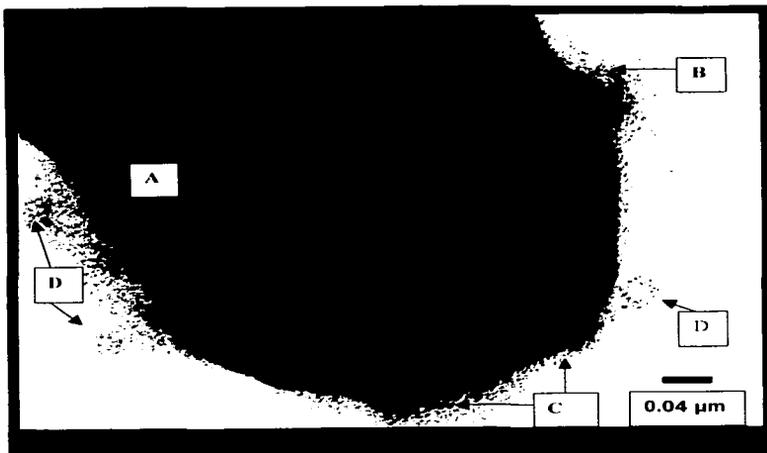


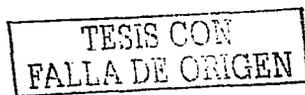
FIGURA 11. Micrografía electrónica tomada con el TEM (JEM-100S) de B. ovis, amplificada de la magnificación a 40,000 aumentos.

Esta micrografía es una ampliación de la micrografía de la figura 10 , es esta ampliación de uno de los costados de a B. ovis podemos observar con mas cercanía a las vesículas de membrana se logra observar con precisión la membrana externa, al observar dos tonalidades de grises (**A**), se muestra 1 vesícula en formación (**B**), 2 vesículas que están brotando de la membrana (**C**), y varias que ya han sido liberadas (**D**) estas vesículas tienen un diámetro de 0.02-0.04 μm y algunas de ellas son totalmente esféricas.

Discusión.

Como se ha observado en las micrografías A. seminis y B. ovis producen de forma natural y espontánea MV in vitro, este fenómeno se ha reportado como normal en otros géneros de bacterias gram negativas se menciona que las MV de A. seminis y B. ovis se forman de forma natural y espontánea ya que en este proyecto no se realizó ningún cambio en las propiedades óptimas de crecimiento de las bacterias, ni tampoco se utilizó ninguna sustancia química como pueden ser antibióticos para la producción de éstas. En este proyecto se menciona que existen varias teorías por las cuales se forman las MV hasta el momento se desconoce el mecanismo definitivo por el cual estas se forman, por lo que todavía queda abierta la pregunta de ¿Cómo se forman las MV? y si todas las vesículas siguen este mecanismo o pueden existir diferencias o es el conjunto de los mecanismos ya descritos. **(15, 26, 20)**

Por otra parte a las MV se les atribuyen muchas propiedades biológicas, bactericidas y de patogenicidad por los componentes bacterianos de los que pueden estar formadas, **(11, 20, 24, 26, 29, 32, 40, 42, 46)** los estudios realizados en A. seminis y B. ovis han sido hasta el momento pocos por lo que falta investigar la composición química de las MV que forman así como propiedades que puedan presentar, se ha reportado que el uso de antibióticos y la falta de algún nutriente o cambios en las condiciones de crecimiento de bacterias puede originar una hiperproducción de vesículas y que además estas suelen ser de un mayor tamaño, en el caso de A. seminis es sensible a penicilina, estreptomycin, sulfas y oxitetraciclina y B. ovis es sensible a tetraciclinas por lo que se puede trabajar con estos antibióticos a diferentes UI, para obtener un MIC (concentración mínima inhibitoria) y con esto realizar un estudio que tenga como



objetivo observar si en estas bacterias también existe una hiperproducción de MV con antibióticos o por la supresión de algún nutriente importante para su metabolismo. En el estudio realizado en P. aeruginosa, fue importante determinar que con el antibiótico gentamicina se induce la hiperproducción de vesículas ya que estas difieren en que son resistentes a la penicilina y como contienen componentes bacterianos esto puede ser perjudicial al dar tratamiento con gentamicina para P. aeruginosa ya que no se eliminaría a la bacteria y al contrario este fomentaría la producción de MV que le pueden ser de gran ayuda para llevar los factores de patogenicidad a otros sitios en donde la bacteria completa no pudiera entrar por lo cual sería de gran interés en el estudio determinar si pasa lo mismo o se asemeja en A. seminis y B. ovis.

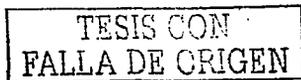
Para la obtención de las micrografías de MV producidas por A. seminis y B. ovis, se realizaron diferentes procedimientos, los cuales son semejantes a los reportados por algunos investigadores en sus trabajos (tabla 5), como podemos observar en la tabla existen varias técnicas para la obtención de MV que van desde la obtención de suspensiones bacterianas, métodos de fijación, empleo de diferentes sustancias para realizar la tinción negativa y métodos de separación, las técnicas empleadas en este trabajo son satisfactorias ya que se pueden observar las vesículas que forman A. seminis y B. ovis, sin embargo esta puede ser modificada empleando diferentes técnicas de separación de vesículas.

TECNICA	OTROS PROYECTOS De otros géneros de bacterias	PROYECTO DE <u>A. seminis</u> y <u>B. ovis</u>
MEB	MEB	MEB
OBTENCIÓN DE LA BACTERIA	Por suspensiones bacterianas en agua destilada, desionizada, PBS o HEPES estériles. Por inclusión de bacterias en agar noble y cortes con cuchilla de diamante.	Por la inoculación caldo BHI a partir de cultivos bacterianos.
FIJACIÓN	Glutaraldehído al 1%, 2 %.	Glutaraldehído al 25 %
SEPARACIÓN	*Centrifugación de una suspensión bacteriana y filtración del sobrenadante que contiene las vesículas. *Por centrifugación de una suspensión bacteriana con densidad gradiente de sucrosa separando en diferentes fases las cuales contienen tanto vesículas, células, células-vesícula. *Separación por centrifugación de una suspensión bacteriana y después por precipitación con ácido tricloroacético al 10% y diálisis con agua o PBS, obteniéndose a las vesículas y separando nuevamente por centrifugación y filtración.	Filtración del caldo BHI que contiene tanto vesículas como células completas.
DESHIDRATACIÓN	Etanol desde el 70% hasta el absoluto, 60% hasta el absoluto, metanol 50% hasta el absoluto.	Etanol desde el 10% hasta el absoluto.
IONIZACIÓN	Con oro por un tiempo de 5, 6, 7, 9,10 min. Platino-carbono	Con oro por un tiempo de 5 min.
TEM	TEM	TEM
OBTENCIÓN DE LA BACTERIA	Por suspensiones bacterianas en agua destilada, desionizada, PBS o HEPES estériles a partir de cultivos celulares.	Suspensión bacteriana en agua desionizada estéril a partir de cultivos bacterianos.
FIJACIÓN	Glutaraldehído al 1%, 2 %. OsO ₄ al 1%	Glutaraldehído al 25 %
SEPARACIÓN	Las misma que en el MEB	Filtración
TINCIÓN NEGATIVA	Ácido fosfotúngstico pH 6,5 Acetato de uranilo al 2%. Tetroxido de osmio al 2%, tûgnstato de metilamida al 2% pH 7,2	Ácido fosfotúngstico pH's 7 y 8

TABLA 5. Comparación entre técnicas reportadas en la hemerografía y la empleada en este trabajo para el TEM y MEB (14, 20, 21, 26, 32, 38, 42)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Hasta el momento las MV han sido de gran importancia en estudios realizados en otros géneros de bacterias gram negativas, ya que como se ha mencionado a lo largo de este trabajo estas se encuentran formadas por una gran cantidad de componentes intra y extracelulares, los cuales muchos de ellos son factores de virulencia importantes en la patogenicidad de los microorganismos además que estas MV pueden inhibir el efecto bactericida del suero y también pueden inducir la lisis de bacterias que contienen un peptidoglucano diferente como un mecanismo para ganar lugar en el organismo y poder infectarlo rápidamente estas son algunas de las actividades ya investigadas por diferentes científicos; en A. seminis y B. ovis falta investigar el contenido de estas vesículas, con el objetivo de conocer si están presentes enzimas importantes tanto para el metabolismo bacteriano como para la patogenicidad de estos dos microorganismos, además la presencia de DNA o RNA y para que sirve este material genético, si también presenta actividad lítica contra otras bacterias y si además estas pueden inhibir la actividad bactericida del suero todo con el fin de darles un uso ya sea para el diagnóstico de A. seminis y B. ovis, en producción de vacunas, lisis de bacterias que producen enfermedades graves sin que A. seminis y B. ovis produzcan enfermedad, es decir quitando de las MV factores de virulencia para producir la enfermedad, estos son simplemente ejemplos que se basan en la revisión hemerográfica realizada ya que varios autores mencionan en otros géneros de bacterias que estas vesículas pueden emplearse para realizar diversos estudios como los arriba descritos pero en A. seminis y B. ovis falta realizar una gran investigación de estas MV, por lo que el tema queda abierto a muchos más estudios.



Conclusiones.

De este trabajo se puede concluir, que A. seminis y B. ovis producen MV, ya que estas vesículas fueron observadas mediante la microscopia electrónica de barrido y transmisión, las vesículas presentan diferentes morfologías pero en general se presentan como pequeñas esferas que brotan de la membrana externa de estas bacterias, las bacterias se observan con sus características morfológicas y solo en los lugares donde se está realizando la producción de estas MV se deforma observándose un abultamiento de la membrana externa que dará origen a una vesícula.

Por otra parte se lograron establecer los tiempos de adsorción en la rejilla (porta muestra del TEM), tiempo de tinción negativa con ácido fosfotúngstico y pH, para obtener el tiempo óptimo de tinción negativa para cada bacteria, esto se ve reflejado en las micrografías ya que como se observa, se logra delimitar bien lo que es la membrana externa, además de lograr observar perfectamente a las MV.

Resta investigar los contenidos de cada una de estas MV tanto para A. seminis como para B. ovis, con el objetivo de conocer si contiene factores de virulencia importantes para la patogenicidad de estos dos microorganismos, determinar si estas MVs pueden llegar a producir la enfermedad aun en ausencia de la bacteria completa, estudiar si pueden inhibir la actividad bactericida del suero o pueden lisar a bacterias que son parte de la microbiota normal de los borregos para que ellas puedan colonizar rápidamente el tejido.

La importancia de observar la producción de MVs en estas dos bacterias primeramente es por que se desconocía que producían estas estructuras, además como ya se menciona estas dos bacterias están asociadas a una enfermedad (epididimitis) que tienen gran importancia ya que esta afecta la producción de crías por lo que se ve afectada la economía del país al tener una baja producción de este ganado y al no poder realizar exportaciones del ganado infectado, por lo que estas vesículas podrían ayudar en el diagnóstico rápido de la enfermedad al purificar los componentes de estas vesículas se podrían extraer proteínas que solo se encuentren en estas especies y realizar métodos de diagnóstico rápido como ELISA, RIA o algunas otras pruebas serológicas, o purificar el DNA y realizar un PCR para la identificación de estos dos agentes causales de epididimitis con el objetivo de poder brindar tratamiento adecuado y oportuno, otra utilidad de estas MVs es en la prevención de la enfermedad utilizando estas vesículas para producir una vacuna debido a que estas vesículas pueden contener una concentración alta de los factores de patogenicidad incluso mas que la célula completa por lo que son altamente inmunogénicas.

Por último con estas vesículas se podría tener una alta concentración de antígenos de superficie importantes, los cuales se pueden extraer e inocular a conejos para que estos desarrollen una respuesta inmune contra estos antígenos y después obtener de ellos anticuerpos los cuales pueden ser marcados a través de un elemento radioactivo o fluorescente e inocularlo a borregos infectados por estos microorganismos para buscar en que parte del tejido se encuentra el antígeno para ubicar exactamente donde colonizan y si este antígeno tiene que ver con la colonización de estos microorganismos.

GLOSARIO.

Absorción: Penetración por debajo a la superficie, hacia el interior.

Adsorbente: Agente que atrae a su superficie otros materiales o partículas.

Adsorción: Unido a la superficie.

Aguda: Que presenta un curso breve y relativamente grave, empleado en la descripción de la evolución de una enfermedad.

Aglutinación: Acción y efecto de pegar o agrupar, agrupamiento de células difusamente distribuidas en un líquido, es provocado por las aglutininas, anticuerpos desarrollados contra ese tipo celular específico.

Anticuerpo: Glucopéptido sérico que puede ser nativo o extraño al huésped, es capaz de unirse en forma específica a una amplia variedad de antígenos naturales y sintéticos, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos, lípidos u otros productos químicos.

Antibiótico ó Antibacteriano: Sustancia química derivada o producida por microorganismos que tienen la capacidad, a bajas concentraciones de inhibir el desarrollo o de destruir bacterias y otros microorganismos.

APY-ZYM: Micrométodo listo para usar, para la identificación de la actividad enzimática de diferentes proteasas de microorganismos.

ATCC: American Type Culture Collection (colecciones de cultivos de referencia tipo). Organización encargada de la designación y caracterización de una cepa viviente de la especie.

Bacilo: Célula en forma de bastón.

Cocobacilo: Microorganismo con forma de bastón pueden ser de morfología regular, más cortos.

Contagiosa: Capaz de transmitirse de un individuo a otro.

Crónica: Aplicable a las enfermedades de larga duración.

Deshidratación: Extracción de agua de una sustancia o materia orgánica.

Desinfección: Procedimiento práctico que reduce la contaminación microbiana de un objeto inanimado.

ELISA: (Enzyme-linked immunosorbent assay), ensayo inmúlogico en donde la enzima esta unida a un inmunoabsorbente para detectar directamente deposiciones de antígenos o anticuerpos específicos.

Epidemiología: Estudio de los factores que determinan la frecuencia y distribución de las enfermedades en una población.

Epidídimo: es una parte del testículo, cada testículo tiene una especie de tubo alrededor de ellos, esto es el epidídimo es el lugar donde los espermatozoides maduran antes de salir al exterior con el eyaculado.

Epididimitis: es una inflamación del epidídimo, causada por bacterias del tracto urinario. Puede aparecer de forma brusca (aguda) o lentamente (crónica). Si la inflamación afecta al testículo se llama orquitis.

Esterilidad: Incapacidad para procrear.

Esterilización: Dejar un objeto o superficie libre de todo organismo vivo

Huésped: Animal o vegetal que proporciona protección física y alimento a otros organismos.

Infecciosa: Que causa infección, es decir la multiplicación de microorganismos en los tejidos, con producción de daño celular.

Infertilidad: Incapacidad para que el esperma fertilice el óvulo.

Inflamación: Proceso por el cual se produce en los tejidos del organismo la reacción contra un daño.

Inoculo: Una mínima cantidad de células bacterianas.

LPS: (Lipopolisacárido) Son glucolípidos complejos compuestos por una porción lipídica llamada lípido A, la región del centro o core polisacárido que en general es similar en estructura dentro de un género o una especie dados de bacterias t cadenas laterales O específicas que son regiones de estructuras bioquímicas variable que confieren una entidad sexológica única a las especies de bacterias gram negativas.

MEB: Microscopio electrónico de barrido.

Medio de Cultivo: Es un sistema artificial, bajo condiciones de laboratorio, que permiten el crecimiento de poblaciones bacterianas.

MVs: Vesículas de membrana externa de bacterias gram negativas.

Patogenicidad: Capacidad de un microorganismo para producir enfermedad.

Patógeno: Elementos y medios que originan y desarrollan enfermedades.

PCR: (Reacción en cadena de la polimerasa), es una técnica altamente sensible en donde una secuencia identificada de DNA o RNA que se encuentra en cantidades muy pequeñas se amplifican enzimáticamente hasta un punto en que pueda ser detectada.

Periplasma: Compartimiento que contiene enzimas y que se encuentra entre la membrana citoplasmática y la porción exterior de la pared celular.

Plásmido: DNA extracromosómico se encuentra frecuentemente presente en el citoplasma de microorganismos procarióticos, son capaces de una replicación autónoma y son heredados por las células de la progenie bacteriana.

Pleomórfico: Organismo que puede existir en varios tamaños o formas.

Progresiva: Que aumenta la infección, signos y síntomas.

REO: (Revertante de ovis) Bacteria mutante de Brucella ovis, es una cepa adaptada a crecer a bajas concentraciones de CO₂

TEM: Microscopio electrónico de transmisión.

Transmisible: Capaz de ser transmitido de un individuo a otro, cepa bacteriana que es capaz de provocar una infección demostrable en un huésped dado.

Vacuna: Suspensión de microorganismos muertos o atenuados, que se administra para prevenir, atenuar o tratar enfermedades infecciosas.

Virulencia: Grado de patogenicidad dentro de un grupo o especie de microorganismos.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.-Appuhamy,S¹ J. G. Coote,¹ J. C. Low, and R. Parton (1997) *PCR Methods for Rapid Identification and Characterization of Actinobacillus seminis Strains* J. Am. Vet. Med. Assoc., vol.182, pp.372-374.
- 2.-Bernad D. Davis M.D.(1978)*Tratado de microbiología*, 2ª edición, Edit. Salvat, España. pp.838-842
- 3.-Birbeck m.s.c.Merce, (1995) *Manual de microscopia electrónica para biólogos*, Ediciones Blume, pp.7-11,41-59
- 4.-BLOOD D.C (1996) *Manual de medicina veterinaria*. Edit. Interamericana, México pp. 343-345
- 5.-BURGESS G.W. & Norris M.J: (1982). *Evaluation of the cold complement fixation test for diagnosis of ovine brucellosis*. Aust. Vet. J. vol: 59, pp.23-25.
- 6.-BURGESS G.W. (1982) *Ovine Contagious Epididymitis: A Review* Veterinary Microbiology, vol. 7 pp. 551-575
- 7.-Cleon Kimberling V. (1988) *Jensen and Swifts diseases of sheep*, 3ª edición, Edit. LEA & FEVIGER pp.7-13, 49-54
- 8.-Dorward David W, Garon Claude, and Judd Ralph (1989).*Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of Neisseria gonorrhoeae*. J.Bacteriol. vol.171 pp.2499-2505
- 9.-DasSarma Shiladitya (1989)*Mechanisms of genetic variability in Halobacterium halobium; the purple membrane and gas vesicle mutations*. Can.J.Microbiol. vol.35 pp.65-72
- 10.-DasSarma Shiladitya and Yang, Chin Fen (1990)*Transcriptional induction of purple membrane and gas vesicle synthesis in the archaebacterium Halobacterium halobium is blocked by a DNA gyrase inhibitor*.J.Bacteriol. vol.172 pp.4118-4121
- 11.-DasSarma Shiladitya, Halladay Jhon, Jones Jeffrey, Lin Feng, MacDonald Bruce. (1993).*The rightward gas vesicle operon in Halobacterium plasmid pNRC100:identification of the gvpA and gvpC gene products by use of antibody probes and genetic analysis of the region downstream of gvpC*.J.Bacteriol. vol.175 pp.684-692
- 12.-DasSarma Shiladitya, Yin Lucy, Arora Priya, Lin Feng, Molinari Elizabeth (1994) *Wild-type Gas Vesicle Formation Requires at Least Ten Genes in the gvp Gene Cluster of Halobacterium halobium Plasmid pNRC100*.J.Bacteriol. vol.176 pp.7646-7652

13.-Ficapal, Jordana, Blasco, Moriyón (1998) *Diagnosis and epidemiology of Brucella ovis infection in rams*, Small Ruminant, vol. 29, pp. 13-19

14.-Gamazo, C. Diaz R, Winter A J, Moriyon I, Blasco M. (1989) *Comparative Analyses of Proteins Extracted by Hot Saline or Released Spontaneously into Outer Membrane Blebs from Field Strain of Brucella melitensis*. Infection and Immunity. Vol.57 pp.1419-1426

15.-Grenier D. and Belanger M. (1991) *Protective Effect of Porphyromonas gingivalis Outer Membrane Vesicles against Bactericidal Activity of Human Serum*. Infection and Immunity, vol.59 pp.3004-30048

16.-Hernández Godoy Silvia (1987), *Diagnóstico, prevalencia y descripción de la epididimitis ovina* Brucella ovis en algunas explotaciones ovinas, TESIS, pp.116-210

17.- Microscopía Electrónica de Barrido
<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/jairo/celular/cell2.htm>

18.-Microscopía electrónica de transmisión
<http://www.uam.es/estructura/servicios/SidI/paginas/124-web.htm>

19.-Kadurugamuwa Jagath, Beveridge Terry (1995), *Virulence factors are released from Pseudomonas aeruginosa in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicina: a novel mechanism of enzyme secretion*, J. Bacteriol. Vol.177, pp. 3998-4008

20.-Kadurugamuwa Jagath, Beveridge Terry (1996) *Bacteriolytic effect of membrane vesicles from Pseudomonas aeruginosa on other bacteria including pathogens conceptually new antibiotics*. J. Bacteriol. vol.178 pp.2767-2774

21.-Kadurugamuwa Jagath, Beveridge Terry(1998) *S-layered Aneurinibacillus and Bacillus spp. Are Susceptible to the Lytic of Pseudomonas aeruginosa Membrane Vesicles*. J. Bacteriol. vol.180 pp.2306-2311

22.-Kimberling Cleon V. (1988), *Jensen and Swift's diseases of sheep.*, 3ra, edición, LEA and Febiger, Filadelfia p.p 7-13

23.-Koneman W. Elmer M.D.(1999) *Diagnóstico Microbiológico*, 5ª edición, Edit. Panamericana, Argentina. pp.394-430



- 24.-Kruger Kerstin and Pfeifer Felicitas (1996) *Transcript Analysis of the c-vac Region and Differential Synthesis of the Two Regulatory Gas Vesicle Proteins GvpD and GvpE in Halobacterium salinarium PHH4*. J.Bacteriol. vol.178 pp.4012-4019
- 25.-Li Ning and Cannon Maura C. (1998) *Gas Vesicle Identified in Bacillus megaterium and Functional Expression in Escherichia coli*. J.Bacteriol. vol.180 pp.2450-2458
- 26.-Li Zusheng Li, Clarke Anthony and Beveridge Terry (1996) *A major autolysin of P.aeruginosa, its subcellular distribution, its potential role in cell growth and division, and its secretion in surface membrane vesicles*. J.Bacteriol. vol.178 pp.2479-2488
- 27.-Marin C.M., Alabart J.L. & Blasco J.M. (1996). *Effect of antibiotics contained in two Brucella selective media on growth of B. abortus, B. melitensis and B. ovis*. J. Clin. Microbiol., **34**, 426-428.
- 28.-MARTIN W:B (1988) *Enfermedades de la oveja* Edit. Acribia, Zaragoza España pp. 293-298
- 29.-Mayrand D and Grenier D.(1989)*Biological activities of outer membrane vesicles*. Can.J.Microbiol. Vol.35 pp.607-613
- 30.-Mendez Narez Graciela (1987). *Diagnóstico diferencial en carneros 0(+) y 0(-) a brucella ovis con o sin epididimitis*, TESIS 116-21032
- 31.-Merchant I.A. (et al)(1980)*Bacteriología y Virología veterinaria*, 3ª edición, Edit.Acribia, España. pp.381-383
- 32.-Negrete Abascal Erasmo, García Rosa M., Reyes Magda, Godínez Delfino, de la Garza Mireya, (2000), *Membrane vesicles released by Actinobacillus pleuropneumoniae contain proteases and Apx toxins*, FEMS Microbiology Letter, vol.191, pp.109-113
- 33.-Nezelof C.(1975) *Técnicas microscópicas*, Edit. Jims, Barcelona, pp.239-242
- 34.-Paolicchi F.A (2000), *Antisperm response in rams experimentally infected with Brucella ovis*, Small Ruminant Research, vol.36 pp. 7-15
- 35.-Pelczar Michael J.(1982)*Microbiología* 2ª edición, Edit. McGraw-Hill, México pp.533-539
- 36.-Ralph E. Jun(1975) *Microscopía electrónica*, Edit. El manual moderno, México pp.2-5
- 37.-Sidney M. Finegld (1989) *Diagnóstico Microbiológico*, 7ª edición, Edit. Panamericana, Argentina. pp.410-419

- 38.-Smalley J.W and Birss A.J (1987) *Trypsin-like Enzyme Activity of the Extracellular Membrane Vesicles of Bacteroides gingivalis W50*. J.of General Microbiology. Vol.133 pp.2883-2894
- 39.-Trejo González Olivia (1992) *Agentes involucrados en la epididimitis ovina*. TESIS pp.4-10
- 40.-Wai-Lap NG, DasSarma Shiladitya (1991) *Structure of the Gas Vesicle Plasmid in Halobacterium Halobium: Inversion Isomers, Inverted Repeats, and Insertion Sequences*. J.Bacteriol. vol.173 pp.1958-1964
- 41.-Walker,R.L.,Leamaster,B.R. (1986) "*Prevalence of Histophilus ovis and Actinobacillus seminis in the genital tract of sheep*", Am.J.Vet.Res., Vol 47 (9): 1928-1930.
- 42.-Walsby A.E. and Hayes P.K.(1988)*The minor Cyanobacterial Gas Vesicle Protein, Gvpc, Is Attached to the Outer Surface of the Gas Vesicle*. J. of General Microbiology. Vol.134 pp.2647-2657
- 43.-Webb R.F., Quinn C.A., Cockram F.A. & Husband A.J. (1980). *Evaluation of procedures for the diagnosis of Brucella ovis infection in rams*. Aust. Vet. J., vol.56, pp.172-175.
- 44.-Whitmire,W.M; and C.F Garon (1993).*Specific and nonspecific response of murine B cells to membrane blebs of Borrelia burgdorferi*. Infect.Immun. vol.61 pp.1460-1467
- 45.-Wolfgang K. Joklik D. Phil (1998)*Microbiologia Zinsser*, 20^{ava} edición, Edit.panamericana, Argentina. pp.827-833
- 46.-Zhou Leah, Srisatjaluk Ratchapin, Doyle Justus, (1998), *On the origin of membrane vesicles in Gram-negative bacteria* .FEMS Microbiology Letter. vol. 163 pp.223-228
- 47.-Zusheng Li and Beveridge Terry J.(1998)*Gram Negative Bacteria Produce Membrane Vesicles Which Are Capable of Killing Other Bacteria*. J.Bacteriol. vol.180 pp.5478-5483