



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION
Y DE LA SALUD ANIMAL

IDENTIFICACION Y EMPLEO DE PROTEINAS DE
Actinobacillus seminis COMO CANDIDATOS A
ANTIGENOS PARA SU DIAGNOSTICO

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

Alma Lucila Núñez del Arco

TUTOR:

DRA. MIREYA DE LA GARZA AMAYA

COMITE TUTORAL:

DR. JORGE TORTORA PEREZ

DR. VICTOR TENORIO GUTIERREZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Alma Lucila Nájera
del Arco

FECHA: 18- Noviembre - 05

FIRMA: 

AGRADECIMIENTO

**EXPRESO MI ETERNO E INMENSO AGRADECIMIENTO A TODAS Y CADA
UNA DE LAS PERSONAS QUE COLABORARON DE FORMA INTELECTUAL,
MANUAL Y EMOCIONAL PARA LA REALIZACIÓN Y TERMINACIÓN
DE ÉSTE TRABAJO.**

**A MI MAMÁ Y HERMANO QUIENES A PESAR DE SU AUSENCIA FÍSICA
SIEMPRE Y EN CADA MOMENTO FORMAN PARTE DE MI VIDA.**

A MI FAMILIA:

**Jaime Morales, Gerardo Morales, a quien esta a punto de llegar,
Baldomero Núñez, Mary Núñez, Alfredo Lovera, Carlos Lovera, Elisa del Arco
por todo su apoyo.**

ÍNDICE

T E M A	página
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 CARACTERÍSTICAS BACTERIOLÓGICAS DE <i>A. seminis</i>	6
1.2 FACTORES DE VIRULENCIA	7
1.3 PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA	9
1.4 LIPOPOLISACÁRIDO	11
1.5 TRANSMISIÓN, PATOGÉNESIS Y SIGNOS CLÍNICOS	12
1.6 DIAGNÓSTICO DE <i>A. seminis</i>	14
1.6.1 CLÍNICO	15
1.6.2 SEROLÓGICO Y PCR	17
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS PARTICULARES	23
2. MATERIAL Y MÉTODOS	24
2.1 CRECIMIENTO DE LA CEPA DE REFERENCIA DE <i>A. seminis</i>	24
2.2 OBTENCIÓN DE FRACCIONES SUBCELULARES (MEMBRANA EXTERNA, MEMBRANA INTERNA Y CITOSOL) DE <i>A. seminis</i>	25
2.3 DETERMINACIÓN DE LIPOPOLISACÁRIDO EN LA MEMBRANA EXTERNA DE <i>A. seminis</i>	26
2.4 CUANTIFICACIÓN DE ENDOTOXINA EN FRACCIONES SUBCELULARES DE <i>A. seminis</i>	27
2.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	28
2.6 PRODUCCIÓN DE SUEROS HIPERINMUNES	29
2.6.1 SUERO HIPERINMUNE DE CONEJO ANTI- <i>A. seminis</i>	29
2.6.2 SUERO HIPERINMUNE DE CONEJO ANTI- <i>B. ovis</i> , <i>M. haemolytica</i> , <i>P. multocida</i> , <i>H. somni</i>	29
2.6.3 SUERO HIPERINMUNE CONTRA LA PROTEÍNA DE 75 kDa DE <i>A. seminis</i>	29
2.6.4 TITULACIÓN DE SUEROS HIPERINMUNES	30
2.7 SDS-PAGE Y WESTERN-BLOT DE FRACCIONES SUBCELULARES Y CÉLULAS SONICADAS DE <i>A. seminis</i> ; SDS-PAGE Y WESTERN-BLOT DE CÉLULAS SONICADAS DE <i>B. ovis</i> , <i>M. haemolytica</i> , <i>P. multocida</i> , <i>H. somni</i>	31
2.8 PURIFICACIÓN Y WESTERN-BLOT DE LA PROTEÍNA DE 75 kDa de <i>A. seminis</i>	32
2.9 OBTENCIÓN DE MICROVESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA DE <i>A. seminis</i>	34
2.9.1 WESTERN-BLOT DE MICROVESÍCULAS DE <i>A. seminis</i>	34

2.9.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)	35
2.9.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)	36
2.10 INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO LIGADO A UNA ENZIMA 37	37
3. RESULTADOS	39
3.1 ELECTROFORESIS Y WESTERN.BLOT DE FRACCIONES SUBCELULARES DE <i>A. seminis</i>	39
3.2 DETECCIÓN Y PURIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA ESPECÍFICA DE <i>A. seminis</i>	40
3.3 TITULACIÓN DE LOS SUEROS HIPERINMUNES OBTENIDOS EN CONEJO ANTI-CÉLULAS COMPLETA, ANTI-PROPEÍNA DE 75 kDa de <i>A. seminis</i> Y DE AISLAMIENTOS	42
3.4 AISLAMIENTO DE MICROVESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA DE <i>A. seminis</i>	43
3.5 INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO LIGADO A UNA ENZIMA	43
4. FIGURAS	45
5. DISCUSIÓN	50
6. CONCLUSIONES	59
7. PERSPECTIVAS DE TRABAJO	61

ÍNDICE DE TABLAS

T E M A	página
TABLA 1. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE LOS PRINCIPALES MICROORGANISMOS ASOCIADOS CON EPIDIDIMITIS OVINA	7
TABLA 2. CEPAS BACTERIANAS DE REFERENCIA Y AISLAMIENTOS	24
TABLA 3. CURVA PATRÓN PARA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR MÉTODO DE BRADFORD	28
TABLA 4. PROTOCOLO DE INMUNIZACIÓN PARA LA PROTEÍNA DE 75 kDa	30
TABLA 5. PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRA DE CONEJOS INOCULADOS CON LA PROTEÍNA DE 75 kDa	30
TABLA 6. SUEROS HIPERINMUNES	42

ÍNDICE DE FIGURAS

T E M A	página
FIGURA 1. SDS-PAGE 10% DE PROTEÍNAS DE EXTRACTOS CELULARES Y FRACCIONES SUBCELULARES DE <i>A. seminis</i> .	45
FIGURA 2. WESTERN-BLOT DE EXTRACTOS CELULARES Y FRACCIONES SUBCELULARES DE <i>A. seminis</i> CON ANTISUERO DE CONEJO ANTI- <i>A. seminis</i> .	45
FIGURA 3. WESTERN-BLOT DE EXTRACTOS CELULARES DE BACTERIAS ASOCIADAS CON EPIDIDIMITIS OVINA CON ANTISUERO DE CONEJO ANTI- <i>A. seminis</i> .	46
FIGURA 4. WESTERN-BLOT DE EXTRACTOS CELULARES DE <i>A. seminis</i> ENFRENTADOS CON ANTISUEROS DE BACTERIAS ASOCIADAS CON EPIDIDIMITIS OVINA	46
FIGURA 5. SDS-PAGE 12% DE PROTEÍNAS DE EXTRACTOS CELULARES Y PROTEÍNA DE 75 kDa ELUÍDA Y EN MICROVESÍCULAS DE EXCRECIÓN	47
FIGURA 6. WESTERN-BLOT DE PROTEÍNA DE 75 kDa OBTENIDA DE OMP DE <i>A. seminis</i> ENFRENTADOS CON ANTISUEROS DE BACTERIAS ASOCIADAS CON EPIDIDIMITIS OVINA	47
FIGURA 7. WESTERN-BLOT DE PROTEÍNA DE 75 kDa OBTENIDA DE OMP DE <i>A. seminis</i> ENFRENTADOS CON ANTISUEROS DE BACTERIAS ASOCIADAS CON EPIDIDIMITIS OVINA	48
FIGURA 8. SDS-UREA 6% DEL PERFIL DE LPS DE <i>A. seminis</i>	48
FIGURA 9. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE MICROVESÍCULAS DE <i>A. seminis</i>	49

R E S U M E N

A partir de la cepa de referencia de *Actinobacillus seminis* 15768 se realizó la identificación de proteínas de membrana externa, membrana interna y citosol. Se encontró que en la membrana externa esta bacteria tiene una proteína con peso molecular de 75 kDa, la cual presenta la característica de ser antigénica y específica de esta bacteria. Esto se concluyó porque al enfrentar suero hiperinmune contra *A. seminis* producido en conejo, con células completas sonicadas de *Brucella ovis*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Histophilus somni* (antes *Haemophilus somnus*) no presentó reacción cruzada. Por otro lado se enfrentó suero hiperinmune producido contra *Brucella ovis*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Histophilus somni* con células completas sonicadas y con proteínas de membrana externa de *A. seminis* y tampoco se encontró reacción cruzada.

Con la finalidad de determinar si la proteína de 75 kDa de *A. seminis* puede ser empleada para el desarrollo de una prueba diagnóstica serológica, se preparó la prueba de ELISA de tipo indirecta en la cual se empleó como antígeno la proteína de 75 kDa obtenida por electroelución, además de producir suero hiperinmune en conejo contra esta misma proteína; se emplearon cuatro sueros hiperinmunes procedentes de conejo contra *B. ovis*, *M. haemolytica*, *P. multocida* y *H. somni* en donde no se observó el desarrollo de reacciones cruzadas.

Por otro lado también se determinó que *A. seminis* tiene la capacidad de liberar vesículas de membrana al medio. Estas vesículas fueron recuperadas por ultracentrifugación y observadas mediante microscopia electrónica de barrido y de transmisión. El contenido de las vesículas fue sometido a corrimiento electroforético e

inmunotransferencia enfrentando con suero hiperinmune contra la proteína de 75 kDa, encontrándose la presencia de esta proteína en las vesículas.

La conclusión a la que se llegó es que *A. seminis* contiene tanto en membrana externa como en vesículas liberadas al medio de cultivo una proteína de 75 kDa, la cual es específica de este microorganismo, además de tener propiedades inmunogénicas. La proteína de 75 kDa podría ser empleada para establecer una prueba diagnóstica que ayude a determinar la presencia de este microorganismo antes de que el animal infectado muestre la sintomatología de la epididimitis.

ABSTRACT

Actinobacillus seminis is a gram-negative bacterium involved in ovine epididymitis which belongs to the Pasteurellaceae family. The protein profile of subcellular fractions from *A. seminis* 15768 was determined. Proteins from outer membrane (OMP), inner membrane (IMP) and citosol (CP) were obtained by using Sarcosyl. In the OMP pattern a protein with molecular mass of 75 kDa was identified which showed to be immunogenic and apparently specific for *A. seminis*. This conclusion was based upon confronting hyperimmune serum of rabbits immunized with whole cells of *A. seminis* against sonicated complete cells of *Brucella ovis*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* and *Histophilus somni*. None of these bacteria showed cross-reaction with the 75 kDa protein of *A. seminis*. Furthermore, when the hyperimmune sera of rabbits immunized with whole cells of *B. ovis*, *M. haemolytica*, *P. multocida* and *H. somni* were confronted against sonicated cells and each one of the subcellular fractions of *A. seminis*, no recognition was found. We describe the isolation and the identification of the *A. seminis* protein of 75 kDa also present in released microvesicles. The results suggest that the 75 kDa protein could be used in order to establish a diagnosis test that results specific for the ovine epididymitis caused by *A. seminis*.

1. INTRODUCCIÓN

Una producción eficiente de corderos dependerá principalmente de lograr una eficiencia reproductiva (capacidad de una población para producir al destete la mayor cantidad de corderos) en las madres (Pijoan, 1986). Por otro lado, los borregos son susceptibles a infecciones bacterianas con tropismo a los órganos genitales, produciendo cuadros clínicos típicos caracterizados por la sobresaliente inflamación del epidídimo. La epididimitis ovina se ha demostrado en la mayoría de los países en los que existen explotaciones borregueras, originándose su estudio en Australia y Nueva Zelanda. En México se demostró la enfermedad por primera vez en 1979 (Flores, 1986).

Son numerosos los agentes bacterianos involucrados en la patología de la epididimitis contagiosa en borregos, incluyendo diversos agentes infecciosos tales como *Histophilus somni* (*H. somni*), *Corynebacterium pseudoyuberculosis* (*C. pseudoyuberculosis*), *Bacteroides*, *Brucella melitensis* (*B. melitensis*), *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*), *Pasteurella multocida* (*P. multocida*), *Brucella ovis* (*B. ovis*) y *Actinobacillus seminis* (*A. seminis*), sin embargo, los dos microorganismos que con mayor frecuencia se asocian con este padecimiento son *B. ovis* y *A. seminis* (Genetzky, 1995). Esta enfermedad se caracteriza por una inflamación del epidídimo en los carneros, con la consiguiente disminución de la fertilidad, baja calidad del semen, presencia de granulomas espermáticos y fibrosis progresiva del epidídimo; además, puede producir abortos tardíos en las hembras y un aumento de la mortalidad perinatal.

El género *Actinobacillus* está integrado por bacterias Gram negativas las cuales son consideradas como responsables de causar diversas enfermedades tanto en humanos como en animales. Actualmente se consideran dentro de este género seis especies considerablemente patógenas en animales: *A. lignieresii*, *A. suis*, *A. equuli*, *A. seminis*, *A. pleuropneumoniae* y *A. capsulatus*; de menor impacto en veterinaria son las especies *A. rossii*, *A. muris*, *A. hominis* y *A. ureae*. *A. actinomycetemcomitans* es el único considerado como patógeno importante en humanos por ocasionar problemas de periodontitis, no es considerado patógeno en veterinaria, sin embargo ha sido aislado de carneros con epididimitis (Ricroft, *et al.*, 2000).

A. seminis es considerada como parte de la microbiota permanente o transitoria de las mucosas del tracto reproductor de los corderos. Causa infecciones ascendentes al epidídimo y ocasionalmente al testículo y órganos sexuales accesorios, sin embargo los factores específicos que predisponen a estos órganos a la infección no se han definido claramente (Scanlan, 1992), además de asociarse con poliartritis en ovinos existen reportes de su aislamiento a partir de semen de bovinos (Stephens *et al.*, 1983). El primer reporte de esta bacteria fue en 1960 en Australia por Baynes y Simmons quienes la aislaron a partir de muestras de semen y de epidídimo provenientes de ovinos con epididimitis, en Nueva Zelanda (Ekdahl *et al.*, 1968), Estados Unidos de Norte América (Livingston y Hardy, 1964), Sudáfrica (van Tonder, 1973) y recientemente en España (De la Puente Redondo *et al.*, 2000). En México, existen reportes de casos de epididimitis por *A. seminis* desde 1986 (Trejo *et al.*, 1986), donde se aisló del epidídimo de un carnero del Estado de Hidalgo. Posteriormente Oviedo *et al.* (1988) realizaron el aislamiento en carneros del Estado de México, por otro lado

Méndez *et al.* (1999) a partir de rebaños de ovinos localizados en los Estados de México, Hidalgo y Distrito Federal los cuales mostraban epididimitis determinada por palpación y confirman su identidad por inmunodifusión doble empleando antígenos sonicados preparados a partir de la cepa de referencia (ATCC 15768) además del aislamiento e identificación bacteriológica.

1.1 CARACTERÍSTICAS BACTERIOLÓGICAS DE *A. seminis*.

A. seminis presenta morfología extremadamente pleomórfica, variando de forma cocobacilar a filamentosa, es Gram negativo y cuando se emplea la tinción de Zielh - Neelsen Modificada (Stamp) se observan cocobacilos color rojo, no formadores de esporas e inmóviles, mide 1 μm X 1-4 μm (ancho y largo, respectivamente) y puede agruparse en cadenas o formando empalizadas. Requiere de medios enriquecidos como agar sangre o presencia de suero, es anaerobio facultativo con metabolismo fermentativo en donde su crecimiento se caracteriza por el desarrollo de colonias con un diámetro de 2 a 4 mm en 48 horas de incubación. Cuando se realizan estudios bacteriológicos se emplean diversas muestras clínicas como cola, cuerpo y cabeza del epidídimo, así como testículos. Todas estas muestras son sembradas en los medios de cultivo antes mencionados y su crecimiento se ve favorecido cuando se incuban a 37 C durante 48 horas en atmósfera de CO₂ al 10%. A las 24 horas se observa el desarrollo de colonias puntiformes que a las 48 horas son grandes y blancas de 1-2 mm de diámetro (Burgess, 1982; Bergey, 1984; Walker, 1986).

En la tabla 1 se resumen las características bioquímicas entre los principales microorganismos asociados con la epididimitis ovina.

Tabla 1. Propiedades Bioquímicas de los principales microorganismos asociados con epididimitis ovina (Genetzky, 1995).

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

1.2 FACTORES DE VIRULENCIA.

Las dos características principales que participan en la virulencia de un microorganismo son: 1) La adherencia de una bacteria a la mucosa, ya que es el paso inicial para la patogénesis y posterior desarrollo de la infección, además de

proporcionar al microorganismo la capacidad para resistir los mecanismos de limpieza en mucosas, proporcionar una superficie endotelial la cual le confiera la propiedad para unirse, incrementar la posibilidad de obtener nutrientes y colonizar sitios específicos en el huésped; y 2) la producción de sustancias (toxinas) que producen daño al huésped (van Alphen *et al.*, 1991).

Dentro del género *Actinobacillus*, la especie *actinomycetemcomitans*, bacteria involucrada en cuadros de periodontitis (Rycroft *et al.*, 2000), se ha encontrado que tiene la capacidad de producir leucotoxina (LTX), integrante de la familia de toxinas formadoras de poros (RTX), desempeñando un papel fundamental en la patogénesis de esta bacteria, la cual es responsable de apoptosis y necrosis de leucocitos, (Korostoff *et al.*, 1998). Por otro lado *A. pleuropneumoniae* es considerado un parásito obligado del tracto respiratorio en cerdos que puede desarrollar cuadros de pleuroneumonía (Bossé *et al.*, 2002), es bien conocido que su virulencia, como en la mayoría de las bacterias patógenas es multifactorial. Dentro de los componentes involucrados en esa virulencia están el polisacárido capsular, el lipopolisacárido, las proteínas de membrana externa, factores de adhesión y exotoxinas (Inzana *et al.*, 1988; 1991 a; Jacques *et al.*, 1991; Idris *et al.*, 1993; Dom *et al.*, 1994; Frey, 1995; Jansen *et al.*, 1995).

Dentro de los trabajos reportados sobre factores de patogenicidad presentes en *A. seminis* se encuentra el desarrollo de un modelo que propone su adhesión *in vitro* a células renales obtenidas a partir de un cultivo primario de células de borrego, de ésta forma se demostró la inhibición de la adhesión por la presencia de anticuerpos policlonales contra la bacteria. Por lo anterior se propone que *A. seminis* posee adhesinas de superficie, tales como fimbrias, proteínas de membrana externa u otros apéndices, los cuales se asocian fuertemente a receptores específicos de células

epiteliales, sin embargo en el trabajo no se identifican o caracterizan los posibles factores de patogenicidad presentes en *A. seminis* (Healey *et al.*, 1991).

Por otro lado Shaller *et al.* (2000), empleando geles de agarosa a partir de extractos totales de *A. seminis* y realizando inmunotransferencia con antitoxinas ApxI, ApxII y ApxIII de *A. pleuropneumoniae* (monoespecíficas, policlonales) se encontró la presencia de reacciones cruzadas, lo que podría indicar la producción de *A. seminis* de toxinas RTX (Shaller *et al.*, 2000).

1.3 PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA.

Las proteínas de membrana externa (OMPs) han sido identificadas en muchas bacterias Gram negativas, algunas han sido caracterizadas como porinas (Hansen *et al.*, 1989; Chevalier *et al.*, 1993), receptores de Fe (Lamont *et al.*, 1998; Simpson *et al.*, 2000) y algunas como factores de virulencia incluyendo adhesinas, invaginas (Millar *et al.*, 1990; China *et al.*, 1993; Cirillo *et al.*, 1996) y factores involucrados en la resistencia a la opsonización y muerte en suero (China *et al.*, 1993; Sandt, *et al.*, 2000).

Se han identificado varias OMPs en los 12 serotipos capsulares de *A. pleuropneumoniae*, los cuales presentan una proteína mayoritaria común la cual no esta presente en otras membranas externas de bacterias Gram negativas relacionadas con la patogénesis del tracto respiratorio del cerdo (Cruz *et al.*, 1996). En *A. actinomycetemcomitans* se ha reportado la presencia de una OMPs con peso molecular aproximado de 34 kDa la cual tiene homología con la proteína A (OMPA) de *Escherichia coli* y de otras bacterias Gram negativas. Posteriormente Komatsuzawa *et al.*, (2002) identificaron seis OMPs denominadas de acuerdo a su peso molecular

aparente como OMP100, OMP64, OMP39, OMP29, OMP18 y OMP16; cada OMP revela homología con algunos factores de virulencia responsables de la adhesión, invasión, resistencia a los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos presentes en el suero o proteínas antigénicas (White *et al.*, 1998).

Escasos son los reportes relacionados con la identificación de OMPs en *A. seminis* entre los cuales está el realizado por Stephens *et al.* (1983) quienes con la finalidad de conocer el perfil proteico de la envoltura celular de cepas de *Histophilus somni* aislado a partir de cerebro, prepucio, pulmón de bovino, *Histophilus ovis* obtenido de cerebro, sangre y vagina de ovino, *Haemophilus agni* de sangre de ovino; además de una cepa de referencia de *A. seminis* (ATCC 15768) y un aislamiento obtenido de un ovino con epididimitis realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS), los resultados indicaron que estas bacterias tienen en común proteínas de envoltura celular con peso molecular aparente de 75 kDa, 95 kDa, 34 kDa, 28 kDa y 13 kDa, además de proteínas minoritarias de alto y bajo peso molecular, las dos cepas de *A. seminis* mostraron un perfil común de proteínas resaltando las de 34 kDa y 13 kDa como mayoritarias y la de 75 kDa como minoritaria en ambos aislamientos (Stephens *et al.*, 1983).

Por otro lado, Healey *et al.* (1988), obtuvieron aislamientos de *A. seminis*, *A. actinomycetemcomitans* y trece aislamientos identificados como *Actinobacillus* spp. recuperados a partir de carneros con cuadro de epididimitis, de los anteriores se obtuvieron extractos celulares empleando *n*-octyl- β -D-glucopiranosil para realizar la identificación de OMPs mediante electroforesis en geles discontinuos. Los resultados indican que el perfil de proteínas mostrado por microorganismos del género

Actinobacillus aislados a partir de animales con epididimitis, incluyen al grupo de proteínas con masa molecular aparente entre 26-94 kDa y un segundo grupo compuesto por cepas que muestran un perfil proteico diferente al anterior; Con lo cual se concluyó que los miembros del género *Actinobacillus* aislados a partir de carneros con epididimitis son de diferentes especies ya que cada uno muestra diferente perfil proteico (Healey *et al.*, 1988).

1.4 LIPOPOLISACÁRIDO.

El lipopolisacárido (LPS) es una estructura de alto peso molecular localizado en la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Está compuesto por una parte lipídica (lípidio A), la cual está unida a la parte polisacárida (polisacárido central) formada por azúcares que incluyen al KDO (ácido-2-ceto-desoxi-D-manosa octulosónico), unido a la cadena "O" específica. La cadena "O" está formada por unidades repetidas de glucosa, galactosa, ramnosa, azúcares aminados como N-acetil-gucosamina y N-acetil-galactosamina, que le confieren propiedades antigénicas específicas, además de proporcionarle características fenotípicas de LPS liso, semirugoso y rugoso. Como este antígeno puede ser compartido por diferentes serotipos relacionados, es considerado como responsable de las reacciones cruzadas entre serotipos (Fedorka-Cray *et al.*, 1994).

Dentro de las propiedades biológicas del LPS están las de presentar actividad de endotoxina, gelificar los amebocitos del género *Limulus*, producir reacción de Schwartzman, actuar como pirógeno exógeno e inducir la liberación de mediadores de la inflamación (IL-1, IL-6, factor de necrosis tumoral, macrófagos) (Fedorka-Cray *et al.*, 1994). *Actinobacillus pleuropneumoniae* tiene LPS tanto liso como rugoso,

dependiendo del serotipo, por otro lado, dentro del género *Actinobacillus* hay especies que muestran ambos fenotipos, liso y rugoso (Haase, *et al.*, 1999); sin embargo, actualmente no existen reportes que indiquen cuál LPS presenta *A. seminis*.

1.5 TRANSMISIÓN, PATOGÉNESIS Y SIGNOS CLÍNICOS.

La epididimitis contagiosa del carnero es una enfermedad infectocontagiosa que puede tener un curso agudo o crónico, afecta a la especie ovina en donde los machos son altamente susceptibles teniendo como puerta de entrada las mucosas uretral, rectal y en el caso de las hembras la vaginal, esta infección tiene severas repercusiones económicas en países dedicados a la crianza de estos animales.

Son diversos los agentes bacterianos asociados con esta enfermedad, tal es el caso de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Haemophilus agni*, *Histophilus somni*, *Pasteurella heomolytica*, *Staphylococcus* spp y *Streptococcus* spp, sin embargo los dos microorganismos que con mayor frecuencia se recuperan de animales que presentan el cuadro clínico característico de este padecimiento son en primer lugar *B. ovis*, seguida de *A. seminis*. Ambos producen los signos característico de la epididimitis como inflamación, edema, induración y formación de tejido cicatrizado en el epidídimo, disminución de la fertilidad, baja calidad del semen, presencia de granulomas espermáticos y fibrosis progresiva del epidídimo; clínicamente la enfermedad es similar cuando es causada por *B. ovis* (común en borregos adultos) o *A. seminis* (común en corderos jóvenes) (Ajai *et al.*, 1980; Flores, 1986; Ley, 1993; Genetzky, 1995).

A. seminis también puede producir abortos tardíos en las hembras y un aumento de la mortalidad perinatal. El carnero con o sin lesiones transmite la infección en

forma directa durante la monta, por contacto prepucial o rectal a otro carnero, o son eliminadas en el semen y en la orina. La infección indirecta es común a través de las hembras, que excretan las bacterias en secreciones vaginales, leche y placenta (Genetzky, 1995; Appuhamy *et al.*, 1998;; de la Puente-Redondo *et al.*, 2000). En el caso de las hembras la infección se inicia con una etapa de bacteremia prolongada y rara vez se presentan lesiones aparentes, sin embargo puede haber exudado purulento y en hembras gestantes se presentan la muerte y la expulsión del feto (Flores, 1986).

La patogénesis de la epididimitis causada por *A. seminis* es incierta, sin embargo se han propuesto teorías que tratan de explicar este proceso. Jansen en 1983 sugirió que *A. seminis* es un microorganismo ambiental que invade la cavidad prepucial y es capaz de ascender a las partes profundas del tracto genital del carnero; también establece que la infección se presenta en los animales jóvenes, más vigorosos y de mayor velocidad de crecimiento. Jansen, (1980) estudió el papel del estado hormonal en la migración de los microorganismos de las partes superficiales del aparato reproductor (mucosa peneana) a las profundas (epidídimo y testículo), con base en los cambios que se producen a nivel del aparato reproductor durante el despertar de la pubertad, especialmente en las células del epitelio epididimal. Únicamente se aisló *A. seminis* de la próstata, vesículas seminales y ámpula del deferente y en un caso de la cola del epidídimo, cuando inoculó la bacteria en el extremo de la uretra y realizó tratamientos con hormona luteinizante (Jansen, 1980). Por otro lado, Sponenberg, (1983) indica que es poco probable la infección por vía ascendente, por no aislar el microorganismo en glándulas ascendentes, debido a que se aisla el microorganismo en glándulas anexas en un caso clínico de epididimitis por *A. seminis*. Posteriormente Walker y Leamaster en 1986 sugirieron que por formar parte

de la flora normal bacteriana del aparato genital de ovinos tanto de machos como de hembras, por razones no conocidas, puede provocar epididimitis en algunos animales; por lo anterior se desconoce si esta bacteria se comporta como patógeno primario o secundario (Walker *et al.*, 1986).

Una vez que las bacterias penetran al organismo se presenta una fase transitoria de bacteremia para posteriormente culminar con la localización de éstas en la cola del epidídimo, manifestándose con una inflamación que puede ser unilateral o bilateral. Posteriormente se desarrolla un cuadro autoinmune debido a que la pared que cubre al túbulo se rompe, en esta etapa se desarrollan granulomas espermáticos y fibrosis progresiva del epidídimo que puede progresar a orquitis con resultados de infertilidad irreversible; la enfermedad se clasifica en subclínica y clínica (Jansen en 1983; Mbai *et al.*, 1996).

Alsenosy *et al.* (1985), reprodujeron cuadros clínicos de mastitis en ovejas por introducción directa de *A. seminis* en la glándula mamaria, al realizar las biopsias correspondientes la bacteria fue recuperada a partir de todas las glándulas inoculadas que mostraban lesiones, no así de tejidos como cerebro, sangre hígado, riñón, pulmón, útero o corazón.

1.6 DIAGNÓSTICO DE *A. seminis*.

La epididimitis ovina es una enfermedad importante en países dedicados a la crianza de estos animales, suele ser diagnosticada con base a una correcta anamnesis, examen clínico, estudios sexológicos, bacteriológicos y de semen (Baynes y Simmons, 1968, Genetzky, 1995). Estos estudios deben realizarse en forma periódica, incluyendo un control durante la pubertad y en animales en servicio, se debe incluir un estudio

detallado dos meses antes de la época de monta y un estudio posterior a la misma (Ley, 1993; Appuhamy, *et al.*, 1998). Es importante recurrir a las pruebas de laboratorio para identificar animales infectados que no manifiesten signos clínicos y determinar que microorganismo es responsable (Watt, 1972, Webb *et al.*, 1980). El diagnóstico clínico no tiene valor definitivo debido a que existen animales infectados que no presentan manifestaciones por lo que es necesario recurrir a pruebas serológicas y bacteriológicas para establecer un diagnóstico preciso (Ficapal, 1993).

Actualmente el diagnóstico de la epididimitis por *A. seminis* se realiza de acuerdo a signos clínicos, patológicos y examen bacteriológico del semen, sin embargo estos no ayudan a identificar a este microorganismo. Por otro lado el aislamiento bacteriológico es tardado debido a que la muestra va contaminada con otros microorganismos los cuales pueden formar parte de flora normal bacteriana, además de que dentro de las pruebas bioquímicas empleadas en el análisis bacteriológico no existe alguna específica que ayude a identificar *A. seminis* de los principales microorganismos asociado con la epididimitis (Tabla 1) (Ajai, 1980).

1.6.1 Clínico:

La obtención y examen del contenido escrotal es utilizada para identificar a los carneros con epididimitis (Hughes *et al.*, 1968), sin embargo, no tiene valor definitivo para el diagnóstico de la infección por *A. seminis* debido a que existen animales infectados que no presentan manifestaciones clínicas ya que puede aparecer como resultado de un traumatismo o de otros factores (Watt, 1972; Webb *et al.*, 1980).

A partir de carneros con lesiones testiculares y epididimales se han identificado y aislado diferentes microorganismos siendo *Brucella ovis* aislado con

mayor frecuencia (Ajai *et al.*, 1980), seguido de otros microorganismos como *Histophilus ovis* (Claxton *et al.*, 1966), *Actinobacillus seminis* (Baynes, *et al.*, 1960; Livingston *et al.*, 1964; Ekdahl *et al.*, 1968; van Tonder 1973, Heath *et al.*, 1991, Mbai *et al.*, 1966; de la Puente Redondon *et al.*, 2000) *Actinobacillus lignieresii* (Hughes *et al.*, 1968), *Actinobacillus acinomycetemcomitans* (DeLong *et al.*, 1979; Komatsuzawa *et al.*, 2002), *Pasteurella* spp. (Edkall *et al.*, 1968), *Bacteroides* (Edkall *et al.*, 1968), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Zamora *et al.*, 1977; DeLong *et al.*, 1979; Yersinia *pseudotuberculosis* (Zamora *et al.* 1977), *Brucella abortus* y *B. melitensis* (Edkall *et al.*, 1968; Jubb *et al.*, 1974; Kulshreshtha *et al.*, 1978), *Corynebacterium pyogenes* (DeLong *et al.*, 1979; Zamora *et al.* 1977), *Chlamydia* (Euxter *et al.*, 1970; Store *et al.*, 1976; Rodolaski *et al.*, 1977) , *Escherichia coli* (Burgess *et al.*, 1981), *Staphylococcus* spp. (DeLong *et al.*, 1979, Zamora *et al.*, 1971 y 1977; Jansen, 1980), *Streptococcus* spp. (Bogdan, 1960), *Pseudomonas* spp. (Zamora *et al.*, 1971).

La gran variedad de microorganismos que pueden estar involucrados hacen necesario el recurrir a pruebas bacteriológicas a partir de semen extraído por electroeyaculación, previa limpieza del prepucio y pene, depositándolo en bolsa de colección estéril. Como paso siguiente se debe realizar la identificación por pruebas bioquímicas primarias y secundarias. Por otro lado, la muestra obtenida se utiliza en estudios de calidad seminal como: motilidad, concentración espermática, porcentaje de anomalías en cabeza, cuerpo y cola, además de porcentaje de espermatozoides vivos y muertos (Low *et al.*, 1995, Mabi *et al.*, 1996). Por otro lado se debe comprobar la presencia de células inflamatorias en frotis teñidos con Giemsa además de la presencia de bacilos pleomórficos Gram negativos (Heath *et al.*, 1991). Al realizar estudios bacteriológicos del semen es importante considerar que las bacterias no son

eliminadas de forma continua, por lo cual los muestreos deben hacerse en forma periódica, con el fin de lograr el aislamiento de *A. seminis* (Bremen *et al.*, 1982).

Van Tonder, (1979) concluye que en el diagnóstico individual y de hato se debe realizar una evaluación completa incluyendo examen clínico, de semen, bacteriológico y sexológico.

1.6.2 Serológico y de PCR:

Se han propuesto pruebas de tipo serológico para ser empleadas en el diagnóstico de la epididimitis causada por *A. seminis*; sin embargo, actualmente no existe una prueba diagnóstica de este tipo que se ocupe de forma rutinaria para la identificación de animales sintomáticos y asintomáticos. A continuación se mencionan las pruebas reportadas en la literatura:

Rehaley (1978) desarrolló la prueba de Fijación de Complemento para establecer una comparación serológica entre *H. ovis*, *A. seminis* y *B. ovis*, las cepas empleadas se obtuvieron a partir de animales que mostraban cuadro clínico de epididimitis, los anti - sueros se elaboraron en conejos. Los resultados indicaron que la infección producida por *A. seminis* e *H. ovis* no se puede diferenciar por la prueba de Fijación de Complemento a menos que el suero del animal infectado sea probado contra ambos antígenos y se mostró una diferencia significativa entre el título de cada uno. Por otro lado, se presentaron reacciones cruzadas a bajos títulos entre los sueros anti-*H. ovis* y anti-*A. seminis* con el anti-*B. ovis*, lo anterior sugiere que los antígenos empleados en las pruebas no son lo suficientemente específicos lo que explica por qué se obtienen resultados positivos en ovinos que presentan brucelosis, por lo que el autor propuso obtener antígenos más específicos que puedan ser

empleados en el desarrollo de ésta prueba; además, se estableció que existe una relación muy estrecha entre los microorganismos probados (Rehaley, 1978).

Ajai *et al.* (1980), establecieron la prueba de inmunofluorescencia directa e indirecta para el diagnóstico de epididimitis ovina, las cepas empleadas fueron *A. seminis* 15768, *B. ovis* 25840 y *C. pseudotuberculosis* 19410 todas ATCC, los antisueros fueron elaborados en cabras, la conjugación se realizó con isotiocianato de fluoresceína y las muestras biológicas empleadas fueron semen obtenido por electroeyaculación a partir de carneros infectados con las anteriores bacterias. Los resultados de este estudio demuestran que *A. seminis*, *B. ovis* y *C. pseudotuberculosis* pueden ser identificados específicamente por inmunofluorescencia observándose igual morfología bacteriana entre *B. ovis* y *C. pseudotuberculosis* destacando el pleomorfismo mostrado por *A. seminis*; sin embargo, las tres desarrollaron igual intensidad de fluorescencia. Es importante considerar que a diferencia de *A. seminis* y *B. ovis*, *C. pseudotuberculosis* es un coccobacilo Gram positivo que causa epididimitis supurativa, esta bacteria presenta actividad bioquímica determinable en el laboratorio la cual ayuda a su rápida identificación a partir de aislamientos; y sin embargo es importante considerar que este procedimiento no es conveniente cuando el tiempo de obtención de resultados es importante (Ajai *et al.*, 1980).

Cardenas *et al.* (1986), realizaron la detección de anticuerpos en carneros con epididimitis usando el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Para tal propósito se emplearon extractos de pared celular y antígenos obtenidos por sonicación y ultracentrifugación respectivamente a partir de aislamientos de muestras de semen de carneros y las cepas de referencia: *B. ovis* ATCC 25840, *A.*

seminis 15768 y *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522. Los sueros se obtuvieron de 5 carneros con diferentes historias clínicas, 2 sueros obtenidos lesiones de epididimitis en necropsia con aislamiento de *A. seminis*, 1 recuperado de carnero con epididimitis identificando como causa a *A. seminis*, uno con epididimitis y granuloma espermático sin aislamiento bacteriológico, una muestra de tejido testicular con aislamiento de *C. pseudotuberculosis* y 14 muestras séricas de animales sanos. Los resultados indican que cuando se emplea como antígeno extractos de pared celular dan bajos valores comparados con los obtenidos con células sonicadas. Se observó que estos antígenos no presentan alta especificidad ya que desarrollan reacciones cruzadas en animales no infectados con *A. seminis* lo cual se confirmó al identificar en la muestra *C. pseudotuberculosis*. Finalmente los sueros de animales sanos mostraron títulos de anticuerpos contra las tres bacterias y no presentaron signos de epididimitis, por lo anterior esta prueba no es confiable para detectar anticuerpos específicos contra *A. seminis* (Cardenas *et al.*, 1986).

En México, Méndez *et al.* (1986), determinaron la prevalencia de *A. seminis* en 6 diferentes rebaños localizados en los estados de México, Hidalgo, Distrito Federal, se tomaron muestras de suero de 307 ovinos y semen de 17 carneros. El estudio serológico se realizó con la prueba de inmunodifusión doble en agar empleando un antígeno soluble y suero control positivo ambos obtenidos a partir de la cepa de referencia ATCC15768, la identificación bacteriana fue con cultivo y pruebas bioquímicas, el antígeno se obtuvo por sonicación de las células. Los resultados indican que *A. seminis* esta presente en rebaños de la región central de México con una alta distribución, por lo que es necesario realizar más estudios para conocer la magnitud del

problema, sin embargo en animales que mostraron aislamientos positivo no fue así para la prueba de inmunodifusión (Méndez *et al.*, 1996).

Recientemente se han sugerido métodos moleculares rápidos, como la identificación de ácidos nucleicos de una región blanco específica del genoma bacteriano por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que es ampliamente utilizada para la detección y diagnóstico de patógenos. PCR presenta características como alta sensibilidad, no requerir agente vivo, evidenciar una infección aunque el individuo se encuentre en ventana inmunológica permite disminuir la transmisión de estas infecciones; sin embargo su implementación requiere de infraestructura física y personal muy especializados. Esta técnica permite la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de DNA existentes en una muestra en número de decenas a niveles de millones de copias en pocas horas, detectando posteriormente dichas secuencias mediante hibridación de ácidos nucleicos o electroforesis (Bell, 1989).

La técnica de PCR se ha utilizado para realizar un rápida identificación de *A. seminis* y establecer diferencias con otros géneros bacterianos. Una región del genoma bacteriano que parece proporcionar un adecuado blanco para la identificación de la bacteria es la región espaciadora entre los genes 16S y 23S rARN. La amplificación del PCR de la región espaciadora 16S-23S rARN ha sido sugerida como base de la identificación universal de la bacteria. Appuhamy *et al.* (1998), muestran que la prueba de PCR ribotipo de la región espaciadora 16S-23S rARN genera dos amplificaciones comunes a partir de todas las muestras de donde se aisló *A. seminis*, posteriormente

utilizaron las secuencias de esas dos regiones espaciadoras intergénicas y elaboraron iniciadores especie-específicos para la rápida detección e identificación de *A. seminis* por PCR. Para este PCR específico se diseñaron iniciadores que amplifican una región del gen *rrnB* que es uno de los operones ribosomales caracterizados, los cuales codifican para dos ARN de transferencia (tARN-Ile y tARN-Ala). Las muestras utilizados se obtuvieron de semen de carnero, las cuales ya se había aislado e identificado *A. seminis*, con estas muestras obtuvieron un solo producto de 436 bp y se obtuvo amplificación con otras bacterias del tracto reproductor ovino (Appuhamy *et al.*, 1998).

JUSTIFICACIÓN

La importación de ganado ovino a nuestro país ha superado el 50% del abasto nacional, lo que incrementa el riesgo de la introducción de enfermedades por algunos lotes que son desviados en su trayecto a la crianza. Este ganado de introducción puede diseminar diversas infecciones, tal es el caso de la epididimitis causada por *A. seminis*.

No se cuenta con un diagnóstico serológico confiable para determinar la presencia de *A. seminis* y con el diagnóstico clínico es imposible distinguir una infección epididimal causada por este microorganismo en carneros.

HIPÓTESIS

Algunas proteínas purificadas de la membrana externa de *A. seminis* podrían ser adecuadas para su uso como antígenos en el desarrollo de pruebas diagnósticas.

OBJETIVO GENERAL

Identificación de una proteína específica e inmunogénica de *Actinobacillus seminis*, la cual será empleada como antígeno en el desarrollo de una prueba de ELISA indirecta.

Objetivos particulares:

1. Obtener de fracciones subcelulares de *A. seminis* ATCC 15768 mediante el método de Sarcosyl determinando su perfil electroforético en PAGE-SDS y el reconocimiento de las proteínas que son inmunogénicas mediante la técnica de Inmunoelectrotransferencia.
2. Identificar mediante inmunotransferencia una proteína inmunogénica que únicamente sea identificada por suero hiperinmune de *A. seminis* obtenido en conejos.
3. Purificar la proteína seleccionada por electroelución.
4. Determinar mediante microscopia electrónica la liberación de microvesículas de excreción de *A. seminis* así como el perfil de proteínas presentes en las mismas.
5. Desarrollar una prueba de ELISA indirecta, empleando como antígeno la proteína seleccionada y probada con sueros hiperinmunes de *A. seminis*, *B. ovis*, *M. haemolytica*, *P. multocida* y *H. somni*.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1 Crecimiento de la cepa de referencia de *A. seminis*

Todas las cepas bacterianas empleadas en este trabajo las cuales son mencionadas en la tabla 3, se sembraron en caldo infusión cerebro y corazón (BHI) (Difco, Detroit, MI, USA) y posteriormente transferidas a placas de agar suplementadas con 5% de sangre de bovino desfibrinada. Todos los cultivos bacterianos fueron mantenidos a 37 C y 10% de CO₂ durante 48 horas.

Tabla 2. Cepas bacterianas de referencia y aislamientos

Bacteria	Clave	Origen
<i>Actinobacillus seminis</i>	15768 Aislamiento	ATCC ^a INIFAP – SAGARPA ^b , Méx.
<i>Brucella ovis</i>	BP 2001 (Aislamiento) BP 2002 (Aislamiento)	BUAP ^c , Méx.
<i>Mannheimia haemolytica</i>	GM31 (Aislamiento) EH 28 (Aislamiento) CA22 (Aislamiento) MA16 (Aislamiento) SC17 (Aislamiento)	FESC, UNAM ^d , Méx.
<i>Pasteurella multocida</i>	SM13 (Aislamiento) AC14 (Aislamiento) SA15 (Aislamiento) AE28 (Aislamiento) SC17 (Aislamiento)	FESC, UNAM ^d , Méx.
<i>Histophilus somni</i>	Aislamiento	INIFAP–SAGARPA ^b , Méx.

^a La cepa de *A. seminis* fue adquirida de *American Type Culture Collection* (ATCC) con clave 15768 (número de orden so82885).

^b Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

^c Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

^d Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Universidad Nacional Autónoma de México.

2.2 Obtención de fracciones subcelulares (membrana externa, membrana interna y citosol) de *A. seminis*

A partir de un crecimiento de *A. seminis* en agar sangre, las células fueron recuperadas en HEPES 10 mM y se lavaron dos veces, la pastilla obtenida fue suspendida en HEPES 10 mM conteniendo como inhibidores de proteasas PMSF 0.1 M (fenil-metil-sulfonil-fluoruro), PHMB (p-hidroxi-mercuribenzoato) y EDTA 2 mM (ácido etilendiaminotetracético). El rompimiento celular se realizó mediante sonicación empleando un sonicador Vibra-cell (Sonios, Newton, Connecticut, USA) con 6 ciclos, cada uno con una duración de 1 minuto por un minuto de descanso. Los detritus celulares fueron removidos centrifugando a 10,000 X g durante 20 minutos, posteriormente el sobrenadante fue centrifugado a 150,000 X g durante 1 hora. El sobrenadante se encontraba enriquecido con proteínas citosólicas (CPS) y la pastilla contenía proteínas de membranas totales; este sedimento fue suspendido en HEPES 10 mM con SDS 1% (N-laurilsarcosina de sodio) (Sarkosyl; Sigma Chemical) y fue sometido a agitación durante 30 minutos a 37 C para posteriormente ser centrifugado a 150,000 X g por 1 hora; la pastilla contenía las proteínas de membrana externa (OMPs) y el sobrenadante las de membrana interna (IMPs), (Filip *et al.*, 1973; Morton *et al.*, 1996).

Para obtener las proteínas contenidas en la pastilla se empleó el método de recuperación cuantitativa de proteínas diluídas en solución de detergentes y lípidos (Wessel y Flugge, 1984), para lo cual a 0.1 ml de OMPs se le adicionaron 0.4 ml de metanol absoluto, la mezcla se centrifugó a 9,000 X g por 30 segundos para la colección total de la muestra, posteriormente se agregó 0.1 ml de cloroformo, se agitó y centrifugó a 9,000 X g durante 1 minuto desechando la fase superior. A la fase clorofórmica (fase inferior) se le agregó 0.3 ml de metanol, se agitó y centrifugó a 9,000 X g durante 1 minuto en

refrigeración. Se separó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente y se guardó a 4 C hasta su uso. Para recuperar las proteínas de IMPs y CPs, estas fracciones fueron precipitadas con etanol frío a una relación de 1:4 v/v dejándolas en refrigeración toda la noche, se centrifugaron a 10,000 X g y el precipitado se secó a temperatura ambiente guardando la pastilla a 4 C hasta su uso. La concentración de proteínas de las fracciones subcelulares se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

2.3. Determinación de lipopolisacárido en la membrana externa de *A. seminis*

La detección de LPS presente en la OMP de *A. seminis* se desarrolló con la técnica de tinción de plata descrita por Tsai *et al.* (1982), para lo cual se llevó a cabo un corrimiento electroforético en poliacrilamida-SDS-urea a una concentración de gel separador del 6% en el que se colocaron células completas y fracciones subcelulares de *A. seminis* y como controles LPS liso de *B. melitensis* y rugoso de *B. ovis*, el gel se fijó toda la noche en solución fijadora (etanol 40%, ácido acético 5%). Posteriormente se oxidaron los azúcares presentes en el LPS con una solución de ácido periódico al 0.7%, etanol al 40% y ácido acético al 5%, después de 5 minutos el gel se lavó con agua desionizada para inmediatamente realizar la tinción adicionando el reactivo de plata amoniacal (NaOH 0.1 N, NH₄OH 14.8 M, AgNO₃ 20%) durante 10 minutos en total oscuridad y agitación continua, después se hicieron tres lavados con agua desionizada y se reveló con formaldehído al 0.0185% y ácido cítrico al 0.005%. Una vez desarrolladas las bandas, la tinción se detuvo con ácido acético al 5% (Tsai *et al.*, 1982).

2.4 Cuantificación de endotoxina en fracciones subcelulares de *A. seminis*

Con la finalidad de determinar la pureza de las fracciones subcelulares de *A. seminis* se ensayó la presencia de endotoxina por el método de *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) QCL-1000 (Quantitative Chromogenic LAL) (Bio Whittaker, Md, USA).

La endotoxina de bacterias Gram-negativas cataliza la activación de una proenzima presente en el Lisado de Amebocitos de *Limulus* (Young, *et al.*, 1972), el grado de activación está determinado por la concentración presente de endotoxina, la enzima activada cataliza la separación de p - Nitroanilina (p-NA) de color amarillo de un péptido incoloro; la p-NA liberada es determinada fotométricamente a una longitud de onda de 405 - 410 nm. El principio bioquímico es el siguiente:



El proceso fue el siguiente:

La microplaca se preincubó a 37 C durante 30 minutos, se adicionaron 50 µl de las fracciones subcelulares, el estándar (endotoxina de *E. coli*) y como blanco agua libre de pirógenos, posteriormente se adicionaron 50 µl de LAL incubando 10 minutos a 37 C, posteriormente se agregaron 100 µl del substrato incubando 16 minutos a 37 C; la reacción se detuvo y se determinaron las absorbancias a la par de la curva estándar.

La concentración de endotoxina presente en la muestra de OMP de *A. seminis* se obtuvo interpolando las lecturas obtenidas de cada muestra con las obtenidas en la curva estándar.

2.5 Cuantificación de proteínas

Previo al corrimiento electroforético se realizó la cuantificación de proteínas presentes en extractos y fracciones celulares por el método de Bradford (Bradford, 1976). La curva patrón fue preparada como se describe en la tabla 2:

Tabla 3: Curva patrón para cuantificación de proteínas por método de Bradford, (1976).

Tubo	Agua destilada (μ l)	(μ l) de ABS (1 μ g/ml)	Reactivo de Bradford (μ l)
Blanco	10	-	200
2	9	1	200
3	8	2	200
4	7	3	200
5	6	4	200
6	5	5	200
Problema	10	-	200

ABS: Albúmina sérica bovina

Todos los tubos se mezclaron y dejaron reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente para ser leídos en un espectrofotómetro a una $\lambda = 595$ nm. La absorbancia mostrada por las muestras problema fue interpolada en una gráfica construida con los datos de la curva estándar, obteniendo así el valor de la concentración de la muestra problema.

2.6 Producción de sueros hiperinmunes

Para cada protocolo de inmunización se emplearon 2 conejos de la raza Nueva Zelanda de 2.0 Kg de peso cada uno.

2.6.1 Suero hiperinmune de conejo anti – *A. seminis*

Se preparó una suspensión con células sonicadas de *A. seminis* (1.5×10^8 UFC / ml) inactivadas con autoclave (15lb, 121C) para inocular a los dos conejos por vía intramuscular con un volumen total de 2 ml, inicialmente se empleó adyuvante completo de Freund más células completas, 20 días después con adyuvante incompleto de Freund. Posteriormente se llevaron a cabo tres inoculaciones semanales más por vía intramuscular sin adyuvante; los títulos de anticuerpos fueron determinados por la técnica de Dot-ELISA empleando como antígeno células completas inactivadas de *A. seminis* (Cloackaert, 1997).

2.6.2 Suero hiperinmune de conejo anti – *B. ovis*, *M. haemolytica*, *P. multocida* y *H. somni*

El suero anti – *B. ovis* fue donado por FESC-UNAM, los sueros anti - *M. haemolytica*, *P. multocida* y *H. somni* fueron donados por CENID-Microbiología, INIFAP-SAGARPA, todos los sueros fueron producidos en conejos empleando células sonicadas. Los títulos de anticuerpos fueron de 1:2000 para *B. ovis* y 1:1000 para las bacterias restantes.

2.6.3 Suero hiperinmune contra la proteína de 75 kDa de *A. seminis*

En el segundo protocolo de inmunización ambos conejos fueron inoculados con la proteína de 75 kDa a una concentración de $4.58 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ contenida en el gel SDS-PAGE al 7.5 %, el gel fue previamente macerado y mezclado con SSF estéril en un volumen aproximado de 1.5 ml. La inoculación fue por vía intramuscular cada tercer

día; en la tabla 4 se muestran los días y vía de inoculación y en la tabla 5 la toma de muestra sanguínea.

Tabla 4. Protocolo de inmunización para la proteína de 75 kDa.

Día	Vía de inoculación	Inóculo
0 - 25	Intramuscular	1.5 ml de proteína de 75 kDa de <i>A. seminis</i> contenida en poliacrilamida macerada
26	Intravenosa	0.5 ml de proteína de 75 kDa de <i>A. seminis</i> eluida
27 - 35	Intramuscular	1.5 ml de proteína de 75 kDa de <i>A. seminis</i> contenida en poliacrilamida macerada
36	Intravenosa	0.5 ml de proteína de 75 kDa de <i>A. seminis</i> eluida

Tabla 5. Protocolo de toma de muestra de conejos inoculados con la proteína de 75 kDa.

Día	Vía
0	Intravenosa
10	Intravenosa
15	Intravenosa
20	Intravenosa
25	Intravenosa
30	Intravenosa
37	Cardiaca

2.6.4 Titulación de sueros hiperinmunes

Los sueros hiperinmunes obtenidos se titularon por la prueba de Dot-ELISA, para ambos se cortaron círculos de membrana de nitrocelulosa (Gibco Laboratorios, Carlsbad, California, USA) de 0.45 μm . Los antígenos empleados fueron la proteína obtenida por elusión a una concentración de 4.58 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ y células sonicadas 1.5×10^8

UFC / ml, de cada uno se adicionaron 50 µl, se dejó adsorber durante 24 horas a 37 C. Posteriormente se realizaron tres lavados con 100 µl de TBS (Tris-NaCl 20 mM pH 7.5). El bloqueo se realizó durante 1 hora a 37 C con leche descremada al 5%, transcurrido el tiempo se lavó tres veces con 100 µl de TBS. Se procedió a adicionar 50 µl de cada uno de los sueros hiperinmunes a titular en diluciones dobles, incubando 2 horas a 37 C; lavando tres veces con 100 µl de TBS. La adición del segundo anticuerpo consistió en adicionar 100 µl de anti-IgG de conejo peroxidado (Sigma) diluido 1:1000 dejando incubar 2 horas a 37 C; lavando tres veces con 100 µl de TBS. El revelado de la reacción en el papel se realizó adicionando 100 µl de ABTS-H₂O₂ (Ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina sulfónico – Peróxido de hidrógeno) (Sigma Chemical, Co.) incubando durante 15 minutos a 37 C; transcurrido este tiempo retiro la solución reveladora realizando un lavado con agua desionizada. La identificación del título de cada muestra se determinó por la visualización de la intensidad de coloración desarrollada (Gavilondo, 1995).

2.7 SDS – PAGE y Western blot de fracciones subcelulares y células sonicadas de *A. seminis*; SDS – PAGE y Western-blot de células sonicadas de *B. ovis*, *M. haemolytica*, *P. multocida* y *H. somni*.

Las células completas sonicadas y fracciones celulares de *A. seminis* y las células completas de *Brucella ovis* (*B. ovis*), *Manheimia haemolytica* (*M. haemolytica*), *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) y *Histophilus somni* (*H. somni*) separadas por SDS-PAGE en geles que midieron 8 cm de alto y 10 cm de ancho y 0.75 mm grosor a una concentración de gel separador del 10% (Laemmli, 1970) a 100 Volts durante 140 minutos, empleando la cámara electroforética MiniProtean II (Biorad, USA) y los geles

fueron teñidos con Azul brillante de Coomassie R-250. La masa molecular aparente de las proteínas se determinó empleando marcadores proteicos comparando la movilidad relativa de éstos con la de las proteínas obtenidas en las fracciones subcelulares. Para la inmunotransferencia, después de realizar la electroforesis, las proteínas fueron transferidas según la técnica descrita por Towbin *et al.* (1979), a membranas de nitrocelulosa (Gibco) de 0.45 μm (Gibco, USA), empleando la Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell BioRad Laboratories, Inc. Hercules, California, USA) a 100 Volts / 400 mAmp durante 1 hora. Para lograr visualizar las proteínas inmunogénicas presentes en células lisadas y fracciones subcelulares se emplearon sueros policlonales producidos en conejo contra *A. seminis*, *B. ovis*, *M. haemolytica*, *P. multocida* y *H. somni* (ver arriba) todos ellos con un título de 1:20 y como anticuerpo secundario anti-IgG de conejo preparado en cabra y conjugado con peroxidasa diluido 1:1000 (Sigma Chemical, Co.). El revelado de la reacción en el papel se realizó adicionando 100 μl de ABTS-H₂O₂ (Sigma Chemical, Co.).

Por otro lado se realizó la separación electroforética de extractos crudos de *B. ovis*, *M. haemolytica*, *P. multocida* y *H. somni* y se enfrentaron con suero policlonal contra *A. seminis* producido en conejo y sueros hiperinmunes de cepas de campo. Como anticuerpo secundario anti-IgG de conejo preparado en cabra y conjugado con peroxidasa diluido 1:1000 (Sigma Chemical, Co.).

2.8 Purificación y Western-blot de la proteína de 75 kDa de *A. seminis*

Para la purificación de la proteína con peso molecular aparente 75 kDa de *A. seminis* 15768, se realizó un corrimiento electroforético de las OMPs en SDS-PAGE al

12% (Laemmli, 1970) en una cámara Hoefer (16 cm X 0.2 cm X 18 cm), (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco California, USA). Posteriormente la banda de la proteína se cortó del gel para ser electroeluida en una cámara Mini Protean III (BioRad), empleando un voltaje de 60 mAmp durante 3 horas. Para la recuperación de la proteína, el material eluido fue precipitado con 4 volúmenes de etanol frío y mantenido durante 24 horas a 4 C y centrifugado a 10, 000 X g por 5 minutos, el etanol se decantó y la proteína se dejó secar a temperatura ambiente (Scopes, 1988). Finalmente, el precipitado obtenido fue resuspendido en agua deionizada para la cuantificación de proteínas, la pureza de la proteína fue comprobada SDS-PAGE al 12% (Laemmli, 1970) empleando como referencia marcadores de peso molecular.

Con la finalidad de comprobar la pureza de la proteína de 75 kDa y corroborar se presenta actividad inmunogénica se realizó Western blot empleando antisuero de conejo contra la proteína de 75 kDa de *A. seminis*. Por otro lado, para determinar si ésta proteína es específica de *A. seminis*, se emplearon cepas obtenidas a partir de tejidos de carneros infectados con *B. ovis*, *M. haemolytica*, *P. multocida* y *H. somni* (ver tabla 2). Las células sonicadas fueron separadas por SDS-PAGE al 12% (Laemmli, 1970), las proteínas fueron electrotransferidas (Towbin *et al.*, 1979), a membrana de nitrocelulosa (Gibco) de 45 µm durante 1 hora a 400 mAmp, y enfrentadas con antisuero de conejo contra la proteína de 75 kDa, como anticuerpo secundario anti-IgG de conejo preparado en cabra y conjugado con peroxidasa diluido 1:1000 (Sigma Chemical, Co.). El revelado de la reacción en el papel se realizó adicionando 100 µl de ABTS-H₂O₂ (Sigma Chemical, Co.).

2.9 Obtención de microvesículas de membrana externa de *A. seminis*

Después de crecer la bacteria en agar *Brucella* por 48 horas a 37 C se cosechó con SSF, se centrifugó a 10, 000 X g por 20 min. a 4 C y el sobrenadante se filtró a través de membrana de nitrocelulosa de diámetro de poro 0.22 µm. Finalmente el filtrado se ultracentrifugó a 150, 000 X g durante 1 hora a 4 C, las vesículas fueron resuspendidas en agua desionizada congeladas (-20 C) hasta su uso (Gamazo *et al.*, 1989). Por otro lado el contenido de las vesículas se detectó por corrimiento electroforético en SDS-PAGE con una concentración de gel separador del 12% y posterior inmunotransferencia, enfrentando con suero hiperinmune (ver tablas 4 y 5) producido a partir de la proteína purificada.

2.9.1 Western-blot de microvesículas de *A. seminis*

Para determinar si la proteína de 75 kDa esta presente en las microvesículas, después de la electroforesis las proteínas de las vesículas fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa (Gibco) durante 1 hora a 400 mAmp (Towbin *et al.*, 1979). Las proteínas transferidas fueron enfrentadas con antisuero de conejo contra la proteína de 75 kDa de *A. seminis*, y de aislamientos de campo anti-*A. seminis*, *B. ovis*, *M. haemolytica*, *P. multocida* y *H. somni* (ver tabla 6) todos diluidos 1:20 como conjugado anti-IgG de conejo preparado en cabra y conjugado con peroxidasa diluido 1:1000 (Sigma Chemical, Co.). El revelado de la reacción en el papel se realizó adicionando 100 µl de ABTS-H₂O₂ (Sigma Chemical, Co.).

2.9.2 Microscopia electrónica de barrido (MEB)

La presencia de vesículas fue confirmada mediante microscopia electrónica de barrido, para lo cual la cepa de referencia fue crecida en agar *Brucella* e incubada en una atmósfera de CO₂ al 10% a 37 °C. A las 48 horas a partir de este crecimiento se tomó una muestra y se resuspendió en caldo BHI, los tubos fueron nuevamente incubados a las condiciones antes mencionadas. Posteriormente el cultivo fue homogenizado por inversión, se tomó 1 ml del cultivo y se depositó en tubo de ensaye agregando 1 ml de glutaraldehído al 25% y se dejó reposar por 24 horas. Transcurrido este tiempo se filtró la mezcla a través de membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm, utilizando un filtro para volúmenes pequeños. Una vez que las bacterias estaban contenidas en el papel, se colocaron en una caja Petri la cual contenía glutaraldehído al 25% dejándose reposar por 1 hora, lo anterior con el objeto de que cese la actividad biológica, se preserve la estructura celular, se mantenga la integridad de la superficie y se eviten cambios autolíticos por temperatura, pH, concentración de oxígeno y nutrientes. Posteriormente se continuó la deshidratación empleando etanol a concentraciones ascendentes desde 10% al absoluto. A continuación la muestra se colocó en un secador de punto crítico (modelo Tousimis Samdri-780). Una vez que la muestra fue deshidratada, ésta se montó en un porta muestra colocando en el mismo una cinta de Carbono Cemento Conductivo (CCC) permitiendo así su aseguramiento y se procedió a colocar el ionizador de oro para recubrir la muestra con oro; el objetivo fue que la muestra se convierta en conductora de corriente eléctrica y se proteja del haz de electrones secundarios, la capa debe ser suficientemente gruesa para permitir una buena resolución de la muestra y lo suficientemente delgada para no enmascarar o tapar

las características superficiales de interés. Finalmente la muestra se colocó en la cámara del ionizador, se selló y se programó el tiempo de recubrimiento (5 minutos) para que el oro se depositara uniformemente para obtener una capa de 50 Amstrong de grosor, se hizo vacío y automáticamente se recubrió la muestra; al finalizar el tiempo el aire ingresó lentamente a la cámara. La muestra fue observada en un microscopio electrónico de barrido modelo JSM-5410LV a una magnificación de 20,000 aumentos (Nezelof, 1975; Birbeck, 1995).

2.9.3 Microscopia electrónica de transmisión (MET)

La cepa de *A. seminis* ATCC 15768 se sembró en Agar sangre incubando a 37 C con 10 % de CO₂, a las 48 horas se observó el crecimiento bacteriológico, se realizó la recolección del crecimiento para su posterior lavado con agua desionizada estéril, del sobrenadante obtenido el cual contenía las vesículas suspendidas se tomó 1 ml agregándolo a tubo de ensaye con rosca estéril 13 x 100, posteriormente se le agregó 1 ml de glutaraldehído al 25% con la finalidad de fijar las células y permitir que cese la actividad biológica de la célula así como preservar la estructura celular (Birbeck, 1995).

Para la adsorción se colocó una gota de la suspensión de las bacterias en un trozo de papel parafilm, a esta gota se le colocó encima la rejilla para que adsorbiera la muestra, para realizar la adsorción se probaron diferentes tiempos (de 1 a 30 minutos) hasta encontrar el óptimo (20 minutos) (Nezeleof, 1975; Birbeck, 1978).

El elemento activo del ácido fosfotúngstico es el tungsteno (P.M. 183.92) con la especial característica de que este compuesto se asocia con cada molécula de 24 átomos de Carbono del mismo. Por el gran peso molecular de este ácido las tinciones electrónicas denotan una gran resistencia al bombardeo del haz de electrones en el

microscopio electrónico de transmisión, el ácido fosfotúngstico es un excelente colorante electrónico con selectividad para los componentes extracelulares como mucopolisacárido, membranas basales, gránulos de secreción, este ácido en general tiñe proteínas ya que es un colorante catiónico (Nezeleof, 1975; Birbeck, 1978). Una vez transcurrido el tiempo de adsorción en la rejilla, se adicionó una gota de ácido fosfotúngstico al 25 % en un trozo de papel parafilm y encima de esta gota se colocó la rejilla para que se adsorba el ácido, se emplearon diferentes tiempos de tinción los cuales fueron de 30 segundos, 1, 2, 3, 4 minutos y diferentes pH (6, 7, 8) para determinar en cual de ellos se observa un mejor contraste de la muestra. Transcurrido el tiempo de tinción se colocó 1 gota de agua destilada en un trozo de papel parafilm y encima se montó la rejilla, el tiempo de enjuague fue de 1 minuto esto con el objetivo de retirar las rejillas quitando el exceso de agua con un trozo de papel filtro y por último se dejaron secar a temperatura ambiente, una vez seca la muestra se observaron en un microscopio de transmisión modelo JEM-100S, a una magnificación empleada fue de 40,000 aumentos (Birbeck, 1995).

2.10 Inmunoensayo enzimático ligado a una enzima

El objetivo de esta prueba fue determinar si con la proteína inmunogénica seleccionada se puede montar una prueba de ELISA de tipo indirecto que podría ser empleada de manera rutinaria en el diagnóstico serológico de epididimitis causada por *A. seminis*. La prueba se realizó empleando sueros hiperinmunes obtenidos de carneros que mostraban cuadros de epididimitis con su correspondiente aislamiento e identificación microbiológica anti-*A. seminis*, *B. ovis*, *M. haemolytica*, *P. multocida* y *H. somni* (tablas 2 y 6).

Como fase sólida o inmunoabsorbente se utilizaron microplacas de poliestireno de 96 pozos, de fondo plano (Nunc-Immuno Plate PolySorp, InterMed, Dinamarca) con capacidad de 350 μ l. Para la adsorción de la proteína en las microplacas, se adicionaron 100 μ l de la proteína de 75 kDa a una concentración de 1 μ g/ml por pozo e incubando toda la noche a 4 C y se retiro la proteína. Posteriormente se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos agregando 100 μ l de leche descremada al 2% y se incubó toda la noche a 4 C, enseguida se agregaron 100 μ l por pozo de cada uno de los sueros hiperinmunes anti-*A. seminis*, *B. ovis*, *M. haemolytica*, *P. multocida* y *H. somni* (ver tabla 6) y como controles positivos sueros hiperinmunes obtenidos a partir de células sonicadas y de la proteína de 75 kDa de *A. seminis* incubando nuevamente a 4 C durante toda la noche. Posteriormente se adicionaron 100 μ l de conjugado (anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa) a una dilución 1:2000 incubando a 4 C durante toda la noche. Finalmente se agregaron 100 μ l por pozo del sustrato ABTS-H₂O₂ (Sigma Chemical, Co.) incubando durante 15 minutos a 4 C, transcurrido este tiempo se adicionaron 100 μ l de ácido sulfúrico 2.5 M para detener la reacción.

Entre cada paso se hicieron tres lavados cada uno con 100 μ l de PBS-Tween 20 (0.05 % pH 7.4). Las lecturas se tomaron en un lector de ELISA modelo 450 BIO-RAD a una longitud de onda de 405 nm.

3. RESULTADOS

3.1 Electroforesis y Western-blot de fracciones subcelulares de *A. seminis*

Para conocer el perfil proteico de las fracciones subcelulares e identificar la proteína específica e inmunogénica que únicamente sea reconocida por suero hiperinmune de *A. seminis* y no por bacterias productoras de cuadros de epididimitis (*B. ovis*, *H. somni*, *M. haemolytica* y *P. multocida*) los perfiles de proteínas de células sonicadas, fracciones subcelulares de *A. seminis* fueron analizadas por SDS-PAGE y Western-blot. La figura 1 muestra el patrón de células completas, OMP, IMP y CP teñidas con azul de Coomassie. La pureza de las proteínas de membrana externa fue verificada por la cuantificación de endotoxina mediante la prueba de LAL, ya que particularmente para el objetivo de este trabajo era importante comprobar que esta fracción subcelular se encontraba libre de contaminación por proteínas de membrana interna y citosólicas. La cantidad de endotoxina contenida en la OMP de *A. seminis* fue de 0.17 UE / ml y de 0.0 UE / ml para IMP y CP concluyendo así que las OMPs se obtuvieron prácticamente libres de contaminación con las otras fracciones subcelulares, además de realizar SDS-urea al 6% teñido con plata de OMP e IMP determinando así que *A. seminis* presenta LPS liso ya que la membrana externa muestra comportamiento electroforético y de tinción similar al desarrollado por el LPS de *B. mellitensis* el cual fue empleado como control de LPS liso (figura 8).

La figura 2 muestra el patrón correspondiente al Western blot de células sonicadas así como de fracciones subcelulares de *A. seminis* presentando alta reactividad antigénica cuando son enfrentadas con anti-suero anti-*A. seminis*, específicamente en las líneas 2 y 5 se muestran extractos celulares y OMP

respectivamente en los cuales se aprecia la presencia de una proteína con peso molecular aparente de 75 kDa la cual no está presente en las fracciones subcelulares restantes. Estos perfiles antigénicos proporcionan los primeros datos respecto a las proteínas presentes en las fracciones subcelulares de *A. seminis* obtenidas con el detergente Sarcosyl y mostradas en geles de poliacrilamida, por otro lado se identificó una proteína con propiedades inmunogénicas y que al parecer únicamente está presente en OMP.

3.2 Detección y purificación de una proteína específica de *A. seminis*

La prueba de Western blot fue desarrollada realizando SDS-PAGE a los extractos celulares de *A. seminis*, *B. ovis*, *H. somni*, *M. haemolytica* y *P. multocida* empleando como suero hiperinmune antisuero anti- *A. seminis*. La figura 5, línea 2 muestra una proteína de aproximadamente 75 kDa presente en extractos celulares de *A. seminis* la cual también es observada en las líneas 3 y 4 (proteína eluida y extracto de microvesículas), presentando en la última un considerable enriquecimiento; lo cual indica que tanto el método de electroelución como las microvesículas son una buena fuente para obtener a la proteína de 75 kDa pura, sin embargo en la última propuesta la proteína se encuentra enriquecida. Por otro lado, cuando reaccionaron los extractos celulares de *A. seminis* con antisueros anti-*B. ovis*, *H. somni*, *M. haemolytica* y *P. multocida* estos anticuerpos no reconocieron a la proteína de 75 kDa (figura 6, líneas 2, 3, 4, 5, 6 respectivamente), por lo anterior es de considerar que esta proteína puede ser específica de *A. seminis*.

En la figura 5, línea 3 se muestra el resultado de SDS-PAGE de la proteína de 75 kDa purificada por electroelución a partir de la OMP de *A. seminis*; la cual fue posteriormente enfrentada con suero hiperinmune anti- *A. seminis*, *B. ovis*, *H. somni*, *M. haemolytica* y *P. multocida*. El Western blot empleando suero anti- proteína de 75 kDa, anti-*A. seminis* de conejo, *B. ovis*, *H. somni*, *M. haemolytica*, *P. multocida* y anti-*A. seminis* las últimas cinco a partir de aislamiento de campo (tabla 6) obtenidos de carneros que mostraban problemas de epididimitis, los resultados revelaron que la proteína eluída fue reconocida únicamente por los sueros hiperinmunes de la cepa de campo de anti-*A. seminis*, (línea 7) y anti-proteína de 75 kDa, pero no por los antisueros anti- *B. ovis*, *H. somni*, *M. haemolytica* y *P. multocida* como se aprecia en la figura 6, líneas 2, 3, 4, 5, 6, 7 respectivamente. Los resultado anteriores confirman que la proteína de 75 kDa es específica de *A. seminis*.

3.3 Titulación de los sueros hiperinmunes obtenidos en conejo anti-células completas, anti-proteína de 75 kDa de *A. seminis* y de aislamientos.

La titulación de ambos sueros hiperinmunes se realizó por la técnica de Dot – ELISA, los títulos obtenidos se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Sueros hiperinmunes

Bacteria	Origen	Título
<i>Actinobacillus seminis</i>	15768 ^a	1:2050
	Aislamiento ^b	1:2000
	Proteína de 75 kDa ^a	1:4000
<i>Brucella ovis</i>	BP 2001 ^c (Aislamiento)	1:2000
	BP 2002 ^c (Aislamiento)	1:2000
<i>Mannheimia haemolytica</i>	GM31 ^d (Aislamiento)	1:1000
	EH28 ^d (Aislamiento)	1:1000
	CA22 ^d (Aislamiento)	1:1000
	MA16 ^d (Aislamiento)	1:1000
	SC17 ^d (Aislamiento)	1:1000
<i>Pasteurella multocida</i>	SM13 ^e (Aislamiento)	1:1000
	AC14 ^e (Aislamiento)	1:1000
	SA15 ^e (Aislamiento)	1:1000
	AE28 ^e (Aislamiento)	1:1000
	SC17 ^d (Aislamiento)	1:1000
<i>Histophilus somni</i>	Aislamiento ^b	1:1000

^a Suero de conejo anti- *A. seminis* American Type Culture Collection (ATCC) con clave 15768 (número de orden so82885).

^b Suero de aislamiento de carnero con epididimitis anti- *A. seminis*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

^a Suero de conejo anti- proteína de 75 kDa de *A. seminis*.

^c Sueros de aislamiento de carnero con epididimitis anti- *B. ovis*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

^d Sueros de aislamiento de carnero anti- *M. haemolytica*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Universidad Nacional Autónoma de México.

° Sueros de aislamiento de carnero anti- *P. multocida*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Universidad Nacional Autónoma de México.

3.4 Aislamiento de microvesículas de membrana externa de *A. seminis*

La liberación de microvesículas al medio de cultivo por parte de *A. seminis* las cuales fueron observadas por microscopia electrónica de barrido (figura 9A) y de transmisión presentadas en las figuras (9B y 9C). Las vesículas presentan una diversidad de tamaños de 20 a 100 nm, como lo indican reportes de microvesículas de *A. actinomycetemcomitans* (Meyer y Fives, 1993) y de *A. pleuropneumoniae* (Negrete et al., 2000). Las vesículas de *A. seminis* fueron concentradas por centrifugación para posteriormente ser analizadas por SDS-PAGE, en la figura 5, línea 4 se presenta el gel electroforético obtenido en donde se aprecia un enriquecimiento de la proteína de 75 kDa. La figura 7, línea 2 muestra que la proteína de 75 kDa presente en las microvesículas fue reconocida por antisuero de células sonicadas anti-*A. seminis* pero no por anticuerpos anti-*B. ovis*, *H. somni*, *M. haemolytica* y *P. multocida* (figura 7; líneas 3,4,5 y 6 respectivamente).

3.5 Inmunoensayo enzimático ligado a una enzima

Al realizar la prueba de ELISA indirecta empleando como antígeno la proteína con peso molecular aparente de 75 kDa de *A. seminis* y como anticuerpos sueros hiperinmunes obtenidos de carneros que mostraban cuadros de epididimitis (ver tablas 2 y 6) los resultados obtenidos indican que es posible emplear la proteína como antígeno ya que a una concentración de 1 µg/ml se observa la identificación del antígeno por parte del antisuero procedente de un carnero con cuadro de epididimitis y

aislamiento positivo de *A. seminis*, el suero hiperinmune producido en conejo anti-*A. seminis*, el suero hiperinmune contra la proteína de 75 kDa de *A. seminis* y no por los sueros anti-*B. ovis*, *M. haemolytica*, *P. multocida* y *H. somni*. Lo anterior se copncluyó ya que visualmente no se desarrolló coloración en los pozos de la microplaca (datos no mostrados).

4. FIGURAS

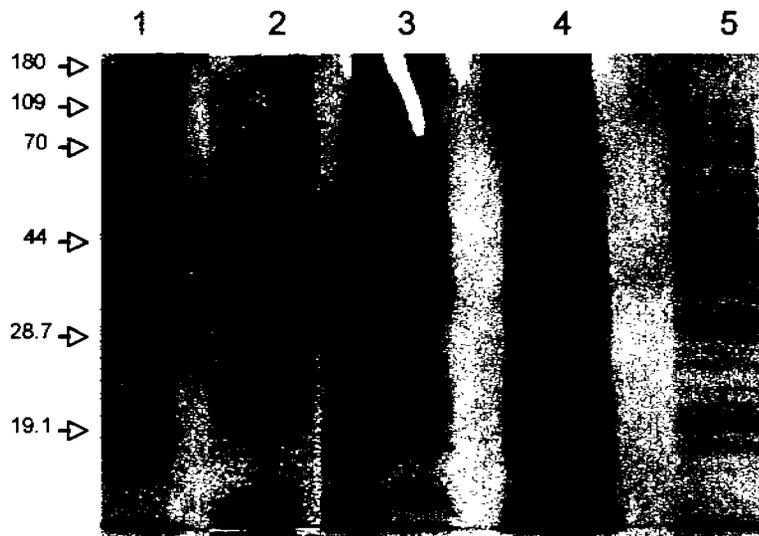


Figura 1. SDS-PAGE 10% de proteínas de extractos celulares y fracciones subcelulares de *A. seminis* teñidas con azul de Coomassie. Cada fracción contiene 10 μ g de proteína. Línea 1, marcadores de peso molecular; línea 2, extractos celulares; línea 3, OMP; línea 4, IMP; línea 5, CP.

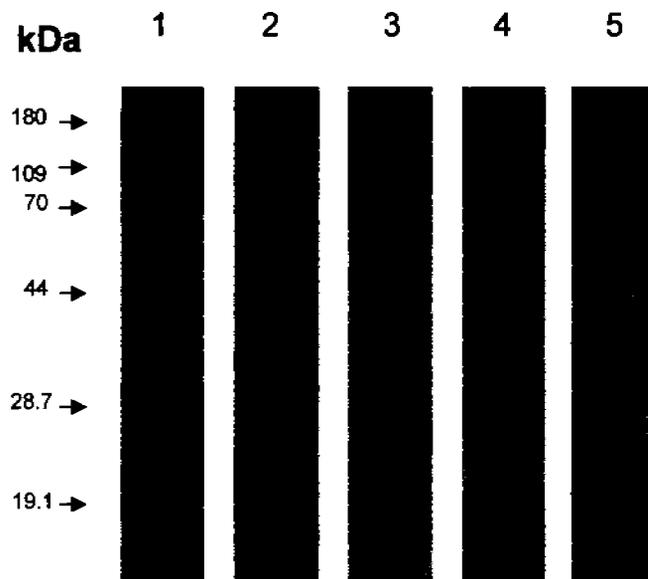


Figura 2. Western-blot de extractos celulares y fracciones subcelulares de *A. seminis* enfrentadas con antisuero de conejo anti-*A. seminis*. Cada fracción contiene 10 mg de proteína. Línea 1, marcadores de peso molecular; línea 2, extractos celulares; línea 3 CP; línea 4, IMP; línea 5, OMP.

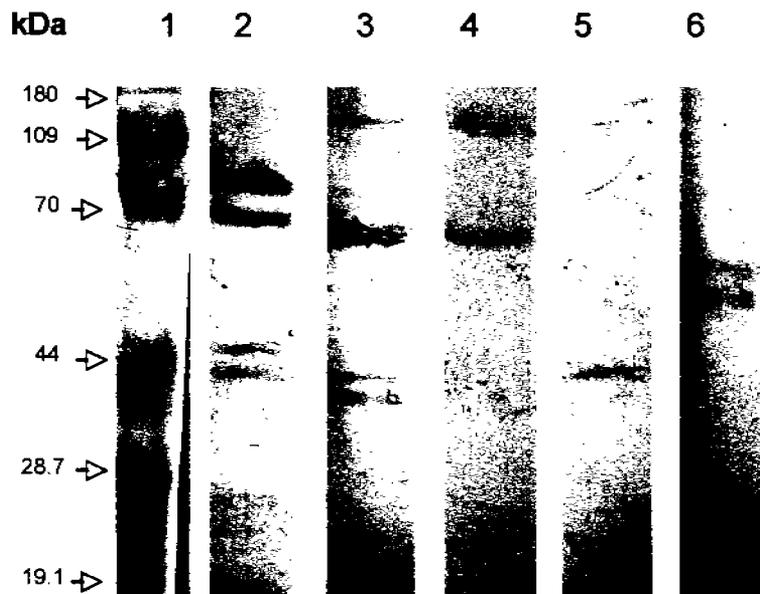


Figura 3. Western-blot de extractos celulares de bacterias asociadas con epididimitis infecciosa, empleando antisuero anti-*A. seminis*. Línea 1, marcadores de peso molecular, línea 2, *A. seminis*; línea 3, *B. ovis*; línea 4, *H. somni*; línea 5, *M. haemolytica*.

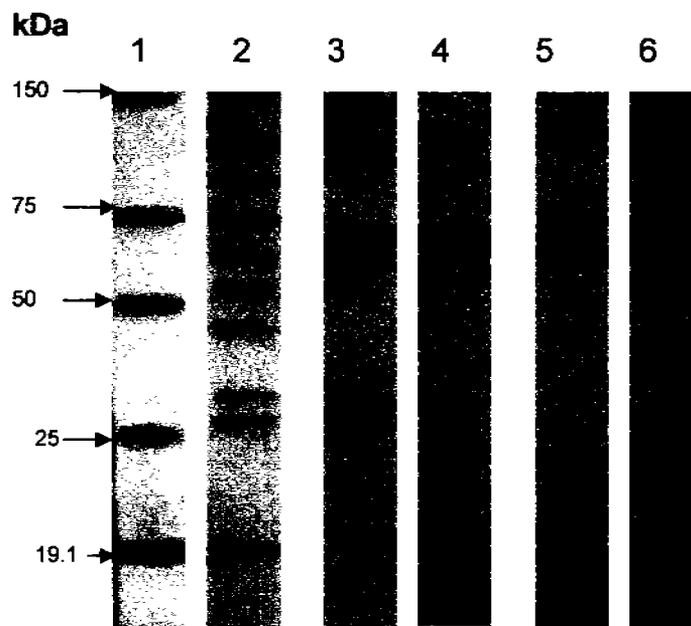


Figura 4. Western-blot de extractos celulares de *A. seminis* enfrentados con antisueros de bacterias asociadas con epididimitis. Línea 1, Marcadores de peso molecular; línea 2, anti-*A. seminis*; línea 3, anti-*B. ovis*; línea 4, anti-*H. somni*; línea 5 anti-*H. haemolytica*; línea 6, anti-*P. multocida*.

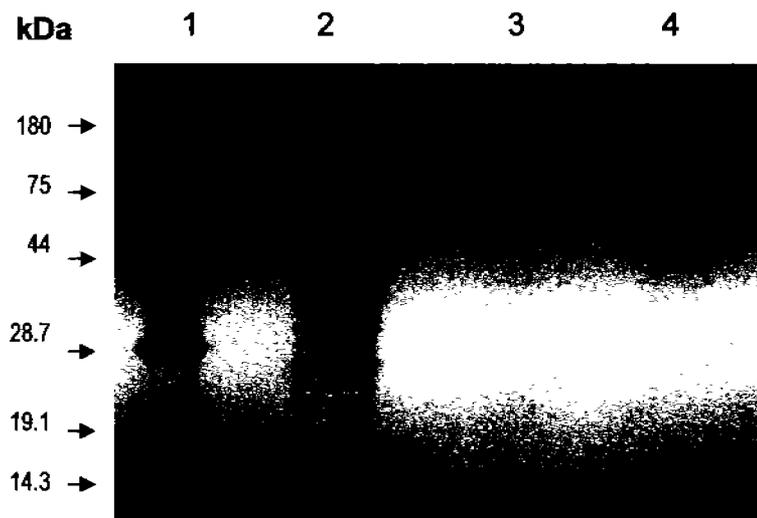


Figura 5. SDS-PAGE 12% de proteínas de extractos celulares, proteína eluída de 75 kDa y microvesículas de *A. seminis* teñidas con azul de Coomassie. Cada fracción contiene 10 µg de proteína. Línea 1, marcadores de peso molecular; línea 2, extractos celulares de *A. seminis*; línea 3, proteína eluída; línea 4, extracto de microvesículas.

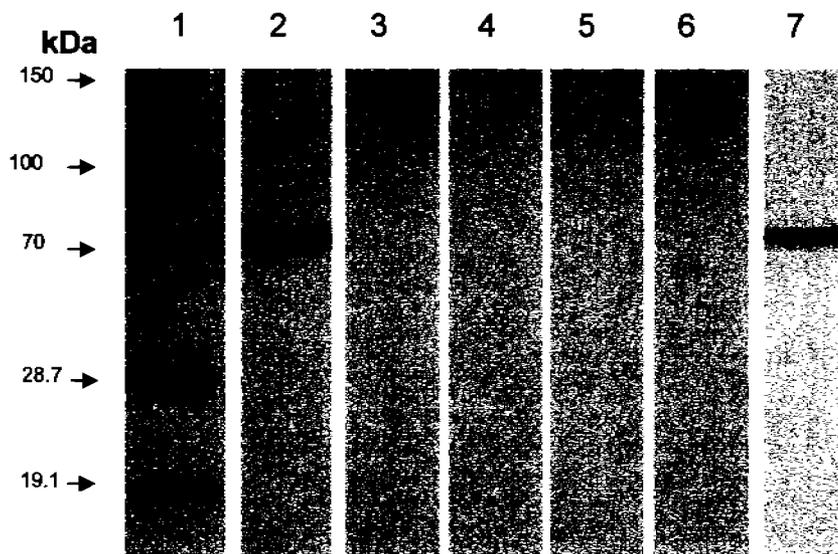


Figura 6. Western-blot de proteína de 75 kDa purificada a partir de OMP de *A. seminis*, enfrentadas con antisueros de diversas bacterias asociadas con epididimitis. Línea 1, marcadores de peso molecular; línea 2, anti-*A. seminis*; línea 3, anti-*B. ovis*; línea 4, anti-*H. somni*; línea 5, anti-*M. haemolytica*; línea 6, anti-*P. multocida*; anti-*A. seminis* (líneas 3,4,5,6,7) procedente de aislamiento de campo.

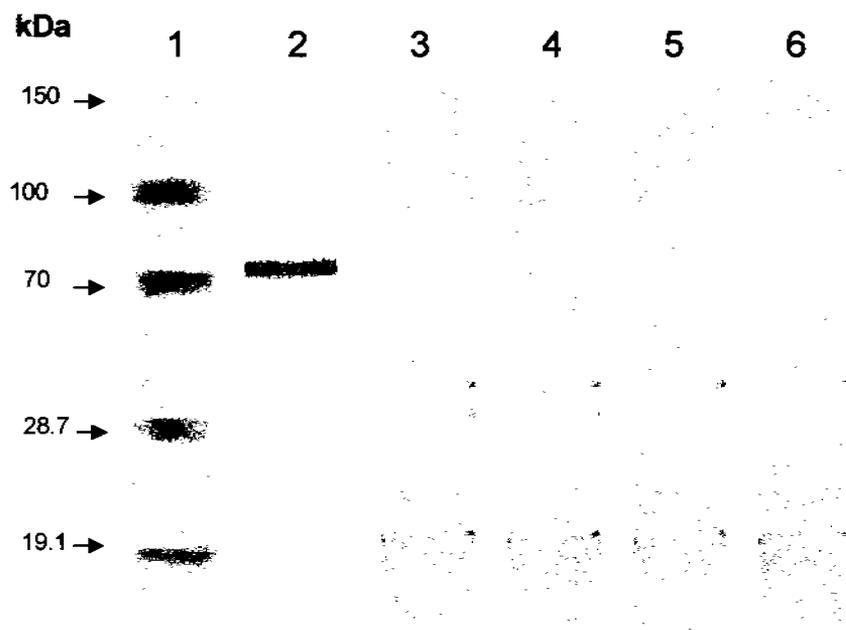


Figura 7. Western-blot de la proteína de 75 kDa obtenida de microvesículas de *A. seminis* enfrentando con antisueros de diversas bacterias asociadas con epididimitis. Línea 1, marcadores de peso molecular; línea 2, anti-*A. seminis*; línea 3, anti-*B. ovis*; línea 4, anti-*H. somni*; línea 5, anti-*M. haemolytica*; línea 6, anti-*P. multocida*.



Figura 8. SDS-urea 6%, perfil del LPS de *A. seminis*. Línea 1, LPS liso de *B. mellitensis*; línea 2, LPS rugoso de *B. ovis*; línea 3 extracto celular de *A. seminis*; línea 4, OMP de *A. seminis*; línea 5, IMP de *A. seminis*.

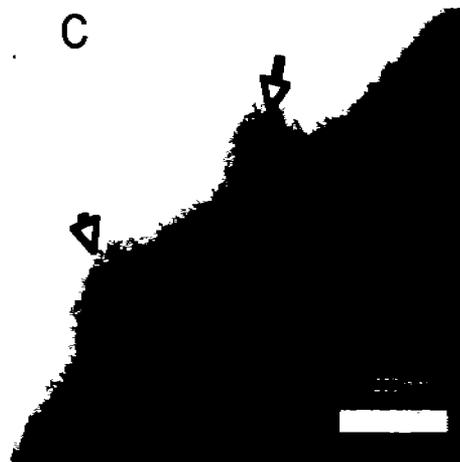
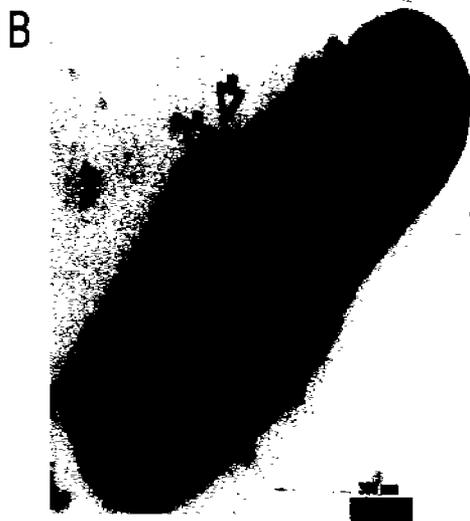


Figura 9. Microscopía electrónica de microvesículas de *A. seminis*. (A) microscopía electrónica de barrido se observa sobre la superficie celular microvesículas. (Barra=1 μ m). (B y C) microscopía electrónica de transmisión, las células fueron teñidas con ácido fosfotúngstico. (Barra=300 nm).

5. DISCUSION

La epididimitis infecciosa en carneros es una de las principales enfermedades desarrolladas en los países dedicados a la industrialización de ganado ovino. En 1960 en Australia, se reportó a *Brucella ovis* como el principal agente etiológico, sin embargo, *A. seminis* y *H. somni* son microorganismos comúnmente aislados a partir de las lesiones además de producir los mismos signos clínicos y problemas característicos en tracto reproductivo en carneros con cuadro de epididimitis (Genetzky, 1995). *A. seminis* y *A. actinomycetemcomitans* son considerados residentes transitorios de tracto genital en ovinos, análisis de su perfil protéico y antígenos de membrana externa sugieren que estos patógenos oportunistas constituyen un grupo diverso de bacterias (Healey *et al.*, 1988). *A. seminis* es uno de los microorganismos frecuentemente aislado que produce signos clínicos, lesiones y problemas reproductivos similares a los desarrollados por *B. ovis* (Van Tonder, 1979).

Comúnmente las técnicas de diagnóstico empleadas para la identificación de *A. seminis* son de carácter bacteriológico, incluyendo tinción de Gram, tinción modificada de Ziehl-Nielsen, esta última de gran aplicación para diferenciar entre *A. seminis* y *B. ovis*, ya que en la gama de pruebas bioquímicas primarias y secundarias no existe alguna que diferencie a *A. seminis* de las otras especies bacterianas involucradas en la epididimitis. Es importante considerar que pruebas son desarrolladas hasta que el animal muestra los signos característicos de la infección.

La envoltura celular de las bacterias Gram negativas es una estructura inmunoquímica compleja que consiste de una membrana interna o citoplasmática, una capa rígida de peptidoglicano y una membrana externa. La membrana externa contiene

gran número de proteínas, fosfolípidos y LPS, diversos estudios en una gran variedad de bacterias han revelado que los componentes de la membrana externa contribuyen a incrementar la virulencia de las bacterias patógenas. En bacterias como *E. coli*, *Neisseria*, *Yersinia* y *Actinobacillus* se ha encontrado que dentro de las funciones de las OMPs están las de ser porinas, receptores de Fe, invasinas y factores involucrados en la opsonización (Corbeil, 1990; Less *et al.*, 1994). El primer reporte sobre la caracterización de OMPs de *A. seminis* fue realizado por Stephens *et al.* (1983), quienes con la finalidad de conocer el perfil protéico de la envoltura celular de bacterias como *Histophilus somni*, *Histophilus ovis*, *Haemophilus agni*, *A. seminis* reportaron que estas bacterias presentan en común proteínas de envoltura celular con peso molecular aparente de 75 kDa, 95 kDa, 34 kDa, 28 kDa y 13 kDa, para las tres primeras, *A. seminis* muestra diversas proteínas resaltando las de 34 kDa, 13 kDa como mayoritarias y una minoritaria de 75 kDa.

Recientemente, el análisis de proteínas de membrana externa, interna y citoplasmática empleando geles de poliacrilamida están siendo empleados para clasificar e identificar familias, géneros y especies a microorganismos aislados a partir de diversas muestras clínicas. Healey *et al.* (1988), emplearon *n*-octyl- β -D-glucopiranosil en aislamientos de campo y cepas ATCC de *A. seminis* y *A. actinomycetemcomitans*, para que posteriormente las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y empleando densitometría a los geles se realizó el análisis de los extractos protéicos obtenidos. Con estos resultados, los aislamientos bacterianos fueron agrupados de acuerdo al perfil de proteínas, por un lado el grupo 1 formado por cepas identificadas como *A. seminis* y *A. actinomycetemcomitans* y siete aislamientos de

Actinobacillus spp. presentando pesos moleculares aparentes de 94, 64, 60, 52, 44 y 26 kDa y por otro lado el grupo 2 que mostró en común proteínas de muy bajo peso molecular. Sin embargo, los resultados no muestran detalladamente el perfil protéico de cada fracción subcelular (Healey *et al.*, 1988).

El presente trabajo muestra los primeros datos referentes al perfil de proteínas presentes en las fracciones subcelulares (OMP, IMP, CP) de *A. seminis*, particularmente en el perfil protéico de OMP se identificó un polipéptido de peso molecular aparente de 75 kDa, el cual no está presente en las fracciones de IMP y CP. Al realizar pruebas de Western-blot se encontró que ésta proteína presenta características inmunogénicas mostradas únicamente al reaccionar con antisuero de *A. seminis* tanto de campo como el producido en conejo y no por antisueros de aislamientos anti-*B. ovis*, *H. somni*, *M. haemolytica* y *P. multocida*. Por otro lado, cuando se enfrentaron células completas procedentes de aislamientos bacteriológicos de *A. seminis*, *B. ovis*, *H. somni*, *M. haemolytica* y *P. multocida* con suero anti-proteína de 75 kDa el único reconocimiento inmunogénico observado fue en *A. seminis*.

En bacterias comúnmente aisladas a partir de carneros con epididimitis se han reportado factores de patogenicidad y en algunas se sabe el papel que estos desarrollan en la patogénesis de la enfermedad. Tal es el caso de *Brucella* spp donde se han identificado las OMPs con actividad inmunogénica clasificadas en tres grupos de acuerdo a su peso molecular aparente: 1) porinas 31-34 kDa, 2) 36-38 kDa, y 3) 25-27 kDa; de las anteriores, la de 25 kDa es considerada como el principal factor de virulencia (Less *et al.*, 1994). *H. somni* causa diversas enfermedades en ganado vacuno y en carneros jóvenes epididimitis siendo uno de los síndromes frecuentemente

reportados que causan bajo nivel de reproducción, mastitis, septicemia, artritis, meningitis y neumonía (Togawa *et al.*, 1993).

La interacción de diversos factores de virulencia con el huésped han ayudado a explicar porque la epididimitis en carneros se manifiesta en unos casos y no en otros, tal es el caso de la endotoxina de *B. ovis* caracterizada como un lipopolisacárido con cadena "O" además de una OMP de 40 kDa la cual al parecer es una proteína inmunodominante importante (Won *et al.*, 1993), además de proteínas con peso molecular aparente de 28 kDa, 37 kDa (Davo *et al.*, 2003); 17.5 y 31 (Gatto *et al.*, 2002). *P. multocida* y *M. haemolytica* están involucradas en enfermedades de rumiantes, ambos microorganismos forman parte de la microflora normal en mucosas oral, nasal, prepucio y pene en la pubertad y es a través de este último y en esta etapa que pueden causar epididimitis ascendente la cual progresa a orquitis. Las lesiones resultantes son muy similares a las causadas por *A. seminis* y *B. ovis*. En *P. multocida* y *M. haemolytica* las OMPs antigénicas presentan pesos moleculares de 28 kDa y 45 kDa respectivamente (Ajai *et al.*, 1980; Morton *et al.*, 1996).

Son escasos los reportes relacionados con los factores de patogenicidad de *A. seminis* dentro de los cuales se encuentra el descrito por Haley *et al.* (1991), en donde proponen que como en todas las infecciones, el primer paso para establecer la infección es una asociación entre adhesinas de superficie y receptores celulares; en éste trabajo se demostró la adhesión de *A. seminis* a células renales y la inhibición de éstas con anticuerpos monoclonales específicos, por lo cual se sugiere que *A. seminis* se adhiere al epidídimo por adhesinas de superficie que se asocian a los receptores específicos de las células epiteliales del hospedero causando epididimitis en carneros vírgenes, también

sugieren que dentro de la especie pueden existir animales que carecen de estos receptores.

No existen reportes sobre la existencia de toxinas que sean responsables del cuadro clínico. En estudios recientes se encontró en extractos totales de *A. seminis* la existencia de reacciones cruzadas con las antitoxinas (monoespecíficas, policlonales) ApxI, ApxII, ApxIII de *A. pleuropneumoniae*, a pesar de que *A. seminis* no posee los genes que codifican para tales toxinas. Lo anterior podría indicar la producción por parte de *A. seminis* de toxinas RTX, distintas a las Apx (Shaller *et al.*, 2000). Respecto al LPS se sabe que dentro del género *Actinobacillus* hay especies que muestran ambos fenotipos, liso y rugoso (Haase *et al.*, 1999), *Actinobacillus pleuropneumoniae* presenta LPS tanto liso como rugoso dependiendo del serotipo. Hasta este momento no existen reportes previos que indiquen el tipo del LPS presente en *A. seminis*, en éste trabajo se determinó por SDS-urea al 6% teñido con plata que *A. seminis* contiene LPS liso ya que la membrana externa muestra comportamiento electroforético y de tinción similar al desarrollado por el LPS de *B. mellitensis* el cual fue empleado como control de LPS liso.

Las microvesículas o blebs producidas por bacterias Gram negativas son el resultado del fraccionamiento de la membrana externa, estas estructuras tienen un tamaño de 20 a 500 nm y son liberadas *in vitro* al medio de cultivo. El contenido de éstas microvesículas es de componentes de membrana externa, toxinas y enzimas por lo que contribuyen al proceso de patogenicidad en las bacterias identificadas (Negrete *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 1993). No existen reportes previos que indiquen la liberación de estas microvesículas por parte de *A. seminis*, en este trabajo a partir del tratamiento por ultracentrifugación de células completas se determinó que *A. seminis* libera estas

estructuras las cuales fueron observadas por microscopia electrónica de barrido y transmisión logrando su visualización sobre la superficie bacteriana de pequeñas estructuras circulares o “burbujas” identificadas como vesículas de excreción. Por otro lado, al realizar SDS-PAGE se determinó que las microvesículas presentan un perfil protéico el cual al compararse con el mostrado por la membrana externa refleja una considerable disminución en cuanto al número de proteínas, pero un enriquecimiento con la proteína de 75 kDa, en el Western-blot realizado con antisuero anti-*A. seminis* únicamente es reconocida la proteína de 75 kDa. Sin embargo de las microvesículas de excreción de *A. seminis* no se sabe cual es su contenido y tampoco si estas estructuras pueden estar relacionadas con el proceso de patogenicidad de esta bacteria. Es importante realizar la caracterización de la proteína de 75 kDa de las microvesículas de excreción y determinar si realizan alguna función en el proceso de patogenicidad de *A. seminis*.

La epididimitis ovina suele ser diagnosticada de acuerdo a manifestaciones clínicas, sin embargo es importante recurrir a las pruebas de laboratorio para identificar animales infectados que aún no muestren manifestaciones clínicas o determinar que microorganismo es responsable de la infección (Watt, 1972, Webb *et al.*, 1980). El diagnóstico clínico no tiene valor definitivo debido a que existen animales infectados que no presentan manifestaciones clínicas por lo que es necesario recurrir a pruebas serológicas y bacteriológicas que establezcan un diagnóstico preciso, por otro lado la signología mostrada por carneros con epididimitis es la misma con lo que es difícil por esta vía establecer el agente etiológico (Ficapal, 1993).

Se han propuesto pruebas de tipo serológico para ser empleadas en el diagnóstico de la epididimitis causada por *A. seminis*, como las realizadas por Rehaley

(1978), que desarrolló la prueba de Fijación de Complemento para establecer una comparación serológica entre *H. ovis*, *A. seminis* y *B. ovis*, los resultados indicaron que la infección producida por *A. seminis* e *H. ovis* no se puede diferenciar por esta prueba a menos que el suero del animal infectado sea probado contra ambos antígenos y se presente una diferencia significativa en el título de cada uno. Por otro lado, existen reacciones cruzadas a bajos títulos entre los sueros anti - *H. ovis* y anti-*A. seminis* con el anti-*B. ovis* (Rehaley, 1978). Otra alternativa de diagnóstico es la prueba de inmunofluorescencia directa e indirecta (Ajai *et al.*, 1980) empleando cepas ATCC de *A. seminis* 15768, *B. ovis* 25840 y *C. pseudotuberculosis* 19410, las bacterias anteriores pueden ser identificados específicamente por inmunofluorescencia observándose igual morfología bacteriana entre *B. ovis* y *C. pseudotuberculosis* destacando el pleomorfismo mostrado por *A. seminis*; sin embargo, las tres desarrollaron igual intensidad de fluorescencia además, es importante considerar que este procedimiento no es conveniente cuando el tiempo de obtención de resultados es importante (Ajai *et al.*, 1980).

Lo anterior sugiere que los antígenos empleados en las pruebas no son lo suficientemente específicos, lo que explica el por que de resultados positivos en ovinos que muestran brucelosis, por lo que el autor propuso obtener antígenos más específicos que puedan ser empleados en ésta prueba, además de establecer que existe una relación muy estrecha entre los microorganismos probados (Rehaley, 1978). Cardenas *et al.* (1986), realizaron la detección de anticuerpos en carneros con epididimitis usando el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), para tal propósito como antígenos se emplearon extractos de pared celular obtenidos por sonicación y ultracentrifugación a partir de aislamientos de muestras de semen de

carneros, 5 sueros procedentes de carneros con diferentes historias clínicas. Los resultados indicaron que estos antígenos no presentaron alta especificidad ya que desarrollan reacciones cruzadas en animales no infectados con *A. seminis* lo cual se confirmó al identificar por pruebas bacteriológicas en la muestra *C. pseudotuberculosis*; los sueros de animales sanos mostraron títulos de anticuerpos contra las tres bacterias y no presentaban signos de epididimitis, por lo anterior esta prueba no es confiable para detectar anticuerpos específicos contra *A. seminis* en carneros antes de manifestarse los signos clínicos de la epididimitis (Cardenas *et al.*, 1986). En México, Méndez *et al.* (1986), determinaron la prevalencia de *A. seminis* por la prueba de inmunodifusión doble en agar empleando un antígeno soluble obtenido por sonicación de las células y suero control positivo obtenido a partir de la cepa de referencia ATCC15768. Los resultados indicaron que la presencia o ausencia de epididimitis no se relaciona con animales seropositivos ni con aislamiento bacteriológico, ya que se aisló *A. seminis* y *B. ovis* de animales con y sin epididimitis clínica (Méndez *et al.*, 1996).

No existen datos del empleo de la prueba de PCR para detectar a *A. seminis* a partir de muestras clínicas de ovinos, tampoco se ha realizado una comparación de la sensibilidad del PCR con la sensibilidad bacteriológica. Palomares, 2003 reportan datos obtenidos de los ensayos a partir de suspensiones de *A. seminis* observando que la PCR utilizada mostró una alta sensibilidad. Sin embargo, se aplicó la metodología descrita del ADN de muestras de semen y tejidos a partir de animales inoculados, no se obtuvo la sensibilidad esperada, resultando negativos al PCR.

Por lo anterior es importante considerar a la proteína de 75 kDa como un candidato para ser empleado en la elaboración de pruebas serológicas confiables que

determinen la presencia de *A. seminis* aún antes de que el carnero presente las manifestaciones propias de la enfermedad, además la prueba a seleccionar deberá de cubrir los requisitos de validación y estandarización con los que se confirme que el antígeno seleccionado es ideal para los fines anteriores.

6. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron mediante el método de Sarcosyl las fracciones subcelulares de *A. seminis* ATCC 15768 determinando su perfil electroforético en PAGE-SDS.
2. Mediante inmunotransferencia se identificó una proteína con peso molecular aparente de 75 kDa como inmunogénica y que únicamente es identificada por suero hiperinmune anti-*A. seminis* producido en conejo y por el de aislamiento de campo. No así por los antisueros anti-*B. ovis*, *M. haemolytica*, *P. multocida* y *H. somni* de aislamiento de campo. Esta proteína se localizó en membrana externa y vesículas de excreción de *A. seminis*
3. Por microscopia electrónica de barrido y transmisión se determinó que *A. seminis* tiene la propiedad de liberar al medio microvesículas de excreción las cuales, están enriquecidas por una proteína de 75 kDa que al realizar Western-blot es identificada únicamente por antisuero anti-*A. seminis* y no por los antisueros anti-*B. ovis*, *M. haemolytica*, *P. multocida* y *H. somni*
4. Al desarrollar la prueba de ELISA de tipo indirecta, empleando como antígeno la proteína de aproximadamente 75 kDa, y como antisueros anti-*A. seminis*, *B. ovis*, *M. haemolytica*, *P. multocida* y *H. somni* obtenidos de cepas de campo de animales con epididimitis se determinó que la proteína seleccionada tiene características que permiten

el reconocimiento por los antisueros anteriores; sin embargo, es importante realizar validación y estandarización de la prueba serológica seleccionada.

5. Se concluye que este trabajo provee información no antes reportada relacionada con la caracterización del perfil protéico de *A. seminis*, además de la identificación de una proteína que únicamente es reconocida por suero hiperinmune anti-*A. seminis* y de los microorganismos comúnmente relacionados con problemas de epididimitis.

7. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

- i. Realizar la caracterización de la proteína de aproximadamente 75 kDa tiene algún papel en la patogénesis de la epididimitis causada por *A. seminis*.
- ii. Conocer la secuenciación de la proteína de aproximadamente 75 kDa.
- iii. Determinar el contenido de las vesículas de excreción y determinar si estas puedan servir como inmunógenos.
- iv. Realizar la estandarización y validación de una prueba diagnóstica serológica que permita identificar carneros infectados antes de mostrar la sintomatología característica.

8. BIBLIOGRAFÍA

Ajai, C., Cook, J., Dennis, S. (1980). Diagnosing ovine epididymitis by immunofluorescence. *Veterinary Research*. 107, 421-424.

Alsenosy, S.M., Dennis. (1985). Pathology of acute experimental *Actinobacillus seminis* mastitis in ewes. *Australian Veterinary Journal*. 62, 234-237.

Appuhamy, S., Coote, J.G., Loa, J.C. Partan. R. (1998). PCR methods for rapid identification and characterization of *Actinobacillus seminis* strain. *Journal of Clinical Microbiology*. 36, 814-817.

Baynes, I.D., Simmons, G.C. (1960). Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis* sp. *Australian Veterinary Journal*. 36, 454-459.

Baynes, I.D., Simmons, G.C. (1968). Clinical and pathological studies of Border Leicester rams naturally infected with *Actinobacillus seminis*. *Australian Veterinary Journal*. 44, 339-343.

Bell, John. The polymerase chain reaction. *Immunology Today*. 1989; 10:351-355.

Birbeck, M.SC. Merce, (1995). Manual de microscopía electrónica para biólogos. Ediciones Blumne. 7-11, 41-59.

Bogdan, J. (1960). A review to the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev. Vet. Med.* 31, 275-283.

Bosse, T.J., Hakan, J., Brian, U.S., Beddek, A.J., Ricraft, N., Simon, J.K., Landford, R.P. (2002). *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathology and pathogenesis of infection. *Microbes and Infection.* 4, 225-235.

Bradford M.A. (1976). A rapid and sensible method for the quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 71:248-254.

Burgess, G.W. & Norris, M.J. (1982). Evaluation of the cold complement fixation test for diagnosis of ovine brucellosis. *Australian Veterinary Journal.* 59, 23-25.

Burgess, G.W. (1982). Ovine contagious Epididymitis. A review *Veterinary Microbiology.* 7, 551-575.

Cardenas, A.L. and Maki, L.R. (1986). Detection of antibody in rams with contagious epididimitis using the enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Veterinary Research.* 47, 738-739.

Cirillo, D.M., Heffernan, E.J., Wu, L., Harwood, J., Fierer, J., Guiney, D.G.(1996). Identification of a domain in Rek, a product of the *Salmonella typhimurium*

virulence plasmid, require for both serum resistance and cell invasion.

Infection and Immunity. 64, 2019-2023.

Claxton, P.P, Everett, R.F. Recovery of an organism resembling *Histophilus ovis* from a ram. (1966). *Australian Veterinary Journal* 42, 457-458.

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

Cruz, W.T., Nedialkov, Y.A., Thacker, B.J., Mulks, M.H. (1996). Molecular characterization of a common 48-kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus pleurpneumoniae*. *Infection and Immunity*. 64, 83-90.

Chevalier, G., Duclohier, H., Thomas, D. Shechter, E., y Wroblewski, H. (1993). Purification and characterization of protein H, the major porin of *Pasteurella multocida*. *J. Bacteriol*. 175, 266-276.

China, B., Sory, M-P., N'Guyen, B.T., de Bruyere, M., Cornelis, G.R. (1993). Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. *Infection and Immunity*. 61, 3129-3136.

De la Puente-Redondo, V.A., Garcia del Blanco, N., Perez-Martinez, C., Gonzalez Rodriguez, MC., Rodríguez, F. E.F, Gutierrez, M. C.B. (2000). Isolation

of *Actinobacillus seminis* from the genital tract of rams in Spain. *Comp Pathol.* **122**, 217-222.

Delong, W.J., Waldhalm, D.G., Hall, R.F. (1979). Bacterial isolates associated with epididymitis in rams from Idaho and eastern Oregon flock. *American Journal Veterinary Research.* **40**, 101-102.

Dom, P., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Charlier, G. (1994). *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs. *Infection and Immunity.* **4**, 1262-7.

Ekdahl, M.O., Money, D.F.L., Martin, C.A. (1968). Some aspects of epididymitis of rams in New Zealand. *New Zealand Veterinary.* **16**, 81-82.

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

Fedorka-Gray, P.J., Hoffman, L., Cray, W.C., Gray, J.T., Breisch, S.S., Anderson, G.A. (1993). *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae. Part I History, Epidemiology Serotyping, and Treatment. Food Animal.* 1447-1455.

Ficapal, Jordana, Blasco, Moriyon. (1993). Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. *Small Ruminant.* **29**, 13-19.

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

Flores, C.R., and Baer, G.M. (1979). Brucellosis (*B.mellitenses*) Zoonotic Implication in: CRC Handbook Series in Zoonosis, 1st, ed., Steele, H.,ed., CRC Florida Press, Florida. 195.

Frey, J. (1995). Virulence in *Actinobacillu pleuroneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol.* **3**, 257-561.

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

Gavilondo, C.J. (1995). Anticuerpos monoclonales. Ed. Elfos. La Habana, Cuba. 71, 99.

Genetzky, M.R., DVM. MS, PhD. (1995). Epididymitis in rams. *Food Animal.* **17**, 447-454.

Hansen, E.J., Haseman, C., Clausell, A., Capra, J.D., Orth, K., Moomaw, C.R., Slaughter, C.A., Latimer, J.L., Miller, E.E. (1989). Primary structure of the porin

- protein of *Haemophilus influenzae* type b determined by nucleotide sequence analysis. *Infection and Immunity*. **57**, 1100-1107.
- Haase , C.C. and Filkelstein, R.A. (1999). Bacterial extracellular zinc-cotaining metalloproteases. *Microbial Review*. **57**, 823-837.
- Healey, M.C., Hank, H., Hwang, Yoyo Y., Elsner and Johnston, A.V. (1991). A model for demonstrating the adhesion of *Actinobacillus seminis* to epithelial cells. *Can Veterinary Research*. **55**, 121-127.
- Healey, M.C., Hwang, H.H., Kleinschuster, S.J., Johnston, A.V., Symons, K.S. (1988). Comprison and partial characterization of protein profiles and outer antigens of *Actinobacillus* species isolated from ram with epididymitis. *Am J Vet Res*. **49**, 1824-1831.
- Heath, P.J., Davies, I.H. Morgan, J.H., Aitken, I.A. (1991). Isolation of *Actinobacillus seminis* from rams in the United Kingdom. *Veterinary Record*. **129**, 304-307.
- Hughes, K.L.,Claxton, P.D. (1968). *Brucella ovis* infection. I. An evaluation of microbiological, serogical and clinical methods of diagnosis in the ram. *Australian Veterinary Journal*. **44**, 41-47.

Idris, U.E., Harmon, B.G., Udeze, F.A., Kadis, S.(1993).Pulmonary lesions in mice inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin and lipopolysaccharide. *Veterinary Pathology*. 30,234-41.

Inzana, T.J., Workman, J.T., Gogolewski, R.P. & Anderson. P. (1988). Virulence properties and protective efficacy of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infection and Immunity*. 56, 1880-1889.

Jacques, M., Belanger, M., Roy, G., Foiry, B. (1991). Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal epithelial cells and frozen lung section. *Veterinary Microbiology*. 27, 133-143.

Jansen, B.C. (1980). The aetiology of ram epididymitis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 47,101-107.

Jansen, R., Briare, J., Smith, H. E., Dom. P., M.A. (1995). Knockout mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 that are devoid of RTX toxins do not activate or kill porcine neutrophils. *Infection and Immunity*. 63, 27-37.

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

Komatsuzawa, H., Asakawa, R., Kaway, T., Ochiai, K., Fujiwara, T., Taubman ,M.A., Ohara, M., Kurihara, H., Cuga, i M. (2002). Identification of six major outer

membrane proteins from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Gene*. 288, 195-201.

Korostoff, J., Wang, J.F., Kieva I, Miller M., Shenker BJ., Lally ET. (1998). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Leukotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. *Infect Immun*. 66, 4474-4483.

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

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*. 227, 680-685.

Lamont, R.J., Jenkinson, H.F., (1998). Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 62, 1244-1263.

Lea Mastaer, B.R., Walker, R.L., Stellflug, J.N., Biberstein, E.L. (1986). Association of age of ram with distribution of epididymal lesions and etiologic agent. *Journal American Veterinary Medical Association*. 12, 1526-28.

Lea Master, B.R. (1986). Prevalence of *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis* in the genital tract of sheep. *American Journal Veterinary Research*. 9, 1928-30.

- Ley, W.B. (1993). Rams epididymitis. *Agri-Pactice*. **14**, 3434-3437.
- Livington, C.W. & Hardy, W.T. (1964). Isolation of *Actinobacillus seminis* from ovine epididymitis. *American Journal of Veterinary Research*. **25**, 660-663.
- Low, J.C., Somerville, D., Mylne, M.J.A. & McA, Kelvey, W.A.C. (1995). Prevalence of *Actinobacillus* in the semen of rams in the United Kingdom. *Veterinary Record*. **136**, 268-269.
- Mbai, K., Mnyua, S.J, Gathumbi, P.K., Mbiuki, S.M. (1996). *Actinobacillus seminis* as a cause of ram infertility in Kenia. *Small Ruminant Research*. **21**, 227-231.
- Mendez, D.G. (1997). Diagnostico diferencial en carneros serotipos y seronegativos a *Brucella ovis* con y sin epididimitis. *Tesis de licenciatura de Medico Veterinario y Zootechnista*. FES Cuautitlan, UNAM.
- Miller, V.L. Bliska, J.B., Falkow, S. (1990). Nucleotide sequence of the *Yersinia enterocolitica* ail gene and characterization of the Ail protein product. *J. Bacteriol.* **172**, 1062-1069.
- Morton R.J., Simons K.R., Confer A.W. (1996). Major outer proteins of *Pasteurella haemolytica* serovars 1-15: comparison of separation techniques and surface-exposed proteins on selected serovars. *Vet Microbiol.* **51**, 319-330.

Negrete, Abascal Erasmo, García Rosa M., Reyes Magda, Godínez Delfino, de la Garza Mireya. (2000). Membrana vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain proteases and Apx toxins. *FEMS Microbiology letter*. **191**, 109-113.

Nezelof, C. (1975). **Técnicas microscópicas**. Edit. Jims, Barcelona. 239-242.

Palomares Reséndiz Gabriela Erika. (2003). Evaluación de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para el Diagnóstico de *Actinobacillus seminis* en ovinos. *Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal*. FES Cuautitlán, UNAM.

Oviedo FC, Hernández VC, Hernández GS, Reyes GA. (1988). Epididimitis ovina (*Brucella ovis*) Diagnóstico, Prevalencia y Descripción en el Estado de México. Memorias del primer Congreso Nacional de Producción ovina. Zacatecas México.

Pijoan, C. (1986). Effect of *Pasteurella multocida* and *Histophilus pleuroneomoniae* toxins on swine alveolar macrophages. *Veterinary Immunology Immunopathology*. **13**, 141-149.

Rahaley, R.S. (1978). Pathology of experimental *Histophilus ovis* infection in sheep. *Veterinary Pathology*. **15**, 631-637.

Rahaley, R.S. (1978). Serological comparison between *Histophilus ovis*, *Actinobacillus seminis* and *Brucella ovis*. *Australian Veterinary Journal*. **54**, 423-425.

Ricroft, A., Lisa, H.G.(2000). Review: *Actinobacillus* species and their Role in Animal Disease. *The Veterinary Journal*. **159**, 18-36.

Sandt, C.H., Hill, C.W. (2000). Four different genes responsible for nonimmune immunoglobulin-binding activities within a single strain of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **68**, 2205-2214.

Scanlan, C.M., Purdy, C.W., Loan, R.W. (1992). Stain diversity within bovine *Pasteurella haemolytica* serovar 2 respiratory tract isolates. *Journal Veterinary Diagnosis Investigation*. **4**, 467-469.

Schaller A., Kuhnert P., De la Fuente-Redondo V.A., Nicolet J., Frey J. (2000). Axp toxins in Pasteurelleceae species from animals. *Vet. Microbiol.* **74**, 365-376.

Simpson, W., Olczak, T., Genco, G.A. (2000). Characterization and expresión of Hmur, a TonB-dependent hemoglobin receptor of *Porphiromonas gingivales*. *Journal Bacteriology*. **182**, 5737-5748.

Sponenber D.P., Carter M.E., Carter G.R. Cordes D.O., Stevens S.E., Veit H.P. (1983). Suppurative epididymitis in a ram infected with *Actinobacillus seminis*. *Journal Am. Vet Med Ass.*; 990-991.

Stephen, L.R., Humphrey, J.D., Little, P.B., & Barnum, P. (1983). Morphological biochemical, antigenic, and citochemical relationships among *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni*, *Haemophilus haemoglonophilus*, *Histophilus ovis*, *Actinobacillus seminis*. *Journal Clinical Microbiology*. 17, 728-737.

Trejo, G. O. (1992). Agentes involucrados en la epididymitis ovina. *Tesis de licenciatura de Medico Veterinario y Zootecnista*. FES Cuautitlan, UNAM.

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

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

Van Alphen, L, Eijk, P., Geelen-van den Broek L, Dankert J. (1991). Immunochemical characterization of variable epitopes of outer membrane protein P2 of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infection and Immunity*. 59, 1247-52.

Van Tonder, E.M. (1973). Infection of rams with *Actinobacillus seminis*. *J.S. African Veterinary Medical Association*. 44, 235-240.

Van Tonder, E.M. (1979). *Actinobacillus seminis* infection in sheep in the Republic of South Africa. I. Incidence and geographical distribution. Onderstepoort *J. Vet.Res.* 46, 129-133.

Walker, R.L., and Leamaster, B.K. (1986). Prevalence of *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis* in the genital tract of sheep. *American Journal Veterinary Research*. 47, 1928-1930.

Walker, R.L., LcaMaster, B.R., Stellflug, J.N. and Biberstein, E.L. (1986). Association of age of ram with distribution of epididimal lesions and etiologic agent. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 188, 393-396.

Watt, D.A. (1972). Testicular abnormalities and spermatogenesis of ovine and other species. *Veterinary Bull.* 42, 181-190.

Webb, R.F. (1983). Clinical finding and pathological changes in *Histophilus ovis* infection of sheep. *Research Veterinary Sciece*. 35, 30-34.

Webb, R.F., Quinn, C.A., Cockram, F.A. & Husband, A.J. (1980). Evaluation of procedures for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Australian Veterinary Journal*. **56**, 172-175.

Welding, H. and Jacobsen, A. (2000). High Resolution Electroelution of polyacrilamide Gels for the Purification of Single Proteins from *Mycobacterium tuberculosis* Culture Filtrate. *Scandinavian Journal of Immunology*. **51**, 70-81.

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

White, D.A., Nair, S.P., Kim, M.-J., Wilson, M., Henderson, B.(1998). Molecular characterization of an outer membrane protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* belonging to the OmpA family. *Infection and Immunity*. **66**, 369-372.

Young N.S., Levin J., Prendergast R.A. (1972). An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: evidence for enzymatic mechanism. *J Clin Invest*. **51**:1790-1799.

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