



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

“RESPUESTA SEROLÓGICA CONTRA LAS  
PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE LA  
CEPA RB51 DE *BRUCELLA ABORTUS* EN  
BORREGAS VACUNADAS”.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**  
**P R E S E N T A :**  
**MARÍA DE LOS ÁNGELES CUEVAS PALACIOS**

ASESOR: M.C. JOSÉ FRANCISCO MORALES ÁLVAREZ

COASESOR: M.C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

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

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

Respuesta serológica contra las proteínas de membrana externa  
de la cepa RB51 de Brucella abortus en borregos vacunadas.  
que presenta la pasante: María de los Angeles Cuevas Palacios  
con número de cuenta: 09437942-6 para obtener el título de :  
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de mayo de 2005

PRESIDENTE	MVZ. Silviano Trejo Núñez	
VOCAL	MVZ. Blanca Rosa Moreno Cárdeni	
SECRETARIO	M.C. José Francisco Morales Alvarez	
PRIMER SUPLENTE	MVZ. Ma. de Lourdes Jara Ramirez	
SEGUNDO SUPLENTE	M.C. Hugo Ramirez Alvarez	

## **DEDICATORIAS**

### **A MI MADRE.**

Por su apoyo moral, quien me enseñó a seguir el buen camino, formando en mi, a una persona de bien, gracias por darme el mejor regalo de todos mi carrera y por ser mas que mi madre, una gran amiga que estará siempre conmigo, no hay palabras que pueda decirte cuanto te agradezco esto.

### **A MI PADRE.**

Por su apoyo recibido durante, mi formación profesional.

### **A MIS HERMANOS.**

David eres mi gran inspiración para superarme, te quiero mucho, gracias por apoyarme en todo y consentirme mucho.

Edith gracias por estar conmigo en este día tan especial para mi.

## AGRADECIMIENTOS

### A DIOS.

Que me permitió terminar mi carrera, y me ha guiado en este camino tan largo y estar junto a las personas que mas quiero y compartir este momento con todos mis amigos.

### A MIS ASESORES.

**DR. JOSÉ FRANCISCO MORALES  
ÁLVAREZ.**

**M. EN C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR  
ORDAZ.**

Muchas gracias por su participación, ya que sin su apoyo, no hubiera sido posible la realización de esta tesis, me llevo el mejor recuerdo de compartir con ustedes un gran momento de mi vida, **mas que *maestros, grandes amigos.***

### DEL CENID MICROBIOLOGIA

**DR. EFRÉN APARICIO**

Por su apoyo y comentarios en la realización de la tesis.

**DR. VÍCTOR TENORIO**

por su cooperación.

**Elizabeth (pecos) y Heidi.**

### A MIS AMIGOS DEL SERVICIO SOCIAL.

Gracias por apoyarme en la realización de esta tesis:

**Antonio Reyes, Antonio Valdez, César y Néstor Cuenca, Claudia Hernández, Edgar Delgado, Efrén Galindo, Francisco Cruz, Guni Delgado, Moisés Wong, Víctor H. Márquez,** fue muy divertido el estar junto a ustedes y deseo seguir contando con ustedes.

## **DEL CONSULTORIO.**

Que me ayudaron en resolver muchas dudas de mi carrera.

**M.V.Z. Gerardo Saavedra.**

**pM.V.Z, Edson Fabián Juárez.**

**M.V.Z Javier Hernández.**

**M.V.Z. H. García Mayen.**

Por compartir tus conocimientos y apoyarme.

## **GENERACIÓN 99-2003**

**Alejandra Gutiérrez, Carlos Cuevas, Carlos Nevero, Carlos Zacarías, Edgar Jácome, Elizabeth Arteaga, Fernando García, Francisca Bernardino, Francisco Villegas, Guadalupe Martínez, Guadalupe A Castillo, Iliana E Pérez, Isis Resendis, Ismael Platas, Jehieli Girela, Juan Espinosa, Lino Cruz, Magaly Cortes, Mariela Padilla, Mónica Urbina, Nancy Villanueva, Naybi y Rodolfo, Perla Contreras, Pilar Sandoval, Ramón Ruiz.**

Ya que siempre han estado conmigo, es un gran apoyo contar con ustedes y aquellas personas que me motivaron a seguir adelante. Gracias amigos.

## **A MIS MAESTROS.**

Por dejar en mi, parte de su experiencia profesional a través de sus enseñanzas.

## **A MIS SINODALES**

Gracias por sus oportunos comentarios.

TENDRAN EN MI, MAS QUE UN AMIGO PARA ORIENTARLOS EN CUALQUIER SITUACIÓN QUE SE LES PRESENTE.

**ANGELES C.P.  
[ANGECUPA]**

## ÍNDICE

Abreviaturas

Índice de cuadros, gráficas y figuras.

### Resumen

	Página
<b>I. Introducción</b>	1
1.1 Características generales del género <i>Brucella</i>	4
1.2 Anatomía y composición química de la envoltura celular	8
1.3 Lipopolisacárido	10
1.4 Patogenia	12
1.5 Vacunas	15
<b>II. Justificación</b>	18
<b>III. Objetivos</b>	19
<b>IV. Material y Métodos</b>	20
<b>V. Resultados</b>	27
<b>VI. Discusión</b>	36
<b>VII. Conclusiones</b>	42
<b>VIII. Literatura citada</b>	43
<b>IX. Apéndice</b>	52

## ABREVIATURAS DE USO FRECUENTE

A.....	Antisuero monoespecífico contra <i>B. abortus</i>
CO <sub>2</sub> .....	Bióxido de carbono
ELISA....	Inmunoensayo enzimático
FC.....	Fijación del complemento
xg.....	Gravedades
H <sub>2</sub> S.....	Sulfuro de hidrógeno
IgG.....	Inmunoglobulina G
Kda.....	kilodaltones
LPS.....	Lipopolisacárido
M.....	Molar
M.....	Antisuero monoespecífico contra <i>B. melitensis</i>
ME.....	Membrana externa
μl.....	Micro litro
μm.....	Micrómetro
OMPs....	Proteínas de membrana externa
PBS.....	Solución buffer fosfatos
PME.....	Proteínas de membrana externa
PMN.....	Polimorfonucleares
PT.....	Pruebas serológica de tarjeta
R.....	Suero anti- <i>Brucella</i> rugosas
RB.....	Rosa de Bengala
RIV.....	Rivanol
SSF.....	Solución salina fisiológica
UFC.....	Unidades formadoras de colonias



## ÍNDICE DE CUADROS, GRÁFICAS Y FIGURAS

	Página
<b>Cuadro 1.1.1.</b> Características bioquímicas para la identificación de especies <i>brucella</i> .....	6
<b>Cuadro 1.1.2.</b> Características diferenciales entre <i>brucella</i> y algunos otros microorganismos gram negativos .....	7
<b>Figura 1.3.1:</b> Componentes del Lipopolisacárido .....	11
<b>Cuadro 4.9.1.</b> Hiperinmunización de conejos y borregos para utilizar como controles positivos .....	26
<b>Cuadro 5.2.1.</b> Características bioquímicas de los aislamientos obtenidos de exudado vaginal de borregas vacunadas con la cepa RB51 de <i>Brucella abortus</i> .....	31
<b>Cuadro 5.2.2.</b> Características bioquímicas de los aislamientos y parámetros comparativos del género <i>Brucella</i> .....	31
<b>Gráfica 5.5.1.</b> Conjugado de proteína G peroxidada .....	32
<b>Gráfica 5.5.2.</b> Conjugado anti-IgM de ovino peroxidada elaborada en conejo .....	33
<b>Gráfica 5.5.3.</b> Conjugado anti-IgG de ovino peroxidada elaborada en conejo .....	34
<b>Figura 5.6.1.</b> Inmunotransferencia utilizando las PME de <i>Brucella abortus</i> como antígeno en borregas vacunadas .....	35

## RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad infecciosa, que afecta al hombre y a las diferentes especies animales. En este trabajo se evaluó la respuesta serológica hacia las proteínas de membrana externa (PME) de *Brucella abortus* cepa RB51 dosis única en borregas primíparas vacunadas. Se vacunaron 24 borregas raza Polipay, con una edad promedio de un año, seronegativas a *Brucella*. Los animales fueron divididos en dos grupos: uno control con 10 animales y otro experimental con 14 animales, los cuales se inocularon vía subcutánea con 2.0 ml de *B abortus* cepa RB51 (dosis reducida). Las borregas fueron muestreadas los días 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 70, y día 84 posvacunación. También se realizó la toma de exudado vaginal a los mismos tiempos. La determinación de anticuerpos contra las PME se realizó mediante la técnica de ELISA-Indirecta. Los resultados del estudio mostraron en el grupo vacunado con RB51, utilizando como conjugado Proteína G peroxidada tuvo una mayor respuesta al día 7 y 70 posvacunación y que descienden al día 56 y 84. Este comportamiento se considera normal por tratarse de una bacteria intracelular, donde la respuesta humoral debida a anticuerpos tiende a producir estas variaciones. En el caso del grupo control tiene una respuesta incipiente el día 14, y después permanece estable muy por debajo del grupo vacunado. Se realizó esta misma prueba con los isotipos IgG e IgM observando en el caso de IgM el día 7 una respuesta elevada; y en IgG una respuesta el día 7, así como los días 21, 35 y 46. En los dos isotipos los grupos controles se mantuvieron debajo de los valores obtenidos. Se seleccionaron los sueros con los títulos más altos y se realizó la prueba de Inmunotransferencia. En esta prueba se observó reconocimiento para proteínas entre 65, 45, 38 y 7 kDa. En el estudio bacteriológico del exudado vaginal no se aisló la cepa vacunal. Los resultados del estudio, indican un reconocimiento hacia las PME de *B abortus* en borregas vacunadas y faltaría determinar si este reconocimiento está asociado con protección, sin embargo la técnica de ELISA, utilizando como antígeno las PME, podría constituir una buena herramienta de diagnóstico para la enfermedad.

**Palabras clave:** Ovinos, *Brucella abortus* RB51, proteínas de membrana externa.

## I. INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias del género *Brucella*, que afecta al hombre y a las diferentes especies animales, y es más importante en el bovino <sup>(1)</sup>, constituyendo una zoonosis de importancia para la salud pública mundial <sup>(9)</sup>. *Brucella abortus* se caracteriza por producir abortos en el último tercio de la gestación con retención placentaria, infertilidad <sup>(32)</sup>, nacimiento de crías débiles <sup>(16)</sup> Además de que disminuye la producción láctea <sup>(18, 74)</sup> y en los machos produce orquitis y epididimitis con eliminación de la bacteria a través del semen <sup>(6, 44, 90)</sup>.

Las bacterias que pertenecen al género *Brucella*, se agrupan en siete especies, que se diferencian entre sí por su virulencia. Se sabe que *B. abortus* (9 biotipos) infecta preferentemente al ganado bovino, mientras que *B. melitensis* (3 biotipos) infecta al ganado caprino y ovino, *B. ovis* al ovino, *B. suis* (4 biotipos) al porcino, *B. neotomae* a la rata del desierto, *B. canis* a perros, y *B. maris* a mamíferos marinos <sup>(7)</sup>. Algunas de estas especies son transmitidas al hombre, aparentemente *B. ovis*, con excepción de *B. neotomae* y se desconoce si *B. maris* pudiera infectarlo <sup>(61)</sup>.

La infección ocurre cuando la bacteria penetra en los tejidos a través de una herida en la piel, la vía conjuntival, la vía oral o por inhalación <sup>(7)</sup>, por medio del contacto directo con fetos abortados, placentas y secreciones provenientes de animales infectados <sup>(45)</sup>.

Con base en los estudios bacteriológicos realizados en México, se conoce la existencia en bovinos de las siguientes biovariedades de *Brucella abortus* 1, 4, 5 y 6, siendo la biovariedad 1 la más frecuente y la biovariedad 4, la más virulenta para el hombre <sup>(103)</sup>.

Diversas organizaciones de salud consideran a la brucelosis como la zoonosis más difundida del mundo. Históricamente los programas de control y erradicación de la brucelosis en los animales tienen como base el diagnóstico; llevando a cabo un programa de sacrificio de los animales infectados y vacunando a los animales jóvenes. Esta estrategia de control ha resultado ser eficiente, ya que, no solo ha reducido el número de animales infectados, sino que también se ha reflejado en el descenso del contagio a humanos, sin embargo esto ha sido posible en países que presentan una prevalencia baja de la enfermedad <sup>(8, 78)</sup>.

En cambio en zonas con alta prevalencia, este plan no es factible de realizar, por lo que se requiere de la aplicación de un programa de profilaxis vacunal para evitar que se difunda la enfermedad, sin embargo, se debe tener en cuenta que al utilizarse por sí solos los programas anteriores (zonas con baja y zonas con alta prevalencia) no se llega a un control del problema, por lo que es recomendable pensar en una combinación de ambos <sup>(8, 78)</sup>.

La eliminación de animales reactivos positivos, basada en las pruebas de diagnóstico serológico es sin duda, la medida más efectiva para el control y erradicación de la enfermedad en el rebaño <sup>(16)</sup>. Sin embargo, se presenta el inconveniente de la interferencia de anticuerpos vacunales con las pruebas de diagnóstico convencionales, ya que la vacunación con cepa 19 induce la formación de anticuerpos contra el antígeno O del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de la bacteria y las pruebas tradicionales de diagnóstico utilizan como antígeno este mismo LPS, por lo que no es posible diferenciar animales vacunados de infectados <sup>(82)</sup>. Diferentes estudios han tratado de resolver el inconveniente de interferencia con las pruebas serológicas, es por esto que se han desarrollado cepas mutantes rugosas, las cuales son deficientes en el antígeno O de la pared celular de la bacteria, es el antígeno inmunodominante hacia el cual va dirigido principalmente la respuesta humoral medida en estas pruebas. Entre estas cepas se encuentra la RB51, la cual ha sido probada con efectividad en vacas, con resultados en cuanto a la protección contra la enfermedad sin interferencia con las pruebas de diagnóstico convencionales <sup>(67)</sup>. En estudios experimentales, aparentemente la

RB51 ha demostrado ofrecer una adecuada protección contra *B abortus* en ratones<sup>(88)</sup> y en cabras<sup>(76)</sup>, además es capaz de proveer protección contra la infección y aborto en vacas<sup>(20, 21)</sup>.

La susceptibilidad del individuo aumenta con la edad, de tal forma que la brucelosis ha sido considerada por algunos autores como una enfermedad de animales adultos. Debido a que, el porcentaje de animales enfermos también se incrementa con la edad, en cuanto más tiempo pase el animal en un medio contaminado por *Brucella*, mayor es la probabilidad de que se infecte. Ambos factores dependen de un considerable número de condicionantes entre los que la nutrición y la herencia, son probablemente los menos conocidos<sup>(18)</sup>.

En México, el diagnóstico oficial de la brucelosis se realiza mediante las pruebas serológicas de tarjeta (PT), rivanol (RIV) y fijación del complemento (FC)<sup>(25)</sup> sin embargo, durante el desarrollo de estas pruebas indirectas se pueden presentar reacciones cruzadas con otras bacterias como *Yersinia enterocolitica* serotipo O:9, *Salmonella grupo N* (0:30), *Vibrio cholerae*, obteniéndose en consecuencia resultados falsos positivos<sup>(56, 63)</sup>.

El diagnóstico definitivo de la brucelosis se lleva a cabo con el aislamiento de *Brucella spp* a partir de tejidos, líquidos corporales y leche<sup>(25)</sup>. La confirmación de la presencia de este microorganismo en cualquiera de las muestras, significa que el animal es positivo, aún en ausencia de anticuerpos séricos<sup>(24, 25, 40)</sup>. Esta práctica no es común en México, porque pocos laboratorios realizan estos aislamientos, además del costo, los procedimientos bacteriológicos no son siempre exitosos, son tardados y representan un gran riesgo de infección para los técnicos de laboratorio<sup>(24)</sup>.

La técnica serológica más adecuada, es la prueba de Inmunoensayo enzimático (ELISA) cuando se desea estudiar grandes poblaciones de animales, esta técnica mide anticuerpos clase IgG<sub>1</sub>, aunque éstos se encuentren en muy bajos niveles en el suero y no sean perceptibles por otras pruebas, <sup>(2, 70, 86, 91)</sup> presenta la ventaja de permitir procesar un mayor número de sueros en menor tiempo. Durante los últimos años ELISA ha sido adaptada al diagnóstico serológico de muchas enfermedades infecto-contagiosas, tanto en el hombre como en diferentes especies animales <sup>(3, 13, 49, 64,65)</sup>.

Existe una prueba de Inmunoensayo enzimático-indirecta (ELISA indirecta) que tiene una alta sensibilidad pero baja especificidad <sup>(55, 62)</sup> y una ELISA competitiva de alta sensibilidad y especificidad <sup>(66, 55)</sup>.

### **1.1 Características generales del género *Brucella***

*Brucella spp* es una bacteria gram negativa, inmóvil que es observada al microscopio de luz como bacilos cortos o cocobacilos de 0.5 a 0.7  $\mu\text{m}$  de diámetro y de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  de largo <sup>(17)</sup>. Los microorganismos aparecen de forma aislada o en grupos, <sup>(44)</sup> su pH es de 6.6 a 7.4 <sup>(4, 42)</sup>.

A la fecha no se han reportado estructuras en su superficie tales como fimbrias, aunque se han identificado en *B. abortus*, unas secuencias compatibles con moléculas proteicas adhesivas no fibrilares, que son semejantes a las adhesinas <sup>(71)</sup>.

A diferencia de otras bacterias gram negativas, *Brucella spp* no produce exotoxinas, no tiene cápsula que la proteja de la fagocitosis, ni muestra una variación antigénica <sup>(36, 37, 58)</sup>. Sin embargo, es una bacteria muy virulenta y patógena en su huésped natural.

Las brucelas son aerobias estrictas, producen catalasa y en general son oxidasa-positivas, no fermentan los hidratos de carbono y no son productores de indol, proliferan con lentitud y requieren medios enriquecidos como suero o sangre para el aislamiento primario, muchas cepas de *B. abortus* también requieren CO<sub>2</sub> suplementario para la proliferación <sup>(4)</sup>. La diferenciación entre *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* se basa en los resultados de diversas pruebas como: el requerimiento de un menor nivel de CO<sub>2</sub> para la proliferación; la producción de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) y la proliferación en presencia de tionina y fucsina básicas <sup>(10, 18)</sup>. En cada una de estas tres especies del género *Brucella*, se han reconocido cierto número de cepas o biovariedades sobre la base de éstas y otras propiedades bioquímicas (**Cuadro 1.1.1 y 1.1.2**).

En los cultivos, las colonias de *B. melitensis* y *B. abortus* aparecen después de 48-72 horas de incubación, son de forma circular, convexas y de coloración gris blanquecina, aunque mediante iluminación oblicua se aprecia un color azulado. Las cepas rugosas presentan un aspecto granuloso y mediante luz oblicua aparecen de color amarillento <sup>(28)</sup>.

**CUADRO 1.1.1. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES *BRUCELLA***

Crecimiento  
en presencia de colorantes    Aglutinación  
serológica

Especie	Biotipo	Necesidad de CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> S	Ureasa	Tionina	Fucsina	A	M	R	Huésped habitual
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	variable	+	+	-	+	-	Caprinos
	2	-	-	variable	+	+	+	-	-	y
	3	-	-	variable	+	+	+	+	-	Ovinos
<i>B. abortus</i>	1	+/-v	+	1-2 hrs.	-	+	+	-	-	
	2	+/-v	+	1-2 hrs	-	-	+	-	-	Ganado
	3	+/-v	+	1-2 hrs	+	+	+	-	-	vacuno
	4	+/-v	+	1-2 hrs	-	+	-	+	-	
	5	-	-	1-2 hrs	+	+	-	+	-	
	6	-	+/-v	1-2 hrs	+	+	+	-	-	
	9	-	+	1-2 hrs	+	+	-	+	-	
<i>B. suis</i>	1	-	+	0-30 min.	+	-	+	-	-	Cerdos
	2	-	-	0-30 min.	+	-	+	-	-	Cerdos, Caballos
	3	-	-	0-30 min.	+	+	+	-	-	Cerdos
	4	-	-	0-30 min.	+	-	+	+	-	Renos
	5	-	-	0-30 min.	+	-	-	+	-	Roedores
<i>B. neotomae</i>		-	+	0-30 min.	-	-	+	-	-	Ratas silvestres
<i>B. ovis</i>		+	-	-	+	-	-	-	+	Ovinos
<i>B. canis</i>		-	-	0-30 min.	+	-	-	-	+	Perros

+, positivo; -, negativo, +/-, variable, pero la mayoría de las cepas son negativas.

Tionina y Fucsina con concentración 20 µg.

A, antisuero monoespecífico contra *B. abortus*.

M, antisuero monoespecífico contra *B. melitensis*.

R, suero anti- *Brucella* rugosas.



**CUADRO 1.1.2. CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES ENTRE *BRUCELLA* Y ALGUNOS OTROS MICROORGANISMOS GRAM NEGATIVOS.**

<b>Prueba</b>	<b><i>Brucella</i></b>	<b><i>Yersinia enterocolitica</i> (0:9)</b>	<b><i>Bordetella bronchiseptica</i></b>	<b><i>Campylobacter fetus</i></b>	<b><i>Moraxella</i></b>
Morfología	Pequeños cocobacilos	Bacilos	Pequeños cocobacilos	Forma de coma	Diplococos
Motilidad a 37° C	-	-	+	+	-
Motilidad a 20° C	-	+	-	-	-
Producción de ácido en agar con glucosa	-	- (a)	-	-	-
Hemólisis en agar sangre	-	-	+	-	<b>V</b>
Catalasa	+	+	+	+	<b>V</b>
Oxidasa	+ (b)	-	+	+	+
Ureasa	+ (c)	+	+	-	<b>V</b>
Reducción del nitrato	+ (d)	+	+	+	<b>V</b>
Utilización del citrato.	-	-	+	-	-

- a) *B. neotomae* puede producir alguna fermentación.
- b) Excepto *B. ovis*, *B. neotomae*, y algunas cepas de *B. abortus* que son negativas.
- c) Excepto *B. ovis* y ocasionalmente *B. abortus*, que son negativas.
- d) Excepto *B. ovis* que no reduce nitratos a nitritos.
- v) Variable.

## 1.2 Anatomía microscópica y composición química de la envoltura celular

La anatomía microscópica de *Brucella* descrita por Dubray y Plommet <sup>(31)</sup>, no se aparta sustancialmente de la estructura clásica de las gram negativas, distinguiéndose, el citoplasma y la envoltura celular, integrada por la membrana citoplásmica, el espacio periplásmico y la membrana externa (ME) <sup>(18)</sup>.

Algunos autores opinan, que la ME de *Brucella* es responsable al menos en parte, de la capacidad de multiplicarse en el interior de los fagocitos, el peptidoglicano es similar a las Enterobacterias pero se encuentra fuertemente asociado a la ME <sup>(38, 58)</sup>, como en el caso de *E. coli* <sup>(60)</sup>.

A diferencia de las enterobacterias, la ME de *Brucella* contiene fosfatidilcolina y no en fosfatidiletanolamina <sup>(37)</sup>, esto explicaría en parte la resistencia que presenta a la polimixina B, además de que el antibiótico no se une al LPS <sup>(18)</sup>.

La supervivencia de este microorganismo en el interior del hospedador depende de la integridad de su membrana externa que representa su barrera defensiva, gracias a ella las bacterias gram negativas resisten la acción tóxica de los ácidos grasos y glicéridos, así como de enzimas proteolíticas y glicosidasas. Por lo tanto *Brucella*, se adapta a medios tan hostiles como el interior de los fagocitos, el pH, falta de nutrientes y presencia de intermediarios reactivos del oxígeno (peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos), formados en los fagocitos para la destrucción de las bacterias ingeridas, *Brucella* resiste mejor la actividad bactericida de estas células que otras bacterias, llegando incluso a inhibirla. Esta resistencia es mayor en cepas en fase lisa que en fase rugosa <sup>(12, 58)</sup>.

*B. abortus* puede permanecer en el fagosoma intacto y bloquear la fusión posterior con el lisosoma. Ello le protege de la acción de los péptidos catiónicos y enzimas líticas presentes en los gránulos lisosómicos. Se cree que la cadena O y quizás lípidos de omitina <sup>(37)</sup>, interactúan directamente con la membrana del fagosoma impidiendo la fusión.

Paralelamente, la superóxido dismutasa y la catalasa, que son enzimas presentes en *Brucella*, se integran al mecanismo de defensa que desarrollan algunos microorganismos frente a la toxicidad oxidativa, por otro lado se sabe que *Brucella abortus* escapa de los polimorfonucleares (PMN) al producir guanosina 5' monofosfato (GMP) y adenina que inhiben la fusión fagosoma lisosoma, la degranulación y la activación del sistema mieloperoxidasa-haluro y la producción del factor de necrosis tumoral<sup>(28, 54, 59)</sup>.

La supervivencia de *Brucella* dentro del macrófago, se ha asociado con la síntesis de enzimas antioxidantes KatE y SodC y proteínas de variados pesos moleculares: 17,24,28,60 y 62 kDa. La de 62 kDa corresponde a la GroEL de choque térmico; las de 24 y de 60 kDa se inducen en medio ácido y su producción se relaciona con la supervivencia de *Brucella* en condiciones ácidas (pH<4). Las proteínas de 17 y 28 kDa se han relacionado con la supervivencia intracelular. La proteína HtrA inducida por el estrés, está involucrada en la inducción de una respuesta granulomatosa temprana hacia *B. abortus* en el ratón. El papel de otras proteínas en la patogénesis de *Brucella* se desconoce, tal es el caso de las proteínas secuestradoras de hierro y de otros sideróforos. En general a concentraciones bajas de hierro, se restringe el crecimiento microbiano y a concentraciones elevadas se promueve la muerte de *Brucella*<sup>(48, 81)</sup>.

*B. abortus* contiene tres grupos de proteínas principales de la ME, cuyo papel como antígeno es en gran parte desconocido. Sus características se resumen a continuación:

- Grupo 1: De peso molecular de 88-94 Kda, posiblemente relacionada con ciertas funciones de la biosíntesis de la propia envoltura.
- Grupo 2: De peso molecular de 36-38 Kda, equivalente a las porinas de otros gram negativos, formando un estado nativo de agrupaciones triméricas por las que penetran ciertos solutos. Dos genes, omp2a y omp2b, codifican estas porinas, pero solo el segundo parece expresarse *in vitro*.
- Grupo 3: De peso molecular de 25-31 Kda y codificados en los genes omp25 (único expresado en *Brucella*) y omp31<sup>(59)</sup>.

En la actualidad, como resultado de la clonación y secuenciación de los genes que codifican las proteínas de membrana externa (OMPs), se les ha asignado otra nomenclatura: Omp25, Omp31 y Omp2b. Otras Omps se han identificado pero, por ser menos abundantes se denominan proteínas menores y presentan masas moleculares de 10, 16.5, 19 y 89 kDa. Con base en estudios genéticos y de su secuencia de aminoácidos, las de 10, 16.5 y 19 kDa, se han identificado como lipoproteínas de membrana externa, denominándolas Omp10, Omp16 y Omp19, respectivamente. La Omp16, pertenece a la familia de lipoproteínas asociadas al peptidoglicano presente en bacterias gram negativas. La Omp1 de 89 kDa se encuentra expuesta en la superficie de la célula, finalmente, se ha puesto de manifiesto la existencia de acuaporinas en la membrana externa, que son proteínas transmembranales con canales para agua y que pertenecen a la familia de las proteínas intrínsecas mayores. Las Omps mayores o principales se encuentran expuestas en la superficie de la membrana externa, sin embargo, están menos accesibles en las cepas lisas que en las rugosas, debido al impedimento estérico que causan las largas y abundantes cadenas O del LPS en las cepas lisas <sup>(15, 28, 30, 31, 34, 35, 89)</sup>.

Han sido caracterizadas numerosas proteínas de membrana externa, interna, citoplásmicas y periplásmicas. Algunas son reconocidas por el sistema inmune durante la infección y solo se han reportado en *Brucella*, por lo que serían de gran utilidad en futuras pruebas diagnósticas o para ser consideradas en las nuevas vacunas <sup>(14, 28, 39, 85)</sup>.

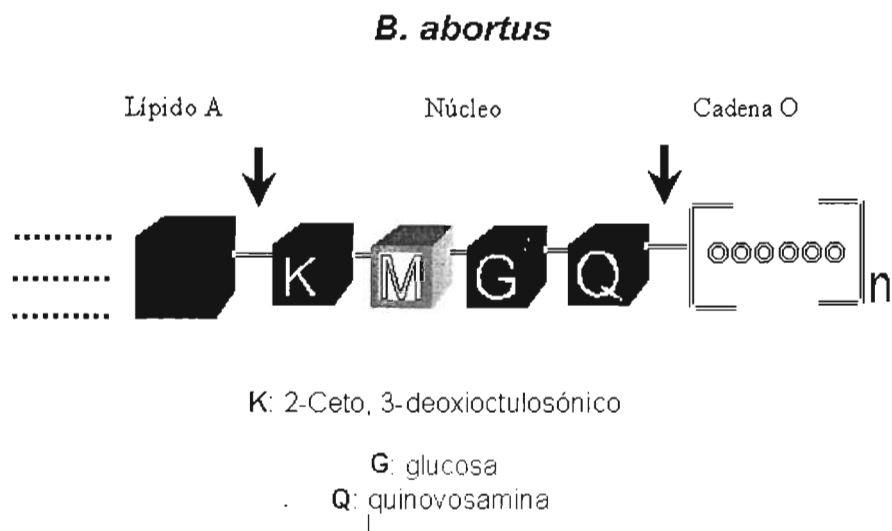
### **1.3 Lipopolisacárido (LPS)**

La molécula de LPS es el principal componente de la membrana externa de *Brucella* y posee propiedades bioquímicas y biológicas que lo diferencian del LPS del resto de las bacterias gram negativas, especialmente en cuanto a su contenido en ácidos grasos. Es el antígeno inmunodominante en esta especie y frente a él aparecen anticuerpos aglutinantes <sup>(28, 39, 83)</sup>, que se pueden detectar mediante numerosas pruebas

serológicas en la que se utiliza como antígeno, tanto células enteras, como extractos celulares que contengan LPS.

Su composición química ha sido estudiada particularmente en *Brucella abortus* y *Brucella melitensis*, especies en fase lisa y que al igual que *Brucella suis* y *Brucella neotomae* poseen LPS liso y dan colonias con morfología lisa <sup>(58, 59)</sup>. El lipopolisacárido está constituido por tres fracciones, **Figura 1.3.1:**

Una parte glucolípica (lípid A), un núcleo y un polisacárido (cadena O).



El primero de ellos es el que está unido a la membrana externa de *Brucella* y está formado por un disacárido de diaminoglucosa sustituido con beta-hidroxiácidos y otros ácidos grasos de cadena larga, como antígeno el lípid A no parece tener relevancia diagnóstica <sup>(60)</sup>, se ha demostrado que juega un papel importante en la resistencia a los péptidos catiónicos bactericidas. De esta manera el LPS se considera un factor de virulencia <sup>(41)</sup>, que genera una eficiente barrera protectora cuando la bacteria se expone a la actividad digestiva de los fagocitos <sup>(28)</sup>, mientras que la cadena

O, es decir, la fracción polisacáridica del LPS-S, está dirigida hacia el exterior ocultando a los determinantes antigénicos de las proteínas de la membrana externa. Entre ambos se encuentra el núcleo que contiene 2-ceto 3-deoxioctulosonato (KDO) quinovosamina, manosa, glucosa y que carece de heptosa, aunque de las dos últimas se desconoce el orden y el número exacto de unidades <sup>(28)</sup>.

Las características antigénicas de *Brucella*, vienen determinadas por el lipopolisacárido contenido en su pared celular en el que se distinguen dos antígenos denominados A y M, cuya relación varía según la especie; así el antígeno A, es un determinante principal para las especies *B abortus* y *B suis* mientras que el antígeno M es para la especie *B melitensis* <sup>(18)</sup>.

Solo las colonias rugosas, se aglutinan en presencia de suero policlonal de conejo anti-R; no lo hacen con los sueros anti-M ó anti-A, dirigido contra los antígenos en fase lisa <sup>(29, 33)</sup>.

## 1.4 Patogenia

*Brucella* es un microorganismo de localización y multiplicación intracelular facultativa, pudiendo reproducirse tanto en el medio extracelular orgánico como en el interior de los macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, después de haber sido fagocitados por ellos. En su interior las cepas virulentas pueden sobrevivir durante períodos de tiempo prolongado, existiendo la posibilidad de que la evolución de la enfermedad dependa de la capacidad bactericida de estas células. El microorganismo, aquí se encuentra protegido de los anticuerpos, así como de los diversos agentes terapéuticos <sup>(18, 44)</sup>.

Posteriormente a su entrada en el hospedador a través de las vías digestiva, nasofaríngea o cutánea, *Brucella* migra por vía linfática hasta los linfonodos regionales, donde se multiplica produciéndose de esta forma la infección. Esta etapa de colonización local o regional corresponde al período de incubación de

duración variable que oscila entre 14 y 180 días, prolongándose hasta la aparición de anticuerpos o de los primeros signos <sup>(18)</sup>.

Los fagocitos en general y los polimorfonucleares en particular, juegan un importante papel como primera línea de defensa contra la infección de bacterias patógenas y debido a la habilidad de *Brucella* para invadir, constituye el eje de la patogenia de la enfermedad, debido a que, además de protegerlos contra anticuerpos y agentes antimicrobianos, facilitan su diseminación hasta los linfonodos donde se multiplican <sup>(12)</sup>.

Algunos autores estiman que, dependiendo de la virulencia de la cepa y de la susceptibilidad del animal, *Brucella* puede ser fagocitada por los neutrófilos y macrófagos, quienes pueden a su vez ser fagocitados y destruidos por los macrófagos del sistema inmune, auxiliados por los anticuerpos y los linfocitos T, o bien en el caso de animales susceptibles y después de ser fagocitada, se reproduce en el interior de los polimorfonucleares a los que destruye, infectando con posterioridad a nuevas células <sup>(62)</sup>.

El mecanismo de penetración de *Brucella* en los polimorfonucleares es similar al de otras bacterias. El contacto entre ambos y la fagocitosis se inicia previa opsonización del microorganismo con opsoninas C<sub>3</sub> e IgG. Los procesos de englobamiento, ingestión y formación del fagosoma finalizan con la fusión de los extremos de la membrana del polimorfonuclear alrededor de *Brucella* <sup>(75)</sup>.

Aunque el mecanismo de supervivencia en el interior de los polimorfonucleares no ha sido definitivamente esclarecido, se estima que las cepas virulentas y avirulentas de *Brucella abortus* (se puede hacer extensible a otras especies de *Brucella*) son susceptibles a los mecanismos letales de oxidación de los fagocitos cuando éstos funcionan normalmente, es decir, si el proceso de degranulación no está alterado, por lo que es lógico pensar que la habilidad de este microorganismo se basa en la inhibición de este proceso y está ligada a determinados

componentes químicos de su membrana externa, como la adenina y el 5' guanosina monofosfato, que podrían ser factores importantes para la supervivencia intracelular de *Brucella* <sup>(44)</sup>.

A partir de los linfonodos se produce la diseminación de *Brucella*, que inicia con su paso al torrente circulatorio, en cantidades poco numerosas, aunque suficiente para posibilitar la colonización de numerosos linfonodos y de los tejidos como el bazo, el hígado o la médula ósea, provocando una bacteremia que generalmente coinciden con un período febril en el hospedador. Esta fase constituye para algunos autores un requisito imprescindible para alcanzar la placenta e implantarse en ella, está generalmente aceptado que, en las hembras gestantes el nivel de bacteremia en esta fase de la enfermedad está directamente relacionado con la infección fetal y el aborto <sup>(32)</sup>.

En esta fase secundaria o estado de adaptación se puede producir una evolución variable de la enfermedad, que dependerá de la totalidad de factores que influyen en la susceptibilidad en general, tanto en ovinos como en caprinos, se suele producir su localización aislada, bien sea placentaria, mamaria, osteoarticular, hepatoesplénica y testicular <sup>(18, 62)</sup>.

La colonización de la glándula mamaria por *Brucella*, podría significar la garantía de persistencia en sucesivas gestaciones, como lo demuestran los resultados del cultivo de leche y tejidos mamaros provenientes de necropsias realizadas en cabras enfermas después de abortar <sup>(18, 44, 73)</sup>.

*Brucella abortus* tiene una predilección característica por el tejido bovino fetal. La cuantificación de la distribución tisular de los microorganismos, ha demostrado que del 60 al 85% de los microorganismos extraídos de los tejidos de los animales infectados están presentes en los cotiledones fetales. El alcohol polihídrico de 4 carbonos eritritol (OHCH<sub>2</sub>-CHOH-CHOH-CH<sub>2</sub>OH) parece ser un producto fetal cuantificable en el tejido placentario y los líquidos amniótico y



alantoico de los fetos bovinos normales. Este alcohol actúa de forma eficiente como una fuente de hidratos de carbono en un medio basal para la *B. abortus* virulenta, pero no para los microorganismos atenuados o rugosos. También incrementa la proliferación intracelular de los microorganismos en un sistema *in vitro* que emplea fagocitos. Por lo tanto, existe una correlación significativa del organotropismo en los bovinos, los ovinos y los caprinos en cuanto a la presencia de eritritol. La ausencia de esta localización tisular en la enfermedad humana se correlaciona con la ausencia de eritritol en estos órganos <sup>(44)</sup>.

Durante la colonización del útero gestante, la bacteria invade el epitelio trofoblástico que envuelve al embrión y se multiplica dentro de los trofoblastos pasando después al epitelio corioalantoideo y de ahí a los tejidos vecinos, se dice que esta localización puede serle beneficiosa para su crecimiento, ya que se ha sugerido que utiliza enzimas y metabolitos de las partes afectadas <sup>(7, 48, 80, 81)</sup>.

## 1.5 Vacunas

En cuanto a la prevención de la brucelosis se desarrollaron vacunas, de las cuales, la cepa 19 de *B. abortus*, es una cepa de baja virulencia, fue desarrollada en 1923 y aprobada en 1941, ha sido ampliamente usada en el ganado bovino desde esa fecha. Una característica es su habilidad para inducir en suero y leche, anticuerpos específicos contra la cadena O de LPS, los cuales interfieren en la interpretación de los resultados de las pruebas diagnósticas de rutina para brucelosis. Con la finalidad de solucionar el problema se desarrolló la cepa RB51, la cual esencialmente no tiene la cadena O y por lo tanto no genera anticuerpos que alteren la interpretación de las pruebas diagnósticas convencionales <sup>(77, 84)</sup>.

Cuando se usa una sola vacunación, su efecto protector es similar al que se inducía al emplear la vacuna cepa 19. En México la vacunación con la RB51, se lleva a cabo una vez en la vida entre los 3 a 6 meses con la dosis becerra ( $1 \times 10^{10}$  UFC) o después de los ocho meses aplicando la dosis para vaca ( $3 \times 10^9$  UFC),

dosis reducida, de manera práctica en zonas endémicas de brucelosis en nuestro país, sólo se recomienda aplicar una vez la revacunación con RB51 <sup>(5, 18, 28)</sup>.

La vacuna cepa RB51 se utiliza actualmente en forma oficial en Estados Unidos de América, en reemplazo de la cepa 19. Su uso también ha sido aprobado e implementado en Chile, Colombia, México y Venezuela <sup>(87)</sup>.

La vacuna RB51 fue desarrollada en 1981 y en México la Secretaría de Agricultura Ganadería, Pesca y Alimentación autorizó el uso de la vacuna RB51 desde 1996, así como la aplicación de ésta por Médicos Veterinarios Zootecnistas. Desde 1997 la producción, comercialización y distribución de la vacuna RB51 para prevención de la brucelosis en todo el territorio nacional, con la publicación de la Norma Oficial Mexicana NOM-053-ZOO-1995 <sup>(25, 26)</sup>.

La cepa RB51 fue seleccionada a partir del crecimiento de la cepa de *B. abortus* 2308 en presencia de penicilina y rifampicina, se empleó para denominarla la "R" por ser una cepa rugosa, la "B" por *Brucella* y "51" (no indica el número de pases necesarios para obtenerla) corresponde a una nomenclatura interna del laboratorio que la desarrolló. La cepa RB51 es una cepa atenuada, como lo indican los ensayos efectuados en ratón, cobayo, caprino y vacuno, de los cuales se elimina en un espacio de tiempo relativamente corto con capacidad abortiva baja o nula, cuando se emplea en protocolos de vacunación de una sola dosis, su capacidad protectora en el vacuno es similar aparentemente a la cepa 19 <sup>(20, 21, 28, 68, 69)</sup>.

La presencia de moléculas de perosamina en el LPS de algunas bacterias gram negativas, es responsable de la actividad antigénica cruzada en las pruebas serológicas, utilizadas en el diagnóstico de la brucelosis animal producida por las especies de *Brucella* en fase S con la infección natural o artificial y se observa en infecciones donde interviene *E. hermanni* (biogrupo atípico de *E. coli*) y *E. coli* O:157, los serotipos del grupo N del género *Salmonella* O:30, *Francisella tularensis* y *Vibrio cholerae* O:1, y sobre todo el serotipo O:9 *Yersinia enterocolitica*; todas ellas

contienen una cadena O idéntica a la de *B. abortus* así como algún determinante M. Este hecho debe de tomarse en cuenta al realizar el diagnóstico por métodos serológicos, ya que con frecuencia se producen errores y no se establece un buen diagnóstico diferencial, esto ha sido ampliamente demostrado por numerosos investigadores<sup>( 56, 63)</sup>.

Las investigaciones y el progreso alcanzado durante los últimos años en el diagnóstico inmunológico de la brucelosis, tanto en ovinos como en caprinos, ha sido escaso. Ya que las técnicas utilizadas actualmente, conforman uno de los pilares básicos en los programas de control y erradicación de esta enfermedad en la mayoría de los países del mundo, fueron estudiadas y estandarizadas para el diagnóstico de la brucelosis bovina y con mínimas modificaciones, también han sido aplicadas en ovinos y caprinos. Es por ello la importancia de las proteínas de membrana externa de *Brucella* para utilizarlas como antígenos en pruebas de diagnóstico específicas en ovinos, obteniendo mayor rapidez y confianza de las pruebas realizadas.

## II. JUSTIFICACIÓN

Uno de los aspectos más importantes en el uso de la cepa RB51 y que justifican su utilización como vacuna contra la brucelosis en bovinos, es el hecho de que ésta cepa no posee la cadena O del lipopolisacárido y por tal motivo, no induce en el animal la producción de anticuerpos contra el LPS que puede ser detectado con alguna de las pruebas de diagnósticos tradicionales <sup>(84)</sup>.

Los trabajos recientes realizados con varias especies animales confirman una actividad protectora excelente en cerdos contra la infección por *B suis* en condiciones de campo <sup>(50, 52)</sup> y también ha demostrado que la cepa RB51 puede proteger hasta al 93% de las cabras vacunadas, contra la infección por *B melitensis*. Los resultados preliminares en el ovino contra *B melitensis* sugiere que la RB51 no induce una inmunidad protectora en esta especie cuando se usa como dosis única; siendo necesarios más estudios <sup>(43)</sup>.

### III. OBJETIVOS

Determinar la presencia de anticuerpos contra las proteínas de membrana externa de la cepa RB51 de *Brucella abortus* en borregas primíparas después de la vacunación.

Determinar por medio de un estudio bacteriológico, si la vacuna RB51 de *Brucella abortus* en dosis reducida es eliminada por borregas primíparas.

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 Animales.

En una explotación ovina de 100 animales, localizada en San Andrés Jaltenco, Zumpango, Estado de México, se trabajó con 24 borregas primaras seleccionadas al azar, raza polipay, con una edad promedio de 1 año (entre 8 y 12 meses de edad), con un peso promedio de 25 Kg, libres de brucelosis utilizando la prueba de Rosa de Bengala (RB) y clínicamente sanas.

### 4.2 Vacuna y Vacunación.

Los animales fueron divididos en dos grupos: Un grupo de 14 borregas recibió una dosis simple de  $3 \times 10^9$  unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa RB51 de *Brucella abortus* (dosis reducida) <sup>1</sup> de la cual se aplicaron 2 ml por vía subcutánea en el área axilar, el otro grupo fue inoculado con 2 ml de solución salina fisiológica (SSF) y permaneció como grupo control. Se obtuvieron muestras de suero de las borregas a los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 70, y día 84 posvacunación de ambos grupos.

### 4.3 Prueba serológica previa a la vacunación.

Se realizó la prueba de Rosa de bengala <sup>2</sup> al 3% para diagnóstico de brucelosis, previo a la vacunación, para la identificación de las brucelas lisas. A las 24 borregas se les tomaron muestras de sangre por venopunción en la yugular y se obtuvieron los sueros por medio de centrifugación a 1, 000 xg por 15 minutos y se realizó la prueba de RB. En un aglutinoscopio se colocaron 30  $\mu$ l del antígeno y 30  $\mu$ l de los sueros, se mezclaron, haciendo movimientos rotatorios a los cuatro minutos después se realizó la lectura en una caja con fondo negro <sup>(27, 51)</sup>.

---

<sup>1</sup> (Lab. Litton de México, S.A de C.V)

<sup>2</sup> (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios)

#### **4.4 Obtención de proteínas de membrana externa (PME) de *Brucella abortus* cepa RB51.**

Se cultivó en agar biotriptasa la cepa RB51 de *Brucella abortus* y se incubaron a 37° C durante 3 días y se cosecharon en solución salina fisiológica, después se inactivaron por calor a 60° C durante 1 hora, se adicionó una mezcla comercial de inhibidores de proteasas la cual contiene inhibidores de serina, cisteína y metaloproteasas <sup>3</sup>. Las bacterias ya inactivadas, fueron sonicadas a una potencia real de 100 watts, manteniendo la suspensión celular en un baño de hielo, durante 1 minuto por 1 minuto de descanso, 8 veces. Posterior a esto fueron, sometidas a otro ciclo de 2 minutos con 30 segundos de reposo, 3 veces, y ambos procedimientos se repiten 7 veces, empleando un generador Sonifier-450 <sup>4</sup> equipado con una micropunta. Entre cada ciclo las muestras fueron ultracongeladas con nitrógeno líquido durante 5 minutos y descongeladas rápidamente para favorecer la ruptura de las bacterias.

Para la extracción de proteínas, las muestras sonicadas se centrifugaron a 4, 424 xg por 15 minutos para remover restos celulares. El sobrenadante se colocó en una ultracentrífuga a 120, 000 xg por 1 hora a 8° C. El sedimento corresponde a la membrana interna, y membrana externa, el sobrenadante corresponde a las proteínas del citosol. El paquete se resuspendió en 10 µl de Sarcosyl al 1% (N-Lauroil-Sarcosina) y se mantuvo en agitación suave por 30 minutos y se centrifugó nuevamente a 150, 000 xg por 1 hora a 8° C, obteniendo en el paquete las proteínas de membrana externa, y en el sobrenadante las proteínas de membrana interna; la membrana externa, se resuspendió en 300 µl de HEPES (ácido H-2-hidroxietil piperazine-N-2-etanosulfónico) 10 µM, con un pH 7.5, con inhibidores de proteasas.

---

<sup>3</sup> (Complete, Lab. Roche).

<sup>4</sup> (Branson Ultrasonic Co., Danbury, Conn, EEUU)

Para la separación cuantitativa de las proteínas unidas a compuestos orgánicos, se procedió a tomar 100  $\mu\text{l}$  de la fracción de la proteína de membrana externa y se le agregó 400  $\mu\text{l}$  metanol, se agitó y se centrifugó a 9, 500 xg por 10 segundos. Después se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de cloroformo, nuevamente se agitó y se centrifugó. Posteriormente para la separación de la fase orgánica se adicionaron 300  $\mu\text{l}$  de agua destilada se agitó y se centrifugó, la fase superior se removió y se desechó.

A la fase restante se le adicionaron 300  $\mu\text{l}$  de metanol, se agitó y se centrifugó por 2 minutos a 9, 500 xg. El sobrenadante se removió. Posteriormente, se cuantificaron las proteínas por el método de microtitulación de Bradford,<sup>5</sup> utilizando como standard albúmina sérica de bovino a diferentes concentraciones, esto se realizó en una microplaca de fondo plano, y la lectura fue a 600 nm.

#### **4.5 Electroforesis para el análisis cuantitativo de las PME.**

Se realizaron corrimientos electroforéticos de las PME en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio al 10 % (PAGE-SDS). Se usaron como marcadores de peso molecular, albúmina sérica de bovino, ureasa y anhidrasa carbónica.<sup>6</sup> Se colocaron 10  $\mu\text{l}$  de la fracción de la PME y otros 10  $\mu\text{l}$  del buffer de muestra<sup>7</sup> en cada espacio del gel. El corrimiento fue a 80 volts por 20 minutos en el gel concentrador y posteriormente a 120 volts por una hora, hasta verificar que la muestra completara el recorrido del gel.

De cada corrimiento que se realizó se hicieron dos geles, uno para ser teñido con Azul de Coomassie y otro para ser transferido a membrana de nitrocelulosa.

---

<sup>5</sup> (Apéndice 6.1)

<sup>6</sup> (Sigma Company)

<sup>7</sup> (Apéndice 4.4)



## 4.6 Inmunotransferencia

Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa por el método de transferencia semiseco usando una cubeta Trans-Blot SD <sup>8</sup>. Se procedió a montar la inmunotransferencia utilizando como metodología el sistema de emparejado <sup>(55)</sup>. La transferencia se corrió a 15 voltios durante una hora y media. Terminado el tiempo de transferencia la membrana fue tratada con leche descremada al 2% por 24 horas; se retiró la leche descremada y se cortó en tiras, cada tira tiene 0.7 cm de ancho, se lavaron las tiras de la membrana con PBS Tween 20 <sup>9</sup> por tres ocasiones y con solución buffer fosfatos (PBS 1x) por dos ocasiones, estos lavados se realizaron entre cada paso de la técnica. Posteriormente, se incubó toda la noche a 4° C con el suero de las borregas vacunadas con *B. abortus* cepa RB51. Después la membrana fue incubada con conjugado de proteína G peroxidada diluida a 1:500 por dos horas a temperatura ambiente en agitación y por último, se revelaron las proteínas con 3,3-Diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno <sup>(22, 55)</sup>.

## 4.7 ELISA-indirecta para la detección de anticuerpos contra PME en borregas vacunadas usando proteína G, anti-IgG y anti-IgM de ovino.

Para la estandarización de la prueba de ELISA-Indirecta se realizaron diluciones de 1:50, 1:100, 1:150, 1:200 del antígeno (PME de *B abortus* cepa RB51), en el caso de los sueros controles positivos y negativos las diluciones fueron de 1:20, 1:40, 1:80, en PBS 1x <sup>10</sup>. Para la evaluación, se realizó la técnica de ELISA descrita abajo, para obtener las diluciones con mejor respuesta.

La ELISA-Indirecta se realizó en microplacas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano con las fracciones de PME de *Brucella abortus* como antígeno, en

---

<sup>8</sup> (Bio-Rad Labs, Richmond, Calif, EEUU )

<sup>9</sup> (Apéndice 5.4)

<sup>10</sup> (Apéndice 5.3)

solución buferada de carbonato–bicarbonato pH 9.6 <sup>11</sup> a una dilución de 1:100, este antígeno se pegó al fondo de las placas por incubación toda la noche a 4° C (sensibilización de la placa), sellando las microplacas con plástico <sup>12</sup> para evitar la evaporación. Una vez que se pegó el antígeno a las microplacas, se colocaron 50 µl de una solución bloqueadora de leche descremada al 2%, se incubó a 37° C por 30 minutos y se procedió al lavado. Posteriormente se depositaron 50µl de los sueros problema diluidos 1:20 en cada uno de los pozos de la microplaca.

La microplaca se incubó durante 30 minutos a 37° C. Los sobrenadantes fueron decantados y los pozos fueron lavados 3 veces con solución de lavado <sup>13</sup>. Posteriormente se añadió 50µl de conjugado de proteína G peroxidada <sup>14</sup> diluido en proporción 1:1000 en solución de TRISS,<sup>15</sup> la microplaca se incubó 30 minutos a 37° C. Posteriormente al segundo lavado, se agregaron 100 µl a cada pozo de la solución sustrato de ácido cítrico, peróxido de hidrógeno y ABTS <sup>16</sup>. Se procedió a agitar la microplaca durante 10 minutos hasta que el color verde de los controles apareció y se detuvo la reacción agregando 100 µl de ácido sulfúrico 3M <sup>17</sup>. Se determinó el desarrollo de color por medidas de absorbancia a 405 nm. La técnica descrita anteriormente se aplicó utilizando conjugados anti-IgG de ovino elaborado en conejo, anti-IgM de ovino elaborado en conejo, conjugados con peroxidasa <sup>18</sup>.

---

<sup>11</sup> (Apéndice 3.3)

<sup>12</sup> (Parafilm)

<sup>13</sup> (Apéndice 3.4)

<sup>14</sup> (Sigma Company)

<sup>15</sup> (Apéndice 3.1)

<sup>16</sup> (Fluka Biochemical)

<sup>17</sup> (Apéndice 3.5)

<sup>18</sup> (ImmunoResearch, Laboratories INC)

#### 4.8 Bacteriología.

Para comprobar si había eliminación de la cepa RB51 vacunal de *Brucella abortus* después de la vacunación, se realizaron estudios bacteriológicos de los exudados vaginales de las borregas vacunadas cada semana, desde el día cero hasta el día 84 (0,7,14,21,28,35,42,49,56,70,84). Las muestras fueron tomadas con hisopos estériles utilizando el medio de transporte de Stuart. Estos se sembraron en placas que contenían un medio selectivo de *Brucella* (Thayer-Martin modificado con hemoglobina)<sup>19</sup>. Se incubaron a 37° C por 5 días en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Las colonias sospechosas se resembraron en el mismo medio y se realizaron pruebas bioquímicas, catalasa, nitrato, oxidasa, ácido sulfhídrico y urea, para la identificación de *Brucella*<sup>(28)</sup>.

#### 4.9 Hiperinmunización de conejos y borregos para la elaboración de suero control positivo.

Para obtener el suero control positivo, se sembraron en agar *Brucella* la cepa RB51, se incubaron a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub>. Después se recolectaron las colonias crecidas, se colocaron en tubos tipo "falcon" con 5 ml de agua destilada estéril y posteriormente se ajustó la concentración de las bacterias a  $3 \times 10^9$ , se procedió a inocular a dos conejos y dos borregos, recibiendo dos aplicaciones cada uno (**Cuadro 4.9.1**).

---

<sup>19</sup> (Apéndice I.1)

**Cuadro 4.9.1.- Hiperinmunización de conejos y borregos para utilizar como controles positivos.**

<b>Animales</b>	<b>Dosis bacteria</b>	<b>Vía Inoculación</b>	<b>Num. de animales inoculados</b>	<b>Número de inoculaciones</b>
Borregos	2 ml	Subcutánea	2	3
Conejos	2 ml y 0.5 ml	Subcutánea y conjuntival	2	4

A cada conejo y borrego, se les extrajeron 7 ml de sangre en tubo sin anticoagulante ocho días después de la inoculación con la cepa RB5I de *Brucella abortus*, se volvió a inocular a los conejos y borregos. En el caso de los conejos, el último sangrado se hizo en blanco (extracción de toda la sangre posible) y en el caso, de los borregos se extrajeron en total 40 ml de sangre, y se obtuvo el suero por centrifugación durante 15 minutos a 1, 000 xg y posteriormente se almacenaron en tubos eppendorf previamente identificados en congelación.

## **V. RESULTADOS**

### **5.1 Análisis serológico previo a la vacunación con la cepa RB51 de *Brucella abortus*.**

A las muestras obtenidas de las 24 borregas seleccionadas para el estudio, previa vacunación con la cepa RB51, se les realizó la prueba de RB, para determinar, que los animales estaban libres de Brucelosis. Los resultados en esta prueba fueron negativos en todos los casos por tal motivo, se procedió a la vacunación.

### **5.2 Análisis bacteriológico en borregas vacunadas con la cepa RB51 de *Brucella abortus*.**

A partir de las muestras de exudado vaginal, que se obtuvieron durante el desarrollo de este trabajo, se realizaron cultivos bacteriológicos para determinar la posible eliminación de la cepa vacunal. De estas muestras solo en dos casos se aislaron bacterias con características morfológicas sugerentes de *Brucella*. A estas bacterias se les realizaron las pruebas bioquímicas sugeridas para la identificación de *Brucella*. Los resultados de estas pruebas se resumen en los **Cuadros 5.2.1 y 5.2.2**. Como puede observarse estos resultados no coinciden con las características bioquímicas del género. Por esta razón se considera que la cepa vacunal no se eliminó durante el periodo que duro este trabajo.

### **5.3 Obtención de las proteínas de membrana externa de la cepa RB51 de *Brucella abortus*.**

Obtenido el antígeno se realizó la cuantificación de proteínas, por el micrométodo de Bradford utilizando una curva de calibración con albúmina sérica bovina, el cálculo de la concentración de la proteína de *B abortus* cepa RB51, fue de 5 mg/ml de proteína. La concentración de proteína que se obtuvo permitió

obtener el volumen necesario para la realización de la electroforesis y de la inmunotransferencia, a una concentración de 10 µg por carril.

#### **5.4 Estandarización de la técnica de ELISA-Indirecta.**

Se realizaron diferentes diluciones, de sueros controles positivos y negativos a *Brucella*, así como del antígeno para determinar las diluciones óptimas, para la realización de la prueba. Estas diluciones fueron de 1:20, 1:40, 1:80 para los sueros, y 1:50, 1:100, 1:150, 1:200 para el antígeno.

En los resultados obtenidos para el suero, se obtuvo una densidad óptica (DO) de 0.350, para la dilución 1:20 y para la dilución de 1:80 se obtuvo una DO de 0.178, por esta razón para probar los sueros problema en la técnica de ELISA se eligió la dilución 1:20. La dilución óptima del antígeno, fue de 1:100 debido a que la DO fue de 0.300, las demás diluciones permanecieron por debajo del valor obtenido en 1:100.

#### **5.5 Determinación de anticuerpos contra las PME de la cepa RB51 de *Brucella abortus* en sueros de borregas vacunadas.**

Los resultados obtenidos de la técnica de ELISA-Indirecta se observa en la **Gráfica 5.5.1**, en general se observa que el grupo de los animales vacunados, presenta niveles elevados de respuesta ( $p < 0.05$ ), siendo más evidente a los días 7 y 70 posvacunación. Las DO alcanzadas fueron de  $0.174 \pm 0.068$  y  $0.172 \pm 0.065$  respectivamente. Durante el período evaluado se observaron variaciones poco significativas a excepción del día 56 donde se observó un decremento importante, con un valor de  $0.097 \pm 0.071$ . Los datos de DO obtenidos en el grupo control se mantuvieron bajos, con un ligero incremento en el día 14 ( $0.0872 \pm 0.097$ ), pero no mostrando diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Este valor relativamente alto, desciende posteriormente y permanece estable durante los demás muestreos.

Es conveniente señalar, que en este método de ELISA se utilizó un conjugado, de proteína G peroxidada. Los resultados obtenidos con los diferentes isotipos de inmunoglobulinas se muestran más adelante.

En el caso de la ELISA-Indirecta utilizando como conjugado anti-IgM de ovino elaborado en conejo, conjugado con peroxidasa, se aprecia en la **Gráfica 5.5.2**, una notable respuesta el día 7 posvacunación, alcanzando una DO de  $0.274 \pm 0.050$ , para después notar un decremento de  $0.209 \pm 0.080$ , posteriormente se observan estables en los días posteriores al muestreo. Con respecto al grupo de los animales no vacunados, permanecen con valores estables durante el período de este trabajo.

Usando como conjugado anti-IgG de ovino elaborado en conejo, conjugado con peroxidasa, se observa un incremento los días 7 ( $0.633 \pm 0.067$ ), 21 ( $0.641 \pm 0.0602$ ), 35 ( $0.633 \pm 0.0274$ ) hasta el día 49 obteniendo una DO mayor que los días mencionados de  $0.6618 \pm 0.060$ , con respecto al grupo no vacunado permanece, por debajo del grupo vacunado. **Gráfica 5.5.3**.

### **Análisis estadístico**

Se realizó la comparación de datos entre los grupos, por medio de un análisis de varianza al azar usando el programa SPSS (statistical package for the social sciences). En donde los resultados de la ELISA-Indirecta, ( $p < 0.05$ ) fueron considerados como significativos.

## **5.6 Reconocimiento de las PME de la cepa RB51 de *Brucella abortus* en sueros de borregas vacunadas mediante la técnica de Inmunotransferencia.**

Para esta prueba se seleccionaron los sueros que mostraron en ELISA una DO mayor, considerando que la DO es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes. Se realizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS para la separación de las proteínas, éstas fueron transferidas del gel a un papel de nitrocelulosa. En la **Figura 5.6.1**, se muestra el perfil de reconocimiento hacia las PME de *Brucella abortus* RB51, como puede observarse se identifican tres proteínas principales de 38, 45, y 65 kDa. También se observa un ligero reconocimiento hacia proteínas de bajo peso molecular de 7 kDa.

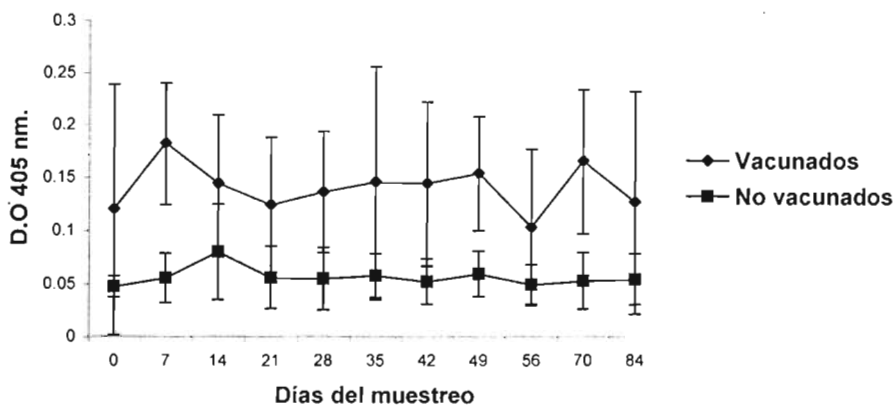


<b>Cuadro 5.2.1. Características bioquímicas de los aislamientos obtenidos de exudado vaginal de borregas vacunadas con la cepa RB51 de <i>Brucella abortus</i></b>		
<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Aislamiento 1</b>	<b>Aislamiento 2</b>
CATALASA	-	-
NITRATO	-	-
OXIDASA	-	-
PRODUCCIÓN DE H <sub>2</sub> S	-	-
UREA	-	-

Es importante mencionar la presencia de otros agentes aislados, como *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp* y otras enterobacterias.

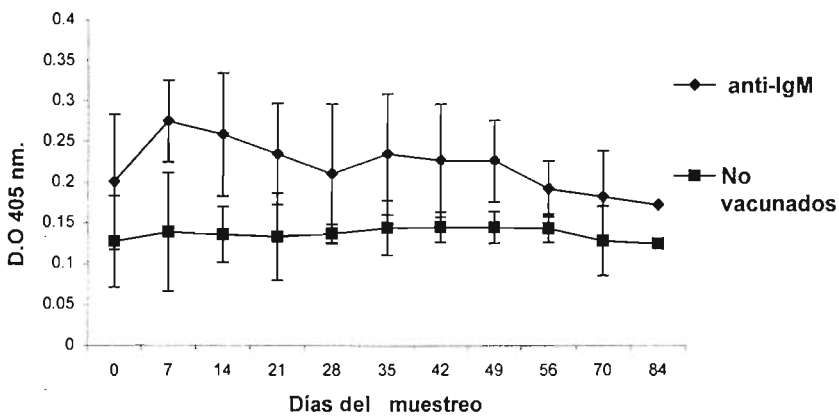
<b>Cuadro 5.2.2. Características bioquímicas de los aislamientos y parámetros comparativos del género <i>Brucella</i>.</b>		
<b>Prueba bioquímica</b>	<b>Aislamiento 1 y 2</b>	<b><i>Brucella</i></b>
<b>MORFOLOGÍA</b>	<i>Staphylococcus</i> y <b>Streptococcus sp</b>	Pequeños cocobacilos
CATALASA	-	+
NITRATO	-	+
OXIDASA	-	+
PRODUCCIÓN DE H <sub>2</sub> S	-	+
UREA	-	+

### Conjugado de Proteína G peroxidada



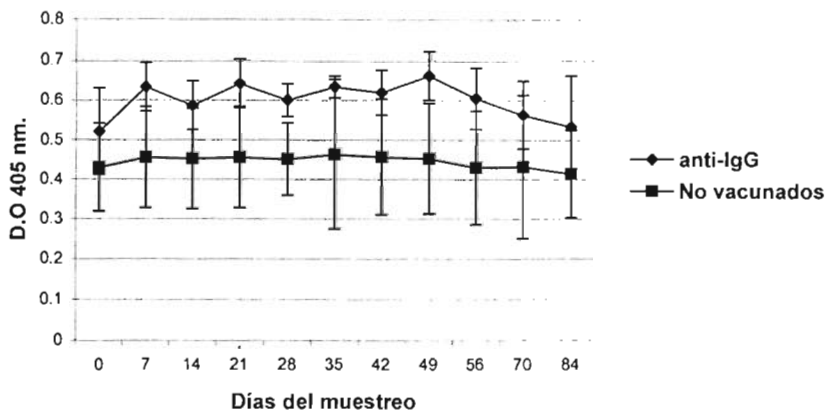
Gráfica 5.5.1. Comportamiento serológico de anticuerpos contra las PME de *Brucella abortus* cepa RB51 dosis reducida, en animales vacunados, utilizando la técnica de ELISA-Indirecta. Como se observa, los animales vacunados muestran una respuesta marcada a la vacunación.

### Conjugado anti-IgM de ovino peroxidada



Gráfica 5.5.2. Comportamiento de los animales vacunados usando como conjugado anti-IgM de borrego peroxidada, elaborado en conejo, se observa una mayor respuesta en los vacunados, aunque en el día 28 muestra un decremento no muy marcado por encima de los valores del grupo no vacunado.

### Conjugado anti-IgG de ovino peroxidada



Gráfica 5.5.3. Resultados obtenidos usando como conjugado en la prueba de ELISA-Indirecta anti-IgG de borrego peroxidada. Los animales vacunados con RB51 presentan mayor respuesta, que los animales no vacunados.

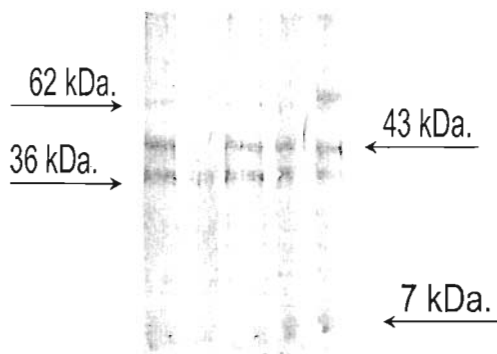


Figura 5.6.1. Inmunotransferencia utilizando las PME de *Brucella abortus* como antígeno en borregas vacunadas. En la cual se muestra el perfil de reconocimiento hacia las PME de *Brucella abortus* cepa RB51. Como puede observarse, se identifican tres proteínas principales de 62, 43, y 36 kDa. También se observa un ligero reconocimiento hacia la proteína de bajo peso molecular de 7 kDa.

## VI. DISCUSIÓN

La prueba más recomendada en las especies domésticas para la determinación de la prevalencia de brucelosis, es la prueba de Rosa de Bengala, esta prueba y la de ELISA son sugeridas por la Organización Internacional de Epizootias (OIE) para su uso en el diagnóstico de la brucelosis <sup>(27)</sup>. El diagnóstico se debe de realizar en diferentes condiciones de acuerdo a la especie animal. En ganado bovino se utiliza una concentración celular al 8% del antígeno, mientras que en los caprinos y ovinos se utiliza al 3% <sup>(51)</sup>. En este trabajo los sueros de los animales obtenidos previa vacunación resultaron negativos, dando esto pauta a la vacunación.

La prueba de RB utiliza una concentración celular al 3%, y ha sido recomendada para el diagnóstico de brucelosis, causada por brucelas lisas, en borregos y cabras en un trabajo realizado por Díaz (1999) con caprinos en donde, se evaluó la sensibilidad y la especificidad de dos antígenos para la prueba de RB utilizada para el diagnóstico de la brucelosis caprina, se utilizó RB a una concentración celular del 3% y 8%; la sensibilidad se determinó usando sueros de caprinos con aislamiento bacteriológico de *B. melitensis* y para determinar la especificidad se utilizaron 100 sueros de caprinos negativos a brucelosis, procedentes de zonas libres. Teniendo como resultado que la sensibilidad de RB al 8% fue del 79% y la del antígeno al 3% fue del 98%. La especificidad para los dos antígenos fue del 100 %. El diagnóstico de la brucelosis en caprinos, usando como antígeno al 8% es inadecuado en caprinos debido a su baja sensibilidad, por lo que es recomendable la utilización del antígeno al 3 % <sup>(27)</sup>.

En este trabajo no se aisló la cepa vacunal a partir de muestras de exudado vaginal de las borregas, utilizando el medio de Thayer Martín modificado, que contiene antibióticos a los que dicha cepa es resistente y que además favorece el crecimiento de la bacteria. En la mayoría de los cultivos realizados se obtuvieron algunas colonias sospechosas con características de *Brucella*. Esta tendencia

coincide con trabajos realizados anteriormente donde se uso la cepa RB51 y se intentó el aislamiento, obteniendo como resultado el no poder aislarla de heces, sangre, orina, saliva, ni de exudado vaginal de borregas vacunadas <sup>(72)</sup>.

Por otro lado, Schuring (1991) menciona que la cepa vacunal RB51 de *B. abortus* no se elimina por ningún tipo de secreción y esto representa una ventaja para su uso <sup>(84)</sup>. Así como Leal (2003) que trabajó con 135 bovinos divididos en cuatro grupos, utilizando, la vacuna RB51 de *B. abortus* dosis reducida, solo tres grupos se revacunaron 2 veces, con un intervalo de 4 meses, las muestras de leche se obtuvieron de vacas recién paridas dentro del primer mes posparto, el exudado vaginal se obtuvo de vacas recién paridas. Bajo estas circunstancias, no fue posible aislar la cepa vacunal en leche y exudado vaginal <sup>(47)</sup>.

También se han hecho estudios para poder aislar otras cepas de tipo vacunal de *Brucella*, Martínez (1998) hizo un seguimiento bacteriológico postvacunal en cabras, intentó el aislamiento de la cepa Rev 1 de *Brucella melitensis*, a dosis reducida  $1 \times 10^5$  a partir de leche y exudado vaginal durante un período de 1 mes y con intervalos de 3, 7, 14, 21 y 28 días y no se logró el aislamiento de la cepa, ni en leche y exudado vaginal <sup>(53)</sup>.

Samartino y cols (2000), en un grupo de 57 animales bovinos vacunados a los seis meses de edad con cepa 19 y revacunados con RB51 a los siete meses de gestación, aislaron la cepa RB51 de un animal a partir de muestra de leche a los tres días posparto. Por lo que la cepa RB51 puede ser aislada de leche en un corto tiempo en un bajo porcentaje de animales revacunados en edad adulta y gestantes, situación que es conocida con la cepa 19 <sup>(79)</sup>.

Estos trabajos nos muestran la importancia de la eliminación de una cepa vacunal, debido a que las cepas Rev-1, 19 y RB51, son potencialmente patógenas para el humano y uno de los mecanismos de infección de brucelosis es por medio

de las descargas vaginales de animales recién paridos o de abortos. A pesar de estos resultados, no se puede concluir si las cepas vacunales puedan ser eliminadas en cualquier otro momento o no exista eliminación. Hay que tener en cuenta que en este trabajo se usó una dosis reducida de la cepa vacunal y se aplicó una sola dosis y no existen estudios que demuestren los efectos de la aplicación de dosis completas.

Los resultados obtenidos en este trabajo, relacionados con la utilización de la técnica de ELISA-indirecta utilizando como antígeno las PME de *Brucella abortus* RB51, demostraron una alta sensibilidad. En diversos trabajos, donde han evaluado cepas vacunales, demuestran la importancia de contar con métodos de diagnóstico alternativos para la detección de diferentes antígenos de *Brucella*.

Investigaciones realizadas por Dájer (1998), sobre la sensibilidad y especificidad del Rivanol, comparándola con técnicas de ELISA-Indirecta han mostrado que esta última tiene una alta sensibilidad en sueros de animales no vacunados, la cual fue del 100%; especificidad en animales no vacunados, fue de 98.4% y vacunados de 88.5% <sup>(23)</sup>. Por otro lado Blasco (1994), menciona que la ELISA-Indirecta proporciona resultados muy similares a la prueba de RB, la prueba desarrollada por este autor, tiene la ventaja de poder usarse para la detección de anticuerpos en leche <sup>(7)</sup>.

El método de ELISA a pesar de ser una prueba de gran utilidad para el diagnóstico, tiene el inconveniente de lo difícil que es obtener antígenos purificados y la posibilidad de tener reacciones cruzadas con otras bacterias gram negativas. En el caso de *Brucella* se ha demostrado la reacción cruzada con *Salmonella* 0:30, *Francisella tularensis* y *Vibrio cholerae* 0:1, y sobre todo el serotipo 0:9 *Yersinia enterocolitica* <sup>(63)</sup>. Estas reacciones cruzadas se deben principalmente a la similitud en sus LPS. La utilización de otros antígenos sobretodo de naturaleza proteica, puede ser una alternativa para contrarrestar estos efectos, pero es necesario contar con más estudios. Sin embargo ya estandarizada la técnica y contando con antígenos



apropiados, representa una herramienta útil. Se han realizado investigaciones utilizando diversos componentes como la envoltura celular de *Brucella*, el lipopolisacárido, los peptidolicanos, los fosfolípidos, y las proteínas de membrana externa con resultados variables<sup>(11, 57)</sup>.

En el presente estudio se decidió medir la respuesta de los isotipos de inmunoglobulinas IgG e IgM debido a que, en estudios previos en bovinos,<sup>(46)</sup> se demuestra la importancia de la evaluación de los diferentes isotipos para diferenciar animales vacunados de animales infectados. Sin embargo en nuestro trabajo no existe un parámetro de comparación dado que no se trabajó con animales infectados, pero resulta interesante mostrar el diferente comportamiento de estas respuestas, donde la IgG alcanza niveles superiores comparada con la IgM. Los dos isotipos utilizados alcanzaron una alta respuesta inmunitaria en la primera semana posvacunación.

Algunos autores mencionan, que la respuesta inmune postinfección se produce a partir de la primera o segunda semana, apareciendo en primer lugar el isotipo IgM y con posterioridad IgG, siendo la concentración de IgG<sub>1</sub>, superior a la de IgG<sub>2</sub>, en lo que se refiere en bovinos, tanto en la respuesta humoral de los animales enfermos por *B. abortus* como de los vacunados con la vacuna cepa 19, aunque en el caso de los animales vacunados con la cepa 19, el nivel de anticuerpos decrece rápidamente, desapareciendo IgG<sub>2</sub> y permaneciendo escasas concentraciones de IgM y IgG<sub>1</sub>, mientras que en los animales enfermos persisten durante más de 6 meses niveles elevados de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub>. Este hecho, se presenta en ovinos y caprinos en similares circunstancias, es decir, en las infecciones producidas por *B. melitensis* o vacunación con Rev-1<sup>(18)</sup>.

En algunas investigaciones, se menciona que las proteínas de membrana externa de *Brucella* son muy resistentes, se requiere de condiciones muy drásticas para extraerlas. Además, las fuertes interacciones entre las proteínas y el lipopolisacárido dificultan su purificación. Inconvenientes que no han impedido, la

obtención de las PME, su análisis mediante ensayos de electroforesis en gel de poliacrilamida, o bien mediante técnicas autorradiográficas o inmunoenzimáticas (18).

El método de extracción utilizado en el presente trabajo está basado en la utilización de detergentes como la L-lauril sarcosina, se obtuvieron buenos rendimientos en la cantidad y calidad de las proteínas obtenidas y esto permitió el análisis adecuado de las mismas.

Respecto a las técnicas de obtención de proteínas Paravis (1995), comenta que la mejor forma de obtención de proteínas es por ultracentrifugación y otro por autoclave a vapor fluente, dando estos métodos de extracción un buen rendimiento para la realización de pruebas de inmunotransferencia <sup>(70)</sup>. Por otro lado, Mejía (2001) menciona que, la cantidad de proteína de membrana externa que se utiliza como antígeno para diferentes pruebas, depende de las concentraciones de las mismas <sup>(55)</sup>.

Los resultados obtenidos en el análisis cualitativo de las proteínas en la inmunotransferencia, utilizando los sueros obtenidos de las borregas vacunadas con la cepa RB51 de *Brucella abortus*, fue en base al reconocimiento de cuatro bandas principales, cuyo pesos moleculares fueron de 62,43,36 y 7 kDa. En trabajos previos, se han caracterizado y descrito las funciones de proteínas de membrana externa de *Brucella* que tienen pesos moleculares similares a los obtenidos en el presente trabajo. Y se ha observado que, existe una proteína de 36 kDa que es equivalente a las porinas de otras bacterias gram negativas, formando en estado nativo agrupaciones triméricas por las que penetran ciertos solutos. Dos genes, Omp2a y Omp2b, que codifican estas porinas, <sup>(30)</sup> pero sólo el segundo Omp2b parece expresarse *in vitro*. Sin embargo, en otros trabajos no se han descrito proteínas similares a las de 62, 43 y 7 kDa, reconocidas en este estudio. Verstrete (1982) menciona que en *B. abortus* hay dos grupos de peso moleculares que van del rango 25 a 27 kDa y 36 a 38 kDa. Es posible que el fuerte

reconocimiento observado hacia estas proteínas en los animales vacunados, sea indicativo de su participación en la patogénesis de la enfermedad <sup>(89)</sup>.

A la fecha, en borregos no existe una vacuna suficientemente evaluada para prevenir la brucelosis. Se han llevado a cabo estudios diversos, sobre la protección obtenida con la cepa RB51 y Rev 1 *B. melitensis* en borregas gestantes, ante una infección con *B. melitensis*. Los resultados demuestran, que la RB51 no indujo producción de anticuerpos que interfieran con las pruebas de diagnóstico convencionales, pero el nivel de protección de la cepa RB51 en el caso de aborto y contra la presencia de brucelas virulentas en exudados vaginales, fetos abortados o corderos no viables nacidos, resultó significativamente inferior al que ofrecía la vacuna Rev 1, comparada con el grupo control <sup>(43)</sup>.

En conclusión los estudios indican que la vacuna RB51 utilizada para bovinos, no protege eficazmente a la oveja contra el aborto inducido por *Brucella melitensis*. Sin embargo, los resultados no han sido concluyentes, a tal grado que en México, existe una fuerte tendencia para al uso de esta vacuna <sup>(43)</sup>.

En este trabajo, se demuestra la importancia de otros antígenos como las PME, ya que se observa su alto poder inmunogénico en animales vacunados y representa una herramienta alternativa para el diagnóstico de brucelosis, por otra parte su posible utilidad para la creación de nuevas vacunas para la prevención de la brucelosis en México.

Por último, habría que tomar en cuenta, que sería importante, realizar más investigaciones respecto a este tema para determinar la capacidad protectora de las PME en modelos de desafío, así como determinar la sensibilidad y especificidad de estos antígenos en pruebas de diagnóstico.

## VII. CONCLUSIONES

- La vacuna RB51 de *Brucella abortus* no se eliminó en el exudado vaginal de hembras vacunadas, bajo las condiciones de este experimento.
- El método de extracción de proteínas de membrana externa de *Brucella abortus* RB51 utilizado, permitió obtener una cantidad y calidad suficiente para el análisis cualitativo y cuantitativo de éstas, en la evaluación de la respuesta inmune en borregas vacunadas.
- Se observó un reconocimiento marcado hacia las PME de 62,43,36 y 7 kDa en borregas vacunadas.
- En la ELISA-indirecta, utilizando como antígeno las PME de *Brucella abortus* RB51, representa una alternativa para el diagnóstico de la Brucelosis ovina.
- La respuesta de IgG inducida por la vacunación en borregas con la cepa RB51 de *Brucella abortus* fue superior a la de IgM.

## VIII. LITERATURA CITADA

1. Abbas AK, Lichtman AH, y Pober JS: Inmunología Celular y Molecular. 4<sup>th</sup> ed. Mc Graw-Hill-Interamericana. España. 2001;541-543.
2. Alfonseca SE, Díaz AE, Hernández AL, y Suárez GF. Comportamiento de un inmunoensayo enzimático competitivo para diagnóstico de brucelosis en diferentes grupos de bovinos. *Vet. Mex.* 1995;26(2):138.
3. Alonso UB, Moriyón I, Díaz R, and Blasca JM. Enzyme-linked Immunosorbent assay with *Brucella* native hapten polisaccharide and smooth lipopolisaccharide. *J. Clin. Microbiol.* 1988;26:1642-1646.
4. Alton GG, Jones LM, Agnus RD, and Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Reserche Agronomique. Paris.1988.
5. Betsy JB, and Halling SM. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strain S19 and RB51. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 1640-642.
6. Blasco JM, y Barberán M. Epidemiología Patogenia y Cuadro Clínico de *Brucella ovis*. Tratado de Patología y Producción ovina. 1990;8:25-32.
7. Blasco JM, y Gamazo C. Brucelosis Animal: Investigación y Ciencia. 1994;218:56-62.
8. Blasco JM. Profilaxis médica vacunal de la brucelosis en los rumiantes: las vacunas tradicionales y las nuevas vacunas. Unidad de Sanidad Animal. Zaragoza, España,1998.
9. Blood DC, Henderson JA, and Rabdostitis OM. Brucelosis. Medicina Veterinaria. 7th ed. Interamericana. México. 1992;729-735.
10. Brooks GF, Stephen AM, and Butel JS. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. *Manual Moderno*. México D.F. 1999;306-309.
11. Candelo A, Benavides A, Arriojas L, Huerta J, Marcano M, y Meléndez G. Determinación de la inmunidad humoral en bovinos vacunados con la vacuna antibrucella RB51, utilizando la técnica de Western-blot. *Vet. Tropical.* 2001;26(2):1-4.

12. Canning PC. Phagocyte inflammation in resistance to brucellosis "Advances in brucellosis research" Texas. A&M. University Press College Station. USA. 1990;151-163.
13. Cargil CK, and Clarke I. Use of Enzyme-linked Immunosorbent Assay in a bovine eradication program. *Aust. Vet. J.* 1992;34:291-305.
14. Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, and Vizcaino N. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiol.* 1996;145:1-8.
15. Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, and Grépinet O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology.* 1995;141:2111-2121.
16. Contreras JA. Brucellosis. *Enfermedades de los Bovinos: Diagnóstico, Tratamiento y Control.* 2ª ed. Barquisimeto. Venezuela. 2000; 475-489.
17. Corbel MJ, and Morgan BW. Genus *Brucella*. in "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". William & Wilking. Baltimore. London. 1984;1:377-388.
18. Crespo LF. Brucellosis ovina y caprina. Office International des Epizooties, Murcia, España. 1994.
19. Cherwonogrodzky JW, Dubray G, and Moreno E. Animal Brucellosis. Antigenes of *Brucella*. K. Nielsen & J.R. Duncan. Boca Ratón, Florida CRC Press. 1990;19-64.
20. Cheville NF, Olsen SC, Jensen AE, Stevens MG, and Pal MV. Effects of age at vaccination on efficacy *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis. *Am. J. Vet. Res.* 1996;57:1153-1156.
21. Cheville NF, Stevens MG, Jensen AE, Tatum FM, and Halling SM. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 1993;54:1591-1597.
22. Christopoulos TK. Immunoassay, Chapter 23, *Academic Press*, USA. 1996: 537-553.

23. Dájer AAF, Gutiérrez REJ, y Zapata VDM. Uso de las pruebas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas y aglutinación con rivanol para el diagnóstico de brucelosis bovina en Yucatán, México. *Vet. Méx.* 1998;29(2)
24. Diana SL, Martínez IO, López A, Martínez JP. Single Step PCR for detection of *Brucella* spp from Blood and Milk of Infected Animals. *J. Clin. Microbiol.* 1995;33(13):3087-3090.
25. Diario de la Federación. 20 de agosto de 1996. Norma Oficial Mexicana NOM-041- ZOO-1995 Campaña nacional contra la brucelosis en los animales.
26. Diario de la Federación. 28 de octubre de 1997. Norma Oficial Mexicana NOM-053- ZOO-1995 Requisitos mínimos para las vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de la brucelosis en los animales. SAGAR.
27. Díaz AE, Blasco MJM, y Suárez GF. Prueba de tarjeta modificada para el diagnóstico de la brucelosis caprina. *Vet. Méx.* 1999;30(4).
28. Díaz AE, Hernández AL, Valero EG, y Arellano RB. Brucelosis Diagnóstico de brucelosis animal. INIFAP-SAGARPA. 2001:34-35.
29. Díaz R, Jones LM, and Leons D. Surface antigens of smooth *brucella*. *J. Bacteriol.* 1968;96:893-
30. Douglas JT, Rosenterg EY, Nikaido H, Verstrete DR, and Winter AJ. Porin of *brucella* species. *Infect. Immun.* 1984;44:16-21.
31. Dubray G, and Plommet M. Structure et constituans des *Brucella*: propriétés biologiques et caractérisation des frations. *Dev. Biol. Standard.* 1977;31:68-91.
32. Enright FM. Mechanisms of self cure in *Brucella abortus* infected cattle. in "Advances in brucellosis research". University Press. College Station. USA. 1990;151-163.
33. Estein SM. Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la epididimitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. *Arch. Med. Vet.* 31:1:1999

34. Ficht TA, Bearden SW, Sowa BA, and Marquis H. Genetic variation at the omp2 porin locus of the *Brucella* species-specific markers. *Mol. Microbiol.* 1990;4:1135-1142.
35. Ficht TA, Hussein HS, Derr J, and Bearden SW. Species-specific sequences at the omp2 locus of *Brucella* type strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996;46:329-331.
36. Freer E, Moreno E, Moriyón I, Pizarro CJ, Weintraub A, and Gorvel JP. *Brucella-Salmonella* lipopolysaccharide cimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than their native *Brucella spp* counterparts. *J. Bacteriol.* 1996;178:5867-5876.
37. Freer E, y Castro AR. *Brucella*: una bacteria virulenta carente de los factores de virulencia clásicos. *Rev. Costarric. Cienc. Méd.* 2001;22:1-2.
38. Freer E. Immunochemical characterisation of *Brucella* LPS and its relation to virulence. ISBN 91 628-2302-7. Ph.D. Thesis, Karolinska Institutet, Stockholm. 1996.
39. Hamdy ME, and Amin AS. Detection of *Brucella* Species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. *Veterinary J.* 2002;163:299-305.
40. Harmon BG, Adams LG, and Frey M. Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. *Am. J. Vet. Res.* 1989;49:1092-1097.
41. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, and Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9<sup>th</sup> ed, Baltimore:Williams & Wilkins, 1994:79.
42. Idrissi AH, Benkirane A, Maadoudi M, Bouslikhane M, Berrada J, y Zerouali A. Estudio comparado de la eficacia de vacunas vivas preparadas con cepa RB51 de *Brucella abortus* y Rev. 1 de *Brucella melitensis* ante la infección experimental por *Brucella melitensis* de ovejas grávidas. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.* 2001,20(3),741-747.
43. Joklik WK, Willett HP, Bernard D, and Wilfert CM. *Microbiología. Médica Panamericana*. 20<sup>a</sup> ed Buenos Aires, Argentina, 1998;828-833.
44. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, y Winn W.C. *Diagnóstico Microbiológico. Médica Panamericana*. 5<sup>a</sup> ed. Madrid, España. 2001;424-430.



45. Leal HM, Jaramillo ML, Díaz AE, Pérez GR, Ramírez V, Hernández AL y Suárez GF. Respuesta inmune en bovinos vacunados con RB51, a la exposición natural con *B. abortus* XXXIX. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. UNAM.2003.
46. Leal HM, Respuesta inmune en bovinos vacunados con RB51, a la exposición natural con *Brucella abortus* y eliminación de la cepa vacunal en leche y exudado vaginal. UNAM. Tesis de maestría. México. DF.2003.
47. Leonard BA, López GI, and Baldwin GL. *Brucella abortus* siderophore 2,3-dihydroxybenzoic acid protects *Brucellae* from killing by macrophage. *Veterinary Research*.1994;28(1):67-92.
48. Lopez J, Best A, y Morales C. Diagnóstico de brucelosis bovina en leche por el Ring Test y ELISA en lecherías de la provincia de Ñuble (VIII Región) *Arch. Med. Vet.* 1998;30(1).
49. Lord V, Cherwonogrodzky J, Schuring G, Lord R, Marcano M, and Meléndez G. Venezuelan field trials of vaccines against brucellosis in swine. *Am J. Vet. Res.* 1998;59(5):546-551.
50. Mancera MA. Prueba del antígeno brucelar amortiguado o de tarjeta. *Brucelosis Animal*. 2ª ed, México D. F. INIFAP. 2001;80-81.
51. Mariño OC, Gallego IM, Rueda E, Sedaño L, and Schurig G. Evaluation of a potential vaccine: *Brucella abortus* RB51 susceptibility and protection in guinea pigs. *Networking in Brucellosis Research II: Proceedings of the UNU/B1OLAC Brucellosis Workshop*. The United Nations University Press, Tokyo, Japan. 1998.
52. Martin WB. *Enfermedades de la oveja*. Acribia, Zaragoza, España, 1998.
53. Martínez MOL. Presencia de la cepa Rev1 de *B. melitensis* en leche de cabras vacunadas. Tesis. Fac. Med Vet. Zoot. Universidad Autónoma de Tamaulipas.1998.
54. Martínez TG, Pizarra CJ, Moreno E, and Moriyón. The outer membranes of *Brucella spp.* are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect and Immun.* 1995;63(8):3054-3061.

55. Mejia SP, Díaz AE, Salas TE y Tenorio GRV. Identificación de las proteínas de 35 y 38Kda específicas de *Brucella ovis*. Téc. Pecu. Méx. 2004;42(2):277-285.
56. Mittal KR, Tizard IR. Studies on the relationship between *Yersinia enterocolitica* 0.9 and *Brucella abortus* agglutinins in naturally infected animals. Res Vet Sci.1980;28(3):311-314.
57. Montaña SN, Rueda LOE, Calderón PCP, Ortega A, Puentes AR, Gallego MMI, y Marino JOC. Medición de respuesta inmune humoral y celular frente a antígenos de *Brucella abortus* RB51 en bovinos. Arch. Med.Vet. 1998;30(2)109-123.
58. Moreno ED, BermanT, and Boettcher LA. Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. Infection and immunity. 1981;31:362-370.
59. Moriyón UI, y López-Goñi I. Estructura genética y fisiología del género *Brucella*. En Diagnóstico de Brucelosis. E. Díaz, L. Hernández, G. Valero, B. Arellano y cols. Editores. INIFAP,SAGAR.2001:17-27.
60. Moriyón UI, y López-Goñi I. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* . Int. Microbiol. 1998;1:19-26.
61. Murray PR, Rosenthalk KS, Kobayashi GS, and Pfaller MA. Microbiología Médica. 4ª ed. Mosby- Elsevier science, Madrid, España.2003.
62. Nicoletti P,. Epidemiología de la brucelosis. III Master Internacional de Atención al Medio. Instituto de Salud Pública. Pamplona. Navarra.19989.
63. Nielsen K. The serological response of cattle immunized with *Yersinia enterocolitica* 0.9 or to *Yersinia* and *Brucella abortus* antigens in enzyme immunoassay, Vet. Immunol. Immunopathol. 1990;24(4):373-382.
64. Nielsen KH, Heck FC, Stiller JM, and Rosenbaum B. Interaction of specifically purified isotypes of bovine antibody to *Brucella abortus* in the haemolysis in gel test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Res. Vet. Sci. 1983; (35):14-18.

65. Nielsen KH, Cherwonogrodzky JW, Duncan JR, and Bundle DR. Enzyme-linked immunosorbent assay of differentiation of the antibody of cattle naturally infected with *Brucella abortus* or vaccinated with Strain 19, Am. J. Vet. Res. 1989;50(1):5-9.
66. Nielsen KPF, Wright WA, Kelly JW, and Cherwonogrodzky JW. A review of enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in cattle, Vet. Immunol. Immunopathol. 1988;(24):373-382.
67. Olsen S. Available vaccines for the control of *brucellosis* in animals. Reunión de consulta de expertos de la OPS/OMS sobre vacunas y estrategias de vacunación en los programas de control/erradicación de la brucelosis. Santiago de Chile 16 al 18 de Noviembre. 1999; 30-33.
68. Olsen SC. Immune responses and efficacy after administration of a commercial *Brucella abortus* strain RB5I vaccine to cattle. *Veterinary Therapeutics*.2000;1:183-191.
69. Olsen SC, Bricker B, Palmer MV, and Jensen AE. Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: serology, clearance and efficacy. *Res. Vet. Sci.* 1999;66:101-105.
70. Paravis MS, Muller G, Rossi S, Tonna H, Silvera V, y Carreto L. *Brucella ovis*. Desarrollo de una técnica de Elisa para diagnóstico serológico en Uruguay. *Rev. Latamer. Peq. Rumin.* 1995; 1(3):197-
71. Pizarro-Cerdá J, Moreno E, and Gorvel JP. *Brucella abortus* invasion and survival within professional and nonprofessional phagocytes. *Advances in Cell and Molecular Biology of Membranes and Organelles.* 1999;6:201-232.
72. Poester FP, Ramos ET, Gomes MP, Chiminazzo C, and Schurig GG. The serological response of adult cattle after vaccination with *Brucella abortus* strain 19 and RB51. In *Networking in Brucellosis Research II: Proceedings of the UNU/BIOLAC Brucellosis Workshop*. The United Nations University Press, Tokyo, Japan. 1998.
73. Price RF, Templeton JW, and Adams LG. Survival of smooth rough and transposon mutant strains of *B. abortus* in bovine mammary macrophages. *Vet. Immunol.Immunopath.* 1990; 26(4):353-365.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

74. Rentería ETB, Organes DLSH, Licea NAF, Medina BGE, Nielsen K, Montaña GMF, Moreno RJF, Pujol MLC. Evaluación de la prueba reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de leche y cultivos puros en el diagnóstico de la brucelosis bovina. *Téc Pecu Méx* 2005;43(1):117-126
75. Rodríguez TA, y Domingo OA. Funciones fagocíticas de los polimorfonucleares y *Brucella*. Resúmenes de Comunicaciones. XII Congreso Nacional de la Asociación Española de Microbiología. 1989;1:363-366.
76. Roop RM, Jeffers G, Bagchi T, Walke RJ, and Enright FM. Experimental infection of goats fetuses in utero with a stable, rough mutant of *Brucella abortus*. *Res. Vet. Sci.* 1991; 51:123-127.
77. Saldarriaga OA, y Rugeles MT. Inmunobiología de la infección por *Brucella spp*: Fundamentos para una estrategia vacunal. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 2002(15)2.
78. Sales HH, Hueston WD, Hoblet KH, and Shulaw WP. Field trial evaluating the safety and serologic reactions of reduced dose *Brucella melitensis* Rev 1 vaccination in adult sheep. *Preventive Veterinary Medicine.* 1992;13:205-215.
79. Samartino LE, Fort M, Gregoret R, and Schurig GG. Use of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 in pregnant cows after calfhoo vaccination with strain 19 in Argentina. *Preventive Vet. Med.* 2000; 4:193-
80. Samartino LE, Truax RE, and Enright M. Invasion y Replication of *Brucella abortus* in three different trophoblastic cell lines. *Journal of Veterinary Medicine.* 1994; 41(4):229-236.
81. Sangari FJ, y Agüero J. Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: an update Publicación de la Sociedad Española de Microbiología. España. 1996;12:2-18.
82. Schurig G. Erradicación de la brucelosis y características principales de la vacuna *Brucella abortus* cepa RB51. Memorias del Simposio Internacional de Brucelosis. Maracay, Venezuela, 26 al 27 de Mayo. 1999;27-

83. Schurig GG, Pringle AT, and Breese SS. Localization of *Brucella* antigens that elicit a humoral response in *Brucella abortus* infected cattle. *Infect Immun.* 1981;34:1000-1007.
84. Schuring GG, Roop RM, Bagchi T, Boyle S, Buhman O, and Sriranganathan N. Biological properties of RB51, a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microb.* 1991;28:171-188.
85. Sowa BA. Membrane proteins of *Brucella spp.* in "Advances in brucellosis research". *Texas. A. & M. University Press.* College Station. USA. 1990;89-105.
86. Stack JA, Perret LL, Brew D, y Mac Millan AP. Competitivo ELISA for bovino brucellosis suitable for testing poor quality samples. *Vet. Record.* 1999;18(25):735-736.
87. Stevens MG, Olsen SC, and Cheville NF. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1995;44:223-
88. Tobias L, Schurig GG, and Cordes OO. Comparative behaviour of *Brucella abortus* strain 19 and RB51 in pregnant mouse. *Res. Vet.Sci.* 1992;3:179-183.
89. Verstreate DR, Creasy MT, Caveney NT, Baldwin CL, Blab MW, and Winter AJ. Outer membrane proteins of brucella abortus isolation and characterization. *Infect. Immun.* 1982;35:979.
90. Villegas AH, Hernández LA, Díaz AE, y Suárez GF. Bacteriología y fagotipificación de Brucelas aisladas de caprinos y bovinos. *Tec. Pec. Mex.* 1999;37(1).
91. Yarazabal L, Petralanda I, y Arango M. La técnica de ELISA y sus aplicaciones en Inmunología Clínica. *Manual de Métodos en Inmunodiagnóstico.* Editado por Contreras E, Figarlla E, Ramírez R y Blanca I. *Acta Científica Venezolana.* Caracas. Venezuela. 1985

## IX. APÉNDICE

### APÉNDICE 1. MEDIO BACTERIOLÓGICO.

#### 1.1 Preparación del medio de Thayer-Martin modificado.

GC médium base .....36 g

Hemoglobina ..... 10 g

#### **Inhibidores:**

Vancomicina..... 3 g

Colistina..... 7.5 g

Nistatina..... 100 000 U.I. (17.7 mg)

Nitrofurantoina..... 10 mg

1000 ml de agua destilada.

El medio GC y la hemoglobina se disuelven en 500 ml de agua destilada. Una vez bien disuelto mediante ebullición, se esteriliza en autoclave (120°C, a 1 atmósfera, 20 min.) Cuando salen del autoclave los 2 matraces de hemoglobina y el medio GC aún calientes, se introducen en un baño María a 45-50°C, hasta que la temperatura se estabiliza (10-15 min. como mínimo) agitando la solución de hemoglobina en un agitador magnético de vez en cuando y con cuidado de no hacer mucha espuma.

Cuando se hayan estabilizado las temperaturas, se mezclan los contenidos de los dos matraces, y se añaden los inhibidores. Se homogeniza en el agitador magnético cuidadosamente para no hacer espuma, y se sirve en placas de petri.

(lo óptimo es obtener entre 35 y 40 placas por litro de medio).

### APÉNDICE 2. TINCIÓN DE GRAM.

-Cristal Violeta 1 minuto

-Lavado

-Lugol 1 minuto

-Lavado

-Alcohol – Acetona

-Lavado

-Safranina 1 minuto

-Lavado

## APÉNDICE 3. REACTIVOS DE ELISA

### 3.1 TRISS ELISA buffer pH 7.4

Cloruro de sodio (NaCl) ..... 8.7 g  
Tris base ..... 6.05 g

Disolver en 850 ml de agua destilada.

Ajustar a pH 7.4 agregando ácido clorhídrico (HCL).

Agregar agua destilada cbp 1000 ml.

Poner 1 g de albúmina de bovino, sobre la solución y deje reposar por 15 minutos.

Agitar despacio hasta que la albúmina se disuelva.

Agregar 0.5 ml de Tween 20 y mezcle bien.

### 3.2 Indicador de color ABTS

ABTS ..... 0.27335 g  
Agua destilada..... 12.5 ml.

### 3.3 Solución buferada de Carbonato – Bicarbonato pH 9.6

Bicarbonato de sodio (Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> ) ..... 1.6g  
Carbonato de sodio (Na HCO<sub>3</sub> ) ..... 2.9 g  
Agua destilada ..... 1000 ml.  
Ajustar a pH 9.6 con Hidróxido de sodio (NaOH ) al 5 M.

### 3.4 Solución de lavado (Wash)

Cloruro de sodio (NaCl) ..... 8.5 g  
Agua destilada ..... 1000 ml.  
Tween 20 ..... 0.5 ml.

### 3.5 Solución de parado (STOP)

Ácido sulfúrico al 3N

### **3.6 Buffer Ácido cítrico pH 4.0 (Substrato)**

Ácido cítrico ..... 9.6 g

Agua destilada ..... 1000 ml.

Ajustar a pH 4.0 con NaOH al 1 M.

### **3.7 Peroxido de hidrógeno**

Agua destilada ..... 7.5 ml.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% ..... 0.5 ml.

La solución substrato de ABTS para una microplaca se hace de la siguiente manera:

Buffer Ac. Cítrico ..... 10 ml.

Solución ABTS ..... 0.1 ml.

Peróxido de Hidrógeno ..... 0.08 ml.

Mezclar antes de usarse, agregar 100 µl por pozo.

ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Diammonium salt.

## **APÉNDICE 4. ELECTROFORESIS**

### **4.1 Elaboración de geles para electroforesis.**

Resolving buffer ..... 5.7 ml

Acrilamida 30% ..... 3.3 ml.

Persulfato de Amonio 0.9% ..... 1.0 ml

TEMED ..... 10 µl

### **4.2 Solución desteñidora para gel.**

100 ml ácido acético.

400 ml de metanol.

500 ml de agua destilada.



#### **4.3 Buffer de corrida.**

TRISS 1.5 M (pH 8.8).....10 ml.  
SDS 10% .....0.4 ml.  
Agua destilada .....12.4 ml.

#### **4.4 Buffer de muestra.**

Tris 0.5 M pH 6.5 ..... .3 ml.  
EDTA 0.2 M..... 0.3 ml.  
SDS 10% ..... 3 ml.  
2- Mercaptoetanol..... 0.3 ml.  
Glicerol..... 2.4 ml.  
Agua destilada..... 3 ml.

### **APÉNDICE 5. INMUNOTRANSFERENCIA**

#### **5.1 Buffer de transferencia**

25 mMTris  
192 mM Glicina pH 8.3  
20% metanol  
0.05-0.01 SDS  
(20mM, Tris-HCL [ pH 8.3 ], 192 mM glicina).

#### **5.2 5X Buffer SDS-page**

15 g de Tris-Base.  
72g de Glicina.  
5 g SDS  
Disolver en 900 ml de agua destilada y ajustar a 1000ml. Antes de usar diluir a 1x combinando 200 ml de solución 5x en 800 ml de agua destilada.

### 5.3 PBS 1x

Cloruro de sodio NaCl .....8g.  
Fosfato de potasio K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .....1.21g.  
cbp un litro de agua destilada.

### 5.4 PBS TWEEN 20

Cloruro de sodio NaCl .....8g.  
Fosfato de potasio K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .....1.21g.  
Tween .....2 ml.  
cbp un litro de agua destilada.

## APÉNDICE 6. BRADFORD

### 6.1 Microtécnica en una placa de 96 pozos.

#### Pozos

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a)	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
b)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

- se colocó albúmina más PBS 1x a diferentes concentraciones de 10 µl a 1µl, se agregaron 190 µl del reactivo de Bradford.
- Se colocaron las PME de *B. abortus* 10 µl en dos pozos.
- Posteriormente se realizó la lectura a 595 nm.
- El primer pozo se usa como control en el cual se aplica solo PBS, en el pozo 2 A se colocó albúmina standard.
- Los datos se grafican y se hace una regresión lineal, obteniendo la cantidad de proteína.