



11623

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL**

**Estudio de la respuesta inmune celular de
fracciones subcelulares de *Brucella ovis***

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

ENRIQUE SALAS TÉLLEZ

TUTOR:

Dr. Francisco Suárez Güemes

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Efrén Díaz Aparicio

Dra. Mireya de la Garza Amaya

Dr. Abel Ciprian Carrasco

Dr. Eliseo Hernández Baumgarten



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.

*“Quisiera parar, y bajo un suspiro mirar atrás,
y en una serie de perfectos cuadros e imágenes,
recomponer mis errores, desempolvar mis aciertos,
y quedarme con el sabor grato del quehacer cumplido,
para de nueva vez mirando al frente, volver a caminar”.*

Dedicatorias:

Sara Adriana

Gracias por tu paciente espera,
Por no dejarte decaer por nada y ante nada,
Por los mejores regalos: nuestros hijos,
Por tu apoyo en la construcción de nuestra familia,
Pero sobre todo, gracias por tu amor.

Enrique Arturo

Aún cuando eres pequeño, te ves tan grande
Muchas veces te has vuelto mi maestro, un guía.
Te amo y en ti veo reflejada mi exitosa vida,
Tú eres uno de mis mayores logros.
Gracias a la vida por dejarme cobijarte en mis brazos,
Gracias "Catuyo" por las cien mil razones de superación
que me trajiste bajo el brazo.

Isabel Adriana

Dulce flaca mía, mi tan hermosa "bellesoni",
Tú la que dominas todo,
Que poder tienes para hacerme flaquear con un beso.
Mi adorada bailarina, mi pertinaz cantante,
Eres la luz que ilumina y día a día me da razones
Para agradecer lo que me da la vida.

Dedicatoria y agradecimiento:

Alma

Agradecer nunca me ha resultado bastante,
Pero tú apoyo, tu compañía y tú cariño,
siempre han sido hacia mí una constante.

Por todo eso, Gracias:

Pertinaz colega,
Sabia compañía,
e incomparable amiga.

Siempre estaré en deuda contigo.

Agradecimientos:

I.- Personales:

a) Por crearme y formarme con amor como ser humano:

Carmen Téllez Ortega y Sergio Salas Morales.

b) Por hacerme sentir que somos una Familia:

Fabiola Salas Téllez Héctor Sergio Salas Téllez

c) Por albergarme como Familia:

Cristina Ríos, Arturo Hernández, Cristina Palomino, Sandra Palomino, Alejandro Palomino, Martín Palomino.

d) Por darle continuidad a nuestras familias:

Sofía, Ulises, Miguel Ángel, Sebastián, Elena, Natalia, Nicolás, Alejandrita, Luís Fabián.

e) A mis amigos por haber estado, por estar, siempre involucrados:

Caro Segundo, Odette Urquiza, Roberto Arenas, José Juan Martínez, Alejandro Vázquez, Luís Talavera.

f) A los cooperadores:

Dra. Sara Valdés, Caro Moreno, Gabino Sánchez, Rodolfo "Chafofas", Nacho "Rey Bibliotecario", David Trujillo.

II.- Académicos:

Al Dr. Francisco Suárez por su asesoría pero sobre todo por su tan constante preocupación (presión), sin la cual no hubiera finalizado este proyecto, gracias por su apoyo y confianza.

A mi comité tutorial: Dra. Mireya de la Garza, Dr. Abel Ciprián, Dr. Efrén Díaz, Dr. Eliseo Hernández, Dr. Francisco Suárez y a los que se integraron para la revisión final: Dra. Susana Mendoza, Dr. Jorge Tórtora y al Dr. Víctor Tenorio. Mil gracias por sus valiosos comentarios, por su apoyo, pero sobre todo muchas gracias por la formación que me ofrecieron.

A la UNAM (PAEP), al CONACYT (Beca), por haberme dado el con que para lograr este proyecto.

III.- Especial:

A Susy Mendoza por siempre tener esa gran disposición a ayudarme, por sus inigualables empujones y por su cariño.

Índice

Tema	Página
Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	5
Aspectos generales de <i>B. ovis</i>	6
Composición antigénica de <i>Brucella</i>	9
Patogénesis de <i>Brucella</i>	15
Diagnóstico de <i>B. ovis</i>	24
Inmunógenos contra <i>B. ovis</i>	29
Justificación	32
Hipótesis	33
Objetivo general y particulares	33
2. Material y métodos	
Experimento I. Determinación de la inmunidad celular inducida por fracciones subcelulares de <i>B. ovis</i> .	34
Experimento II. Protección conferida por Omp, Vesículas y una bacterina de <i>Brucella ovis</i> en el modelo murino.	41
3. Resultados	
3. Experimento I. Determinación de la inmunidad celular inducida por fracciones subcelulares de <i>B. ovis</i> .	44
3.1. Proteínas antigénicas de <i>B. ovis</i>	44
3.2. Respuesta de citocinas producidas por las fracciones subcelulares de <i>B. ovis</i>	44
3.3. Hipersensibilidad tardía	45
Experimento II. Protección conferida por proteínas de membrana externa (Omp), Vesículas y una bacterina de <i>Brucella ovis</i> en el modelo murino.	
3.4. Evaluación en el modelo murino de la protección conferida por Omp, Vesículas y una bacterina de <i>Brucella ovis</i> .	49
4. Discusión	54
5. Conclusión	61

Resumen

El primer objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de tres fracciones subcelulares: membrana externa (OMP), membrana interna (IMP) y citosol (CP) de *Brucella ovis* en la respuesta inmune celular, determinando *in vitro* la inducción de IL-2, IL-4 e IFN- γ . Se empleó la cepa REO 198 de *Brucella ovis*, la cual fue cultivada en caldo brucella durante 48 horas en agitación orbital a 37 C, se obtuvo la biomasa por centrifugación a 10, 000 x g por 15 minutos, realizando dos lavados con solución de HEPES. La biomasa fue resuspendida en HEPES 10 mM + PMSF 0.1 M + EDTA 2mM, para sonicarse en pulsos de 60 segundos por 60 segundos de descanso. Se centrifugó a 10, 000 g x 15' a 4 C. El sobrenadante se ultracentrifugó a 150, 000 g x 1 hora a 4 C, de donde se obtuvo el sobrenadante que contiene las proteínas del citosol y la pastilla que contiene las membranas totales. La pastilla fue tratada con la solución de HEPES 10mM+ Sarcosyl al 1 %, agitada por 30 min a 37 C y centrifugada a 150, 000 g x 1 hora a 4 C. De este último tratamiento se obtuvieron dos fracciones la insoluble al sarcosyl (OMP) y la soluble al sarcosyl (IMP). La fracción de OMP y CP fueron precipitadas con etanol absoluto en una relación 1:4, mientras que la OMP fue concentrada mediante la adición de cloroformo-metanol. Las tres fracciones fueron evaluadas en PAGE-SDS al 15 % y se realizó la tinción de plata para determinar la presencia de LPS. Se formaron tres grupos con 6 ratones Balb/c de 5 semanas de edad, los cuales fueron inoculados con la fracción OMP, IMP y CP respectivamente. Posteriormente se obtuvo el bazo y se realizó un cultivo primario de linfocitos, a los cuales se les colocó 10 μ l de la fracción correspondiente, se tomó muestra de sobrenadante a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas. A los sobrenadantes se les determinó la presencia de IL-2, IL-4 e IFN- γ mediante un estuche comercial. La OMP resultó ser la mejor inductora de inmunidad celular, produjo una alta respuesta de IL-2 (1000 pg) a las 24 horas y se encontró una producción ascendente de IFN- γ , siendo de 720 pg a las 120 horas, en cuanto a la inducción de IL-4 solo se encontró una muy pobre respuesta en esta fracción debida quizá a la presencia de LPS-rugoso, el comportamiento de citocinas demuestra que la respuesta fue por linfocitos Th1; por lo tanto, las proteínas de OMP resultaron buenas inductoras de la inmunidad celular.

El segundo objetivo del presente trabajo fue evaluar en el modelo murino el grado de protección conferido por Omp, vesículas y una bacterina de *B. ovis*, al desafío experimental con *B. ovis*. **Inmunógenos:** a) membrana externa de *B. ovis* (Omp): se obtuvo de la forma en que se mencionó anteriormente. b) vesículas de membrana externa de *B. ovis*: después de crecer la bacteria en agar brucella por 48 horas a 37 C, se cosechó con SSF, se centrifugó a 10, 000 X g por 15 min a 4 C y el sobrenadante se filtró en 0.22 μ m y finalmente el filtrado se ultracentrifugó a 150, 000 X g durante 1 hora, la pastilla fue resuspendida en agua desionizada y se congeló hasta su utilización. c) bacterina de *B. ovis*, se obtuvo a partir de un crecimiento en agar brucella por 48 horas a 37 C y una posterior inactivación con fenol al 5% en amortiguador de fosfatos 20mM (pH 7.2) por 2 días, se lavó la biomasa tres veces con agua destilada. **Evaluación de la protección *in vivo* de los inmunógenos.** Se usaron 8 grupos de 12 ratones Balb/c cada uno. Los grupos se conformaron así: 1) Omp + Adyuvante completo de Freund (ACF), 2) Omp + Adyuvante incompleto de Freund (AIF), 3) Vesículas + ACF, 4)

Vesículas + AIF, 5) Bacterina + ACF, 6) Bacterina + AIF, y como controles los grupos 7) ACF, 8) AIF y 9) SSF. Los ratones fueron inoculados subcutáneamente con los respectivos inmunógenos ya mencionados y se les aplicó un refuerzo a los 10 días, en el día 20 postinmunización se procedió al desafío, este consistió en la aplicación por vía intravenosa de la cepa de *B. ovis* a una concentración de 3×10^5 UFC. **Determinación de la unidades formadores de colonia (UFC/ml):** Se realizó el sacrificio de tres ratones por grupo en los días 7, 14 y 21 posdesafío para la determinación de UFC/ ml presentes en el bazo. **Análisis estadístico:** se realizó el análisis de ANOVA para determinar las diferencias entre los distintos inmunógenos. Las UFC determinadas en el día 7 en los diferentes grupos, no muestran diferencias significativas entre ellos; sin embargo, para el día 14, resulta notoria la disminución de UFC de los grupos de vesículas y bacterina (encontrándose entre ellos diferencias significativas) en comparación con Omp. En el día 21 los datos finales demuestran una diferencia significativa entre las vesículas y los demás grupos, presentándose un efecto similar entre la bacterina y las Omp. El efecto posdesafío mostrado por los adyuvantes (ACF, AIF) detalla el impacto producido por el tipo de adyuvante durante los días de muestreo (7, 14 y 21), en el ACF existió una diferencia significativa durante los tres días. Es posible observar que la disminución de UFC/ml adjudicadas al efecto del adyuvante fue disminuyendo conforme pasaron los días, atribuyéndose el descenso final en las UFC/ml al tipo de inmunógeno empleado. Las pruebas realizadas en el modelo murino demuestran que las Omp de *B. ovis* aún cuando tienen una buena actividad *in vitro*, no resultan tan eficientes *in vivo*. Las vesículas de *B. ovis* mostraron una protección más eficiente a los 21 días de la evaluación posdesafío en el modelo murino, se requieren investigaciones posteriores que esclarezcan las diferencias encontradas con otros autores. Finalmente, ha quedado bien establecido el efecto modulador de la respuesta inmune dependiente del tipo de adyuvante utilizado, los resultados expresados demuestran el efecto que produce la utilización de ACF y AIF, es bien sabido que su presencia incrementa la magnitud de la respuesta en comparación de cuando no se usan. Este efecto lo pudimos observar en las evaluaciones del adyuvante postdesafío, siendo de mayor relevancia la desarrollada por ACF; sin embargo, dicho efecto va disminuyendo conforme el tiempo postdesafío avanza para finalmente depender el efecto protector del inmunógeno empleado.

Abstract

The first objective of the study was to evaluate the effect of three *B. ovis* subcellular fractions: outer membrane (OMP), inner membrane (IMP) and citosol (CP) on the cellular immune response by *in vitro* determination of the induction of IL-2, IL-4 and IFN- γ production. *B. ovis* REO 198 strain was used; it was cultured in brucella broth for 48 hrs, with orbital agitation at 37C. The biomass was obtained by centrifugation at 10,000g, for 15 min in HEPES 10mM - PMSF 0.1M+ EDTA 2mM. After growth, the bacteria were sonicated at 60 second pulses allowing a 60 second rest. After sonication, the biomass was then ultra centrifuged at 150,000 g for 1 hr at 4C. After the centrifugation, the supernatant was obtained containing citosol proteins; while the pellet containing total membranes was treated with HEPES 10mM+sarcosyl 1% and agitated for 30 min at 37 C and centrifuged at 150,000g 1 hr at 4C. From this treatment, two fractions were obtained: the sarcosyl insoluble (OMP) and the sarcosyl soluble fraction (IMP). The fractions of OMP and CP were precipitated with absolute ethanol in a 1:4 ratio, while OMP was concentrated by the addition of chloroform-methanol. The three fractions were evaluated on PAGE-SDS at 15% and stained with silver to determine LPS presence. Separately, three groups of six 5 days old Balb/C mice were inoculated with OMP, IMP and CP fractions respectively. The spleen was obtained and a primary lymphocyte culture was done. Ten microliters of the fraction were added to the culture and the culture supernatants were sampled at 24, 48, 72, 96 and 1200 hrs. IL-2, IL-4 and IFN- γ were determined in the culture samples by a commercial reagent set. The OMP fraction highly induced cellular immunity, producing a high IL-2 response at 24 hr (1000pg) while showing an increasing production of IFN- γ that reached a 720pg peak at 120 hrs of incubation. IL-4 response was very low in this fraction probably due to the presence of rough LPS; the cytokine production showed that the response came from Th1 lymphocytes. The data demonstrated that OMP proteins were good inducers of cellular immunity.

The second objective of the study was to assess the degree of protection provided by OMP, vesicles and a *B. ovis* bacterine to the experimental challenge to *B. ovis*, in a murine model. **The immunogens** used were ; a) *B. ovis* outer membrane (OMP) obtained as described above; b) vesicles of *B. ovis* outer membrane: the bacteria were grown in brucella agar for 48 hrs and 37 C, the microorganisms were recovered with physiological saline, centrifuged at 10,000 g for 15 min, 4C and the supernatant was filtered through 0.22 μ m and at last the filtered solution was ultracentrifuged at 150,000 g for 1 hr. The pellet was resuspended with deionized water and frozen until its usage, c) *B. ovis* bacterine, it was obtained from a growth in brucella agar for 48 hrs, at 37 C and an inactivation with 5% phenol in phosphate buffer 20 mM (pH 7.2) for 2 days. The biomass was washed three times in distilled water. **Evaluation of the *in vivo* protection of immunogens.** Nine groups of 12 Balb/C mice were used. The groups were divided as follows: 1) OMP + Freund's complete adjuvant (FCA), 2) OMP + Freund's incomplete adjuvant (FIA), 3) vesicles + FCA, 4) vesicles +FIA 5) bacterine + FCA, 6) bacterine + FIA and controls were groups 7) FCA, 8) FIA and 9) physiological saline. The mice were inoculated subcutaneously with the respective immunogens and received a new inoculation at the 10 days. On day 20 after the immunization, the mice were inoculated with *B. ovis* at a concentration of 3×10^5 CFU intravenously. **Determination of the colony forming units (CFU/ml).** CFU were determined in the spleen of three mice at day 7, 14 and 21 after challenge with *B. ovis*. Statistical

analysis: ANOVA was used to determine the difference among the immunogens used. At day 7, there is no significant difference among the different groups, however on the day 14, there is a noticeable decrease in the UFC in the vesicle and bacterine groups compared to OMP. On day 21 there is a significant difference between bacterine and the other groups while bacterine and OMP showed a similar response. The post-challenge response demonstrated by adjuvants highlights their effect during the sampling period (7, 14 and 21 days). FCA was significantly different to FIA on each of the sampling days. It is possible to observe a steady decrease in UFC/ml due to the adjuvant, while the final decrease could have been due to the type of immunogens used. The tests in the murine model showed that even though *B. ovis* OMP have a good activity in vitro, they are not as efficient in vivo. The *B. ovis* vesicles showed a more efficient protection at the 21 days in the murine model; they may require additional research to clarify the results obtained herein when compared to other results reported in the literature. The study also emphasized the modulating effect on the immune response of the type of adjuvants by increasing the immune response. In this study, FCA developed a higher response that decreased through time to finally depend only on the immunogen protective effect.

1. INTRODUCCION

La brucelosis sigue siendo una de las zoonosis de mayor distribución en el mundo. Afecta principalmente al ganado bovino, ovino, caprino, suino, canino, animales silvestres y mamíferos marinos. En los animales la infección causa abortos y aumento de la mortalidad perinatal, así como infertilidad, existiendo diversas vías de infección.

Si bien varios países han erradicado la *Brucella abortus* de los bovinos, en algunas áreas *B. melitensis* y *B. suis* están también surgiendo como causa de infección en bovinos. Además existen las especies: *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. canis* y recientemente una que infecta diversos mamíferos marinos, la cual se ha denominado *B. maris*.

El hombre contrae la enfermedad por contagio directo, durante el manejo de los animales, o por ingestión de productos lácteos frescos contaminados, pero no es fuente de contagio.

En el Manual Bergey de bacteriología sistemática (1984), se reconoce la existencia de seis especies del género *Brucella*, de las que cuatro son de interés económico: *B. melitensis*, que afecta sobre todo al ganado caprino y ovino; *B. abortus*, al ganado bovino; *B. suis*, a los suinos; y *B. ovis* que infecta principalmente a los machos ovinos y es el agente etiológico de la epididimitis contagiosa del carnero.

La epididimitis contagiosa del carnero es una enfermedad infectocontagiosa que afecta a la especie ovina y puede tener un curso agudo o crónico. Esta enfermedad se caracteriza por una inflamación del epidídimo en los carneros, con la consiguiente disminución de la fertilidad, baja calidad del semen, presencia de granulomas espermáticos y fibrosis progresiva del

epidídimo. Además, puede producir abortos tardíos en las hembras y un aumento de la mortalidad perinatal. El cuadro 1 resume diversos eventos relevantes en la historia de *B. ovis*.

Cuadro 1. Antecedentes históricos de *Brucella ovis*.

AÑO	EVENTO	BIBLIOGRAFIA
1952	Se aísla un bacilo Gram negativo a partir de carneros afectados de epididimitis	McFarlane y col., 1952
1953	Se describe un microorganismo semejante en Australia y Nueva zelanda	Simmons and Hall, 1953; Buddle y Boyes, 1953.
1953	El microorganismo se considera una mutante de <i>B. melitensis</i>	Buddle y Boyes, 1953.
1955	Se denomina <i>Brucella ovis</i> porque contiene antígenos comunes con cepas rugosas de <i>B. abortus</i> y <i>B. melitensis</i> , sin poseer antígenos A y M. Este mismo autor propuso la denominación alternativa de " <i>B. brucei</i> var. <i>ovis australasiae</i> ".	Buddle, 1955
1956	Se incluye dentro del género <i>Neisseria</i> o dentro de <i>Haemophilus</i> , debido a la existencia de ciertas propiedades comunes.	Meyer and Cameron, 1956; Kennedy y col., 1956
1962 y 1966	El subcomité de Taxonomía del genero <i>Brucella</i> de la ASM, rehusó admitir este microorganismo como <i>Brucella</i> .	Jones, 1967
1967	Con base en las relaciones antigénicas de <i>B. ovis</i> con <i>B. melitensis</i> , se recomienda su inclusión en el genero <i>Brucella</i> .	Díaz y col., 1967
1968	Debido al análisis de los ácidos nucleicos se propone que <i>B. ovis</i> pertenece al genero <i>Brucella</i> .	Hover y McCullough, 1968.
1974	Se describe por primera vez en México la presencia de anticuerpos contra <i>Brucella ovis</i> .	Suárez y col., 1974
1976	Es aceptada la inclusión de <i>Brucella ovis</i> dentro del genero <i>Brucella</i> por el Subcomité de Taxonomia	Alton y col., 1976.
1979	Se realiza el primer aislamiento de <i>Brucella ovis</i> en México a partir de sementales Suffolk importados de USA.	Pérez y col., 1979.
1983	La epididimitis se describe en numerosos países.	Blasco, 1983.
1997	Se considera importante la presencia de la enfermedad en México, al reportarse el 2.4 % de reactores positivos en sementales jóvenes	Núñez y col., 1997.

Aspectos generales de *B. ovis*.

Es bien conocido que *B. ovis* crece adecuadamente en el medio Thayer - Martin (Thayer y Martin, 1964), modificado mediante la adición de diversos antimicrobianos: Nitrofurantoina, Vancomicina, Colistina y Nistatina (Alton y col., 1976; Brown y col., 1971); agregados a la base de agar sangre ó agar soya tripticaseína enriquecida con un 5 a 10% de suero animal (Sanchis y

Giaufret, 1975; De Long y col., 1979). El primoaislamiento debe hacerse a 37°C en una estufa con 10 a 20 % de CO₂ o bien carecer de éste si se trata de cepas previamente acondicionadas (ejemplo: REO198). En el primoaisalmiento las colonias pueden aparecer aproximadamente entre los cuatro y siete días. Estas son grisáceas y circulares, con bordes enteros y regulares, convexas y de superficie brillante; el centro es opaco y la periferia translúcida y morfológicamente es prácticamente imposible distinguirlas de las colonias de otras especies lisas del género *Brucella* (Alton y col., 1976).

B. ovis es catalasa positiva y oxidasa negativos. No produce H₂S, ni hidroliza la urea. Requiere CO₂ para crecer. Su crecimiento es inhibido por el violeta de metilo, pero se multiplica en presencia de fucsina y tionina y no reduce los nitratos a nitritos. Oxida los aminoácidos L y D-alanina, L-asparagina, L-ácido glutámico, D y L-serina y el adonitol. No oxida la L-arabinosa, D-galactosa, D-glucosa, D-ribosa, mesoeritritol, D-xilosa, L-arginina, D y L-citrulina, D y L-ornitina y L-lisina. Los cultivos no son lisados por los fagos Tb, WB, M-51-5708, Fz, Bk, MC-75, D y R. Sin embargo, Los fagos R/O - R/C son líticos para *B. ovis*. Es sensible "*in vitro*" a la penicilina, estreptomicina y tetraciclina (Corbel y Brinley-Morgan, 1975; Alton y col., 1976).

El Cuadro 2 resume las propiedades bioquímicas entre los principales microorganismos asociados con la epididimitis ovina.

CUADRO 2. Propiedades Bioquímicas de los principales microorganismos asociados con epididimitis ovina. (Bergey, 1984)

Característica Bioquímica	<i>Brucella ovis</i>	<i>Actinobacillus seminis</i>	<i>Histophilus ovis</i>
Catalasa	+	-/+	-
Motilidad	-	-	-
Hemólisis	-	-/+	-
Nitratos	-	-	+
Oxidasa	-	-	+
Indol	-	-	-/+
Urea	-	-	-
Rojo de Metilo	-	-	-
Voges - Proskauer	-	-	-
Arabinosa	-	-	-
Ramnnosa	-	-	-
Xilosa	-	-	+
Glucosa	-	-	+
Fructosa	-	-	+
Galactosa	-	-	-
Sucrosa	-	-	-
Lactosa	-	-	-
Trealosa	-	-	-
Glicerol	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Manitol	-	-	-/+
Sorbitol	-	-	-/+
Gelatina	-	-	-
Maltosa	-	-	+
Gram	-	-	-
Ziehl – Neelsen	-	-	-
Ziehl – Neelsen Modificado (Stamp)	Cocobacilos de color azul	Cocobacilos de color rojo	-

Composición antigénica de *Brucella*:

Brucella es una bacteria gram negativa, por lo que su envoltura celular contiene membrana interna (IMP) y membrana externa (OMP) y un espacio periplásmico que contiene al péptidoglicano (Dubray, 1976).

Lipopolisacárido (LPS).

En aquellas bacterias gram negativas que carecen de cápsula, el antígeno inmunodominante de la superficie celular es el lipopolisacárido (LPS). El LPS consta de una parte glucolipídica (lípidio A) inserta en la membrana externa y por tanto no expuesta en la superficie y otra polisacárida dirigida hacia el exterior que se acostumbra dividir en dos secciones: el núcleo, más interno, y la cadena O (Lugtemberg y Van Alphen, 1983). El tamaño de la porción polisacárida es variable en la mayoría de las bacterias es máximo en los aislamientos primarios (formas salvajes o cepas lisas) pero puede reducirse parcial o completamente, generando mutantes rugosas (R). En *Brucella* la situación es algo más compleja, pues este género incluye especies permanentemente rugosas (*B. ovis*, *B. canis*) junto con especies lisas (S) (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*) y con las mutantes R derivadas de estas últimas (Corbel y Brinley-Morgan, 1984).

El análisis químico del LPS de las mutantes R de las especies lisas de *Brucella*, sugiere una estructura del núcleo con 2-ceto, 3-deoxi-octulosonato (KDO), glucosa, galactosa y quinovosamina como componentes principales (Moreno y col. 1984). La mayor parte de esta estructura parece ser común a las especies estudiadas, con la salvedad de *B. ovis*. La cadena O es un homopolímero de N-formil-perosamina (Bundle y col., 1987; Caroff y col. 1984;

L'vov y col. 1985; Moreno y col., 1987; Wu y Mackenzie, 1987) que lleva los antígenos A y M descritos por Wilson y Miles (Díaz y col., 1968b).

La falta de reacción cruzada entre la cadena O de las brucelas lisas y el LPS de *B. ovis* demuestra que este último carece de N-formil-perosamina. Sin embargo, los LPS-R de los mutantes R y el de *B. ovis* no son idénticos, pues existen diferencias cuantitativas en los azúcares, y el análisis por precipitación en gel muestra sólo identidad parcial (Díaz y Bosseray, 1974) lo que demuestra que, entre los LPS-S de las especies lisas y el LPS de *B. ovis*, sólo son comunes parte de los determinantes antigénicos del núcleo-lípido A. Aún a pesar de compartir parcialmente componentes, no se observa normalmente una reacción cruzada, cuando se emplean células completas, pues la cadena O cubre el núcleo en la superficie de las células lisas y la inestabilidad de las suspensiones celulares R dificulta su empleo en muchas pruebas serológicas. Cuando se usan LPS-R y LPS-S purificados y resuspendidos en soluciones acuosas tampoco se observa normalmente la reacción cruzada. La razón es que los LPS-S se agregan formando micelas con las cadenas O hacia el exterior tapando los determinantes internos (Shands, 1971) y los LPS-R, por ser muy hidrófobos, no forman micelas o suspensiones estables una vez purificados. Un cierto grado de reacción cruzada es detectable con sueros de animales infectados por *B. melitensis* en el ELISA cuando se emplea LPS-R, o extractos enriquecidos de éste (Lamb y col., 1979; Riezu-Boj y col. 1986).

El lípido A de *Brucella* es químicamente diferente del de las gram negativas clásicas y está formado por un disacárido de diaminoglucosa sustituido con β -hidroxiácido y otros ácidos grasos de cadena larga. A esta composición diferente se debe el que algunas de las actividades características de los LPS

relacionadas con la endotoxicidad, como la pirogenicidad, sean diferentes en *Brucella*, lo que podría tener implicación en la patogénesis (Moreno y Morrión, 2001).

Proteínas de Membrana externa.

Mediante diversas técnicas se pueden detectar en la membrana externa de *Brucella* hasta 22 proteínas, de entre las cuales tres grupos, llamados 1, 2 y 3, son dominantes (Gamazo y col., 1989; Moriyon y Berman, 1982). De entre ellos, el grupo 3 ha sido estudiado en más detalle. Se sabe que están expuestas en la superficie de los mutantes R y de *B. ovis* (Riezu-Boj y col., 1990; Cloeckert y col. 1990) y que inducen una respuesta inmune humoral importante en las infecciones por *B. ovis* (Riezu-Boj y col., 1986 y 1990).

Los estudios sobre las moléculas de superficie que componen la envoltura de *Brucella* han conducido a la caracterización de dos fracciones inmunogénicas que inducen actividad protectora: la fracción de pared celular insoluble al SDS (SDS-I) y el extracto salino caliente (HS).

De esta manera, las proteínas mayores de la membrana externa (Omp) de *Brucella* fueron inicialmente identificadas en 1980 y 1981 (Dubray y Bézard, 1980; Dubray, 1981). Se demostró que la fracción de SDS-I resultaba protectora en el modelo ratón (Dubray y Bézard, 1980; Dubray, 1981; Dubray y Charriaut, 1983). La fracción SDS-I de *B. abortus* mostró estar constituida principalmente de dos grupos mayores de Omp, de una masa aproximada de 25–27 y 36–38 kDa, respectivamente, encontrándose una asociación estrecha con el peptidoglicano (PG) (Dubray y Bézard, 1980; Dubray, 1981; Dubray y Charriaut, 1983; Dubray, 1987; Sowa y col., 1991). Esta fuerte asociación,

probablemente covalente, ha resultado esencial para entender la diversidad que llega a existir en las masas moleculares de las diferentes Omp reportadas (Clockaert y col., 1992). Estas dos Omp anteriormente mencionadas, también fueron identificadas por Vestrate y col (1982) y las designó como proteínas del grupo 2 (36 – 38 kDa) y grupo 3 (25 – 27 kDa). Las proteínas del grupo 2 fueron identificadas posteriormente como porinas (Douglas y col., 1984). La fracción de SDS-I de *B. melitensis* contiene otro grupo mayor de Omp, de 31 – 34 kDa, asociado fuertemente al PG (Clockaert y col., 1992c, Clockaert y col., 1995^a; Dubray, 1981). Por lo tanto la fracción SDS-I estaba constituida de Omps y PG, y se creyó que la protección que esta confería en el modelo ratón, se debía a la presencia de las Omps (Dubray y Bézard, 1980; Dubray, 1981; Dubray, 1987). Sin embargo, la fracción SDS-I de cepas rugosas (R) de *B. abortus* y *B. melitensis* fueron incapaces de proveer protección en el modelo ratón contra el desafío de cepas virulentas lisas (S) de *B. abortus* o *B. melitensis*. (Dubray, 1981; Clockaert y col., 1995). Estas observaciones provocaron dudas acerca del papel de las Omps en la protección y también, si el SDS-I contaminado con LPS-S (< 1 %) podría no ser el mayor antígeno involucrado en la protección. A pesar de que el menor componente de la fracción SDS-I es el LPS-S se ha demostrado que por si solo es altamente inmunogénico y que en la fracción SDS-I, produce un mayor título de anticuerpos en el ratón, que cuando se emplea solo (Clockaert y col., 1995). En el SDS-I digerido con pepsina, en donde las Omps fueron también digeridas, se probó que proporcionan mejor protección que la fracción de SDS-I sin digerir (Clockaert y col., 1995). Estos datos llevan a concluir que las Omps, tienen poco o ningún papel en la protección contra la infección de *Brucella* de tipo lisa

en el modelo murino y el LPS-S juega un papel importante en la protección, demostrado por experimentos de inmunización pasiva con anticuerpos monoclonales anti-LPS-S (Cloekaert y col., 1992^a, Cloekaert y col., 1995^a, Elzer y col., 1994, Limer y col., 1989, Montaraz y col., 1986, Philips y col., 1989, Vizcaíno y Fernández, 1994; Winter y col., 1989).

Se ha demostrado mediante anticuerpos monoclonales (MAbs), ELISA, microscopía electrónica y citometría de flujo, que las Omps están expuestas en la superficie de la bacteria (Bowden y col., 1995 a,b; Cloekaert y col., 1990; Cloekaert y col., 1991). Sin embargo, estas proteínas son menos accesibles en el caso de las brucelas S en comparación con las R, lo cual es posiblemente debido a lo largo de la cadena O de los LPS-S de la superficie de las cepas de *Brucella* S. Esto comprueba el porqué los MAbs de las mayores Omps en el modelo murino resultaron pobremente o no protectores contra los desafíos de cepas S de *Brucella* en el modelo murino (Montaraz y col., 1986; Jacques y col., 1992; Cloekaert y col., 1991).

Finalmente, el empleo de Omps recombinantes purificadas o de la expresión en *E.coli* de los respectivos genes inmunogénicos, confirmó la poca importancia de las Omps mayores en la protección conferida en contra de la infección por cepas S de *Brucella*, empleando el modelo murino (Bowde, 1994; Bowden y col., 1998; Guilloteau y col., 1999). Además, se ha observado que las Omps mayores inducen una baja y heterogénea respuesta de anticuerpos, por lo que resultan pobres inmunógenos en el ganado infectado por *B. abortus* (Cloekaert y col., 1992b) o en los borregos infectados con *B. melitensis* (Zygmunt y col., 1994). Las Omps mayores por lo tanto no son candidatos

interesantes para el serodiagnóstico de la brucelosis causada por cepas S de *Brucella* (CloECKaert y col., 2002).

La situación resulta diferente para *B. ovis* la cual es una cepa normalmente rugosa que carece de la cadena O de sus LPS, por lo que Omps mayores y otras se encuentran fácilmente accesibles a los anticuerpos (Bowden y col., 1995). El extracto "hot saline" (HS) de *B. ovis* se ha encontrado que es protector contra el desafío de *B. ovis* en el ratón (Jiménez de Bagués y col., 1994) y en los carneros (Blasco y col., 1993). El HS esta compuesto por LPS-R y Omps, principalmente del grupo 3 (Gamazo y col., 1989). Empleando MAbs, todas las Omps de *Brucella* (CloECKaert y col., 1990) han sido encontradas en el extracto HS (Bowden y col., 2000). La demostración de que el extracto HS carente de LPS-R conservaba su actividad protectora en el ratón resaltó la contribución de las Omps en la inmunidad protectora (Jiménez de Bagués y col., 1994); sin embargo, en el carnero, no resultó así (Blasco y col., 1993), lo que han requerido de mayores investigaciones. Además, los MAbs contra las Omps ha resultado ser altamente protectores en el ratón contra *B. ovis* (Bowden y col., 1995; Bowden y col., 2000). De manera particular, el MAb específico de la Omp de 31-34 kDa ha conferido un nivel muy alto de protección contra *B. ovis* en el modelo murino, lo que hace ser a esta Omp un promisorio candidato de vacuna subcelular contra la epididimitis (Bowden y col., 2000). Esta proteína también ha mostrado ser inmunodominante en respuestas serológicas de carneros infectados con *B. ovis* (Kittelberger y col., 1995; Kittelberger y col., 1998). Experimentos recientes empleando Omps del grupo 3 recombinantes de *B. melitensis* y *B. ovis* producidas en *E. coli*, conducen a una actividad protectora contra el desafío de *B. ovis*; además, se encontró que la

inmunidad puede ser transferida mediante el suero inmune de estos experimentos, lo que da el soporte de la actividad de los anticuerpos contra epítopes de las Omps en la infecciones por brucelas de tipo R (Cloeckert y col., 2002).

Patogénesis de *Brucella*.

A pesar de que la definición clásica de la especies de *Brucella* las describe como parásitos intracelulares facultativos, esta definición no hace honor a su verdadera naturaleza, la cual es mejor entendida si se les refiriese como extracelulares aunque realmente son intracelulares facultativos. Se sabe que el nicho preferido de *Brucella* es el medio ambiente intracelular de la célula hospedero, dicho ambiente resulta un desafío para este microorganismo, ya que se tiene que adaptar al difícil ambiente que representan las condiciones de resistencia que genera al activar el sistema inmune del hospedero, dentro del cual se incluye la activación de los macrófagos. Este medio ambiente contiene gran cantidad de sustancias de replicación, que permiten la expansión bacteriana y la subsiguiente transmisión a nuevas células hospederas, frecuentemente esto último ocurre a través del feto abortado quien esta fuertemente infectado en las Brucelas lisas (Gorvel y Moreno, 2002; Köhler y col., 2003).

En contraste con otras bacterias patógenas, factores clásicos de virulencia, como son: exotoxinas, citolisinas, exoenzimas incluyendo exoproteasas, cápsulas, fimbrias, flagelos, plásmidos, fagos lisogénicos, formas de resistencia, variación antigénica o inductores apoptóticos, no han sido reportados en el caso de *Brucella* (Moreno y Moriyón, 2001; Letesson y col,

2002), quedando como el único factor de virulencia el antígeno O del LPS (Ficht, 2003). Recientes publicaciones de la secuencia genómica de *Brucella* verifican la ausencia de los factores clásicos de virulencia, además de la carencia de islas de virulencia o patogenicidad, encontradas en otros microorganismos (DelVechio y col., 2002; Paulsen, 2002). Una excepción a lo anterior puede ser el sistema de secreción tipo IV, el cual ha resultado importante para la sobrevivencia en el modelo ratón y macrófagos (Comerci y col., 2001; Foulongne y col., 2000). El locus que codifica la mayoría de las funciones requeridas para la biosíntesis del antígeno O, representa un segundo ejemplo de genes de virulencia adquirida (Godfroid y col., 2000).

Los verdaderos elementos de virulencia de *Brucella* son determinantes moleculares que le permiten invadir (Guzman- Verri y col., 2001), sobrevivir intracelularmente (Moreno y Moriyón, 2001) y extender su nicho de replicación en fagocitos (Gorvel y Moreno, 2002; Letesson y col., 2002). Los eventos realizados por *Brucella* durante su biogénesis en la célula, resaltando su unión con la membrana del huésped y culminando con su replicación intracelular en compartimentos vacuolares, se resumen en la figura 1.

Una vez que *Brucella* invade las mucosas, la ingieren los fagocitos allí presentes. Esto se ha observado en células M, macrófagos y neutrófilos que ingieren *Brucella* mediante una fagocitosis tipo cremallera (Ackermann y col., 1988). La *Brucella* opsonizada es internalizada vía complemento y receptores Fc en macrófagos y monocitos, mientras que *Brucella* no opsonizada parece penetrar vía receptores de lectina o fibronectina, y otros receptores desconocidos (Campbell y col., 1994). Se ha informado, sin embargo, que la *Brucella* opsonizada a través de receptores inmunológicos preferencialmente

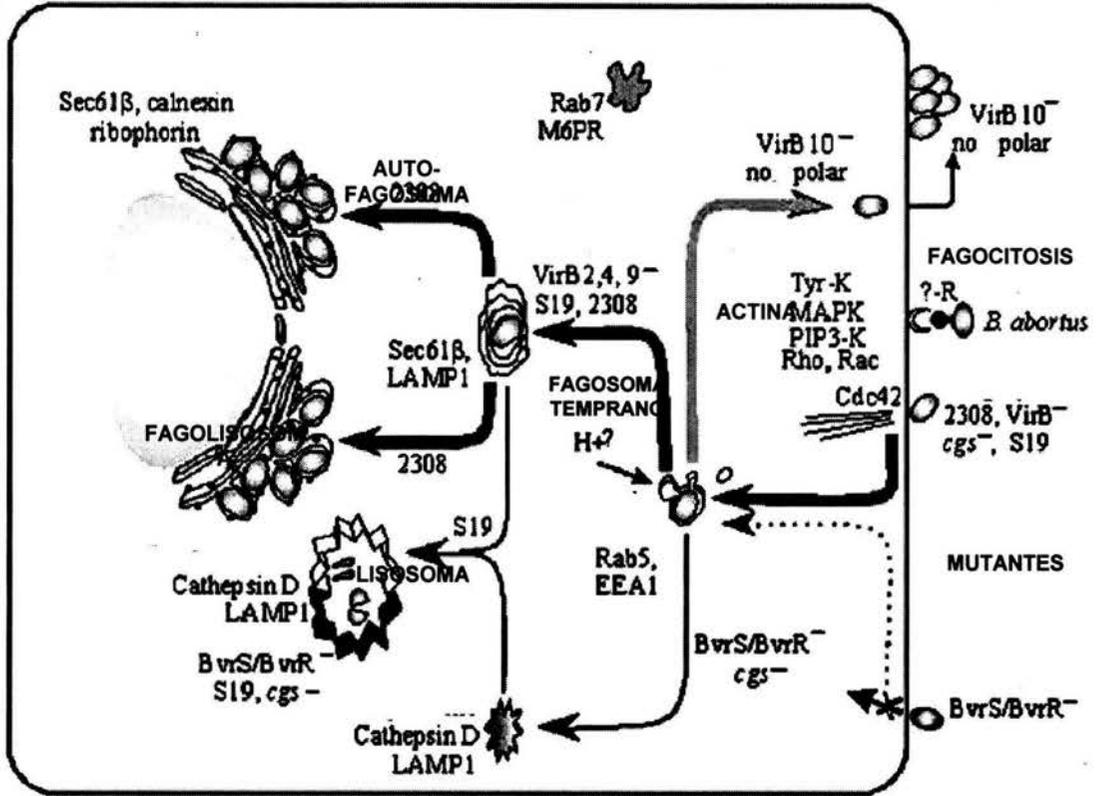


Figura 1 . Modelo esquemático de la invasión y tránsito intracelular de *B. abortus* en células epiteliales HeLa. *Brucella* se une discretamente a sitios de la célula, vía moléculas receptoras (?-R) desconocidos. La bacteria penetra mediante una discreta fagocitosis con un moderado reclutamiento de filamentos de actina, activación de pequeñas GTPasas (Cdc42, Rac y Rho), un reclutamiento directo de Cdc-42 y señales mediadas por segundos mensajeros (Tyr-K, MAP-K y PIP3-K). La bacteria ingerida, inicia su recorrido en compartimentos del fagosoma temprano (marcados por Rab-5 y EEA1) el cual puede acidificar (H⁺) mediante la adquisición el trabajo de una bomba de protones (?). En las células HeLa, la mayoría de las células ingeridas son conducidas (flechas gruesas) hacia el retículo endoplásmico (sec 1β, calnexina, riboforina) mediante la ruta autofagocítica (marcada con LAMP1 y sec61β), mientras que pocas bacterias van directamente (flechas delgadas) a fagolisosomas. Algunas mutantes nulas (*BvrS/BvrR⁻*) son defectuosas en la penetración (flechas cruzadas) y cuando son ingeridas (flechas punteadas) son incapaces de evadir la fusión con lisosomas (marcadas con catepsina D, LAMP1). Otras mutantes no son defectuosas en la penetración pero no pueden evadir la fusión con los lisosomas (*cgs⁻*), mientras otros transitan de los autofagosomas a fagolisosomas (*S19, VirB 2, 4 y 9* mutantes nulas) o de fagosomas tempranos a la membrana celular (*VirB10 no polar*, flechas gruesas grises). Señales de inhibición de la apoptosis pueden ser liberadas del nicho de replicación de *Brucella*. Es notorio que la *Brucella* virulenta no transita a través de los endosomas tardíos (marcado con Rab7, M6PR). (Gorvel and Moreno, 2002).

es más propensa a ser destruida que bacterias que invaden macrófagos por otros medios (Gross y col., 2000). Es así, que el modo mediante el cual los fagocitos internalizan *Brucella*, parece tener que ver con el destino de ésta en los compartimentos intracelulares; por el contrario, al parecer esto no ocurre en fagocitos donde el modo de entrada no condiciona el tránsito intracelular de la *Brucella* ingerida (Gorvel y Moreno, 2002).

Una vez que *Brucella* se ubica en el interior de la célula huésped debe pasar largos procesos de adaptación dentro del curso de su evolución, la génesis final dentro del nicho es compleja y necesita de la sincronización de varias funciones. Las cinéticas de multiplicación de *Brucella* dentro del huésped natural (el macrófago) reflejan la complejidad de dichos eventos, observándose diferentes curvas de replicación dependientes del tipo de cepa empleada (por ejemplo: rugosa, lisa, atenuada, etc.) (Köhler y col., 2003). Se ha mencionado que son diferentes las condiciones que determinan el tiempo en que *Brucella* construye su nicho de replicación, se basa en lo observado en el caso de *Brucella suis* donde se requiere de un pH ácido en la vacuola y la activación de genes de virulencia, operón *virB*, el cual es reconocido como el mayor factor de virulencia de las brucelas (O`Callaghan, 1999).

Durante las primeras horas de infección, necesarias para inducir *virB* y probablemente otros genes, *Brucella* resulta aún sensible a la actividad bactericida de los macrófagos. Se ha visto que el decremento en la viabilidad posinfección, resulta mayor cuando la bacteria carece de la cadena O (cepas rugosas), y se cree que esta mayor sensibilidad de las cepas rugosas se debe a la fragilidad de su membrana. Sin embargo, diferentes observaciones de fusiones tempranas de compartimentos de mutantes rugosas con lisosomas,

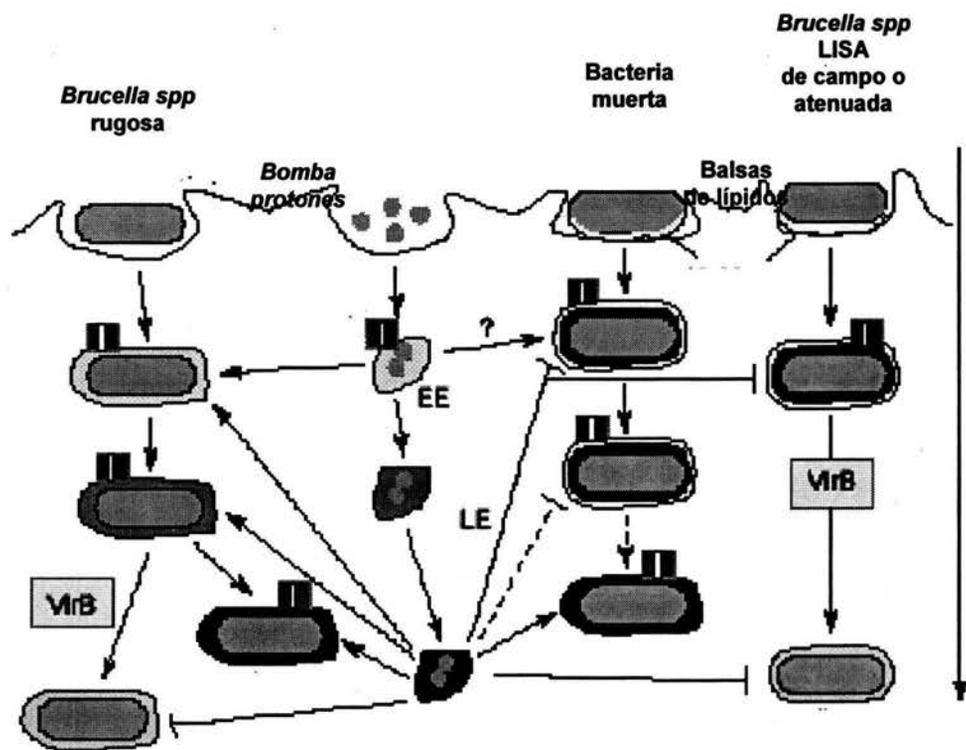


Figura 2 . Comparación de la respuesta y trafico intracelular de cepas lisas y rugosas de *Brucella spp*. Los eventos claves como la participación de cúmulos (balsas) de lípidos en la bacteria y la expresión temprana de *virB*, pueden ser para una infección exitosa de la célula huésped y alcanzar el nicho final de replicación – el “brucelosoma”- por parte de la cepa nativa y las mutantes atenuadas capaces de sobrevivir intracelularmente sin multiplicarse. Las vacuolas que contienen bacterias muertas por calor toman la vía de fusión en balsas de lípidos con lisosomas que se confirma por la ausencia de *virB*. En contraste, las balsas de lípidos no están involucrados en las fagocitosis de cepas rugosas y sus vacuolas rapidamente entran a la vía clásica del endosoma. Solo algunas bacterias escapan exitosamente debido a una rápida expresión de *virB*. (Köhler et al., 2003).

sugieren una interpretación radicalmente diferente (Porte, 2003); en donde la cadena O está involucrada en evitar los pasos tempranos de la vía del endosoma, con lo que se retarda una rápida muerte del patógeno. En los casos de *B. suis* y *B. abortus*, se ha visto que la fagocitosis involucra cúmulos de membrana ricos en colesterol, las vesículas formadas con estos cúmulos, se cree que retardan la interacción con la bien conocida vía del endosoma-lisosoma (Duncan, 2002), sugiriéndose que *Brucella* usa una vía alternativa para entrar al macrófago y prevenir las rápidas interacciones con las vesículas que contienen agentes letales, como son las enzimas líticas o péptidos antimicrobianos. Esta ruta es asociada con fenotipos lisos debido a: 1) las cepas rugosas (naturales o mutantes) no necesitan cúmulos (balsas) ricos en colesterol para penetrar dentro de la célula y 2) la mayoría de fagosomas contienen cepas rugosas fusionadas con lisosomas en un lapso de 1 hora postinfección. Se cree que algunas cepas rugosas pueden escapar antes de que se de la unión fagosoma-lisosoma, a un nicho seguro donde puedan replicarse, por lo que se han observado varios grados de replicación intracelular. Lo que ha llevado a proponer un nuevo término que describe la vacuola donde crece *Brucella*, denominado "brucelosoma", en él la bacteria elude las armas encontradas en el fagosoma genuino y sintetiza todos los metabolitos necesarios para su sobrevivencia, usando respiración aerobia y microaerofílica. Los diferentes caminos propuestos que llevan cepas rugosas y lisas de *Brucella* son resumidos en la figura 2 (Köhler y col., 2003).

Se ha demostrado que las cepas rugosas atacan en mayor número a las células que las cepas lisas de *Brucella*; sin embargo, las bacterias rugosas son

menos eficientes en la invasión. Este fenómeno sugiere que el polisacárido O y el hapteno nativo (NH), juegan un papel importante en la invasión de células por parte de *Brucella*. Al menos en el caso de *Brucella* opsonizada con anticuerpos, estas dos moléculas (polisacárido O y NH) juegan un papel importante ya que son los principales determinantes para la unión de los anticuerpos (Gorvel y Moreno, 2002).

Uno de los hallazgos más interesantes acerca del parasitismo de *Brucella*, es que esta bacteria es capaz de replicarse extensivamente dentro de la célula sin restringir sus funciones básicas o inducir un daño obvio en ésta. Una gran cantidad de bacterias dentro del retículo endoplásmico causaría constricción del núcleo celular, sin embargo, dicha invasión nunca se logra. Los procesos cruciales del ciclo celular como la síntesis de ADN, la condensación de cromosomas, la mitosis, la cariocinesis y la citocinesis no son inhibidas. Se ha visto que la síntesis de *novo* de proteínas no se requiere durante el parasitismo intracelular (Detilleux y col., 1991).

Brucella es capaz de inhibir la muerte celular en macrófagos profesionales y no profesionales, este fenómeno no se restringe a la célula infectada sino también se ha visto en las células vecinas, de donde se propone la existencia de una sustancia que libera *Brucella*, que permite la sobrevivencia y proliferación celular para su propio beneficio (Gorvel y Moreno, 2002).

Recientemente se ha descubierto la presencia de genes que presuntamente codifican la producción de hemolisinas y sus correspondientes proteínas de secreción (DeVecchio y col, 2002). Las hemolisinas de *Legionella* forman poros y desintegran la vacuola y la membrana celular después de que su replicación intracelular termina (Abu-Kwaik, 2001), se sugiere que dicho

fenómeno también ocurre en el caso de *Brucella*. En el caso de infección de fagocitos y trofoblastos corioalantoideos, la extensa replicación bacteriana eventualmente genera necrosis después de que la célula libera a la bacteria, ocasionándose un proceso inflamatorio. Un proceso similar se observa en los tejidos fetales masivamente infectados, y se sugiere que la necrosis es el destino final de la célula infectada.

Después que la bacteria es liberada, la infección a otras células prosigue. En contraste, con patógenos como *Listeria* o *Shigella*, la *Brucella* no infecta a las células por diseminación intracelular de célula a célula (Gorvel y Moreno, 2002).

Durante la infección por *Brucella*, varias citocinas como IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-10, e IL-12 controlan el crecimiento intracelular de cepas de *Brucella* dentro de los macrófagos, mientras que IL-1^a, IL-4, IL-6 y GM-CSF no presentan efectos claros (Golding y col., 2001). Entre las diferentes citocinas, el IFN- γ es el más relevante para generar macrófagos con una fuerte actividad para matar intracelularmente a *Brucella*. Posteriormente, IL-2, IL-10 e IL-12, todas ellas influyen la respuesta celular adquirida y específicamente contribuyen a controlar la multiplicación de *Brucella*, al parecer trabajando vía el camino dependiente de IFN- γ (Murphy y col., 2001).

El papel del factor de necrosis tumoral (TNF α) en el control de la replicación intracelular de *Brucella* es evasivo. En contraste a lo que se ha observado en macrófagos murinos, cepas de *Brucella* no inducen TNF α en macrófagos humanos y la *Brucella* viva es capaz de inhibir la producción de citocinas. Sin embargo, los macrófagos humanos pretratados con TNF α exógeno inhiben significativamente la proporción en la replicación

intracelular de *Brucella*. El TNF α no es esencial para la adquisición de la resistencia celular, pero probablemente activa directamente células efectoras que limitan la multiplicación intracelular de *Brucella* (Otones y col., 2000; Zhan y col., 1996).

Respuesta inmune.

Los linfocitos T se diferencian en dos subclases, Th1 y Th2. Los Th1 principalmente secretan IL-2, IFN- γ y TNF- β , los cuales participan en la inmunidad celular, mientras que los Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-10, los que promueven una respuesta inmune humoral. Además, existen otras citocinas producidas por ambas subclases de Th. Se ha reportado que células vivas de *Brucella abortus* inducen la producción de IFN- γ , sin embargo, células muertas o fracciones subcelulares inducen a IL-4 (Zhan y col., 1995 a). La respuesta inmune de *B. abortus* depende de la activación de macrófagos mediada por células T antígeno-específicas (Oliveira y col., 1998).

La respuesta inmune celular es crucial para la defensa del huésped contra bacterias intracelulares como *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Brucella abortus*. Ha significado un paradigma el explicar como la bacteria induce la respuesta inmune celular en el huésped (Cheers, 1997). Existen pocos estudios relacionados con la respuesta inmune celular en ovinos y ratones inducida por *Brucella ovis* (Murillo y col., 2001).

B. ovis no es tan virulenta como otras especies del género, pero resiste a la acción de las células del sistema reticuloendotelial y, aunque las manifestaciones de la infección sean principalmente genitales, puede ser aislada del bazo y otros tejidos, en ocasiones sin lesión aparente (Jubb y

Kennedy, 1974). *B. ovis* parece poseer un tropismo por los órganos del aparato genital, útero en la hembra y epidídimo y glándulas genitales anexas, especialmente vesículas seminales, en el carnero. Otros órganos glandulares no están afectados, o lo están solamente de forma transitoria (Biberstein y col., 1964). En las ovejas, el desarrollo de la infección uterina cuando llega a presentarse es de curso lento (McGowan y Schultz, 1956).

Diagnóstico de *B. ovis*

a) Clínico:

La inspección y la palpación del contenido escrotal es utilizada para identificar a los carneros infértiles (Hughes y Claxton, 1968). Sin embargo, no tiene valor definitivo para el diagnóstico de la infección por *B. ovis* debido a que existen animales infectados que no presentan manifestaciones clínicas (Hughes y Claxton, 1968; McGowan, 1979; Murray, 1969; Watt, 1972; Webb y col., 1980), ya que una epididimitis puede aparecer como resultado de un traumatismo, o de otras causas infecciosas.

A partir de carneros con lesiones testiculares y epididimales se han identificado o aislado: *Cisticercus tenuicollis* (Shorteridge, 1962), *Histophilus ovis* (Claxton y Everet, 1966), *Actinobacillus seminis* (Baynes y Simmons, 1960 y 1968; Bruere y col., 1977; Hardefelt, 1977; Livingston y Hardy, 1964; Simmons y col., 1966; Van Tonder, 1973; Worthington y Bosman, 1968), *Actinobacillus lignieresii* (Hughes y Claxton, 1968), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (DeLong y col., 1979), *Pasteurella* spp. (Edkall y col., 1968; Jamieson y Soltys, 1947; Jansen, 1980a; Zamora y col., 1971), *Bacteroides* (Edkall y cole, 1968), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (DeLong y col.,

1979; Zamora y col., 1977), *Yersinia pseudotuberculosis* (Zamora y col., 1977), *B. abortus* y *B. melitensis* (Edkall y col., 1968; Jubb y Kennedy, 1974; Kulshreshtha y Kalra, 1978) *Corynebacterium pyogenes* (DeLong y col., 1979; Zamora y col., 1977), *Chlamydia* (Euxter y col., 1970; Rodolakis y Bernardt, 1977; Storz y col., 1976), *Escherichia coli* (Burgess y McDonald, 1981), *Staphylococcus spp.* (DeLong y col., 1979; Jansen, 1980a; Zamora y col., 1971 y 1977), *Streptococcus spp.* (Bogdan, 1960) y *Pseudomonas spp.* (Zamora y col., 1971). La gran variedad de microorganismos que pueden estar involucrados, hace necesario el recurrir a diferentes pruebas bacteriológicas y serológicas para establecer un diagnóstico diferencial preciso.

b) Serológico

El diagnóstico serológico se basa en la demostración de anticuerpos frente a antígenos de *B. ovis*. Para ello, se han aplicado una gran variedad de pruebas serológicas, bien con células completas o con extractos antigénicos, como son: aglutinación en tubo (Buddle, 1956; Diaz y col., 1967), hemaglutinación indirecta (Diaz y col., 1967; RIS, 1964), inhibición de la hemaglutinación (Verstreat y col., 1982), inmunofluorescencia indirecta (Cox y col., 1977), doble difusión en gel (Cox y col., 1977; Diaz y Bosseray, 1973; Jones y col., 1975; Myers y Siniuk, 1970; Myers, 1973; Núñez y col., 1998), contraimmunolectroforesis (Myers y Varela-Díaz, 1979), fijación del complemento (Biberstein y McGowan, 1958; Clapp, 1955; Cox y col., 1977; Jones y col., 1975; McDiarmid, 1978; O'Hara y Weddel, 1979; Ris, 1974; Sanchis y Giaufret, 1976; Webb y col., 1980; Weddel, 1974; Suarez y col., 1974) y ELISA ("Enzyme-linked immunosorbent assay") (Afzal y col., 1984;

Marín y col., 1989; Chin, 1983; Dolley y col., 1982; Rahaley y col., 1981; Riezu y col., 1986; Ris y col., 1984; Spencer y Burgess, 1984; Walker y col., 1985; Worthington y col., 1984 y 1985).

Las pruebas serológicas actuales para la determinación de anticuerpos de *B. ovis* son la prueba de inmunodifusión doble en gel (IDG), la prueba de fijación de complemento (FC) y varios tipos de pruebas inmunoenzimáticas indirectas (IELISA) (Salas y col., 2001).

Myers y Siniuk (1970) fueron los primeros que aplicaron el IDG al diagnóstico de la infección por *B. ovis* utilizando como antígeno un extracto salino tipo HS. Estos autores encontraron que los sueros de los animales infectados producían una línea de precipitación característica, cuya presencia o ausencia se correlacionaba con los resultados de la FC. Los márgenes de sensibilidad de la IDG van de 54.2 a 100%, esta variación depende de cómo se prepara el antígeno y el agar (Worthington y col., 1984; Worthington y col., 1985; Marin y col., 1989; Robles, 1998; Cerri y col., 2000). Sin embargo, la especificidad permanece en 100% no importando el método de preparación del antígeno o del agar. Las desventajas de la IDG incluyen la baja capacidad de correr muchas muestras, la duración de la prueba y su trabajo intenso en la realización, hacen que esta prueba sea difícil de emplear en programas de erradicación, inspección y brotes de la enfermedad (Salas y col., 2001).

La prueba de FC tiene una buena sensibilidad y especificidad (Cuadro 3); sin embargo, las desventajas incluyen, resultados anticomplementarios (Searson, 1982; Marin y col., 1989), sueros hemolisados (Worthington y col., 1984; Marin y col., 1989), inactivación del suero (Marin y col., 1989), falsos positivos (Webb y col., 1980; West y Bruere, 1979; Worthington y col., 1984;

Searson, 1982; Lee y col., 1985) y falsos negativos (Afzal y col., 1984; Cox y col., 1977; Hardefeldt, 1977; Hugues y Claxton, 1968; Rahaley y col., 1983; Spencer y Burgess, 1984; Webb y col., 1980; Worthington y col., 1984 y 1985; Burgess y Norris, 1982; Searson, 1982; Lee y col., 1985). Más del 25% de los falsos negativos de la FC dependen posiblemente del método empleado (Searson, 1982).

Cuadro 3. Diferentes especificidades y sensibilidades en la prueba de FC reportados para *B. ovis*.

Especificidad (%)	Sensibilidad (%)	Referencias
100 (n = 44) ^b	98.68 (n = 75) ^a	Cerri et al., 2000
96.0 (n=175) ^b	97.5 (n = 79) ^c	Cho and Niito, 1987
100 (n = 83) ^b	92.7 (n = 83) ^c	Marin et al., 1989
99.69 ± 0.42 (n =675) ^b	88.89 ± 11.85 (n = 28) ^c	Vigliocco et al., 1997

Cameros infectados con *B. ovis*^a; Cameros libres de Brucella^b; Cameros con aislamiento positivo de *B. ovis*^c.

La prueba de ELISA también se ha utilizado sobre placas de poliestireno y con conjugados anti-IgG ovina con peroxidasa (Afzal y col., 1984; Marín y col. 1989; Rahaley y col., 1983; Riezu-Boj y col., 1986; Ris y col., 1984; Spencer y Burgess, 1984; Walker y col., 1985; Worthington y col., 1984 y 1985) o fosfatasa alcalina-proteína A (Chin, 1983). Como antígenos, se han empleado suspensiones celulares completas, extractos tipo HS, o extractos obtenidos con detergentes a partir de envolturas celulares. La generalidad de los autores coinciden en señalar la alta sensibilidad de la técnica. Sin embargo, en un estudio comparativo realizado con un antígeno tipo HS en las mismas pruebas, el ELISA no fue claramente superior al IDG o a la FC (Marín y col. 1989). Por otra parte, se ha encontrado que los sueros de los animales negativos dan una reacción inespecífica fuerte con el HS en el ELISA y que, con este mismo antígeno, los sueros de los animales infectados por *B. melitensis* muestran una

perceptible reacción cruzada (Riezu-Boj y col., 1986), además de observarse una reacción cruzada con las Omp de otros microorganismos (Gall y col., 2003).

En el caso del ELISA indirecto, es una prueba cuyo desarrollo y lectura se logra en el mismo día de iniciada, no es difícil y no presenta problemas con sueros hemolizados y resulta menos costosa en comparación con IDG y FC. Así también, la IELISA puede ser semiautomatizada o automatizada con la finalidad de tener resultados expeditos. Varios ELISAs han sido desarrollados y muestran buena especificidad y sensibilidad, como se muestra en el cuadro 4.

Cuadro 4 . Comparación de la especificidad y la sensibilidad en la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos de *B. ovis*.

Especificidad (%)	Sensibilidad (%)	Referencias
100 (n = 44) ^b	100 (n = 75) ^a	Cerri y col., 2000
99.4 (n = 175) ^b	100 (n = 79) ^c	Cho y Niito, 1987
84 (n = 39) ^b	97 (n = 33) ^d	Nuñez-Torres y col., 1997
100 (n = 83) ^b	97.6 (n = 83) ^c	Mariny col., 1989
100 (n = 675) ^b	96.43 (n = 28) ^c	Viglioccoy col., 1997
99.6 (n = 263)	96.3 (n = 206)	Gall y col., 2003.

Cameros infectados experimentalmente con *B. ovis*^a; Cameros libres de *B. ovis*^b; Cameros con aislamiento positivo de *B. ovis*^c; de Animales infectados confirmados bacteriológicamente^d.

c) Molecular.

Reciente se han desarrollado técnicas de biología molecular como herramientas de diagnóstico de la brucelosis, tales como la hibridación con sondas, el análisis del Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Ficht y col., 1996; Herman y col., 1992; Hussein, 1993; Leal-Klevezas y col., 1995; O'hara y col., 1985; Manterola y col., 2003).

INMUNOGENOS CONTRA *Brucella ovis*

En general, y en particular cuando por su alta incidencia la enfermedad no pueda ser erradicada por diagnóstico y sacrificio, habrá que realizar campañas de vacunación.

Los inmunógenos más comúnmente utilizados contra la infección por *B. ovis* han sido las bacterinas (inoculadas solas o asociadas a la cepa 19 viva de *B. abortus*) y la vacuna Rev 1 de *B. melitensis*. Las bacterinas de *B. ovis* con adyuvante oleoso tienen una eficacia limitada y, además, presentan inconvenientes importantes, como el alto costo de la revacunación anual y una respuesta serológica residual muy duradera que interfiere con la interpretación de las pruebas serológicas (Biberstein y col., 1962; Buddle y col., 1963; Claxton, 1968; Swift y Maki, 1968; Haughey y Hugues 1969). La inoculación simultánea de la cepa 19 viva de *B. abortus* y las bacterinas de *B. ovis* incrementan la protección conferida por las bacterinas solas (McGowan y Harrold, 1979). Sin embargo, la cepa 19 puede colonizar los órganos reproductivos del macho causando epididimitis y ser excretada en el semen (Buddle, 1962) y también puede ser responsable de cojeras debidas a epifisitis (West y col., 1978).

La vacuna más eficaz es la cepa *B. melitensis* Rev 1, una revertante en fase lisa de un mutante estreptomycin-dependiente (Elberg y Faunce, 1957). Por ser atenuada para la oveja (no para el hombre), ha sido empleada para la vacunación contra *B. melitensis* y *B. ovis* en ovino. Si se examinan bacteriológicamente los órganos genitales y extragenitales de carneros vacunados y sometidos a infección experimental conjuntival, el nivel de

protección se aproxima al 80 % para la dosis estándar de vacuna (Fensterbank y col., 1982). La revacunación no mejora el nivel de protección (Gradwell y Van Zyll, 1975), y presenta inconvenientes prácticos e induce una respuesta serológica duradera frente a antígenos lisos, por lo que no es recomendable (Blasco y col., 1987). Aunque se ha descrito que la vacunación de carneros adultos no da buenos resultados (Gradwell y Van Zyll, 1975), otros investigadores han demostrado que la vacunación de carneros adultos con Rev 1 confiere un significativo nivel de protección (Marín y col., 1990).

La vacuna Rev 1 estimula la síntesis de anticuerpos contra los antígenos utilizados en el diagnóstico de la infección por brucelas en fase S y, en mucho menor grado, con las pruebas de *B. ovis* empleadas habitualmente (FC y IDG con HS). Si se vacuna a los 3-4 meses de edad, en la mayoría de los animales la reacción no persiste más de 6 meses (García-Carrillo, 1981; Gradwell y Van Zyll, 1975), sin embargo, en algunos carneros pueden persistir títulos en FC durante más de un año (Fensterbank y col., 1982). Esta interferencia de la respuesta post-vacunal se minimiza si se emplea la vía conjuntival (Marín y col., 1990), ya que la mayoría de los animales vacunados se hacen seronegativos a los 4-6 meses tras la vacunación.

La protección conferida por diversas vacunas (*Brucella melitensis* Rev.1, *B. abortus* S19 y *B. abortus* RB51) contra la epididimitis ovina no ha resultado exitosa (Blasco, 1997; Jiménez de Bagües y col., 1995), de allí que exista gran preocupación por los investigadores en obtener un inmunógeno que funcione en campañas de control y erradicación. El desarrollo de nuevas vacunas que no posean los inconvenientes del empleo de las vacunas vivas (por ejemplo: la interferencia que se causa en el diagnóstico serológico debido al empleo de

vacunas con cepas lisas, y la permanencia residual de la virulencia), ha llevado a diversas investigaciones. Los nuevos inmunógenos se han basado en la utilización de componentes de fracciones subcelulares, además de la utilización de diversos adyuvantes (Murillo y col., 2002).

Estudios previos han demostrado la protección conferida por el antígeno HS de *Brucella ovis* (Riezu-Boj y col., 1986; Gamazo y col., 1989; Riezu-Boj y col., 1990) en el modelo murino, ante el desafío de *B. ovis*. Murillo y col., (2001 y 2002) reportaron que el antígeno HS encapsulado en micropartículas de poli- ϵ -caprolactona, activa una respuesta de citocinas responsables de la inmunidad celular, importante en los microorganismos intracelulares, además señalan la importancia del adyuvante en el desarrollo de una respuesta celular o humoral. Estudios previos realizados por nuestro grupo (Salas y col., 2003), demostraron que empleando diferentes fracciones subcelulares de *B. ovis*: proteínas de membrana externa (Omp), proteínas de membrana interna (Imp) y proteínas de citosol (Cit), las que mejor respuesta inmune celular produjeron *in vitro* fueron las Omp.

Justificación

Brucella ovis es el agente causal de la epididimitis contagiosa del carnero, una enfermedad infecciosa de distribución mundial que causa un decremento en la fertilidad y finalmente esterilidad del carnero con severas pérdidas económicas. El empleo de inmunógenos contra *B. ovis* y el desarrollo de nuevas vacunas, ha tomado gran relevancia en cuanto a las campañas de erradicación y control de la enfermedad. El empleo de diversos antígenos de entre los cuales se encuentran las fracciones subcelulares junto con la combinación de adyuvantes adecuados, se pretende encontrar inmunógenos que logren una adecuada protección del ganado ovino, sin que existan los inconvenientes de las cepas lisas de *Brucella*, empleadas en el pasado como inmunógenos.

HIPOTESIS

Alguna de las fracciones subcelulares de *Brucella ovis* es adecuada para emplearse como inmunógeno.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la respuesta inmune celular de fracciones subcelulares de *B. ovis* en el modelo murino y determinar su posible uso como inmunógeno.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtención de fracciones subcelulares de *Brucella ovis* mediante el método de Sarcosyl determinando su perfil electroforético en PAGE-SDS y el reconocimiento de aquellas que son inmunogénicas mediante la técnica de Western Blot.
2. Determinar *in vitro* la fracción subcelular de *B. ovis* que produzca una mejor respuesta inmune celular mediante la determinación de IL-2 e IFN- γ .
3. Determinar *in vitro* la respuesta humoral mediante la determinación de IL-4
4. Determinar *in vivo* la DTH producida por las diferentes fracciones subcelulares de *B. ovis*.
5. Evaluar el nivel de protección conferido en ratones Balb/c inmunizados con la fracción subcelular Omp y desafiados con *B. ovis*.

2.- MATERIAL Y METODOS

Experimento I.- Determinación de la Inmunidad celular inducida por fracciones subcelulares de *Brucella ovis*.

2.1. Cepa: se empleó *Brucella ovis* REO198, la cual se mantuvo y desarrolló para la obtención de membranas en placas de agar *Brucella* (DIFCO) durante 48 horas a 37 C.

2.2. Fracciones subcelulares: La bacterias fueron cosechadas de las placas de agar *Brucella* en HEPES 10 mM para realizársele dos lavados. La pastilla finalmente fue suspendida en HEPES 10 mM conteniendo fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 0.1 M, p-hidroxi.mercuribenzoato (PHMB) 0.1 M y EDTA 2mM. El rompimiento celular se llevó acabo mediante sonicación con 6 ciclos de un minuto por un minuto de descanso en el Vibra-cell (Sonios), los detritus celulares fueron removidos a baja centrifugación de 10,000 X g por 20 minutos, al sobrenadante se le centrifugó a 150,000 X g por 1 hora. El sobrenadante contenía las proteínas del Citosol (CP) y en la pastilla permanecieron las membranas totales, estas fueron suspendidas en HEPES 10mM con N-lauroilsarcosina de sodio (Sarkosyl; Sigma Chemical) al 1% y sometidas a agitación durante 30 minutos a 37 C, posteriormente se centrifugaron a 150, 000 X g por una hora. La pastilla contenía la membrana externa y el sobrenadante la membrana interna. (Filip y col., 1973; Morton, 1996).

A la membrana externa se le realizó el método de Wessel y Flugge, 1984, para la recuperación cuantitativa de proteínas diluidas en solución en presencia de detergentes y lípidos, el cual brevemente se describe: a 0.1 ml de

membrana externa y se le adicionó 0.4 ml de metanol, se agitó y centrifugó a 9,000 X g por 10 segundos para la colección total de la muestra, a ésta se le agregó 0.1 ml de cloroformo se agitó y centrifugó; para la separación de las fases se adicionó 0.3 ml de agua, se agitó y centrifugó un minuto a 9, 000 g; la fase superior se desechó. Se adicionó posteriormente 0.3 ml de metanol a la fase clorofórmica inferior y la interfase con las proteínas precipitadas, la muestra se agitó y centrifugó. Se removió el sobrenadante y la pastilla se secó bajo flujo de aire. La pastilla seca se guardó hasta su uso. Las proteínas de la membrana interna y citosol fueron precipitadas con etanol frío (1:4 v/v), se dejó en refrigeración toda la noche, se centrifugó a 10, 000 X g y el material sedimentado se secó bajo corriente de aire, la pastilla se guardó en congelación hasta su uso. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976).

2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida - dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) e Inmunotransferencia. Las fracciones subcelulares fueron separadas en PAGE-SDS al 10% (Laemmli, 1970) empleando el aparato MiniProtean II (Biorad, USA), los geles fueron teñidos con Azul brillante de Coomassie R-250. La masa molecular aparente de la proteínas fue determinada por comparación con la movilidad relativa de los marcadores de pesos moleculares estándares (Weber y Osborn, 1969) Para la inmunotransferencia, después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas según la técnica descrita por Towbin y col. (1979) a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μm (Gibco, USA) empleando el Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Biorad, USA). Para la identificación de las

proteínas inmunogénicas, se empleó un suero hiperinmune policlonal, producido en conejo con título de 1:20 por inmunodifusión con el antígeno HS de *Brucella ovis* y como anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo producida en cabra unida a peroxidasa 1:1000 (Sigma Chemical Co.).

2.4. Suero hiperinmune en conejo. Se emplearon conejos Nueva Zelanda de 2.0 Kg, se inocularon con células completas de *Brucella ovis* (1.5×10^8 UFC/ml), inicialmente con adyuvante completo de Freund y 20 días después con el incompleto, posteriormente se realizaron tres inoculaciones más vía Intramuscular sin adyuvante. Los títulos fueron medidos en inmunodifusión doble empleando como antígeno el HS de *Brucella ovis* (Cloackaert, 1997).

2.5. Protocolo de inmunización y sangrado.- se inmunizaron 6 ratones de la cepa Balb/c, machos de 4 a 5 semanas de edad por cada una de las tres fracciones subcelulares, inicialmente con adyuvante completo de Freund vía intramuscular y posteriormente dos inoculaciones intraperitoneales. Las concentraciones empleadas fueron estandarizadas a 20 μ g/mL para Omp, Imp y CP. Se sangraron los ratones de la vena de la cola y se determinó mediante DOT-ELISA la existencia de anticuerpos contra la fracción subcelular correspondiente.

2.6. Preparación del cultivo primario de células del bazo de ratón Balb/c.- la preparación de linfocitos se llevo a cabo de la siguiente manera: se disecaron los bazos de los ratones singénicos (de la cepa Balb/c) para la

obtención de las células presentadoras de antígeno (CPA), todo el procedimiento se realizó bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Los bazos se lavaron por lo menos 3 veces con solución balanceada de Hanks (HBSS), posteriormente se colocaron en una caja de Petri que contenía 5 ml de medio RPMI 1640 (GIBCO) con 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomina (GIBCO), y con un pedazo de tela de organza preparada, los bazos se envolvieron totalmente con la tela la cual sirvió como tamiz para retener los restos de tejido. Los bazos se maceraron cuidadosamente con el émbolo de una jeringa estéril con el fin de disgregarlos; la suspensión celular se colocó en un tubo cónico estéril de 15 ml y se le agregaron 5 ml de medio RPMI con antibióticos; se dejó 5 minutos en reposo para que sedimentara los restos de tejido, posteriormente se pasó a otro tubo cónico teniendo cuidado de no tomar el sedimento y escurriendo la suspensión de células por las paredes del tubo para no maltratarlas, se centrifugó 10 minutos a 400 X g a temperatura ambiente; se decantó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió con 1 ml de Cloruro de Amonio 0.17 M (NH_4Cl) por cada bazo, durante 5 minutos a 4 C para lisar los eritrocitos. Se centrifugó nuevamente y el botón celular se resuspendió en medio RPMI con antibióticos y se hicieron 2 lavados más, después del último lavado el botón se resuspendió en medio RPMI con suero fetal de bovino (SFB) al 20% (GIBCO), L-glutamina 200 mM (GIBCO) y aminoácidos no esenciales 0.1 mM (GIBCO). Aproximadamente se colocaron 6.5×10^6 linfocitos de los ratones inoculados con Omp, Imp y CP.

2.7. Inoculación del cultivo primario de células del bazo de ratón

Balb/c: cada pozo de la placa de cultivo celular fue inoculado con 10 μ l de la fracción subcelular correspondiente y la placa se incubó a 37 C con 5% CO₂. Un control positivo fue incubado con concanavalina A. Los sobrenadantes se colectaron a las 24, 48, 72 y 96 horas post-inoculación y fueron congelados hasta su uso.

2.8. Medición de Citocinas (IL-2, IFN- γ e IL-4): para la medición de citocinas se emplearon los estuches comerciales (DUOSET Mouse IFN- γ , DUOSET Mouse IL-2 y DUOSET Mouse IL-4) de ELISA Development System (R&D System), y a continuación se describe brevemente la técnica:

a) Preparación de la placa.- Se depositaron 100 μ l/ pozo del anticuerpo de captura en una microplaca de 96 pozos. Posteriormente se sellaron las microplacas e incubaron toda la noche a temperatura ambiente. Se aspiró y lavó con amortiguador de lavado (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, filtrado en 0.2 μ m) llenando cada pozo con 400 μ l y se hizo una perfecta remoción del amortiguador. Se bloqueó la placa adicionando 300 μ l de amortiguador de bloqueo por pozo y se incubó a temperatura ambiente una hora. Se aspiró y lavó.

b) Procedimiento: se depositaron 100 μ l/ pozo de la muestra o del estándar en una microplaca de 96 pozos, se selló e incubó 2 horas a temperatura ambiente. Se preparó el anticuerpo detector. La microplaca fue aspirada y lavada con amortiguador de lavado llenando cada pozo con 400 μ l y se hizo una perfecta remoción del amortiguador. Posteriormente, se adicionaron 100 μ l por pozo del anticuerpo detector, se cubrió e incubó 2 horas a temperatura ambiente, se aspiró y lavó. Finalmente se adicionaron 100 μ l de Streptoavidina-HRP (horse

radish peroxidase) a cada pozo, se cubrió e incubó 20 minutos a temperatura ambiente, tratando de evitar el contacto con la luz directa, se aspiró y lavó. Se reveló adicionando 100 μ l de solución sustrato (H_2O_2 + tetrametilbencidina) a cada pozo, se incubó 20 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 50 μ l de solución de paro (H_2SO_4 2N) por pozo, se mezcló bien y se determinó la densidad óptica a 420 nm y a 540 nm.

Las concentraciones empleadas para el anticuerpo de captura, anticuerpo detector y el estándar de citocinas, fueron de 2000, 300 y 1 ng/ml para IL-2; 4000, 400 y 2 ng/ml para IFN- γ y 720 μ g/ml, 36 μ g/ml y 1 ng/ml; para IL-4. En todos los casos se realizó una curva patrón de cada estándar de citosina para después extrapolar los resultados.

2.9. Hipersensibilidad tardía (DTH).- se formaron tres grupos con ratones Balb/c previamente inmunizados con las distintas fracciones subcelulares. Se inoculó 50 μ l en el cojinete plantar vía subcutánea con cada fracción subcelular de *Brucella ovis*, se calculó el aumento porcentual de la induración a las 24 y 48 horas en comparación con el grosor de la piel al momento de inocular 50 μ l de PBS en el cojinete plantar del ratón testigo (Fotografía 1), todas las mediciones fueron realizadas con un vernier (Chatelain et al., 1992).



Foto 1.- Determinación del grado de induración en el cojinete plantar de ratones Balb/c. La imagen muestra el grado de induración producido al inocular la fracción de Omp en el cojinete plantar, dicho grado de induración fue producido a las 48 horas y se midió empleando un vernier.

Experimento II.- Protección conferida por Omp, Vesículas y una bacterina de *Brucella ovis* en el modelo murino.

2.10. Inmunógenos: Los inmunógenos empleados se obtuvieron de la siguiente forma:

a) Membrana externa de *B. ovis* (Omp): la bacteria fue cultivada en agar *Brucella* durante 48 horas a 37 C, se cosechó con solución salina fisiológica (SSF), y la biomasa se centrifugó a 10,000 x g por 15 min, realizando dos lavados con solución de HEPES. La biomasa fue resuspendida en HEPES 10 mM + PMSF 0.1 M + EDTA 2mM, para sonicarse en 6 pulsos de 60 segundos por 60 segundos de descanso. Se centrifugó a 10,000 X g por 15 min a 4 C. El sobrenadante se ultracentrifugó a 150,000 g x 1 hora a 4 C, de donde se desechó el sobrenadante. La pastilla que contenía las membranas totales fue tratada con la solución de HEPES 10 mM + Sarcosyl 1 %, agitada por 30 min a 37 C y centrifugada a 150, 000 X g por 1 hora a 4 C. De este último tratamiento se obtuvieron dos fracciones la soluble y la insoluble en Sarcosyl, en esta última se localizan las Omp (Filip y col., 1973; Morton y col., 1996). A las Omp se les realizó el método de recuperación cuantitativa de proteínas diluidas en solución en presencia de detergentes y lípidos (Wessel y Flugge, 1984). La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976).

b) Vesículas de *B. ovis*: después de crecer la bacteria en agar *Brucella* por 48 horas a 37 C, se cosechó con SSF, se centrifugó a 10, 000 X g por 15 min a 4 C y el sobrenadante se filtró en 0.22 µm y finalmente el filtrado se ultracentrifugó a 150, 000 X g durante 1 hora, la pastilla fue resuspendida en agua deionizada y se congeló hasta su utilización. (Gamazo y col., 1989). La

presencia de vesículas fue confirmada mediante microscopia electrónica de transmisión.

c) Bacterina de *B. ovis*: esta se obtuvo a partir de un crecimiento en agar *Brucella* por 48 horas a 37 C y posterior inactivación con fenol al 5% en amortiguador de fosfatos 20 mM (pH 7.2) por 2 días, se lavó la biomasa tres veces con agua destilada. La inactivación de la cepa fue corroborada mediante siembra en agar *Brucella*, procediendo a conservar por liofilización.

2.11. Activación de la cepa de desafío en ratones: para el desafío, la cepa de *Brucella ovis* fue reactivada de la siguiente manera: Se emplearon cinco ratones Balb/c, inoculándose tres veces en lapsos de siete días por vía intraperitoneal, los ratones fueron sacrificados al mes de la primera inoculación. A partir de los bazos extraídos se recuperó la cepa, ésta fue identificada como *B. ovis* y así se empleó para el desafío.

2.13. Evaluación de la protección *in vivo* de los inmunógenos. Se tomaron ocho grupos de 12 ratones hembras Balb/c (5 a 7 semanas de edad) cada uno. Los grupos se conformaron así: 1) Omp + Adyuvante completo de Freund (ACF), 2) Omp + Adyuvante incompleto de Freund (AIF), 3) Vesículas + ACF, 4) Vesículas + AIF, 5) Bacterina + ACF, 6) Bacterina + AIF, y como controles los grupos 7) ACF + PBS y 8) AIF + PBS.

Los ratones fueron inoculados subcutáneamente con los respectivos inmunógenos ya mencionados y se les aplicó un refuerzo a los 10 días, en el día 20 postinmunización se procedió al desafío, este consistió en la aplicación por vía intravenosa de la cepa de *Brucella ovis* a una concentración de 3×10^5 /ml (Bowden y col., 1995; Bowden y col., 2000).

2.14. Determinación de la unidades formadores de colonia (UFC/ml):

Se realizó el sacrificio de tres ratones por grupo en los días 7, 14 y 21 posdesafío para la determinación de UFC/ ml presentes en el bazo (Jiménez de Bagués y col., 1993). El procedimiento fue el siguiente, una vez sacrificados los ratones, los bazos fueron extraídos y macerados en SSF estéril, posteriormente a partir de un pool se realizaron dos diluciones decimales y se sembraron en placas de agar *Brucella*, dejando incubar por cinco días a 37 C, para finalmente realizar el conteo de colonias (Bowden y col., 1995; Bowden y col., 2000).

2.15. Análisis estadístico: se realizó el análisis de ANOVA para determinar las diferencias entre los distintos inmunógenos.

3. RESULTADOS

Experimento I.- Determinación de la Inmunidad celular inducida por fracciones subcelulares de *Brucella ovis*.

3.1. Proteínas antigénicas de *B. ovis*.

Para conocer el perfil proteico de las fracciones subcelulares de *B. ovis*, se realizaron SDS-PAGE e inmunotransferencias. La figura 3 A muestra que el patrón de proteínas es diferente para cada una de las fracciones. La pureza de la fracción Omp fue verificada por la presencia de LPS (Figura 3B).

Existe una alta reactividad de las tres fracciones subcelulares cuando fueron probadas contra el antisuero anti- *B. ovis* de células completas (Figura 4), principalmente a bandas de 42 y 20 kDa, así como una doble de 38 kDa de peso molecular en las Omp. Las células completas mostraron un alto grado de reconocimiento antigénico (datos no mostrados). El citosol (CP) mostró un polipéptido de 28 kDa, el cual estuvo ausente en la fracción Imp. Mostrando esta última fracción un polipéptido enriquecido de 47 kDa.

3.2. Respuesta de citocinas producidas por las fracciones subcelulares de *B. ovis*.

Para evaluar la producción de citocinas por parte de las células T reactivas, las fracciones subcelulares fueron adicionadas al cultivo de linfocitos de ratón (Figura 5). La fracción de Omp (Figura 5 A) indujo una rápida y fuerte respuesta de IL-2 a las 24 h, disminuyendo drásticamente a las 48 h. Sin embargo, IFN- γ indujo una respuesta que se incrementó gradualmente después de las 72 h, y obtuvo su máximo de inducción a las 120 h. Se observó una

pobre respuesta de IL-4, la cual inicio a las 72 h y permaneció a bajos niveles durante todos los muestreos.

La fracción Imp (Figura 5B) muestra una adecuada respuesta en la inducción de la producción de IFN- γ , dicha respuesta se incrementó continuamente a partir de las 24 h. La respuesta producida por esta fracción para IL-2 inició a las 48 horas y permaneció al mismo nivel hasta las 120 h. Esta fracción no indujo respuesta de la IL-4.

La fracción CP (Figura 5C) provocó una respuesta inicial de IFN- γ a las 24 horas, la cual rápidamente decreció a las 48 horas y permaneció a bajos niveles durante todos los muestreos. Se obtuvo una débil inducción de IL-2, mostrando su mayor pico a las 96 h; sin embargo, esta respuesta en comparación con las otras fracciones resultó muy pobre. Así mismo, esta fracción no mostró inducción de IL-4.

3.3. Hipersensibilidad tardía (DTH).-

La reacción de DTH producida en el cojinete plantar del ratón por las diferentes fracciones fue como sigue: las Omp mostraron una alta induración (90%) posterior a las 48 h de inoculación; Imp y CP presentaron una induración de 29.7 y 18.6 % respectivamente en el mismo tiempo. No existió incremento del valor de induración

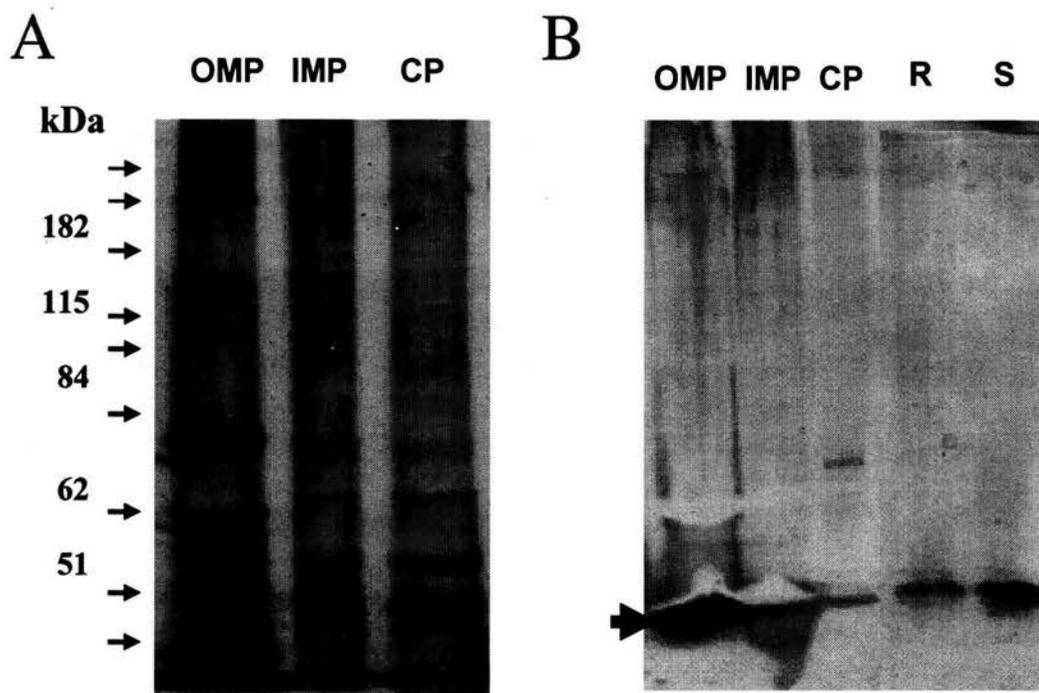


Figura 3.- SDS-PAGE al 15% y Tinción de plata para LPS de fracciones subcelulares de *B. ovis*. A) Perfil proteico de las fracciones subcelulares de *B. ovis*. teñidas con azul de Coomassie, B) La pureza de la fracción Omp fue verificada por la presencia de LPS (→) mediante la tinción de plata. Membrana externa (Omp), membrana interna (Imp) y citosol (CP). Las fracciones fueron separadas con sarcosyl. Las flechas indican los marcadores de peso molecular.

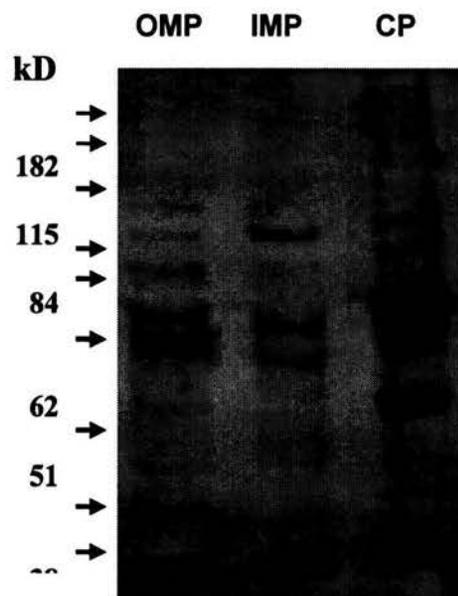


Figura 4. Inmunotransferencia de las fracciones subcelulares de *B. ovis*: membrana externa (OMP), membrana interna (Imp) y citosol (CP). Las proteínas de la figura 1A se transfirieron a papel de nitrocelulosa, los antígenos fueron detectados empleando suero de conejo anti-*B. ovis* 1:20 y la reacción se reveló empleando anti-IgG de conejo 1: 1000. Las flechas indican los marcadores de peso.

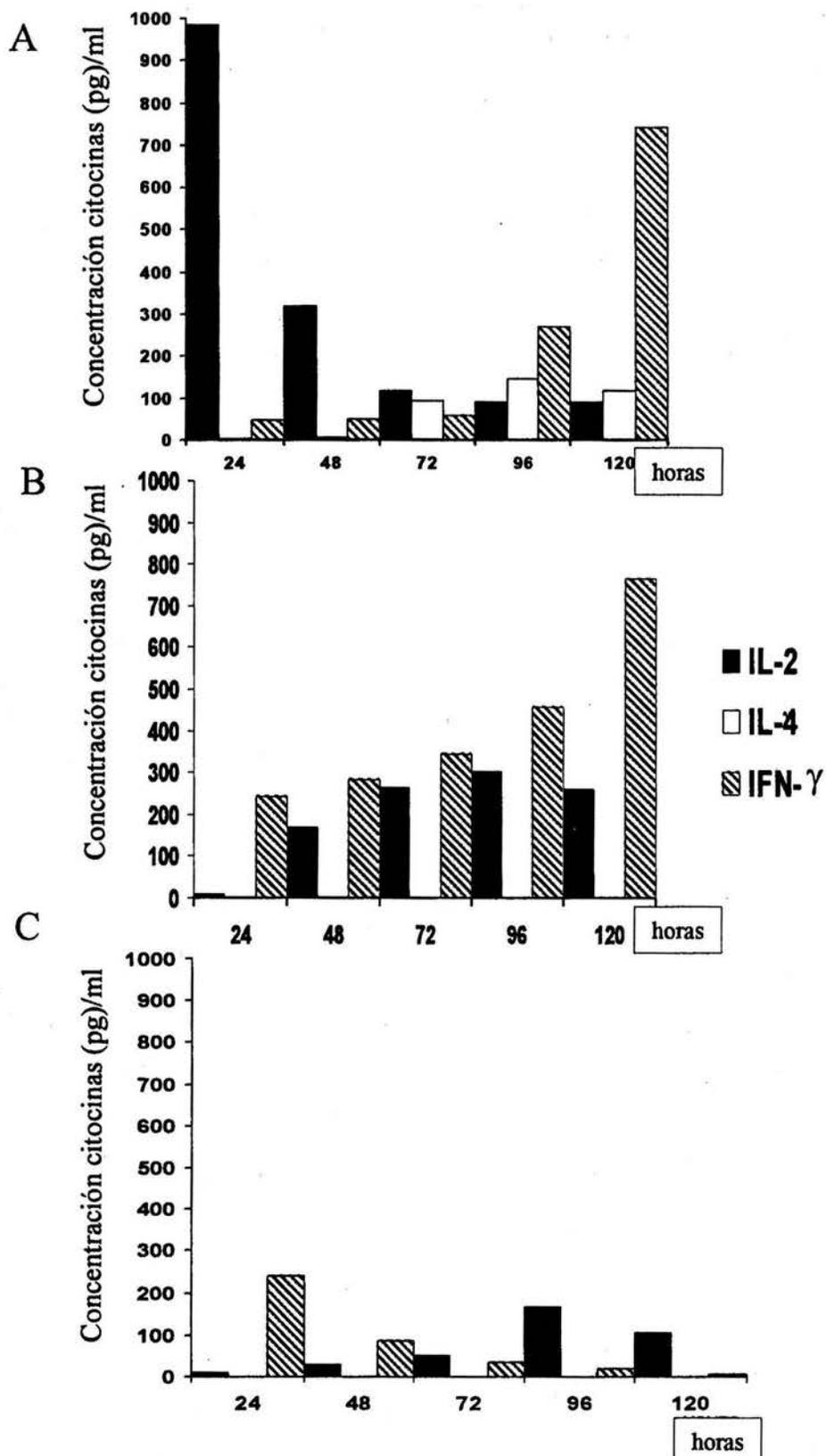


Figura 5. Inducción de IL-2, IFN- γ e IL-4 en células de ratón Balb/c estimuladas con fracciones subcelulares de *B. ovis*: A) Membrana externa (Omp), B) Membrana interna (Imp) y C) Citosol (CP). El sobrenadante de los cultivos fue tomado a diferentes tiempos y se probó en el ELISA-Duoset.

Experimento II.- Protección conferida por Omp, Vesículas y una bacterina de *Brucella ovis* en el modelo murino.

3.4. Evaluación en el modelo murino de la protección conferida por Omp, Vesículas y una bacterina de *Brucella ovis*.

Posteriormente al desafío con *B. ovis* se determinó la cantidad de UFC aisladas del bazo para establecer el comportamiento de los inmunógenos evaluados. En la figura 6 se muestran los resultados, todos los grupos fueron graficados descartando el efecto del adyuvante utilizado, con la finalidad de medir el efecto directo de cada inmunógeno. Las UFC determinadas en el día siete en los diferentes grupos, no muestran diferencias significativas entre ellos; sin embargo, para el día 14, resulta notoria la disminución de UFC del grupo de vesículas y bacterina (encontrándose entre ellos diferencias significativas) en comparación con Omp. En el día 21 los datos finales demuestran una diferencia significativa entre las vesículas y los demás grupos, presentándose un efecto similar entre la bacterina y las Omp.

En la figura 7, se muestra el efecto total conferido por cada uno de los adyuvantes (ACF, AIF) y su participación en el grado de protección conferida de acuerdo al inmunógeno empleado. El análisis estadístico mostró una diferencia significativa entre el uso de ACF o AIF, observándose una mejor respuesta cuando se empleó ACF en todos los casos. Si bien el ACF promueve *per se* una respuesta inmune inespecífica, el empleo del ACF + vesículas produjo la mejor protección comparada contra los otros inmunógenos, además este efecto también resultó aceptable incluso empleando AIF. Se encontró una

diferencia significativa entre la interacción de los adyuvantes y los distintos inmunógenos.

El efecto posdesafío mostrado por los adyuvantes (ACF, AIF) se observa en la Figura 8, este gráfico detalla el impacto producido por el tipo de adyuvante durante los días de muestreo (7, 14 y 21), en el ACF existió una diferencia significativa durante los tres días. Es posible observar que la disminución de UFC/ml adjudicada al efecto del adyuvante fue mayor conforme pasaron los días, atribuyéndose el descenso final en las UFC/ml al tipo de inmunógeno empleado.

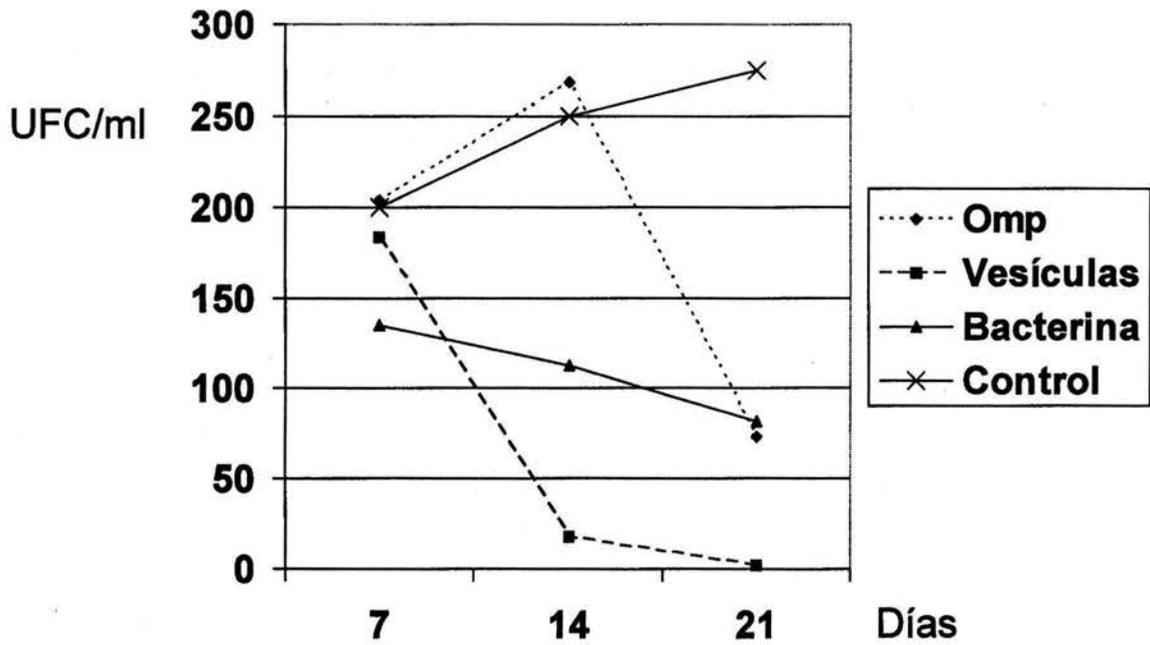


Figura 6. Comportamiento posdesafío en *Brucella ovis* de los distintos Inmunógenos evaluados en el modelo murino. Los tres inmunógenos empleados (Omp, vesículas y Bacterina) mostraron un comportamiento muy similar en el Día 7, presentándose una drástica caída en las Ufc/ml ocasionada por las vesículas en el día 21.

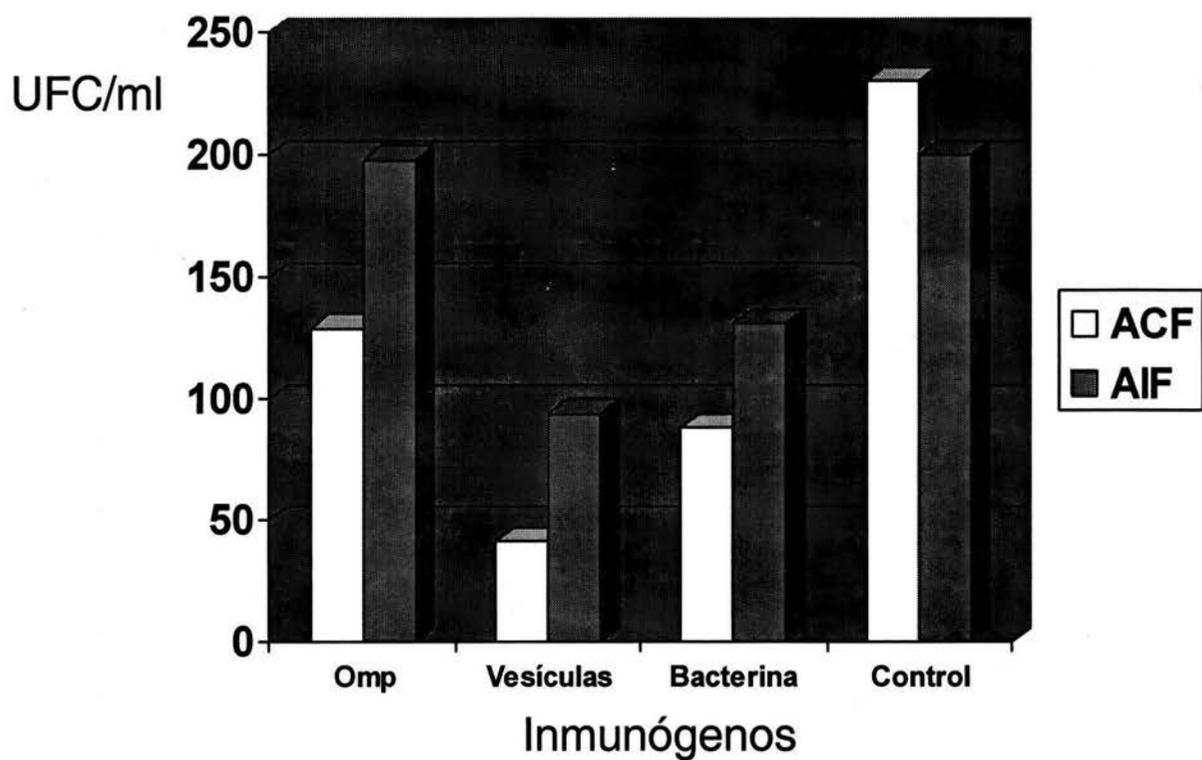


Figura 7. Efecto posdesafío de los distintos inmunógenos evaluados en el modelo murino, comparando los dos adyuvantes empleados.

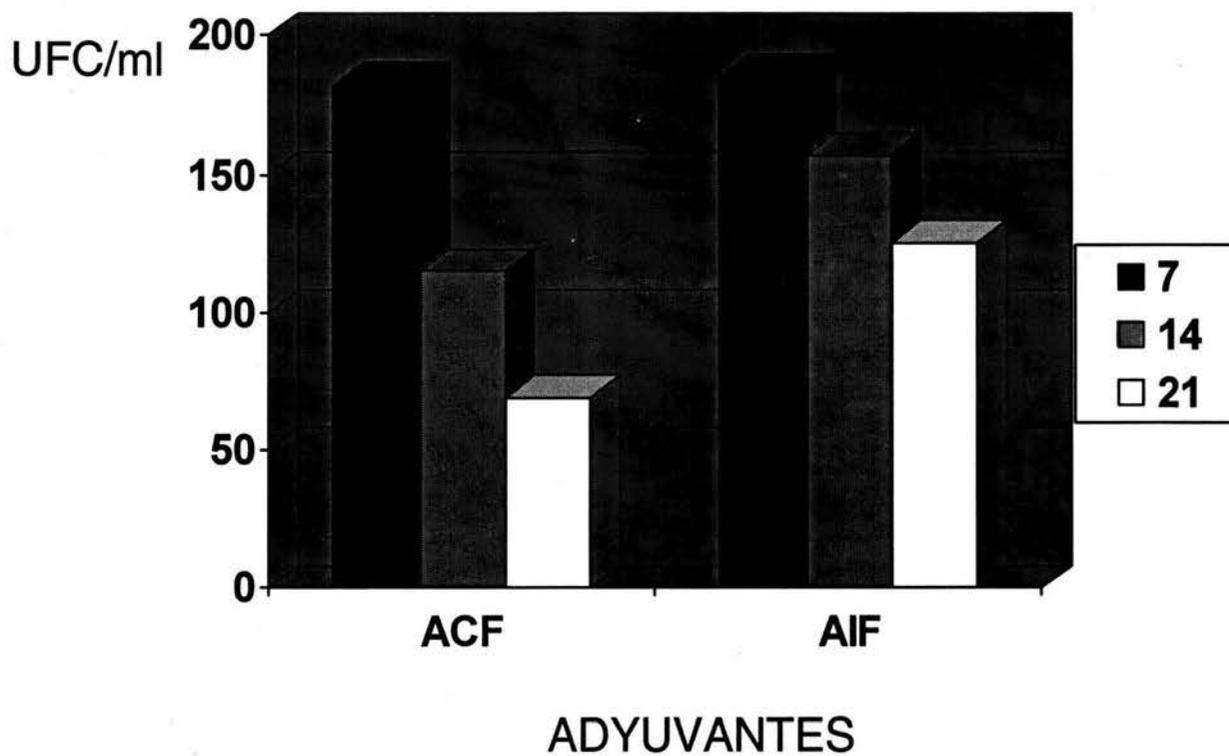


Figura 8. Efecto producido únicamente por el adyuvante y evaluado en tres diferentes días posdesafío con *Brucella ovis*.

4. DISCUSION

Las recientes investigaciones en *B. ovis* han tendido a encontrar el inmunógeno ideal, el cual produzca un alto nivel de protección sin producir efectos negativos. En el desarrollo de nuevas vacunas contra la brucelosis se busca evitar los inconvenientes de las vacunas vivas (por ejemplo: su baja virulencia en el modelo ratón y la interferencia en el diagnóstico con pruebas serológicas causadas por las vacunas lisas empleadas en las campañas de erradicación) (Bowden y col.,2000).

Uno de los acercamientos para diseñar y preparar una nueva vacuna que resulte segura y eficiente, se ha basado en el empleo de componentes subcelulares utilizando adyuvantes adecuados. Sin embargo, no existe información concerniente a cuáles antígenos deberían emplearse para desarrollar una vacuna subcelular contra la brucelosis (Murillo y col., 2001). Los antígenos protectores contra esta enfermedad se han definido en el modelo de ratón y se han localizado en la membrana externa de otras especies de *Brucella* (Bowden y col., 1995).

Algunos componentes selectos de la superficie de las cepas R de *B. ovis* con adyuvantes adecuados proporcionan protección contra *B. ovis* en carneros (Blasco y col., 1993) y *B. abortus* lisas en becerros (Adams y col., 1998), independientemente del adyuvante empleado. Zhan y col (1995) demostraron que adyuvantes como el aluminio y el ACF incrementan la magnitud de la respuesta comparados con la inducción que produce el antígeno sin adyuvante, sin tener influencia en el tipo de respuesta inmune.

Los perfiles de proteínas de la fracción Omp de *B. ovis* obtenidas en este estudio fueron similares a lo informado en otros estudios (Filip y col., 1973;

Chin y Turner, 1990; Clockaert y col., 1992). En este trabajo se estudiaron los patrones de proteínas de las fracciones de Imp y CP de *B. ovis*, con la finalidad de conocer el contenido antigénico de cada fracción. Se demostró también que las tres fracciones subcelulares poseen diferentes capacidades para inducir una respuesta inmune celular.

Existen numerosos estudios de antígenos de *Brucella* que tienen o demuestran la capacidad de activar una respuesta de células T, los cuáles han sido empleados para encontrar un adecuado inmunógeno o desarrollar una prueba diagnóstica diferencial (Zhan y col., 1993 a). Las Omp han sido purificadas y caracterizadas de varias especies de *Brucella*; sin embargo, solo las Omp solubles de *Brucella abortus* fueron probadas para estimular una respuesta celular, esta fue determinada mediante blastogénesis (Baldwin et al., 1985), y en la actualidad se mide por la inducción de diversas citocinas (Fernández y Baldwin, 1995; Zhan y col., 1993 a; Zhan y col., 1993 b; Zhan y Cheers, 1995 a; Zhan y Cheers, 1995 b; Cheers, 1997).

Los cultivos de células de bazo de ratón inoculados con bacterias completas muertas o extractos de bacterias indujeron la producción exclusivamente de IL-2 (no de IFN- γ o IL-4), en contraste cuando se emplearon bacterias vivas, las cuales produjeron IL-2 e IFN- γ pero no IL-4 (Zhan y col., 1995).

Existe sólo un informe acerca de la inducción de la respuesta de citocinas por *B. ovis*. En dicho estudio el antígeno HS fue encapsulado dentro de micropartículas de poly- ϵ -caprolactona (HS-PEC) y se probó como vacuna contra *B. ovis* y *B. abortus* en el ratón. Las HS-PEC por vía de administración subcutánea pero no oral en ratones BALB/c, indujo altas cantidades de IFN- γ e

IL-2 pero bajas de IL-4, lo que sugirió una respuesta inmune combinada Th1/Th2. El empleo solo de HS o de micropartículas PEC vacías no produjeron ningún efecto protector (Murillo y col., 2001). En contraste, en esta investigación se emplearon diferentes fracciones subcelulares (Omp, Imp y CP) de *B. ovis* para inducir la respuesta de citocinas, además los tiempos de dicha evaluación fueron más largos (24 a 120 h). Los resultados aportan un mayor conocimiento con respecto a los efectos que se producen a lo largo del tiempo en la respuesta inmune celular contra *B. ovis*.

Se obtuvo una importante inducción de citocinas con la fracción Omp. También se obtuvo una alta respuesta de IL-2 fue obtenida a las 24 h, la cual disminuyó considerablemente después de las 48 h, mientras que la respuesta que se obtuvo de IFN- γ presentó un valor máximo a las 120 h. Este perfil se considera una respuesta clásica de linfocitos Th1, la cual está directamente involucrada en la resistencia celular adquirida y en la hipersensibilidad retardada (DTH) (Zhan y col., 1993b). Posteriormente, se encontró que las Omp produjeron una alta respuesta de DTH. La IL-4 sólo fue inducida por la fracción Omp, demostrándose una activación de los linfocitos Th 2, los cuales están involucrados en la respuesta inmune humoral. Quizás la respuesta sea debida a la presencia de residuos de LPS-R, considerando el hecho de que epítopes del LPS- R de *B. ovis* son muy accesibles al sistema inmune. Además, se han encontrado anticuerpos circulantes contra el LPS-R han sido encontrados durante la enfermedad, y juegan un papel en la inmunidad dependiente de anticuerpos (Bowden y col., 1995).

Con base en la capacidad de inducir la producción de citocinas y promover la respuesta DTH. Se considera que la fracción Omp de *B. ovis*,

podría funcionar como un adecuado inmunógeno, por lo que se decidió evaluarlo en el modelo de ratón.

Los experimentos que se han realizado empleando al huésped natural (ovinos) son los mas adecuados, pero requieren demasiado tiempo para realizarse y resultan muy costosos. Razón por la cual se ha establecido un modelo murino (BALB/c) para estudiar a *B. ovis*, el cual ayuda a superar los inconvenientes ya mencionados (Jiménez de Bagués y col., 1993; Jiménez de Bagués y col., 1994; Murillo y col., 2001; Murillo y col., 2002).

B. ovis es una especie rugosa natural, que carece del polisacárido O, el cual constituye el principal antígeno de las especies lisas de *Brucella*. El extracto HS de *B. ovis* REO198, está constituido por lipopolisacárido rugoso (LPS-R) y una abundante cantidad de Omp del grupo 3. El extracto HS de *B. ovis* ha demostrado ser protector contra el desafío de *B. ovis* en el ratón (Jiménez de Bagués y col., 1994) y en el carnero (Blasco y col., 1993). Sin embargo, el inconveniente ha sido la necesidad de revacunación para inducir una inmunidad fuerte y duradera (Murillo y col., 2002).

La búsqueda de distintas alternativas para la vacunación, justifica el empleo de diferentes tipos de antígenos, apoyándonos en trabajos previos del grupo (Salas y col., 2003), se determinó la efectividad de tres fracciones subcelulares de *B. ovis* (Omp, Imp y Cistosol) en cuanto a la activación de una respuesta Th1 con linfocitos previamente activados con las fracciones anteriormente citadas, de donde se concluyó que las Omp de *B. ovis* eran las que mejor activaban un perfil de citocinas de tipo Th1. En la brucelosis, una inmunidad protectora esta dada por anticuerpos opsonizantes y una respuesta Th1, la cual permite la destrucción del microorganismo intracelular facultativo

(Araya y Winter., 1990; Jiang y Baldwin., 1993; Zhan y Cheers, 1993; Jiménez de Bagúés y col., 1994).

En la fracción de Omp de *B. ovis* se pueden observar los tres grupos de proteínas (1, 2 y 3) que ampliamente se han mencionado en la literatura (Cloekaert, 1997). Empleando anticuerpos monoclonales, todas las Omp reportadas de *Brucella* (Cloekaert y col., 1990) han sido encontradas en el extracto HS (Bowden y col., 2000). Sin embargo, se menciona una mayor concentración del grupo 3 y de LPS-R, debido al método de obtención. En particular, dentro de las proteínas del grupo 3, la Omp 31 aparece como un antígeno inmunodominante en el curso de la infección por *B. ovis* en carneros y ha resultado ser un antígeno protector en el modelo murino desafiado con *B. ovis* (Cloekaert y col., 2002).

Las Omp de *B. ovis* que se emplearon en este trabajo tenían presencia de los tres grupos antigénicos, y demostraron en conjunto una adecuada estimulación de la respuesta inmune celular *in vitro*. Debido a los resultados obtenidos se decidió demostrar su poder protector ante el desafío por *B. ovis*, para lo cual se incluyeron otros dos inmunógenos: vesículas de *B. ovis* y bacterina de *B. ovis* con fines comparativos.

Las pruebas realizadas en el modelo murino demuestran que las Omp de *B. ovis* aún cuando tienen una buena actividad *in vitro*, no resultan tan eficientes *in vivo*. Las vesículas de *B. ovis* mostraron una protección más eficiente a los 21 días de la evaluación posdesafío en el modelo murino, esto resulta contrastante con lo reportado por Blasco y col. (1993), quienes emplearon vesículas y bacterina en carneros y no encontraron una protección satisfactoria. No existen otros reportes comparativos en cuanto al uso de

vesículas y bacterina de *B. ovis* en el modelo murino y carneros, por lo que se requerirá de posteriores investigaciones, que esclarezcan las diferencias encontradas.

Tanto las Omp como las vesículas contenían a la Omp 31, además de la presencia de LPS-R. Murillo y col., (2002), mencionan que el LPS-R potencializa la respuesta producida por el extracto HS, induciendo un mayor patrón de citocinas Th1. Además, considera que entre mayor dispersión tenga el LPS-R dentro del extracto HS, mejor será la respuesta. Por otra parte, se ha demostrado que el extracto HS carente de LPS-R conserva su actividad protectora en el ratón, lo que demuestra la contribución en la inmunidad protectora de las Omp (Jiménez de Bagûés y col., 1994). Ambos parámetros se cumplen en el caso de los inmunógenos que se emplearon, hecho que explica el grado de protección obtenida; quizá, la diferencia exista en cuanto al contenido de las vesículas de *B. ovis*, el cual no está bien esclarecido, como en el caso de otras bacterias gram negativas, por lo que se requirieron estudios posteriores.

Ha quedado bien establecido que el efecto inmunopotenciador de la respuesta inmune es dependiente del tipo de adyuvante utilizado. Los resultados obtenidos demuestran, que el efecto que produce la utilización de ACF y AIF, concuerda con lo que se conoce, de que su presencia incrementa la magnitud de la respuesta en comparación de cuando no se usan (Zhan y col., 1995). Este efecto se pudo observar en las evaluaciones del adyuvante postdesafío, siendo de mayor relevancia la desarrollada por ACF; sin embargo, dicho efecto va disminuyendo conforme el tiempo postdesafío avanza, para finalmente depender del efecto protector del inmunógeno empleado. Murillo y

col (2002) mencionan importantes diferencias en la protección adquirida en el modelo murino, dependientes del tipo de adyuvante, ruta de administración y cepa de desafío. En la actualidad el uso de micropartículas (Murillo y col., 2001; Murillo y col., 2002) que permitan una liberación controlada del antígeno ha tenido buenos resultados en el grado de protección conferida contra el desafío de *B. ovis* en el modelo murino, resta saber si se comportara igual en el hospedero natural.

Finalmente, y debido a los datos obtenidos en esta investigación consideramos importante la utilización de las vesículas de *B. ovis*, empleando un adyuvante que sea permitido dentro de las explotaciones ovinas, con la finalidad de conseguir un inmunógeno protector.

5. CONCLUSIONES

La fracción subcelular Omp de *Brucella ovis*, presentó la mejor inducción *in vitro* de la respuesta inmune celular, al estimular la producción de IL-2 a las 24 horas y posteriormente la de IFN- γ que duró 120 horas, perfil que se considera clásico en la activación de la respuesta celular.

En la prueba de inmunización de ratones Balb/c, las vesículas y las Omp de *Brucella ovis*, mostraron un adecuado nivel de protección ante el desafío de *B. ovis*, considerándose que ambas pudieran resultar adecuados inmunógenos.

Los inmunógenos seleccionados deberán probarse en el ganado ovino para demostrar su eficacia.

Se deberá estudiar el contenido de las vesículas de *B. ovis* para entender mejor el grado de protección que llegaron a conferir en el ratón.

Se requerirá de estudios posteriores que incluyan la utilización de adyuvantes permitidos en las explotaciones ovinas.

6. BIBLIOGRAFIA

Adams, G., Fitch, T., Allen, C., 1998. Derivation and evaluation of the rough rfbk brucellosis vaccine in cattle. In: III Foro Internacional de Brucelosis, Acapulco, México.

Araya IN., Winter AJ. 1990. Comparative protection of mice against virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* by passive transfer of immune T cells or serum. *Infect. Immun.* **58**: 254-256.

Alton, G.G., Jones, L.M. Pietz , D.E.1998. **Las técnicas de laboratorio en la brucelosis**. FAO/OMS. Serie monografías 55. Edición 1976. Ginebra Suiza.

Ackermann , M.R., Cheville, N.F., Deyoe, B.L., 1998. Bovine ileal dome lymphoepithelial cells: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. *Vet. Pathol.* **25**, 28-35.

Abu-Kwaik, Y., 2001. *Legionella* deploys unusual survival tactics and exit strategies. *Am. Soc. Microbiol. News.* **67**, 240-241.

Afzal , M ., Tengerdy , R.P., Squire , P.G. Ellis , R.P. 1984. Characterization of *Brucella ovis* lipopolysaccharide and its use for diagnosis of ram epididymitis by enzyme-linked immunosorbent assay *.J.Clin . Microbiol.* **20**:1159-1164.

Baldwin, C.L., Verstrate, D.R., Winter, A.J., 1985. Immune response of cattle to *Brucella abortus* outer membrane proteins measured by lymphocyte blastogenesis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **9**, 383-396.

Baynes , I.D. Simmons , G.C. 1960 . Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis* . *Aust. Vet. J.* **44**: 339-343.

Biberstein, E.L., Mc Gowan , B., Olander , H. Kennedy , P , C. 1964. Epididymitis in rams. Studies on pathogenesis. **Cornell. Vet. 54**: 27-41.

Biberstein , E.L. Mc Gowan . B. 1958. Epididymitis in rams. Studies on laboratory diagnosis. **Cornell Vet. 48**: 31-44

Biberstein, E.L., McGowan, B., Robinson , E.A. Harrold, D.R., 1962. Epididymitis in rams. Studies on immunity. **Cornell Vet. 52**: 214-227.

Blasco , J.M., Marin , C.M ., Barberan , M., Moriyon , I. Díaz R., 1987. Immunization with *Brucella melitensis* Rev 1 against *Brucella ovis* infection of rams. **Vet. Microbiol. 14**: 381-392.

Blasco, M.J.M. 1990. **Epidemiología, patogenia y cuadro clínico. Brucelosis ovina. Tratado de patología y producción ovina.** Luzáns ediciones. España. 8: 25-32.

Blasco , J.M., Gamazo , C., Winter , A.J., Jiménez de Bagüés , M.P., Marín , C., Barberán ,M., Moriyón , I., Alonso Urmeneta , B., Díaz,R., 1993. Evaluation of whole cell and subcellular vaccines against *Brucella ovis* in rams. **Vet. Immunol. Immunopathol. 37**, 257-270.

Blasco, JM. (1997). A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. **Prev. Vet. Med. 31**, 275-283.

Bogdan , J. 1960. A contribution to the etiopathogenesis of epididymitis tail nodes in rams. **Folia Vet. 4** : 209.

Bowden, R.A., Cloeckert, A., Zygmum, S.M., Bernad, S., Dubray, G.,1995. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. **Infect. Immun. 63**, 3945-3952.

Bowden , R.A ., Cloeckert , A., Zygmunt , M.S., Bernard , S., Dubray , G., 1995a. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitope in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry . **Infect . Immun.** **63** , 3945-3952.

Bowden , R.A., Cloeckert , A., Zygmunt , M.S., Dubray , G., 1998. Evaluation of immunogenicity and protective activity in BALB/ C mice of the 25 Kda major outer – membrane protein of *Brucella melitensis* (omp 25) expressed in *Escherichia coli*. **J.Med . Microbiol.** **47**, 39-48.

Bowden , R.A., Estein, S.M ., Zygmunt , M.S., Dubray , G ., Cloeckert , A., 2000. Identification of protective outer membrane antigens of *Brucella ovis* by passive immunisation of mice with monoclonal antibodies. **Microbes Infect . 2** , 481-488.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein –dye binding. **Anal. Biochemistry . 72:** 248-254.

Bruere , A.N., West , D.M., Mc Lachlam , N.I., Edwards , J.D., Chapman, H.N. 1977. Genital infection of ram hoggets associated with a gram-negative pleomorphic organism. **N.Z. Vet.J.** **25:** 191-193.

Buddle, M.B. Boyes, B.W.1953. A *Brucella* mutant causing genital disease of sheep in New Zealand and Australia. **Aust. Vet.J.** **29:** 245-253.

Buddle, M.B. 1955. Observations on the transmission of *Brucella* infections in sheep. **New. Zel.Vet. J.** **3:** 10-14.

Buddle, M.B. 1956. Studies on *Brucella ovis* as cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. **J. Hug.** **54:** 351-366.

Buddle, M.B., Calverley, F.K. Boyes, B.W., 1963. *Brucella ovis* vaccination of rams. **N.Z. Vet. J.** **11:** 90-93.

Buddle , M.B. 1962. Production of immunity in rams against *Brucella ovis* infection , **N.Z. Vet. J. 10**: 111-115.

Bundle, D.R., Cherwonogroszky, J.W., Caroff, M. Perry, M.B.1987. The lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. **Ann Inst. Pasteur. Microbiol. 138**: 92-98.

Burgess, G.W., Mc Donald, J.W. 1981. *Escherichia coli* epididymitis and seminal vesiculitis in a ram. **Aust. Vet.J. 57**: 479-480.

Burgess, G.W., Mc Donald, J.W. Norris, J.J. 1982. Epidemiological studies on ovine brucellosis in selected ram flocks. **Aust. Vet. J.59**:45-47.

Campbell ,G.A., Adams, L.G., Sowa, B.A., 1994. Mechanism of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. **Vet. Immunol. Immunopathol. 41**, 295-306.

Cerri D. Ebani, VV, Pedrini A, Bassi S, Bey RF, Andreani E, Farina R. 2000. Evaluation of test employed in serological diagnosis of Brucellosis caused by *Brucella ovis*. **New Microbiol. 23**(3): 282-288.

Cheers, C. 1997. Cell mediated immunity to murine Brucellosis and the role of cytokines. In: 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. Chicago.

Chin, J.C. 1983. Comparison of different antigenic preparation for the detection of ovine serum antibodies against *Brucella ovis* by ELISA. **Aust. Vet. J. 60**: 261-264.

Chin , J . and Tuner , B. 1990. Extraction of membrane antigen from *Brucella ovis* and an assessment of their serological activity by immunoblotting . **J. of Gen. Microbiology. 136**: 1615-1622.

Claxton, P.D. 1968. *Brucella ovis* vaccination of rams. A comparison of two commercial vaccines and two methods of vaccination. **Aust. Vet.J. 44**: 48-54.

Claxton, P.D. Everest, R.E. 1966. Recovery of an organism resembling *Histophilus ovis* from a ram. **Aust. Vet. J. 42**: 457-458.

Clapp , K.H. 1955. A Complement fixation test for the diagnosis of ovine brucellosis with special reference to epididymitis. **Aust. Vet. J. 31**: 27-28.

Cloekaert, A. 1997. "Antigens of *Brucella* ", in 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conferense . November , 8-9.

Cloekaert, A., de Wergifosse, P., Dubray , G., Limet , J.N., 1990. Identification of seven surface – exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme – linked immunosorbent assay. **Infect . Immun. 58**, 3980-3987.

Cloekaert , A., Verger, J.M., Grayon, M., Grepinrt, O., 1995. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 Kda and 36 kDa Outer membrane proteins of *Brucella* . **Microbiology 141**, 2111-2121.

Cloekaert , A., Zygmunt , M.S., de Wergifosse, P., Dubray , G., Limet , J.N. , 1992c. Demonstration of peptidoglycan – associated *Brucella* outer–membrane proteins by use of monoclonal antibodies. **J.Gen .Microbiol. 138**, 1543-1550.

Cloekaert, A., Kerkhots, P., Limet, J.N., 1992b. Antibody response to *Brucella* outer membrane protein in bovine brucellosis: Immunoblot analysis and competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. **J.Clin. Microbiol. 30**, 3168-3174.

Cloeckaert , A., Jacques , I., de Wergifosse , P., Dubray , G., Limet , J.N., 1992a . Protection against *Brucella melitensis* or *Brucella abortus* in mice with immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM monoclonal antibodies specific for a common epitope shared by the *Brucella* A and M smooth lipopolysaccharides. ***Infect immun.* 60**, 312-315.

Cloeckaert, A., Vizcaíno N., Paquet J.Y., Bowden RA., Elzer PH. 2002. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. ***Veterinary Microbiology* 90**: 229-247.

Comerci , D.J., Martínez –Lorenzo , M.J., Sieira , R., Gorvel , J.P., Ugalde, R.A., 2001. Essential role of the vir B machinery in the maturation of the *Brucella abortus*- containing vacuole. ***Cell Microbiol.* 3**, 159-168.

Corbel, J.M. y Brinley–Moorgan , W.J. 1975. Proposal for minimal standards for descriptions of new species and biotypes of the genus *Brucella*. ***Int. J. Sist.Bact.* 25**: 83-89.

Corbel, M.J. and Brinley–Morgan, W.J. 1984. Genus *Brucella* . En N.R. Kneg and I.G. Holt (eds).Bergey’s manual of systematic bacteriology, Vol. 1. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.

Cox, J.C., Gorrie, C.J., Nairn, R.C. Ward. H.A.1977. A comparison of methods for the serological diagnosis of *Brucella ovis* infection. ***Brit. Vet. J.* 133**: 442-445.

De Long, W.J., Waldhalm, D.G. Hall, R.F. 1979. Bacterial isolates associated with epididymitis in rams from Idaho and eastern Oregon Flocks. ***Am. J. Vet. J.* 40**: 101-102.

Del Vecchio, V.G., Kapatral, V., Redkar, R.J., Patra, G., Mujer, C., Lost, T., Ivanova, N., Anderson, I ., Bhattacharya, A., Lykidis , A ., Reznik , G ., Jablonski, L., Larsen, N., D´ Souza , M., Bernal, A., Mazur, M ., Goltsman , E., Selkov , E., Elser, P.H., Hagius, S., O’Callaghan, D., Letesson, J.J., Haselkorn,

R., Kyrpides, N., Overbeek, R., 2002. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen.

Detilleux, P.G., Deyoe, B.L., Chevillat, N.F., 1991. Effect of endocytic and metabolic inhibitors on the internalization and intracellular growth of *Brucella abortus* in vero cells. **Am.J.Vet.Res.** **52**, 1658-1664.

Díaz, R., Jones, L.M. Wilson, J.B. 1967. Antigenic relationship of *Brucella ovis* and *B. melitensis*. **J. Bacteriol.** **93**: 1262-1268.

Díaz, R. Bosseray, N. 1973. Identification d'un composé antigénique spécifique de la phase rugueuse (R) des *Brucella* : **Ann. Rech. Vet.** **4**: 283-292.

Dolley, P., Geral, M.F., Pellerin J.L., Milon A. Lautle R. 1982. L'épididymite contagieuse du bélier (infection à *Brucella ovis*) . Note 1: Mise au point de trois méthodes de diagnostic sérologique. **Rev. Med. Vet.** **133**: 187-195.

Douglas, J.T., Rosenberg, E. Nikaido, H., Verstrete, D.R., Winter, A.J., 1984. Porins of *Brucella* species. **Infect Immun.** **44**, 16-21.

Dubray, G., Bézard, G., 1980. Isolation of three protective cell-wall antigens of *Brucella abortus* in experimental brucellosis on mice. **Ann. Rech. Vet.** **11**, 367-373.

Dubray, G., Charriut C., 1983. Evidence of three major polypeptide species and two major polysaccharide species in the *Brucella* outer membrane. **Ann. Rech. Vet.** **14**, 311-318.

Dubray, G., 1987. Protective antigens in Brucellosis. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol.** **138**, 84-87.

Duncan, M.J. et al. (2002) Microbiol entry through caveolae; variations on a theme. **Cell Microbiol.** **4**, 783-791.

Edkall, M.O., Money, D.F. Martín, C.A. 1968. Some aspects of epididymitis in rams in new zealand. **N.Z. Vet.J. 16**: 81-82.

Eugster , A.K., Ball, L., Carroll, E.J. Storz , J. 1970. Experimental genital infection of bulls and rams with chlamydial agents. Proc. 6th Int. Meet. Dis. Cattle , pp. 327-332.

Fensterbank , R., Pardon, P. Marly , J.1982 . Efficacy of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine against *B. ovis* infection in rams. **Ann. Rech . Vet . 13**: 185-190.

Fernandes, D.M., Baldwin, C.L., 1995. Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. **Infect. Immun. 63**, 1130.

Ficht, T.A., Hussein , H.S., Derr, J., Bearden , S.W., 1996. Species – Specific sequences at the omp2 locus of *Brucella* type strains. **Int. J. Syst. Bacteriol . 46**, 329-331.

Filip, C., Fletcher, G., Wulff, J.L., Earthart. C.F., 1973. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium –lauryl sarcosinate. **J. Bacteriol. 115**, 717-722.

Foulonge , V., Bourg , G., Cazevielle , C., Michaux – Charachon , S., O’Callaghan, D., 2000. Identification of *Brucella ovis* genes affecting intracellular survival in an in vitro human macrophage infection model by signature–tagged transposon metagenesis. **Infect. Immun. 68** , 1297-1303.

Gamazo ,C., Winter , A.J.,Moriyon, L., Riezu-Boj, J.L. Blasco, J.M. y Díaz, R. 1989. Comparative analysis of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. **Infect. Immun. 57**: 1419-1426.

Garcia – Carrillo, C. 1981. Protection of rams against *Brucella ovis* infection by *B. Melitensis* Rev 1 vaccine. **Vet. Med. B. 28**: 425-431.

Godfroid , F., Cloeckaert , A., Taminau , B., Danese, I., Tibor, A., de Bolle , X., Mertens, P., Letesson, J.J., 2000. Genetic organisation of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of *Brucella melitensis* 16M. **Res.Microbiol.** **151**, 655-668.

Golding, B., Scott, D.E., Scharf , O., Huanh, L.Y., Zaitdeva, M., Lapham , C., Eller, N., Golding, H., 2001. Immunity and protection against *Brucella abortus* . **Microb. Infect.** **3**, 43-48.

Gorvel, J.P., Moreno, E., 2002. *Brucella* intracelular life: from invasión to intracellular replication. **Vet. Microbiol.** **90**, 281-297.

Gradwell, D.V, Van Zyll, F.E.1975. Effectivity of rev 1 vaccine in rams against *Brucella ovis* infection. **J.S. Afr. Vet. ASS.** **46**: 349-351.

Gross , A., Terraza, A., Ouahrani-Bettache, S., Liautard , J.P., Dornand , J., 2000. In vitro *Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. **Infect . Immun.** **68**, 342-351.

Guilloteau, L.A., Laroucan, K., Vizcaíno, N; Jaques, I., Dubray, G., 1999. Immunogenicity of recombinant Escherichia coli expressing the omp 31 gene of *Brucella melitensis* in BALB/ C mice . **Vaccine** **17** , 353-361.

Guzmán- Verri ,C., Chaves-Olarte , E., Von Eichel – Streiber, C ., Lópex-Goñi, I., Thelestam, M., Arvidson, S., Gorvel, J.P., Moreno, E., 2001. GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in non-professional phagocytes: direct activation of CDC42. **J. Biol. Chem.** **276**, 4435-4444.

Hardefeldt, K.W. 1977. Field investigations into the diagnosis of some infectious causes of epididymitis in rams. **Vet. Proc.** **35**: 28-29.

Haughey, K.G. y Hughes, K.L. 1969. The apparent failure of a vaccine to protect rams against naturally occurring *Brucella ovis* infection. **Aust .Vet .J. 45:** 10-12.

Herman, L., De Ridder, H., 1992, Identification of *Brucella* spp. By using the polymerase chain reaction. **Appl. Environ, Microbiol. 58** , 2099-2101.

Hoyer, B.H., Mc Cullough, N.B., 1968b. Polynucleotide homologies of *Brucella* deoxyribonucleic acids. **J. Bacteriol . 95**, 444-448.

Hughes, K.L., Claxton, P.D. 1968. *Brucella ovis* infection. **Aust . Vet . J. 44:** 41-47.

Jansen, B.C. 1980. The etiology of ram epididymitis. **Onderstepoort J. Vet. Res. 47:** 101-107.

Jiang X. and Baldwin CL. 1993. Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. **Infect. Immun. 61:** 124-131.

Jiménez de Bagüés, MP., Elzer, PH., Blasco, J.M., Marín, CM., Gamazo C y Winter AJ. (1994). Protective immunity to *Brucella ovis* in BALB/c mice following recovery from primary infection or immunization with subcellular vaccines. **Infect. Immun. 62** (2): 632-638.

Jiménez de Bagüés, M.P., M. Barberán, C.M. Marín, y J.M. Blasco. 1995. The *Brucella ovis* in rams. **Vaccine. 13:** 301-304.

Jiménez de Bagüés, MP., Marín, CM., Barberán, M., y Blasco JM. (1993). Evaluation of vaccines and of antigen therapy in a mouse model for *Brucella ovis*. **Vaccine 11** (1); 61-66.

Jiménez de Bagüés, MP. Barberán, M., Marín, CM y Blasco JM. (1995) The *Brucella abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams. **Vaccine 13**, 301-304.

Jones, L.M. 1967. Report to the International Comité on Nomenclature of bacteria by the Subcommittee on Taxonomy on Brucellae. **Int. J. System. Bact.** **17**: 371-375.

Jones, L.M., Dubray, G. Marley, J. 1975. Comparison of methods of diagnosis of *Brucella ovis* infection of rams. **Ann. Rech. Vet.** **6**: 11-22.

Jubb, K.V., Kennedy, P.C. 1974. **Patología de los animales domésticos**. Tomo I. Ed. Labor. Barcelona.

Kennedy, P.C. Frazier, L.M. y Mc Gowan, B. 1956. Epididymitis in rams. Pathology and bacteriology. **Cornell Vet.** **46**: 303-319.

Kittelberger, R., Hilbink, F., Hansen, M.F., Ross, G.P., De Lisle, G.W., Cloeckaert, A., de Bruyn, J., 1995. Identification and characterisation of immunodominant antigens during the course of infection with *Brucella ovis*. **J. Vet. Diagn. Invest.** **7**, 210-218.

Kitterberg, R., Diack, D.S., Vizcaíno, N., Zygmunt, M.S., Cloeckaert, A., 1998. Characterisation of an immunodominant antigen in *Brucella ovis* and evaluation of its use in an enzyme – linked immunosorbent assay. **Vet. Microbiol.** **59**, 213-227.

Köhler, S., Michaux-Charachon, S., Porte, F., Ramuz, M., Liautard, S.P., 2003. What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*? Opinion (**Trends in Microbiology**). **Vol. 11**. No 5. 215-219.

Kurshreshtha, R.C., y Karla, D.S. 1978. A study on sheep brucellosis with particular reference to infectious epididymitis outbreak in rams. **Indian Vet.J.** **55**: 357-362.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during assembly of bacteriophage T4. **Nature (Lodon)** **227** : 680-685.

Leal-Kleuezas , D.S.,Martínez –Vázquez , I.O., López –Merino, A., Martínez – Soriano, J.P., 1995. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. From blood and milk of infected animals . **J.Clin. Microbiol.** **33**, 3087-3090.

Letesson, J-J., Lestrade , P., Delrue, R.M., Danese , I ., Bellefontaine , F., Fretin, D., Taminiau , B., Tibor, A., Dricot , A., Deschamp , C., Haine, V., Leonard, S., Laurent, T., Mertens , P., Vandenhautte, J., De Bolle, X . 2002. Fun stories about *Brucella* : the “furtive nasty bug”. **Vet. Microbiol.** **90**, 317-328.

Limet , J.N., Bosseray , N., Grain – Bastuji , B., Dubray , G., Plommet, M., 1989. Humoral immunity in mice mediated by monoclonal antibodies against the A and M antigens of *Brucella* . **J. Med. Microbiol .** **30**. 37-43.

Livingstone , C.H. Hardy , W.T. 1964. Isolation of *Actinobacillus seminis* from ovine epididymitis . **Am. J. Vet. Res.** **25**: 660-663.

Lugtenberg, B. Van Alphen, L. 1983. Molecular architecture and Functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram negative bacteria. **Biochi. Biophys. Acta** **737**: 51-115.

Manterola, L., Tejero – Garcés, A., Ficapal , A., Shopayeva , G., Blasco, J.M., Marin, C.M., López – Goñi., I., 2003. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. **Vet . Microbiology.** **92**, 65-72.

Marin, C.M., Jimenez de Bagues , M.P., Blasco , J.M., Gamazo , C., Moriyon , I. y Díaz , R., 1989. Comparison of three serological test for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. **Vet . Record** **125**: 504-508.

Marin, C.M., Barberan, M., Jimenez de Bagues, M.P. y Blasco J.M. 1990. Comparison of subcutaneous and conjuntival routes of rev 1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. **Res .Vet. Sci.** **48**: 209-215.

Mc Diarmid , J.J. 1978. Observation on *Brucella ovis* CFT results. **N.Z. Vet. J.26**: 286-287.

Mc Farland, D., Jebson, J.L., Hatley,W.J., Salisbury,R.M., Mc Cutle, T.J. Osborne, H.G.1952. Ram epididymitis, ewe abortion and lamb neonatal mortality. **Aust. Vet.J. 28**:221-226.

Mc Gowan, B. Schultz, G.1956. Epididymitis in rams. Clinical description and field aspects. **Cornell Vet. 46**: 227-281.

Mc Gowan , B. 1979.Epididymitis in rams: effect of vaccination and calling on the clinical incidence of the disease. **Cornell Vet. 69**: 67-72.

Montaraz, J.A., Winter, A.J., Hunter, D.M., Sowa, B.A., Wu, A.M., Adams, L.G., 1986. Protections against *Brucella abortus* in mice with O-polysaccharide – specific monoclonal antibodies. **Infect. Immun. 51**, 961-963.

Moreno, J.A., Borowiak, D., y Mayer, N. 1987. *Brucella* lipopolysaccharides and polisaccharide. **Ann.Inst.Pasteur.Microbiol. 138**: 102-105.

Moreno, E., Jones, L.M. y Berman, D.T. 1984. Inmunochemical Characterization of rough *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides. **Ann. Inst. Pasteur. Microbiol. 138**: 102-105.

Moreno , E., Moriyón, I ., 2001. The genus *Brucella*. In: Darwin , M., Falkow , S., Rosenberg , E., Schleifer , K., H., Stackebrandt, E. (Eds.), The Prokaryotes . Electronic version. Springer, New York.

Morton, R.J., Simons, K.R., Confer, A.W., 1996. Major outer proteins of *Pasteurella haemolytica* serovars 1- 15: comparison of separation techniques and surface-exposed proteins on selected serovars. **Vet. Microbiol. 51**, 319-330.

Murillo, M., Grilló. M.J., Reñé, J., Marín. C.M., Barberán. M., Goñi. M.M., Blasco, J.M., Irache, J.M., Gamazo, C., 2001. A *Brucella ovis* antigenic bearing poly- ϵ -caprolactone microparticles confer protection against experimental brucellosis in mice. **Vaccine 19**, 4099-4106.

Murillo, M; Goñi, MM., Irache, JM., Arangoa, MA., Blasco, JM and Gamazo, C. (2002). Modulation of the cellular response after oral or subcutaneous immunization with microparticles containing *Brucella ovis* antigens. **Journal of controlled release 85**, 237-246.

Murphy, E.A., Sathiyaseelan, J., Parent, M.A., Zou , B., Baldwin, C.L., 2001. Interferon- γ is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/C mice. **Immunology . 103**, 511-518.

Murray , R .M. 1969. Scrotal abnormalities in rams in tropical Queensland with particular reference to ovine brucellosis and its control. **Aust . Vet. J . 45**: 63-67.

Myers , D.M.y Siniuk . A.A. 1970. Preliminary report on the development of a diffusion in gel method for the diagnosis of ram epididymitis. **Appl. Microbiol. 19**: 335-337.

Myers , D.M. y Varela-Díaz , V. 1979. Serodiagnosis of ram epididymitis by Counterimmunoelectrophoresis using *Brucella ovis* surface R antigen. **J.Clin. Microbiol. 10**: 451-453.

Núñez, T.E., Díaz, A.E., Tenorio, R.V. Hernández, L., Marin, C., Suárez , G.F. 1998. Stability of antigen and agarose used in a double immunodiffusion serologic test for *Brucella ovis*. **J.Vet. Diagn.Invest.10**: 113-115.

Núñez, T.E., Díaz, A.E., Velásquez, Q.F., Trigo, T.F. y Suárez, G.F. 1997. Presencia de anticuerpos contra diferentes especies de *Brucella* en sementales ovinos jóvenes. **Vet. Méx. 28** (3): 241-245.

O'Callaghan , D., Cazevielle , C ., Allardet-Servent, A., Boschioli, M.L., Bourgh, G., Foulongne , V., Frutos , P., Kulakov , Y., Ramuz , M ., 1999. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* Vir B and *Bordetella pertussis* ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. **Mol. Microbiol.** **33**, 1210-1220.

O'Hara, D.J. y Weddel, W. 1979. What use is the *Brucella ovis* complement fixation test. **N.Z.Vet. Ass. Sheep.Soc.Seminar.**1979. 39-44.

Oliveira, S.C., Harms, J.S., Rech, E.L., Rodarte, R.S., Bocca, A.L., Goes, A.M., Splitter, G.A., 1998. The role of T-cells subset and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **31**, 77-84.

Ottonnes , F., Liautard , J; Gross, A; Rabenoelina , F., Liautard , J.P., Favero , J., 2000b. Activation for human Vgamma g delta 2 T cells by a *Brucella suis* non-peptide fraction impairs bacterial intracellular multiplication in monocytic infected cells. **Immunology.** **100** , 252-258.

Pawson, I.T., Seshadri , R., Nelson ,K.E., Eisen, J.A., Heidelberg , J.F., Read, T.D., Dodson , R.J., Umayam , L., Brinkac , L.M., Beanan , M.J., Daugherty, S.C., Deboy, R.T., Durkin , A.S., Kolonay , J.F., Madupu , R ., Nelson , W.C ., Ayodeji, B., Kraul , M., Shefty , J., Malek , J., Van Aken , S.E ., Riedmuller , S., Tettelin , H., Gill, S.R., White , O., Salzberg , S.L., Hoover, D.L., Lindler, L.E., Halling , S.M., Boyle , S.M ., Fraser , C.M., 2002. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **99** , 13148-13153.

Pérez, E., Flores , C.R., De la Huerta, J.A. y Trigo, T.F.J. 1979. Diagnóstico y descripción de un brote de epididimitis ovina en México originado por *Brucella ovis*. **Vet. Méx.** **10** : 221-226.

Phillips, M., Deyoe, B.L., Canning , P.C., 1989. Protection of mice against *Brucella abortus* infection by inoculation with monoclonal antibodies recognizing *Brucella* O-antigen . **A. M.J. Vet. Res.** **50**, 2158-2161.

Porte, F. (2003) Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O-antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome –lysosome fusion in murine macrophages . **Infect . Immun.** **71**, 1481-1490.

Rahaley, R.S., Dennis, S.M, y Smeltzer, M.S. 1983. Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay and Complement fixation test for detecting *Brucella ovis* antibodies in sheep. **Vet. Rec.** **113**: 467-470.

Riezu-Boj, J.L.,Moriyon, L., Blasco; Marin , C.M. y Díaz , R. 1986. Comparision of lipopolysaccharide extracts in an enzyme–linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection . **J. of Clin. Microbiology.** **23**: 938-942.

Riezu–Boj, J.L., Moriyon, L., Blasco, J.M. Gamazo, C; Díaz, R. y Winter, A.J. 1990. Analysis by Immunoblot of the antibody response of sheep infected by smooth and rough *Brucella* to outer membrane protein extracted with hot saline. **Infect. Immun.** **58**: 489-494.

Ris, D.R. 1964. An indirect haemagglutination test for the detection of *Brucella ovis* antibodies. II. Comparison of the indirect haemagglutination test with other methods.**N.Z. Vet. J.** **12**: 72-75.

Ris, D.R. 1974. The complement fixation test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in sheep. **N.Z. Vet.J.** **22**: 143-146.

Ris, D.R., Hamel, K.L.y Long, D.L. 1984. Comparison of an enzyme-linked immunospecific assay with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infection. **N.Z. Vet.J.** **32**: 18-20.

Rodolakis, A., y Bernard, K. 1977. Isolation of *Chlamydia* from the genital of rams affected by clinical epididymitis . **Bull. Acad. Vet. Fr.** **50**: 65-70.

Salas, T.E., Núñez del A. A., Mejía, S.P. 2001. Diagnóstico de *Brucella ovis*. En: Diagnóstico de brucelosis animal. Editores: Díaz, E., Hernández, L., Valero, G., Arellano, B. INIFAP-SAGARPA, México.

Sanchis, R.y Giauffret, A.1976. Mise au point d'une microtechnique de fixation du complement appliquée au sérodiagnostic de l'épididymite contagieuse du bélier. **Rec. Med. Vet. 152**: 305-310.

Shortridge , E.HH. 1962. Lesions of the testicle and epididymis of rams. **N.Z. Vet. J.10**: 23-26.

Simmons, G.C., Baynes, I.D. y Ludford , C.G. 1966. Epidemiology of *Actinobacillus seminis* in flocks of border leicester sheep. **Aust . Vet . J. 42**: 183-187.

Simmons, G.C. y Hall, W.T.1953. Epididymitis of rams. **Aust. Vet. J. 29**: 33-40.

Sowa , B.A., Kelly, K.A., Ficht , T.A., Frey , M., Adams , L.G., 1991. SDS-Soluble and peptidoglycan-bound proteins in the outer membrane-peptidoglycan complex of *Brucella abortus*. **Vet. Microbiol. 27**, 351-369.

Spencer, T.L. y Burgess, G.W. 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Brucella ovis* specific antibody in ram sera. **Res.Vet. Sci. 36**: 194-198.

Storz, J., Carroll, E.J., Stephenson, E.M., Ball, L, y Eugster, A.K. 1976. Urogenital infection and seminal excretion after inoculation of Bulls and rams with Chlamydia. **A.m. J. Vet. Res. 37**: 517-520.

Suárez, G.F., Martínez, Y.E. Flores, C.R. 1974. Presencia de anticuerpos contra *B. ovis* en borregos tabasco o pelibuey . Resumen de la XI Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. Pág. 20. México D.F.

Swift, B.L. Makl, L.R., 1968. Immunological studies on three ram epididymitis bacterins . **Cornell Vet. 58**: 659-665.

Thayer , J.D. y Martín, J.E. 1964. A selective médium for cultivating *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. **Publ Helath Dpto. U.S. 79:49**

Towbin, H., Stachelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76**, 4350-4354.

Tsai, C., Frash, C.E., 1982. A sensitive silver stain for detection lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem. 119**, 115-119.

Van Tonder, E.M. 1973. Infection of rams with *Actinobacillus seminis* . **J.S. Afr. Vet. Ass. 44**: 235-240.

Verstrete , D.R., Creasy , M.T., Caveney , M.T., Baldwin, C.L., Blab, M, W. Winter, A.J. 1982. Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: isolation and characterization. **Infect . Immun. 35**: 979-989.

Vizcaíno, N., Fernández-Lago, L., 1994. Protection and Supresión of the humoral immune response in mice mediated by a monoclonal antibody against the M epitope of *Brucella* . **FEMS Immunol . Med. Microbiol. 81**, 133-140.

Walker, R.L., Leamaster, B.R., Stellflug, J.N. Biberstein, E.L. 1985. Use of an enzyme –linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Brucella ovis* in sheep: field trial. **Am. J. Vet. Res. 46**: 1642-1646.

Watt, D.A. 1972. Testicular abnormalities and spermatogenesis of the ovine and other species. **Vet. Bull. 42**: 181-190.

Webb, R.F., Quinn, C.A., Cockram, F.A. y Husband A.J. 1980. Evaluation of procedures for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. **Aust.Vet. J. 56**: 172-175.

Weber, K., Osborn, M., 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412.

Weddel, W. 1974. An automated complement fixation test for *Brucella ovis* in sheep. *N.Z. Vet. J.* **22**: 1-4.

Wessel, D., Flügge, U.I., 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**, 141-143.

West, D.M. y Bruere, A.M. 1979. Accreditation for freedom from ovine brucellosis. *N.Z. Vet. J.* **27**: 263-265.

West, D.M., Johnstone, A.C., Bruere, A.N. y Chapman, H.N., 1978. Epiphysitis in rams following vaccination against *Brucella ovis* infection, *N.Z. Vet. J.* **26**: 133-134.

Winter, A.J., Duncan, J.R., Santisteban C.G., Douglas, J.T., Adams, L.G., 1989. Capacity of passively administered antibody to prevent establishment of *Brucella abortus* infection in mice. *Infect. Immun.* **57**, 3438-3444.

Worthington, R.W. Bosman, P.P. 1968. Isolation of *Actinobacillus seminis* in South Africa. *J.S. Afr. Vet. ASS.* **39**: 81-85.

Worthington, R.W., Stevenson, D.J. y Delisle, G.W. 1985. Serology and Semen culture for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in chronically infected rams. *N.Z. Vet. J.* **33**: 84-86.

Worthington, R.W., Weddel, W .y Penrose , M.E. 1984. A Comparison of three serological tests for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. **N.Z Vet.J.** **33**: 58-60.

Zamora, J., Chauan, E., Polette, M., Alonso, O., Rojas, X., Kruce, J. y Herve, M. 1977. *Brucella ovis* y otros agentes etiológicos en epididimitis y orquitis infecciosa ovina . **Arch .Med. Vet.** **9**: 94-99.

Zamora, J., Reinhardt, G. y Rojas, X. 1971. Epididimitis de los carneros . II . Frecuencia y etiología de la enfermedad en el sur de Chile. **Arch.Med. Vet.** **3**:75-76.

Zhan Y., y Cheers C. 1993. Endogenous gamma interferon mediates resistance on *Brucella abortus* infection. **Infect. Immun.** **61**: 4899-4901.

Zhan, Y., Liu, Z., y Cheers, C., 1996. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. **Infect. Immun.** **64**, 2782-2786.

Zhan, Y.F., Cheers, C.,1995a. Endogenous interleukin-12 (IL-12) is involved in the resistance to *Brucella abortus* infection. **Infect. Immun.** **63**, 1387.

Zhan, Y.F., Cheers, C.,1995b. Differential induction of macrophage –derived cytokines by live and dead intracellular bacteria *in vitro*. **Infect. Immun.** **63**, 720.

Zhan, Y.F., Kelso, A., Cheers, C., 1995. Differential activation of *Brucella*-reactive CD4+ T-cells by *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts. **Infect. Immun.** **63** ;969.

Zhan, Y.F., Yang, J.L. Cheers, C., 1993a. Cytokine response of T-Cell Subsets from *Brucella abortus* Infected mice to soluble *Brucella* proteins. *Infect. and Immun.* **61**; 2841-2847.

Zhan, Y.F., Kelso, A., y Cheers, C., 1993b. Cytokine production in the murine response to *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts. *Immunology* **80**:458

Zygmunt, M.S., Cloeckert, A., Dubray, G., 1994. *Brucella melitensis* cell envelope protein and lipopolysaccharide epitopes involved in humoral immune responses of naturally and experimentally infected sheep. *J.Clin. Microbiol.* **32**, 2514-2522.