



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLÁN

**DETERMINACIÓN DEL PERFIL PROTEÍNICÓ DE LAS MICROVESÍCULAS
DE *Brucella ovis*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ROSA LAURA CRUZ RAMOS

ASESORES: DRA. ALMA LUCILA NUÑEZ DEL ARCO

DR. ENRIQUE SALAS TÉLLEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2011



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.

INDICE

Índice de Abreviatura -----	I
Índice de Figuras -----	II
Índice de Tablas -----	III
Índice de graficas -----	IV
I. Introducción -----	1
1.1. Generalidades de la epididimitis -----	1
1.2. Aspectos generales de <i>Brucella ovis</i> -----	3
1.3. Composición antigénica de <i>Brucella ovis</i> -----	7
1.4. Respuesta inmune de <i>B. ovis</i> -----	9
1.5. Epidemiología de <i>B. ovis</i> -----	11
1.6. Diagnostico de <i>Brucella . ovis</i> -----	12
1.7. Diagnostico diferencial -----	15
1.8. Tratamiento de <i>Brucella ovis</i> -----	16
1.9. Generalidades de las vesículas de excreción -----	17
1.9.1. Métodos de aislamiento y composición de las microvesículas -----	17
1.10. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida -----	18
II. JUSTIFICACION -----	24
III. HIPOTESIS -----	25
IV. OBJETIVOS -----	26
V. MATERIAL Y METODOS -----	27
5.1. Preparación del inóculo -----	27

5.2. Estudio Bacteriológico de <i>B. ovis</i> -----	27
5.3. Obtención de células completas de <i>B. ovis</i> -----	27
5.4. Obtención de microvesículas de <i>B. ovis</i> -----	28
5.5. Metodología de electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) -----	30
5.5.1 Metodología para determinar el PM de las proteínas “incognitas” de las microvesículas de <i>B. ovis</i> -----	34
5.6. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) -----	35
VI. RESULTADOS -----	37
VII. DISCUSIÓN -----	43
VIII. CONCLUSIONES -----	46
IX. ANEXO -----	47
X. BIBLIOGRAFIA -----	50

INDICE DE AVREVIATURAS

<i>B.ovis</i>	<i>Brucella ovis</i>
CO₂	Dióxido de carbono
H₂S	Ácido sulfhídrico
ME	Membrana Externa
PG	Peptido glucano
PME	Proteínas de membrana externa
Acm	Anticuerpo monoclonal
LPS	Lipopolisacarido
LPS-R	Lipopolisacárido rugoso
kDa	kilodalton
Omp	(outer Membrane Proteins) Proteínas de Membrana Externa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
IgG	Inmunoglobulina de tipo G
LTh1	linfocitos T colaboradores del tipo 1
MVs	microvesículas, vesículas
SSF	Solución salina fisiológica
rpm	Revoluciones por minuto
µm	Micrómetro
MEB	Microscopio electrónico de barrido
ELISA	(Enzyme-Linked immunoabsorbent Assay) Prueba Inmunoabsorbente ligado a enzimas
MPM	Marcadores de peso moleculares

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Palpación de testículos de carnero.-----	2
Figura 2. Testículo normal (izquierda) y con epididimitis (derecha).-----	2
Figura 3. <i>B.ovis</i> teñida con Ziehl Neelsen modificada.-----	3
Figura 4. <i>B.ovis</i> en agar soya tripticasa.-----	4
Figura 5. <i>B.ovis</i> en agar Columbia.-----	4
Figura 6. Estructura de la envoltura celular de <i>Brucella ovis</i> . -----	7
Figura 7. Ejemplo de una curva de referencia para la estimación del peso molecular de proteínas mediante SDS-PAGE-----	21
Figura 8. Análisis de la composición de subunidades de una proteína en SDS-PAGE.--- -----	
- 22	
Figura 9. Partes de un gel de SDS-PAGE.-----	23
Figura 10. <i>Brucella ovis</i> sembrada en Agar Brucella. -----	37
Figura11. Imagen del MEB de células que en su superficie muestran la presencia de las vesículas producidas por <i>Brucella ovis</i> .-----	38
Figura12. SDS-PAGE al 10% Perfil proteínico de las MVs de <i>B. ovis</i> , teñida con azul de Coomassie. -----	39
Figura 13. Ilustración de los pesos moleculares de las proteínas encontradas en las microvesículas de <i>B.ovis</i> .-----	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades bioquímicas de los principales microorganismos asociados a la epididimitis ovina (Bergey,1984). -----	6
Tabla 2. Diagnóstico diferencial de <i>B.ovis</i> .-----	16
Tabla 3. Determinación del peso molecular de una proteína "incógnita", mediante SDS-PAGE.-----	21
Tabla 4. Resultados de las pruebas bioquímicas para <i>Brucella ovis</i> .-----	37
Tabla 5. Marcadores de peso molecular utilizados para la determinación de las proteínas de las MVs de <i>B.ovis</i> . -----	40
Tabla 6. Determinación del peso molecular de las proteínas desconocidas de las microvesículas de <i>B.ovis</i> .-----	42

ÍNDICE DE GRAFICAS

Grafica 1. Curva de referencia para la estimación del peso molecular de proteínas mediante SDS-PAGE.-----	41
Grafica 2. Regresión lineal de la curva de referencia para la estimación del peso molecular de proteínas mediante SDS-PAGE.-----	41

INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de la epididimitis.

La infección por *B. ovis* esta asentado básicamente en el aparato genital ocasionando en los carneros epididimitis y disminución de la calidad del semen, y en las hembras preñadas aborto y mortalidad perinatal (Alton y col., 1988). Un sinónimo de la epididimitis es orquiepididimitis infecciosa, esta se produce cuando la infección alcanza a los testículos, puede ser aguda o crónica afectando a las envolturas serosas de los testículos y del epidídimo, provocándose engrosamiento y adherencias de las serosas lo cual es clínicamente detectable, así como la lesión y obstrucción del epidídimo afectado, lo que produce degeneración y atrofia del testículo y consecuente subfertilidad o esterilidad.

Como consecuencia de estos trastornos el semen disminuye su calidad debido a la presencia de células inflamatorias, detritos celulares, disminución del número y motilidad de los espermatozoides y anomalías morfológicas (Kott y col., 1988; Blasco, 1990).

La brucelosis origina lesiones en los genitales del macho produciendo infertilidad o subfertilidad.

Las manifestaciones clínicas más importantes en los carneros son la epididimitis y la disminución de la fertilidad, debido a la mala calidad del semen, obligando a que se eliminen reproductores de alto valor genético; además produce aborto en ovejas y nacimientos de corderos débiles.

En la mayoría de los casos, las lesiones en los testículos y epidídimos solo pueden detectarse por palpación. Se puede detectar un engrosamiento y endurecimiento especialmente de la cabeza y cuerpo del epidídimo (ver Figura 1 y Figura 2).



Figura 1.- Palpación de testículos de carnero;

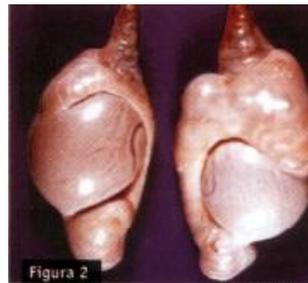


Figura 2.- Testículo normal (izquierda) y con epididimitis (derecha).

Sin embargo, no todos los animales enfermos presentan lesiones testiculares; se ha comprobado que hasta un 70% de los carneros infectados suelen no desarrollar lesiones palpables, cabe decir que sólo el 30% de los afectados presentan epididimitis (ver Figura 2). Los demás carneros pueden tener testículos y eyaculados de apariencia normal, pero igualmente pueden eliminar bacterias por el semen en forma intermitente.

El control de la enfermedad se apoya en la eliminación de los machos con diagnóstico bacteriológico y/o serológico positivo, y en la vacunación en lugares con alta prevalencia (Blasco, 1990). Las técnicas más eficientes para el serodiagnóstico de la infección por *Brucella ovis*, son la fijación del complemento, la inmunodifusión doble bidimensional y Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA del inglés "Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay"), que utilizan como antígeno el extracto salino obtenido por calentamiento (HS).

Recientemente se ha desarrollado un ELISA indirecto utilizando una proteína periplásmica como antígeno con utilidad para el diagnóstico de la infección por *B. ovis* (Arese y col., 1997).

La vacunación es el medio más económico y práctico para controlar la infección por *B. ovis* en países con prevalencias altas. Si bien la mayor parte de las vacunas utilizadas

hasta el presente han demostrado proteger contra la infección por *B. ovis*, la mayoría posee la desventaja de inducir anticuerpos indistinguibles de los producidos por la infección natural acarreado confusión en el diagnóstico serológico de la enfermedad. Por esta razón, es importante el desarrollo de vacunas subcelulares, mediante la identificación de los antígenos de *B. ovis*, que induzcan una respuesta inmunitaria protectora sin interferir en el serodiagnóstico (Blasco y col., 1987).

En este proyecto se utilizó la célula completa de *B. ovis*, a la cual mediante un método de ultracentrifugación obtuvimos las vesículas las cuales fueron utilizadas en la realización de la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE); con la finalidad de obtener el perfil proteínico de las vesículas de *B. ovis*.

1.2 Aspectos generales de *Brucella ovis*.

Brucella ovis es un cocobacilo acapsulado que carece de flagelos y pili (Merchant y Packer, 1975). Es un microorganismo Gram negativo y que se tiñe de rojo con la coloración de Stamp (Ziehl Neelsen modificada) o de Macchiavello (Timoney y col., 1988) ver Figura3.

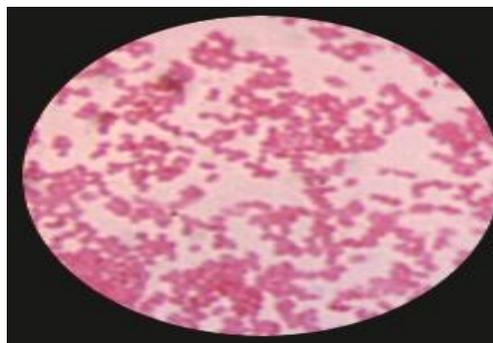


Figura 3.- *B. ovis* teñida con Ziehl Neelsen modificada.

B. ovis crece en medios sólidos ordinarios como el agar tripticasa soya o agar Columbia, (ver Figura 4 y Figura 5) enriquecidos con suero normal equino, bovino u ovino en una concentración final del 5 al 10 % (Alton y col., 1988) y en una atmósfera

con 5-10 % de CO₂ (Corbel y Bringley-Morgan, 1984) o bien carecer de éste si se trata de cepas previamente acondicionadas (ejemplo: REO198). Para un primer aislamiento a partir de semen, mucus cervical o muestras de necropsia se utilizan los medios de cultivo sólidos selectivos como el Thayer Martin modificado (Marín y col., 1996) o el agar Skirrow que permiten el crecimiento de *B. ovis* inhibiendo la presencia de otros microorganismos presentes en la flora normal de vagina o prepucio (Paolicchi y col., 1991; Terzolo y col., 1991).

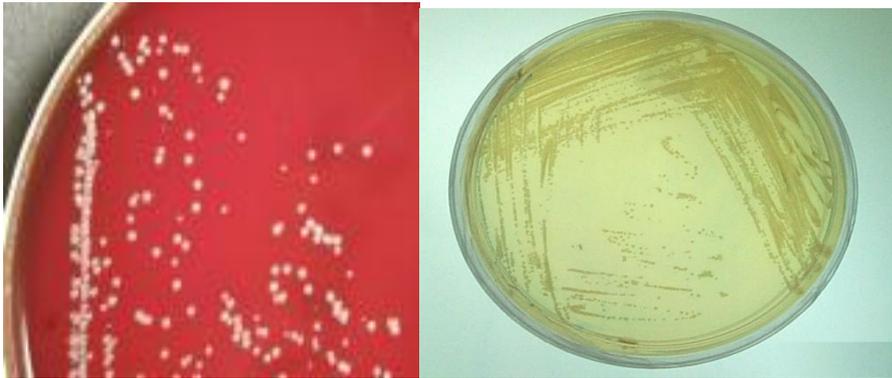


Figura 4.- *B.ovis* en agar soya tripticasa.

Figura 5.- *B.ovis* en agar Columbia.

Las colonias en medio sólido, visibles luego de un período de incubación de 3 a 5 días, son pequeñas, circulares, de borde entero, opacas, de superficie granular y con distintas tonalidades desde el blanco mate al marrón. Se caracterizan por formar agregados granulares al ser resuspendidas en solución fisiológica o en soluciones ácidas débiles. La morfología rugosa de *B. ovis*, puede ser observada en forma directa a través del método de transiluminación oblicua donde las colonias aparecen de color amarillo, con un aspecto seco, granular y opaco. La confirmación de la observación directa se realiza mediante el uso de acriflavina, colorante que autoaglutina las colonias rugosas, o por la tinción de las colonias de color rojo o púrpura con el cristal violeta (Alton y col., 1988).

Brucella ovis es catalasa positiva y oxidasa negativa; esta no produce H₂S, ni hidroliza la urea. Requiere de CO₂ para crecer. Su crecimiento es inhibido por el violeta de metilo, pero se multiplica en presencia de fucsina y tionina y no reduce los nitratos a nitritos (Tabla1).Oxida los aminoácidos L y D-alanina, L-asparagina, L-ácido glutámico, D y L-serina y el adonitol. Los cultivos no son lisados por los fagos Tb, WB, M-51-5708, Fz, Bk, MC-75, D y R. sin embargo, los fagos R/O- R/C son líticos para *B.ovis*. Es sensible “*in vitro*” a la penicilina, estreptomomicina y tetraciclina (Corbel y Brinley-Morgan, 1975; Alton y col., 1976).

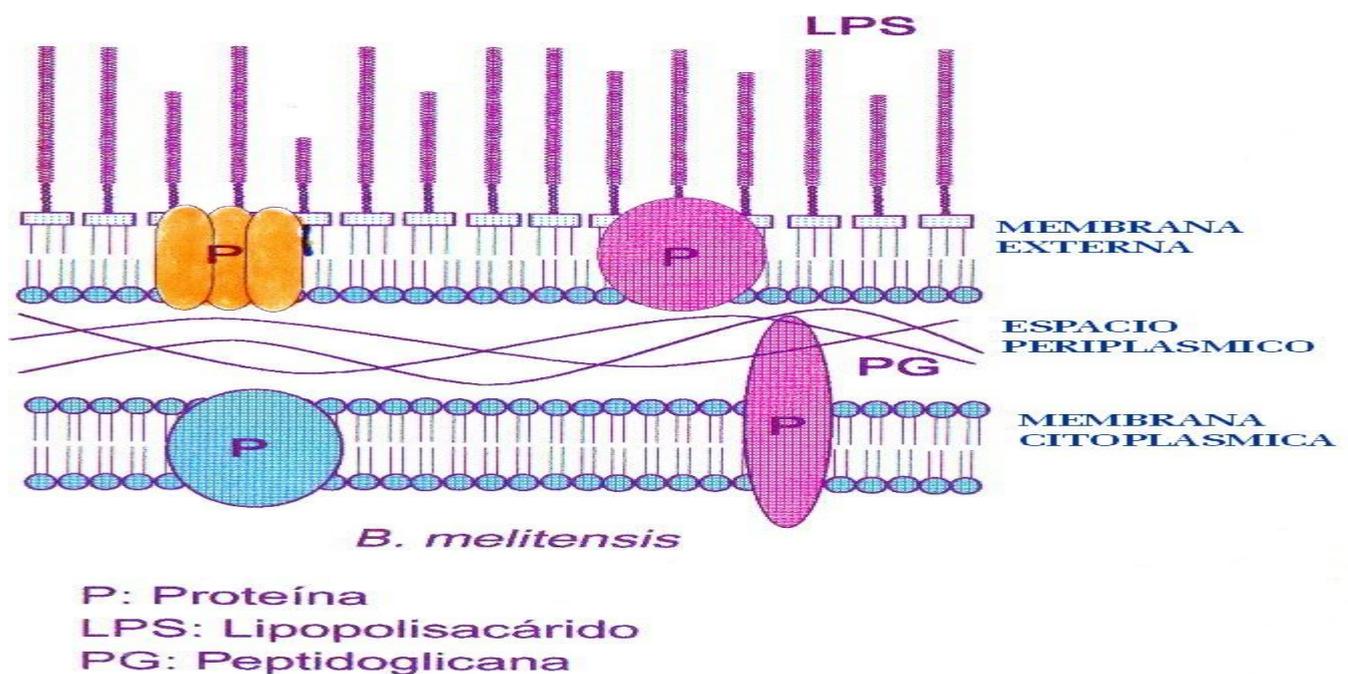
Tabla 1. Propiedades bioquímicas de los principales microorganismos asociados a la epididimitis ovina (Bergey,1984).

Características	Brucella ovis	Actinobacillus seminis	Histophilus ovis
Bioquímicas			
Catalasa	+	-/+	-
Motilidad	-	-	-
Hemólisis	-	-/+	-
Nitratos	-	-	+
Oxidasa	-	-	+
Indol	-	-	-/+
Urea	-	-	-
Rojo de Metilo	-	-	-
Voges – Proskauer	-	-	-
Arabinosa	-	-	-
Ramnosa	-	-	-
Xilosa	-	-	+
Glcosa	-	-	+
Fructosa	-	-	+
Galactosa	-	-	-
Sucrosa	-	-	-
Lactosa	-	-	-
Trealosa	-	-	-
Glicerol	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Manitol	-	-	-/+
Sorbitol	-	-	-/+
Gelatina	-	-	-
Maltosa	-	-	+
Gram	-	-	-

Ziehl – Neelsen	-	-	-
Ziehl – Neelsen (Stamp)	Cocobacilos azul	Cocobacilos rojo	-
Modificado (stamp)			

1.3 Composición antigénica de *Brucella ovis*.

Los antígenos de *B. ovis* han sido estudiados por su interés tanto para el diagnóstico como para la inmunoprofilaxis. En cortes estudiados por microscopía electrónica, las especies del género *Brucella* presentan una envoltura celular trilaminar constituida por una membrana interna o citoplasmática, separada de la membrana externa (ME) por un espacio periplásmico rico en proteínas solubles y peptidoglicano (PG) (Dubray y Plommet, 1976) (Figura 6).



Estructura de la envoltura celular de *Brucella*

Figura 6.- Estructura de la envoltura celular de *Brucella ovis*.

En la ME se encuentran dos grupos de antígenos mayores: el lipopolisacárido rugoso (LPS-R) y las proteínas de membrana externa (PME). Ambos se encuentran expuestos en la superficie de la ME presentando epítopes accesibles a los anticuerpos

monoclonales ya que no existe el impedimento estérico de la cadena O del lipopolisacárido presente en las cepas lisas de *Brucella*. Esto ha sido comprobado mediante distintas técnicas tales como ELISA sobre células enteras, microscopía electrónica y citometría de flujo (Bowden y col., 1995a).

El LPS-R es una molécula compleja y de bajo peso molecular compuesto por el lípido A y un núcleo constituido por oligosacáridos de glucosa, manosa y el 2-ceto, 3-desoxioctonato (KDO). Este último se encuentra en mayor proporción en *B. ovis* con respecto del resto de las especies de *Brucella* (Afzal y col., 1984a). Aunque en el lípido A y en el núcleo existen epítopes compartidos con cepas rugosas de otras brucelas, hay también epítopes específicos de *B. ovis* (Díaz y Bosseray, 1973; Moreno y col., 1984; Suárez y col., 1990) y otros comunes con especies de otros géneros pertenecientes a la subdivisión a-2 de la clase Proteobacteria (Moreno y col., 1990; Velasco y col., 1997).

La ME de *B. ovis* contiene dos grupos de PME que se clasifican en mayores y menores de acuerdo a su abundancia relativa, las cuales se hallan estrechamente unidas al LPS-R. Al primer grupo pertenecen las proteínas de 36-38 kDa (Omp2b) o llamadas grupo 2 que funcionalmente son porinas (Verstrete y col., 1982) y el grupo 3 compuesto de las proteínas de 25-27 kDa y 31-34 kDa, actualmente denominadas Omp25 y Omp31 respectivamente, las cuales se encuentran asociadas fuertemente al PG (Cloeckaert y col., 1992).

Los genes que codifican para las principales PME se encuentran conservados en las distintas especies de *Brucella*. En el caso del gen para la Omp 25 presenta en *B. ovis* una única delección que permite distinguirla de las otras especies del género. En *B. ovis*, esta proteína presenta un peso molecular menor y una conformación diferente, la cual permitiría la exposición de epítopes discontinuos específicos en superficie (Cloeckaert y col., 1996a). Por otro lado, el clonado y la secuenciación del Omp25 reveló que esta proteína no pertenece a la familia OmpA presente en otras Gram negativas como se había sugerido anteriormente de acuerdo a la composición aminoacídica (Cloeckaert y col., 1996b).

La proporción de las PME varía en las distintas especies, en el caso de *B. ovis* las PME del grupo 3 son predominantes (Santos y col., 1984) y abundan en las vesículas liberadas espontáneamente durante la fase de crecimiento exponencial (Gamazo y col., 1989).

Las PME menores son las proteínas de 10 kDa, 16.5 kDa, 19 kDa y 89 kDa (89-94 kDa o grupo 1) habiéndose encontrado marcadores específicos de *B. ovis* en las primeras tres proteínas, actualmente llamadas Omp10, Omp16 y Omp19.

Recientemente, se ha identificado en el espacio periplásmico, una proteína de 26 kDa (BP26) que ha sido caracterizada y clonada, que se presenta altamente conservada en el género *Brucella*. Por otro lado, en el citoplasma, se ha identificado y caracterizado una proteína de 18 kDa, específica del género *Brucella*, cuyo gen ha sido clonado (Goldbaum y col., 1993) y secuenciado (Hemmen y col., 1995).

1.4 Respuesta inmune a *B. ovis*.

La respuesta inmunitaria humoral a *B. ovis* ha sido estudiada a través de las pruebas serológicas clásicas. Sin embargo, sólo a través del Western Blot se han podido identificar los antígenos individuales y su inmunodominancia en el curso de la respuesta humoral a *B. ovis*. Los estudios realizados en ovinos infectados natural y experimentalmente, indican que la respuesta inmunitaria humoral ha estado dirigida principalmente contra el LPS-R y las PME del grupo 3, ambos expuestos en la superficie de *Brucella* y presentes en el extracto salino obtenido por calentamiento (HS) (Riezu Boj y col, 1986 y 1990). En animales con epidídimo-orquitis la respuesta fue más intensa y dirigida hacia un mayor número de proteínas que en aquellos sin síntomas, esto probablemente a una mayor estimulación antigénica. En otros estudios se identificaron cinco antígenos inmunodominantes presentes en las fases aguda y crónica de la infección: el LPS-R, las PME de 17, 19 y 29 kDa (reconocidas por los Acm anti-Omp 16, anti-Omp 19 y anti-Omp 25, respectivamente) y una proteína del estrés térmico de 63 kDa (Kittelberger y col., 1995a). Estudios posteriores llevados a cabo por estos mismos autores confirman estos hallazgos (Kittelberger y col., 1995b, 1996, 1997, 1998). Recientemente, la investigación de un suero de carnero naturalmente infectado, fue estudiada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones (SDS-PAGE) y Western Blot (Teixeira-Gomes y col., 1997). Los resultados obtenidos indicaron que si bien hay anticuerpos dirigidos hacia la PME de 89 kDa, también se reconocen proteínas periplásmicas (BP26) y citoplasmáticas (DnaK, GroEL).

Entre los animales de laboratorio, el ratón ha sido elegido para estudiar la respuesta inmunitaria a *B. ovis* (Jiménez de Bagués y col., 1993). Una de las estrategias utilizadas para identificar antígenos protectores se ha basado en la inyección de Acm anti-PMEs y anti-LPS-R previa a la inoculación de *B. ovis*. Los resultados de estos ensayos de protección indicaron que las PME menores y Omp31, son blancos importantes de la inmunidad humoral con una importante participación del LPS-R en la protección (Bowden y col., 1995b; Estein y col., 1996). Si bien se desconocen cuales son los mecanismos de protección participantes, algunos autores se refieren a la opsonización como facilitadora de la muerte intracelular de *B. ovis*, lo que sugiere una probable función de los anticuerpos, en tanto que la muerte extracelular podría estar mediada por el complemento o por las células "natural killer" (Jiménez de Bagués y col., 1994a).

B. ovis se puede considerar como un parásito intracelular facultativo, capaz de sobrevivir y multiplicarse en el interior de los macrófagos al abrigo de la acción de los anticuerpos y defensas innatas del huésped. Si bien la inmunidad celular no ha sido aún estudiada en el carnero, ensayos en el ratón permitieron establecer que la transferencia pasiva de suero anti-HS resultó en una mayor protección que la transferencia de células sensibilizadas a dicho antígeno (Jiménez de Bagués y col., 1994b). Por otro lado, el suero anti-*B. abortus* RB51(cepa vacunal rugosa) confirió mayor protección que las células inmunes en el control de la infección por *B. ovis* (Jiménez de Bagués y col., 1994b). Por lo anteriormente expuesto, la inmunidad humoral cumpliría un papel más importante que la celular en la protección, aunque se desconoce cuáles son las células implicadas en la respuesta. Por otro lado, el predominio de los isotipos IgG2a e IgG3 en ratón permitiría inferir que *B. ovis* induce la población de linfocitos T colaboradores del tipo 1 (LTh1) productores de interferón gamma (Jiménez de Bagués y col., 1994a).

1.5 Epidemiología de *B. ovis*.

B. ovis infecta en forma natural exclusivamente a la especie ovina, siendo el macho más susceptible a la infección que la hembra. Por otro lado, la raza Merino es más resistente a la infección que las razas británicas y sus cruza, en condiciones de explotación similares. Aunque la resistencia genética sería importante, las diferencias de precocidad y actividad sexual entre estas razas podría ser el aspecto determinante de la diferencia en la susceptibilidad (Timoney y col., 1988).

La infección experimental de caprinos jóvenes y adultos demostró que estos son menos susceptibles que los carneros, ya que la infección de los caprinos es de carácter leve y de corta duración (García Carrillo y col., 1974). Por otro lado se desconoce si la infección se transmite del ovino al caprino en condiciones de campo. En el hombre se han hallado reacciones serológicas positivas, pero no se ha citado la infección en esta especie (Meyer 1982)

B. ovis afecta principalmente el tracto reproductor del carnero y produce infertilidad ya que altera la calidad del semen (Kott y col., 1988; Bulgin y col., 1990a). Si bien la transmisión venérea es la principal vía de contagio en machos con experiencia sexual (Buddle y col., 1983; Radostits y col., 1994), el contagio de carneros vírgenes se produce frecuentemente en períodos de estabulación prolongada por el contacto con orina de animales infectados. En estas condiciones el germen ingresa al organismo a través de las mucosas nasal (olfateo), oral (lamido), conjuntival o por la vía percutánea a través de heridas o escoriaciones (Alton y col., 1988; Bulgin y col., 1990c). Asimismo, la conducta homosexual de los machos fuera de la época de servicio, favorecería la entrada del microorganismo a través de la mucosa rectal (sodomía) (Bulgin y Anderson, 1983; Bulgin, 1990d).

El carnero infectado con *B. ovis* constituye el principal reservorio en el rebaño, siendo el semen fundamental en la difusión del germen. La liberación de *B. ovis* en semen es intermitente y por períodos prolongados, habiéndose hallado cultivos positivos hasta 80 semanas post-infección experimental (Paolicchi y col., 1991; Radostits y col., 1994).

Aunque la oveja es relativamente resistente a la infección algunos autores sostienen que juega un papel importante en la difusión de la enfermedad (Homse y col., 1995). La hembra infectada transmite el germen a otros machos sanos si es montada por éstos

dentro de un mismo ciclo estral y esto explica los brotes de brucelosis posteriores a la época del servicio. Raramente la hembra mantiene la infección por más de dos ciclos y siendo responsable de difundir la enfermedad de un año a otro (Bulgin y col., 1990b). Si bien *B. ovis* no afecta la concepción, puede provocar mortalidad embrionaria con infertilidad transitoria y en menor proporción abortos hacia el final la gestación (Homse y col., 1995) ; así como placentitis, la cual impide la nutrición fetal y ocasiona abortos o el nacimiento de corderos prematuros o débiles (Libal, 1990). Si no se presta adecuada asistencia en el momento del parto, el cordero infectado muere; si sobrevive éste puede ser un potencial portador pudiendo desarrollar la enfermedad al llegar a la pubertad. Aunque la oveja se recupera de la infección luego del parto, se ha comprobado que ésta excreta *B. ovis* a través de las secreciones vaginales y uterinas, placenta y loquios. Asimismo, si bien la leche es una fuente potencial de infección, no existe información de la transmisión por esta vía al cordero lactante.

1.6 Diagnóstico de *Brucella ovis*.

El diagnóstico de la epididimitis contagiosa del carnero se basa en la combinación del examen clínico y su confirmación mediante el aislamiento de *B. ovis* en el semen y/o resultados positivos en las pruebas serológicas. Por otro lado, se debe tener en cuenta la situación epidemiológica de la majada, datos reproductivos como vacunaciones y antecedentes previos de epididimitis (Alton y col., 1988).

El examen clínico consiste en la palpación minuciosa del contenido escrotal, aunque el 50% de los animales infectados no desarrollan una epididimitis palpable siendo portadores y transmisores de la enfermedad. Sin embargo, el hallazgo de un animal con epididimitis es solo orientativo y se debe realizar el diagnóstico diferencial (Kott y col., 1988).

El semen, obtenido por electroeyaculación, es examinado al microscopio óptico para determinar la existencia de anomalías en la motilidad de los espermatozoides o en su morfología (desprendimiento de cabeza o cola, vacuolización del acrosoma, etc.). La coloración con Giemsa permite evaluar la presencia de células inflamatorias, aunque el hallazgo de las mismas no es un signo patognomónico de la enfermedad. La muestra de

semen se colorea con la coloración de Stamp. Ante la presencia de microorganismos sospechosos, la muestra se siembra en medio selectivo y se incuba en una atmósfera de 5-10% de CO₂, se debe examinar durante 10 días antes de dar un cultivo como negativo. Por otro lado, este resultado negativo no descarta la presencia de *B. ovis* ya que la naturaleza crónica de la enfermedad lleva a que la liberación del germen sea intermitente o que no se excrete (Kott y col., 1988).

Diversas pruebas serológicas han sido desarrolladas a lo largo del tiempo para detectar anticuerpos contra *B. ovis*. Las pruebas de aglutinación no son adecuadas para el diagnóstico de esta especie debido a la naturaleza autoaglutinante de sus células en suspensión. La hemaglutinación indirecta usando un antígeno sonicado de *B. ovis* no tuvo aceptación debido al alto número de falsos negativos y las dificultades en su estandarización. Por otro lado, la inmunofluorescencia indirecta si bien es específica posee una sensibilidad menor que la fijación del complemento (Afzal y col., 1986). Por lo que las pruebas serológicas actuales para la determinación de anticuerpos de *B. ovis* son la prueba de inmunodifusión doble en gel, la prueba de fijación de complemento y las pruebas inmunoenzimáticas indirectas (Salas y col., 2001).

El diagnóstico y descarte, basados en la fijación del complemento con el extracto HS, combinados con la palpación escrotal, han dado resultados satisfactorios en los programas de erradicación en Australia y Nueva Zelanda (Niilo, 1984). La temperatura en que se desarrolla la reacción de fijación del complemento es importante. Se ha observado que a bajas temperaturas (1-4°C) los títulos obtenidos han sido mayores y se han hallado reacciones positivas en estadíos tempranos de la infección. Sin embargo la prueba a baja temperatura resulta más sensible pero menos específica que la reacción a 37°C. Esta prueba presenta la desventaja de ser compleja ya que requiere una rigurosa estandarización y titulación de cada uno de los reactivos (Sanchis y Abadie, 1986), presenta fenómeno de prozona, tiene menor sensibilidad (Ris y Te Punga, 1984) y especificidad que el ELISA (Vigliocco y col., 1997) y la inmunodifusión (Myers, 1973). Además no es compatible con el uso de sueros hemolisados o anticomplementarios (Searson y col., 1982).

La inmunodifusión en gel, utilizando el mismo antígeno, es la prueba de referencia en países de América del Sur como Chile, Argentina, Brasil, Perú y Uruguay. Esta técnica se caracteriza por ser sencilla, de bajo costo, fácil interpretación (Myers y

Siniuk, 1970), aunque se trata de una prueba cualitativa y que aún no ha sido adecuadamente estandarizada.

La fijación del complemento, la inmunodifusión en gel y el ELISA utilizan como antígeno al extracto HS, obtenido a partir de la cepa REO 198 de *B. ovis*. En un mismo estudio, la comparación de estas técnicas utilizando diferentes extractos antigénicos, resultó en la elección del extracto HS debido a su solubilidad en agua, fácil obtención y a que éste es rico en antígenos inmunodominantes (Gamazo y col., 1989; Marín y col., 1989b). El principal problema que se presenta al usar este antígeno es la reacción cruzada en áreas donde hay alta prevalencia de *B. melitensis* o existen animales vacunados con *B. melitensis* Rev.1, además de observarse una reacción cruzada con las Omp de otros microorganismos (Gall y col., 2003).

En los últimos años, se ha estudiado la técnica de ELISA indirecta utilizando diferentes extractos antigénicos y ha sido comparada con la técnica de inmunodifusión en gel y con la de fijación del complemento; en estos trabajos las preparaciones antigénicas que han sido utilizadas son las siguientes: antígeno de *B. ovis* sonificado o autoclavado, extractos de la ME obtenidos con desoxicolato y LPS-R extraído con mezclas de éter de petróleo-fenol-cloroformo (Afzal y col., 1984a; Ficapal y col., 1995). En otros estudios han utilizados antígenos internos, por ejemplo, un ELISA indirecta anti-BP26 la cual ha permitido diferenciar ovinos sanos, infectados o vacunados con *B. melitensis* Rev 1 (Arese y col., 1997; Rossetti y col., 1996; Zygmunt y col., 1997).

La prueba de ELISA supera en sensibilidad y especificidad a las técnicas anteriores y permite el procesamiento de gran número de muestras simultáneamente; además la hemólisis del suero no afectan la reacción. Por otro lado una desventaja que presenta es que requiere un espectrofotómetro para la lectura de la placa, con un mayor costo inicial. Los mejores resultados se han obtenido por la combinación de la inmunodifusión en gel y ELISA resultando en una sensibilidad del 100%.

Otra alternativa interesante para el diagnóstico de brucelosis es la prueba alérgica, que utiliza como alérgeno a la brucelina del INRA2, y que permite detectar la presencia de infección en un rebaño (Kolar y col., 1984). Esta es una prueba de vigilancia epidemiológica muy específica para *Brucella spp*, la cual es interferida por la vacunación con *B. melitensis* Rev 1 o por la infección con otras especies de *Brucella*.

Por otra parte, aunque carece de importancia como prueba de diagnóstico individual, es de elección en países sin una adecuada infraestructura (Fensterbank, 1982).

1.7 Diagnóstico diferencial.

La epididimitis contagiosa de los carneros producida por *B. ovis*, debe ser diferenciada de la "epididimitis de los corderos" ocasionada por *Histophilus ovis*, *Haemophilus somnus* y *Actinobacillus spp.* A diferencia de *B. ovis*, este grupo de microorganismos pequeños y pleomórficos infectan animales más jóvenes y sin experiencia sexual (Bulgin y col., 1990c). Ver tabla 2.

La infección placentaria por *B. ovis* debe ser distinguida de la producida por *B. melitensis*. Otros agentes intracelulares, también responsables de placentitis en la oveja, como *Coxiella burnetti* y *Chlamydia psittaci*, son puestos de manifiesto mediante la coloración de Giménez (Carter y Cole, 1990).

Tabla 2. Diagnóstico diferencial de *B. ovis*.

PRUEBA	AÑO	ANTIGENO (Ag)	REACCION CRUZADA
Fijación del complemento	Rehaley. 1978	Células inactivadas por autoclave	B.melitensis H.ovis
ELISA indirecta	Cárdenas y col., 1986	Células sonicadas	Falsos positivos

			B.melitensis
			Falsos negativos
Elisa indirecta	Takes y col., 1990	Células sonicadas	B.melitensis
Inmunodifusión doble (I.D.D)	Méndez y col., 1996	Antígeno soluble	B.melitensis
PCR	Appuhamy, 1998	ADN amplificado	-

1.8 Tratamiento de *Brucella ovis*.

La multiplicación y supervivencia de *B. ovis* dentro del macrófago dificulta la acción de la terapia antibiótica. Por esta razón es necesario mantener concentraciones bactericidas por períodos prolongados y utilizar antibióticos capaces de atravesar la membrana de las células fagocíticas. La combinación de aureomicina con sulfato de estreptomycinina, o bien oxitetraciclina con dihidroestreptomycinina ha dado resultados satisfactorios ya que cura la epididimitis y elimina la excreción de *B. ovis* por semen (Marín y col., 1989a). No obstante esto, el tratamiento sólo es práctico desde el punto de vista económico en carneros de valor, y siempre y cuándo sea instituido antes de que aparezcan lesiones epididimarias irreversibles (Radostits y col., 1994).

1.9 Generalidades de las vesículas de excreción.

Las vesículas, son pequeñas esferas cerradas que derivan de la membrana externa de bacterias Gram negativas por fragmentación seguida de su cierre, probablemente son el resultado de su expulsión de la membrana celular lo cual es un fenómeno normal, entre sus sinónimos se conocen: vesículas alternativas, microvesículas, vesículas, vesículas de la membrana, vesículas de membrana externa (MVs) o vesículas extracelulares. Estas son formadas tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” se ha informado que diferentes géneros de

bacterias Gram negativas las producen durante el crecimiento normal, durante su formación las MVs encierran varios componentes del periplasma celular, pueden contener lipopolisacárido, proteínas periplásmicas y de membrana externa, fosfolípidos, toxinas, enzimas, ADN, factores de virulencia y componentes como el lipopolisacárido (LPS) (Kadurugamuwa y col., 1995; Li y col., 1998, Zhou y col., 1998). Por lo tanto, las vesículas proveen una fuente excelente de moléculas biológicamente activas, tienen un tamaño de 20 a 500 nm, pueden unirse a la membrana celular o soltarse de la misma. Las MVs se han encontrado en diferentes géneros como *Bacteroides*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Actinobacillus*, *Escherichia* y *Brucella*; recientemente, estos estudios han demostrado que las vesículas pueden liberarse de las bacterias al ambiente, esto se ha informado en varios géneros incluyendo *Bacteroides* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Smith en 1977 sugiere que la presencia de enzimas proteolíticas en la superficie celular bacteriana podría ser potencialmente importante en la nutrición bacteriana, así como en el proceso de patogenicidad.

1.9.1 Métodos de aislamiento y composición de las microvesículas.

Se han usado diferentes métodos para el aislamiento de MVs a partir del sobrenadante del medio de cultivo, como son los métodos de precipitación con sulfato de amonio, centrifugación con sacarosa, ultra centrifugación y ultrafiltración. (Zhou Leah, Srisatjaluk, Doyle Justus, 1998).

Las vesículas extracelulares son parte de la membrana externa de las células bacterianas que se dividen generando por lo tanto estructuras idénticas a la composición bacteriana. Se encontró que las vesículas recuperadas por ultra centrifugación de varias especies de Bacteroides eran idénticas a los modelos de membrana externa.

Se ha encontrado que las vesículas pueden contener polipéptidos que pueden ser obtenidos:

- De algunas proteínas que son parte de las células que se encuentran en el proceso de formación de vesículas.
- De proteínas que están en el interior de la célula pueden ser envueltas, cuando brota la vesícula .
- O de algunas otras proteínas que son el resultado de la acción de las proteasas en las moléculas de la superficie de las vesículas.(Mayrand y col., 1989; Dorward y col., 1989).

1.10 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.

Los geles de poliacrilamida constituyen un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas, dado que reúnen una serie de propiedades idóneas: transparencia, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos. La poliacrilamida se forma por copolimerización de dos compuestos, la acrilamida y la bis-acrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por la tetrametiletiléndiamina (TEMED) y el persulfato de amonio. El radical persulfato activa al TEMED, el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice. Las cadenas de poliacrilamida son entrecruzadas al azar por la bisacrilamida, formándose así una red de porosidad bastante uniforme, que puede ser regulada variando las condiciones de la reacción y las concentraciones de los monómeros.

Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés "polyacrylamide gel electrophoresis"), probablemente la más utilizada es la modalidad que se lleva a cabo en presencia del detergente duodecilsulfato de sodio (SDS), tanto para analizar mezclas de proteínas, como para ser combinada con técnicas de inmunoelectrotransferencia. En la técnica de SDS-PAGE, se mezclan las proteínas con el detergente aniónico SDS para formar complejo desnaturalizados, cargados negativamente. Dado que la relación final carga/masa queda constante para las distintas proteínas (se anula su carga intrínseca), estas van a ser separadas en el gel poroso fundamentalmente con base en sus diferencias de peso molecular (PM): a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína, y viceversa.

Esta técnica permite estimar el peso molecular (PM) de una proteína, comparando su movilidad electroforética con la de proteínas de PM conocido. Estas determinaciones poseen un margen de error de aproximadamente del 10%. Algunos tipos de proteínas pueden mostrar una migración atípica en esta técnica, por ejemplo, proteínas con puntos

isoelectricos muy extremos (donde la carga intrínseca puede ser lo suficientemente fuerte para influir en la movilidad o de proteínas altamente glicosiladas).

1.10. Determinación del peso molecular de una proteína “incógnita” mediante SDS-PAGE

La determinación del PM de proteínas mediante SDS-PAGE es válida cuando se analizan cadenas proteicas individuales (subunidades), en donde se han reducido todos los enlaces disulfuro y por ende, se ha distendido toda la cadena proteica para su interacción con el SDS. Bajo estas condiciones, la migración de las moléculas obedece fundamentalmente a su PM. En ocasiones es útil analizar muestras no reducidas de una proteína, por ejemplo, para evaluar su composición de subunidades. En este caso, la movilidad electroforética en SDS-PAGE, aunque guarda una cierta relación con el PM, no necesariamente corresponde con su PM exacto, dependiendo de la forma y los pliegues causados por los enlaces disulfuro, que seguirían intactos aún después de la interacción SDS-proteína, en condiciones no-reductoras.

Si la muestra ha sido reducida con 2-mercaptoetanol, los enlaces disulfuro intra- e inter-catenarios son disociados, la estructura cuaternaria se pierde y las subunidades se separan como cadenas peptídicas individuales. La movilidad electroforética relativa (**R_f**) es inversamente proporcional al logaritmo del PM. Trazando un gráfico con estándares de PM conocido, se obtiene una línea de referencia en la cual se puede interpolar muestras de PM desconocido. El R_f se calcula dividiendo la distancia (mm) recorrida por la banda en cuestión, entre la distancia recorrida por el colorante azul de bromofenol (u otro punto de referencia arbitrario). En la Tabla 3 se muestra un ejemplo de los marcadores moleculares utilizados para calcular el peso molecular de una proteína incógnita.

Tabla 3: Marcadores moleculares utilizados para determinar el peso molecular de un proteína problema. Las muestras fueron reducidas con 2-mercaptoetanol, y corridas en un gel al 12% de concentración.

Marcador	PM	Distancia (mm)	Rf (vs.70 mm)
Albúmina bovina	66.000	6,5	0,092
Ovalbúmina	45.000	13,0	0,186
Gliceraldeh-3-P-DH	36.000	18,0	0,257
Anhidrasa carbónica	29.000	25,0	0,357
Tripsinógeno	24.000	28,5	0,407
Inhibidor de tripsina	20.100	38,0	0,543
α -Lactalbúmina	14.200	50,0	0,714
Banda incógnita ?		44,0	0,623

Al graficar los datos anteriores en papel semilogarítmico ($x=Rf$, $y=PM$) se observa la relación mencionada (Figura.7). El PM estimado para la proteína incógnita es de 16.2 kDa, interpolando mediante una regresión lineal en los puntos adecuados.

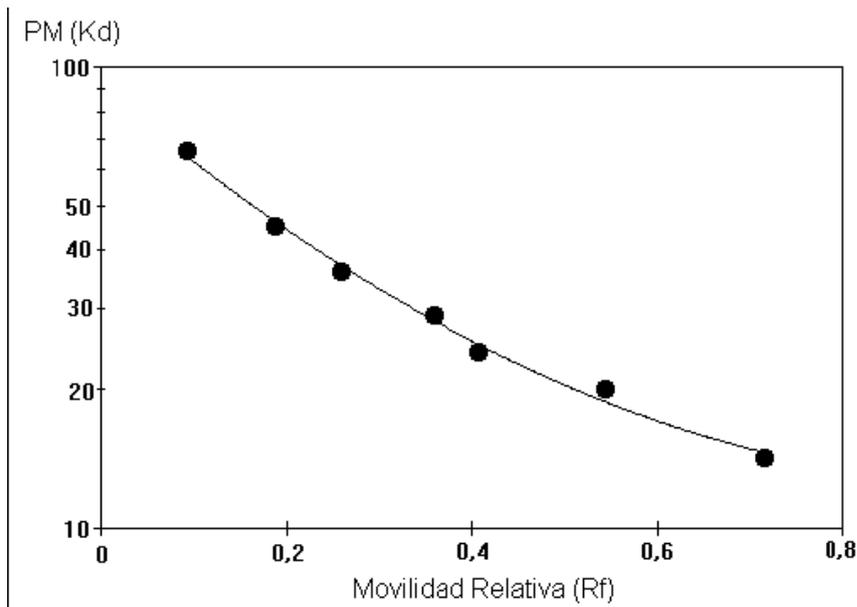


Figura 7. Ejemplo de una curva de referencia para la estimación del peso molecular de proteínas mediante SDS-PAGE.

Los datos corresponden al ejemplo del Tabla 2. Nótese que la línea de regresión con los estándares de PM conocido muestra una ligera curvatura, típica de los geles de concentración homogénea. Para la interpolación de bandas incógnita, en la práctica es más sencillo aplicar una regresión lineal simple a los puntos colineales más cercanos a la muestra. La extrapolación de la curva hacia el eje Y, donde $R_f=0$, indica que, teóricamente, las proteínas mayores de 100 Kd no penetran en el gel.

Para ilustrar la utilidad del análisis de una proteína bajo condiciones de reducción o no-reducción, se puede usar como ejemplo la molécula de IgG (Figura.8). Al correr una preparación pura de IgG no reducida, se obtendrá una sola banda, en la región de PM ~150-

160 Kd. Si se trata la muestra con un reductor como el 2-mercaptoetanol, se observará dos bandas: una de ~50 Kd (la cadena pesada) y otra de ~25 Kd (las cadenas ligeras kappa y lambda).

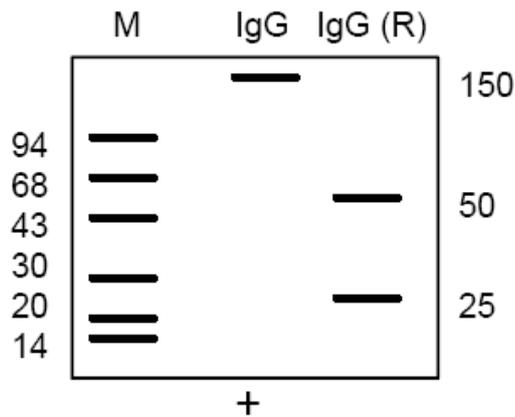


Figura 8. Análisis de la composición de subunidades de una proteína en SDS-PAGE. Una muestra de IgG purificada (carril central) que no fue tratada con agente reductor, migrará con un PM aparente de 150-160 Kd. La misma se separará en dos bandas, al ser reducida (IgG (R)), con PM de 50 y 25 Kd, respectivamente. A la izquierda se representan los marcadores de PM conocido (M).

La técnica de SDS-PAGE posee un alto poder de resolución. Lo anterior se deriva del uso de un sistema electroforético **discontinuo**, formado de dos geles de distinta porosidad y pH, que primero compactan las muestras (en el gel superior o **compactador**) y luego las separan (en el gel inferior o **separador**). Ver Figura 9.

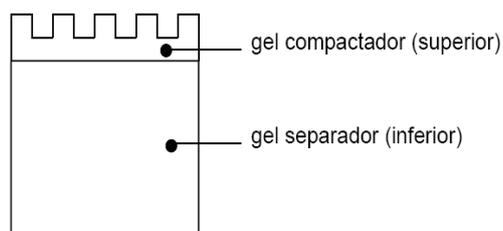


Figura9. Partes de un gel de SDS-PAGE. Está compuesto de dos geles de distinta porosidad y pH, que cumplen funciones diferentes, para aumentar el poder de resolución.

En el gel separador, la movilidad es restringida por el tamaño del poro, el cual depende de la concentración de monómeros del gel. Así, si se requiere resolver componentes de muy alto PM, se utilizan geles al 5% o al 7,5%, mientras que los geles de poro menor, ejemplo: 15-20% son útiles en la separación de péptidos y proteínas pequeñas. Los geles de poro intermedio (10-12%) proveen una separación adecuada para proteínas de ~10.000-90.000 daltons (Lomonte *et al.*, 1990).

II. JUSTIFICACIÓN

Brucella ovis es uno de los agentes que se encuentra involucrado con la epididimitis contagiosa del borrego, esta es una enfermedad infecciosa que causa una disminución en la fertilidad hasta llegar a la esterilidad; esta infección es de distribución mundial por lo que causa mucha pérdida económica. Por lo que actualmente se han realizado estudios sobre los agentes causales de esta enfermedad, por ejemplo su identificación, su diagnóstico diferencial, profilaxis y hasta su tratamiento. Con base en lo anterior es de gran importancia conocer el perfil proteínico de las vesículas de *Brucella ovis* para tener un parámetro más que ayude en los procesos de diagnóstico, así como en la formación de nuevos inmunógenos para lograr un mejor control de la enfermedad.

III.HIPÓTESIS

Si mediante los métodos de ultracentrifugación y filtración obtenemos las microvesículas de *Brucella ovis*, entonces mediante la técnica de SDS-PAGE se podrá observar el perfil proteínico de las microvesículas de *B.ovis*

IV.OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Obtener las microvesículas de *Brucella ovis*, mediante los métodos ultracentrifugación y filtración; para determinar su perfil proteínico mediante la técnica SDS- PAGE.

OBJETIVO PARTICULAR:

- 1.-Realizar la obtención de microvesículas de *Brucella ovis* mediante la técnica de ultracentrifugación y filtración.
- 2.- Determinar en geles de SDS-PAGE la presencia del perfil proteínico del extracto proteico obtenido (microvesículas de *B. ovis*).
- 3.- Establecer el peso molecular de las proteínas presentes en las microvesículas de *B.ovis*, mediante una curva estándar.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Preparación del inóculo

Se empleó la cepa de referencia de *Brucella ovis*_REO 198, esta cepa fue proporcionada por CEMD Microbiología de Palo Alto, INIFAP SAGARPA. A la cual se le ratificó la pureza mediante pruebas bioquímicas, esta se mantuvo durante toda la

investigación en Agar Brucella a 37° C durante 48 horas y con una atmósfera de CO₂ (Estufa de CO₂, Thermolyne-Modelo 379000).

5.2 Estudio bacteriológico de *Brucella ovis*

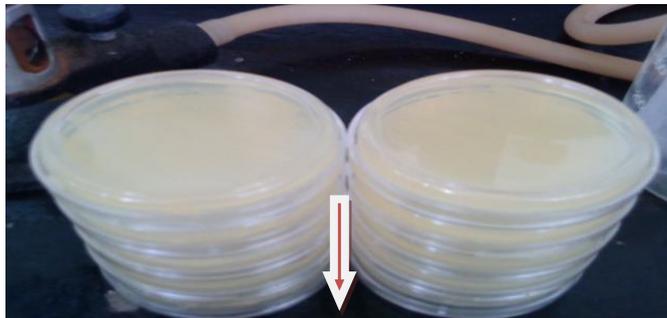
A esta cepa se le identifico primeramente mediante la tinción de Gram; posteriormente se realizaron algunas pruebas bioquímicas como son: catalasa, oxidasa, citratos, motilidad, nitratos, OF, producción de H₂S.

METODOLOGÍA

5.3 OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPLETAS DE *Brucella ovis*

Se cultivo la cepa de referencia de *B.ovis* en agar brucella a 37°C y se incubo de 24-48 hrs.

De esta cepa se sembraron 20 cajas de agar Brucella, se incubaron a 37°C por 24-48 horas.



ovis.

5.4 OBTENCIÓN DE MICROVESÍCULAS DE *B.ovis*



Se cosecha cada una de las cajas con SSF.

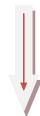


Se coloca la cosecha en un tubo para centrifuga.



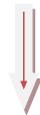


Se centrifugó el tubo con la cosecha a



Se recuperó el sobrenadante y se filtró a vacío con un equipo

(millipore) con un diámetro de $0.22\mu\text{m}$. Completamente



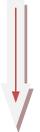
El filtrado se ultracentrifugó a 45,000 rpm / 3 horas a 4°C .



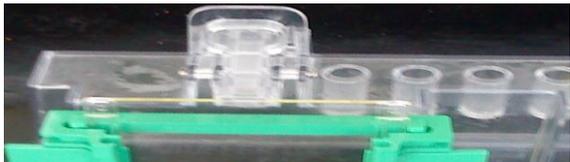
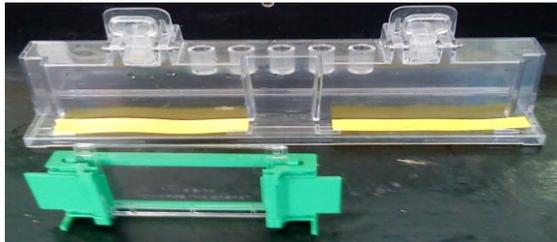


Se desecho el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con agua desionizada en un volumen mínimo. Y se guardó hasta su uso

5.5 METODOLOGÍA DE ELECTROFORESIS



Se montó la cámara de electroforesis siguiendo los pasos de la técnica, añadiendo los reactivos del gel separador y el concentrador al 10% (ver anexo para la preparación de soluciones), dejándolo gelificar por 10 minutos.



PREPARACION DEL GEL



Para preparar los geles se realizó el cálculo del volúmen de la Cámara Bio-Rad, y con base a este volumen se utilizaron las siguientes concentraciones:

Reactivo	Gel separador (10%)
Solución "A"	3.3 ml
Solución "B"	2.5 ml
Agua	4.2 ml
PSA	100 μ L
TEMED	5 μ L

Reactivo	Gel concentrador
Agua	2.3 ml
Solución "A"	0.67ml
Solución "C"	1.0 ml
PSA	50 μ L

TEMED	5 μ L	
-------	-----------	--



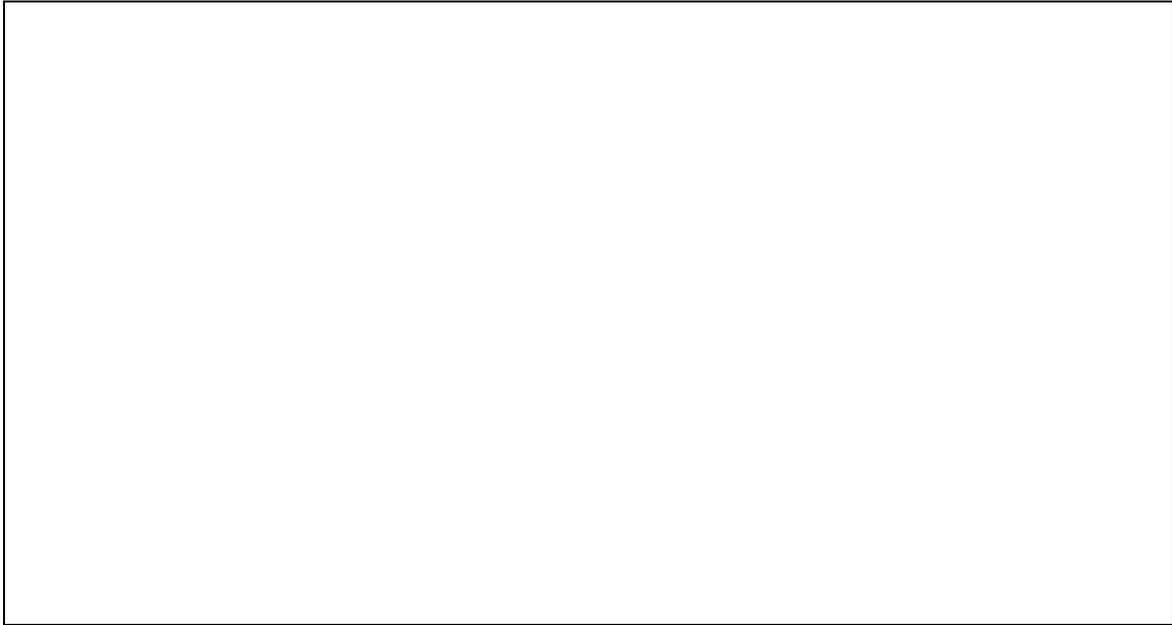
Colocar la mezcla del gel separador al 10% en la Cámara de Electroforesis, aproximadamente 2-3 cm del borde superior, eliminar las burbujas que llegasen a quedar.



Adicionamos la mezcla del gel concentrador al 5% en la Cámara de Electroforesis, esto sobre el gel separador, posteriormente se coloca la peineta y se espera a que gelifique para así poder quitar la peineta.



Después que gelificó el gel se monto la cámara de Electroforesis y se llena con la solución de corrimiento (ver anexo), cuidando de que el gel este cubierto con esta solución.

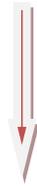


Se preparo la muestra y los Marcadores de PM como sigue:

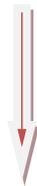
TUBO	Muestra (μL)	Muestra Buffer (μL)
1	100	100
2	10 μL de Marcador de PM	



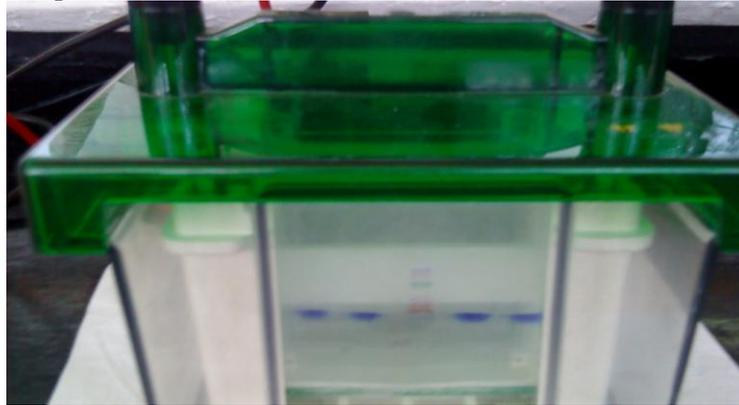
Se colocaron 20 μl de la muestra la cual contiene (microvesículas de *B.ovis* con un volumen de buffer muestra), en cada pozo del gel en el último pozo se colocó 10 μl del marcador de peso molecular.



El gel se corrió a 80 volts.



Posteriormente, transcurrido el tiempo de corrimiento se desmontó la cámara y con cuidado se desprendió el gel del vidrio de la cámara, para luego colocarlo en un recipiente



Se tiñó el gel con una solución de Azul de Coomasie R-250 ya preparada (ver anexo) este gel se colocó en un recipiente con aproximadamente 20 ml del colorante y se dejó reposar 24 hrs.

Una vez teñido el gel, se retira el colorante se enjuaga con agua y se adicionan 20 ml de solución decolorante, se agito poco a poco teniendo cuidado de no decolorarlo completamente; así se observaron las bandas y cada una de las proteínas contenidas en las microvesículas de *B. ovis*. Se retiró la solución decolorante, y se adiciono agua

**5.5.1 METODOLOGÍA PARA DETERMINAR EL PM DE LAS PROTEÍNAS
“INCOGNITAS” DE LAS MICROVESICULAS DE *B.ovis*.**



Ya que se tiene el gel, se le calcula el Rf tanto a los marcadores de peso molecular que se utilizó como de las bandas que se obtuvieron; este se calcula dividiendo la distancia (mm) recorrida por la banda en cuestión, entre la distancia recorrida por el colorante azul de Coomassie R-250.



Después de calcular el Rf, se realizó un grafico en donde en X= Rf y Y=PM. Se observara en esta relación una línea curvada, por lo que se realizó una regresión lineal para poder interpolar los PM de las proteínas encontradas en las microvesículas de *B.ovis*.

5.6 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Para la obtención de la fotografía por microscopia electrónica de barrido (MEB), se utilizó la cepa de *Brucella ovis* REO 198, la cual se sembró en Agar brucella se incubó en una atmosfera de CO₂ al 10% a 37°C, después de 3 días de incubación observamos el crecimiento y le realizamos un Gram para poder identificarla así como su morfología, de estas cajas sembradas tomamos unas asadas e inoculamos un tubo de caldo BHI; este se incubó en una atmosfera de CO₂ a 37°C durante 48 horas, después de este tiempo se homogenizo por inversión y se tomo 1 ml de caldo y se agregó en un tubo de ensaye con rosca estéril, después se le agregó 1 ml de glutaraldehído al 25% y se dejo reposar por 24 hrs. Después de este tiempo se filtro la bacteria empleando un papel de nitrocelulosa con un poro de 0.22 µm, una vez que la bacteria esta obtenida en el papel, se coloca en una caja petri, la cual contiene glutaraldehído al 25% y se dejó reposar 1 hr, esto es para poder fijar las células y poder permitir que cese la actividad biológica de la célula, así como también preservar la estructura celular y así evitar cambios auto líticos.

Después de lo anterior se procede a la deshidratación, ya que para poder trabajar la muestra se debe encontrar libre de agua y para esto se utilizaron soluciones de etanol a

diferentes porcentajes (etanol al 10% hasta llegar al etanol absoluto), cada membrana se dejó por 10 min, en cada uno de los porcentajes de etanol. Después del secado se pasa a punto crítico, para esta técnica se utilizó CO₂ líquido y gaseoso, para realizar la remoción total de agua de la muestra, el aparato se basa en que el CO₂ a temperatura baja es líquido y a temperatura alta es gaseoso. Cuando la muestra sale deshidratada por etanol, se colocó en el secador de punto crítico (TOUSIMIS SAMDRI-780A), la muestra se purgo con CO₂ líquido hasta que el etanol haya sido reemplazado, posteriormente se sella la cámara y se calienta hasta que la temperatura llegue a 31°C, de esta manera el CO₂ líquido se evapora y la muestra queda totalmente seca. Ya que la muestra esta deshidratada y seca a punto crítico, se monto en un porta muestra colocándole a esta una cinta de carbono cemento conductor, esto con el fin de que la muestra este segura y así permitir la colocación en el ionizador de oro.

Se procede al recubrimiento con oro, esto se realizó con un ionizador (FINE COAT JEOL ION SPUTTER JFC-1100). Se colocó la muestra en la cámara, se sella y se programa el tiempo de recubrimiento, donde el oro cae uniformemente y se obtiene una capa de 50 Å de grosor, se hace vacío y automáticamente el timer se enciende y la muestra se recubre totalmente según el tiempo programado, finalizado este tiempo, ingresa lentamente aire a la cámara y la muestra esta lista para poder colocarla y observarla en el MEB.

VI. RESULTADOS

Con la finalidad de corroborar la pureza de la cepa empleada, se realizó la identificación mediante la tinción de Gram, observándose un cocobacilo Gram negativo. En la siembra en medio de cultivo específico como el Agar Brucella, observamos su morfología colonial clásica de este microorganismo: colonias pequeñas, rugosas, circulares, de un borde entero, opacas de color mate. Ver Figura 10.



Figura 10. Crecimiento de *Brucella ovis* sembrada en Agar Brucella, durante 72 horas a 37 C.

Por otro parte, para poder confirmar el género y la especie de la cepa se realizaron pruebas bioquímicas de identificación, mostrándose los resultados en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a *Brucella ovis*.

PRUEBA	RESULTADO
Catalasa	+
Oxidasa	-
Motilidad	-
Nitritos	-

Con la finalidad de demostrar la exitosa extracción de microvesículas, se procedió a emplear la microscopia electrónica de barrido. En la Figura 11, se puede observar los cuerpos celulares de la *Brucella ovis*, de la cual emergen las estructuras microvesiculares, dichas estructuras son liberadas durante el proceso de

ultracentrifugación y posteriormente, se recuperan del sobrenadante (Figura 11. fotografía obtenida en el MEB del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM).

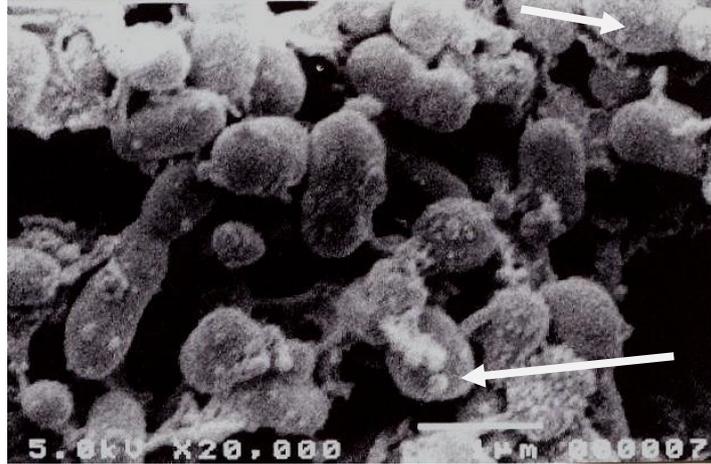


Figura 11. Micrografía electrónica tomada con el MEB de *B. ovis*, las flechas señalan algunas de las microvesículas de *brucella ovis*.

En esta micrografía, también permite observar con claridad a *B. ovis*, y sus características morfológicas de coco bacilo pequeño, y como ya se menciona, en su superficie presenta la formación de microvesículas que miden aproximadamente de 0.04-0.06 μ m.

El objetivo principal de la tesis fue el conocer el perfil proteínico de las microvesículas de *B. ovis*, para tal efecto, se realizó la técnica de SDS-PAGE al 10% y su posterior tinción con el colorante de Azul de Coomasie R-250 (Figura 12). La concentración final del gel de corrida fue de 10%; sin embargo, cabe resltar que fueron diversas las concentraciones que se emplearón para llegar a la definitiva.

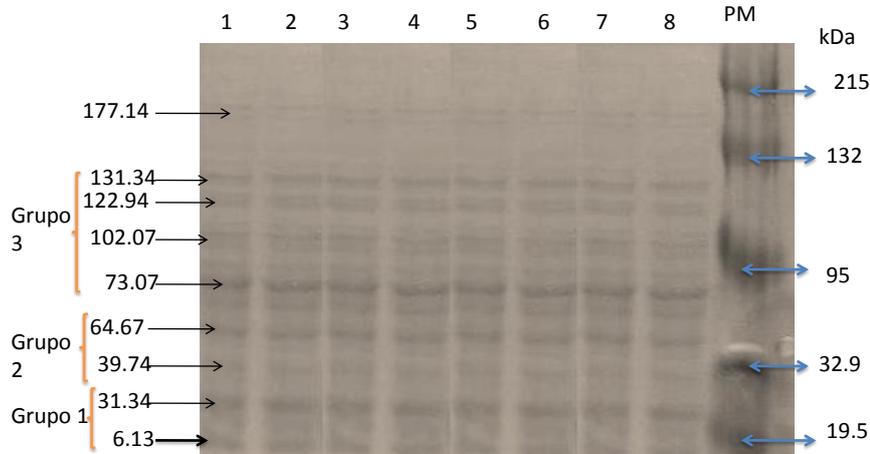


Figura 12.- SDS-PAGE al 10% Perfil proteínico de las MVs de *B. ovis*, teñida con azul de Coomassie. Carril 1-8 MVs de *Brucella ovis*, en el carril 9 están los marcadores de peso molecular.

En la Figura 12, observamos 9 carriles de los cuales del 1-8 de izquierda a derecha son las microvesículas de *B. ovis*. Las flechas señalan la presencia de bandas proteicas de la Membrana Externa (OMP) de estas MVs. Mientras que en el último carril se corrió los Marcadores de Peso Molecular los cuales están señalados con las flechas del lado derecho del gel. El tiempo de corrimiento fue aproximadamente de 146 min a 80 volts.

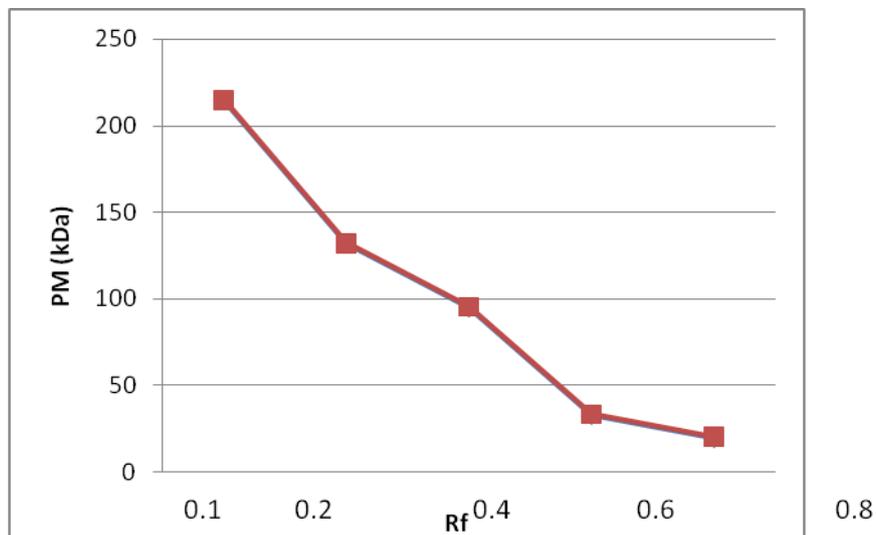
En la Tabla 5 se muestran los marcadores de peso molecular que se utilizaron para la determinación del peso molecular de las proteínas presentes en las microvesículas de *B. ovis*, así también se calcularon los Rf de estos marcadores como de las bandas observadas, esto se realizó dividiendo la distancia (mm) recorrida por la banda en cuestión, entre la distancia recorrida por el colorante azul de Coomassie.

Tabla 5: Marcadores de peso molecular utilizados para la determinación de las proteínas de las MVs de *B.ovis*.

Las muestras fueron corridas en PAGE-SDS al 10%

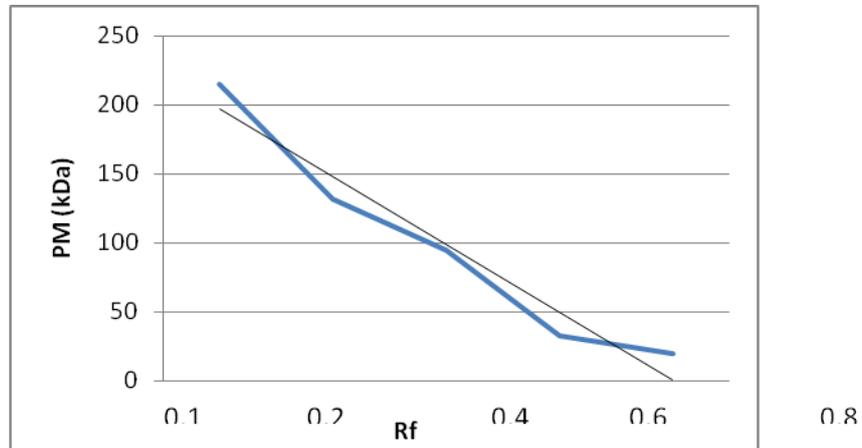
	215	2.33	7,0	0.107
	132	2.12	15,0	0.230
	95	1.97	28,0	0.430
	32.9	1.51	45,0	0.692
	19.5	1.29	54,0	0.830
Proteínas desconocidas				
1	¿?		11	0.169
2	¿?		22	0.338
3	¿?		24	0.369
4	¿?		29	0.446
5	¿?		36	0.553
6	¿?		38	0.584
7	¿?		44	0.676
8	¿?		46	0.707

Al graficar los datos que tenemos en la tabla 3, en este caso los PM de los marcadores moleculares, en relación con sus Rf obtenemos una curva de referencia ver Grafica 1.



Grafica 1. Curva de referencia para la estimación del peso molecular de proteínas mediante SDS-PAGE. Los datos corresponden a la Tabla 3. Nótese que la línea de regresión con los estándares de PM conocido muestra una ligera curvatura.

Para la interpolación de bandas desconocidas, se aplicó una regresión lineal simple y se muestra en la Gráfica 2.



Gráfica 2. Regresión lineal de la curva de referencia.

Los PM estimados para las proteínas desconocidas se interpolaron mediante una regresión lineal y los resultados se muestran en la Tabla 6.

1	177.14
2	131.34
3	122.94
4	102.07
5	73.07
6	64.67
7	39.74
8	31.34
9	6.13

Tabla 6. Determinación del peso molecular de las proteínas desconocidas de las microvesículas de *B.ovis*.

VII. DISCUSIÓN

La infección por *B. ovis* afecta exclusivamente al ganado ovino en el que produce un cuadro denominado: Epididimitis infecciosa ovina o Epididimitis de los carneros. No hay evidencias de contagio a la especie humana, pero produce importantes pérdidas económicas, al disminuir la producción animal. Es por esto la importancia de buscar alternativas para la detección de este agente infeccioso.

La infección por *B. ovis* produce un impacto negativo en todos aquellos países donde la cría del ovino es una actividad económica importante. Esto se debe a una caída en la fertilidad del rebaño, un aumento en el descarte de carneros infectados, acortamiento de la vida reproductiva de los machos, abortos, aumento de la mortalidad perinatal, complicaciones en el manejo y restricciones en el comercio (Moro y col.,1974).

B. ovis presenta una envoltura celular trilaminar constituida por una membrana interna o citoplasmática, a su vez esta separada por una membrana externa, en esta ME se localizan dos grupos de antígenos: el lipopolisacárido rugoso y las proteínas de membrana externa. El extracto HS de *B. ovis* ha demostrado ser protector contra el desafío de *B. ovis* en el ratón (Jiménez de Bagués y col.1994) y en el carnero (Blasco y col., 1993).

La ME de *B. ovis* extraídas del cuerpo celular completo, muestran que contienen dos grupos de PME las cuales se clasifican en mayores y menores esto de acuerdo a su abundancia, éstas se encuentra unidas al LPS-R. En el primer grupo tenemos a las proteínas de 36-38 kDa (Omp2b) o también llamadas grupo 2 que funcionalmente son porinas y tenemos al grupo 3 compuesto por proteínas de 31-34 kDa y de 25-27 kDa, estas en su actualidad las denominan Omp25 y Omp31; ambas se encuentran asociadas fuertemente al péptidoglucano (Cloekaert y col., 1992).

La proporción de las PME varía en las distintas especies, pero en el caso de *B. ovis*, las proteínas de membrana externa del grupo 3 son predominantes. Las PME menores son las proteínas de 10, 16.5, 19 y 89 kDa (89-94 kDa o grupo 1) habiéndose encontrado marcadores específicos de *B. ovis* en las primeras tres proteínas, las cuales en la actualidad llamamos Omp10, Omp16, Omp19, respectivamente. Algunos estudios mostraron que la Omp19 presenta en *B. ovis* una masa molecular aparente mayor que en el resto de las especies.

Considerando lo anterior y analizando nuestros resultados, lo que podemos observar es que las microvesículas de *B. ovis* tienen presencia de las Omp tanto del grupo 2 y del grupo 3 reportado de la ME del cuerpo completo, en otros microorganismos se ha mencionado que gran parte de las proteínas de la ME son arrastradas en el proceso de liberación de las microvesículas al medio circunlante, señalándose incluso la presencia de LPS en los extractos estudiados. En este trabajo, demostramos la liberación de microvesículas por parte de *B. ovis*, resaltándose que no se emplearon antibióticos estimuladores de su producción y que el desarrollo y aislamiento fue hecho en base al crecimiento en el agar, modificándose el desarrollo ya que otros investigadores lo habían realizado en caldo. Las ventajas de la extracción en agar, es que no fue necesario realizar procesos de dializado para eliminar las peptonas del medio de cultivo. Sin embargo, el rendimiento no fue ideal por lo que resulto mínima la producción de MVS y esto condujo a que no se pudiera medir la concentración de proteínas y se tuvo que colocar en el corrimiento en el PAGE-SDS una dilución 1:1 con el buffer de corrida.

De las proteínas identificadas en las MVs de *B. ovis*, se resalta la de 30 kDa dicha proteína se ha reportado que tiene una participación importante en el proceso de protección contra *B. ovis*, este nivel de protección fue identificado a partir de ME de *B. ovis*. La presencia en MVs permite pensar que las microvesículas podrían funcionar como un inmunógeno, ya que el comportamiento micelar de estas vesículas las convierten en excelentes presentadores de antígenos, lo cual podría aprovecharse, si se desarrolla eficientemente un proceso de producción y extracción de las mismas. Ya la literatura da constancia de la posibilidad de emplear microvesículas como vacunas, algunas de ellas han sido combinadas con adyuvantes de nueva generación, que entre sus cualidades permiten una liberación controlada del antígeno y una correcta exposición ante el sistema inmune. Se sabe que las proteínas de membrana externa inmersas en adyuvantes oleosos, despiertan una adecuada respuesta inmune humoral y celular, siendo esto aprovechado sobre todo cuando estamos hablando de un microorganismo como *Brucella* el cual es intracelular.

Se han llevado a cabo recientes investigaciones a cerca de *B. ovis*, esto para encontrar la manera de poder erradicar esta enfermedad la cual causa pérdidas económicas. Por lo que para desarrollar nuevas vacunas contra la brucelosis se busca un inmunógeno ideal el cual produzca una protección definida y no cause efectos adversos. Las microvesículas de *B. ovis* pueden ser de gran importancia, en la búsqueda de una vacuna ideal, la cual no requiera la inoculación del microorganismo completo.

VIII. CONCLUSIONES

- Las microvesículas de *Brucella ovis* muestran la presencia de proteínas de membrana externa (OMP), identificándose OMP's de los grupos 2 y 3; resaltando la presencia de la proteína de 30 kDa, la cual ha sido señalada como un importante inmunógeno protector.
- Estos son los primeros resultados con respecto al perfil proteico de las microvesículas de *B. ovis*, aunque quedan varias determinaciones por hacer, dentro de las cuales esta el conocer si existe la presencia de LPS-R y otros compuestos como restos de ADN en estas MVs.

- Sería importante el probar si las MVs son capaces de inducir una respuesta inmune humoral y celular que resultará protectora contra la infección de *B. ovis*.

IX. ANEXO

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS

SOLUCIÓN “A”

- Acrilamida30g
- Bisacrilamida0.8g

- H₂O100ml

SOLUCIÓN “B”

- Tris-HCl (8.8)75ml
- SDS 10%4ml
- H₂O21ml

SOLUCIÓN “C”

- ✓ Tris-HCl (6.8)50ml
- ✓ SDS 10%4ml
- ✓ H₂O46ml

2 M tris-HCl (pH 8.8) 100ml

- Tris base 24.2g
- Adicionar 50ml de H₂O desionizada
- Adicionar HCL concentrado y lentamente hasta tener un pH de 8.8
- Aforar a 100ml

1M tris-HCl (pH 6.8) 100ml

- ❖ Tris base 12.1g
- ❖ Adicionar 50ml de H₂O desionizada
- ❖ Ajustar a un pH de 6.8 agregando HCl concentrado
- ❖ Aforar a 100ml

PERSULFATO DE AMONIO

- Persulfato de amonio.... 0.5g
- Agua 5ml

SDS 10%

- SDS5g
- H₂O50ml

BUFFER DE CORRIMIENTO 10X

- Tris30g
- Glicina144g
- SDS10g
- H₂O1 L

SOLUCIÓN TEÑIDORA DE AZUL DE COOMASSIE (100ml)

- ✓ Azul Coomassie0.1g
- ✓ Metanol45ml
- ✓ H₂O45ml
- ✓ Acido acético glacial.....10ml

BUFFER MUESTRA 10ml

- ✓ 1M tris-HCL (pH 6.8)0.6ml
- ✓ Glicerol 50%5ml
- ✓ SDS 10 %2ml
- ✓ 2-merceptoethanol0.5ml
- ✓ Azul de bromofenol 1%1ml
- ✓ H₂O0.9ml

Estable en refrigeración.

SOLUCIÓN DESTEÑIDORA 1L

- Metanol100ml
- Acido acético glacial100ml
- H₂O800ml

Se prepararon cada una de las soluciones anteriores para poder realizar el gel de electroforesis, el cual se preparó a una concentración de 10% de la siguiente manera:

GEL SEPARADOR

Sol. "A"3.3ml
Sol "B"2.5ml
H₂O4.2ml
Persulfato100µl
TEMED5 µl

GEL CONCENTRADOR

H₂O2.5ml
Sol "A"0.67ml
Sol "C"1.0ml
Persulfato40 µl
TEMED5 µl

PREPARACION DE MUESTRA PROBLEMA

Microvesículas de B.ovis..... 100 µl

Buffer muestra..... 100 µl

BIBLIOGRAFIA

AFZAL, M., R.P. TENDERDY, P.G. SQUIRE, R.P. ELLIS. 1984a. Characterization of *Brucella ovis* lipopolysaccharide and its use for diagnosis of ram epididymitis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **20**: 1159-1164.

AFZAL, M., R.P. TENDERDY, R.P. ELLIS., C.V. KIMBERLING., C.J. MORRIS. 1984b. Protection of rams against epididymitis by a *Brucella ovis* vitamin E adjuvant vaccine. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **7**: 293-304.

AFZAL, M. and C.V. KIMBERLING. 1986. How to control *Brucella ovis*-induced epididymitis in rams? *Vet. Med.* **81**: 364-370.

ALTON, G.G. and S.S. ELBERG. 1967. Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. *Vet. Bull.* **37**: 793-800.

ALTON, G.G., L.M. JONES, R.D. ANGUS, J.M. VERGER. 1988. *Brucella ovis*. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA. París.

BLASCO, J.M., C.M. MARÍN., M. BARBERÁN., I. MORIYÓN., R. DÍAZ. 1987. Immunization with *Brucella melitensis* Rev. 1 against *Brucella ovis* infection of rams. *Vet. Microbiol.* **14**: 381-392.

BLASCO, J.M. 1990. Animal Brucellosis. CRC Press. Boca Ratón.

BLASCO, J.M., C. GAMAZO., A.J. WINTER, M. P. JIMÉNEZ DE BAGUÉS, C. MARÍN., M. BARBERÁN, MORIYÓN I., ALONSO-URMENETA B., DÍAZ R. 1993a. Evaluation of whole cell and subcellular vaccines against *Brucella ovis* in rams. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **37**: 257-270.

BLASCO, J.M., C. MARÍN., M.P. JIMÉNEZ DE BAGUÉS., M. BARBERÁN. 1993b. Efficacy of *Brucella suis* strain 2 vaccine against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine* **11**: 1291-1294.

BOSSERAY, N. 1987. *Brucella* infection and immunity in placenta. II. Forum de Microbiologie. *Brucella* and brucellosis an update. *Ann. inst. Pasteur/ Microbiol.* 138: 110-113.

BOWDEN, R.A., A. CLOECKAERT, M.S. ZYGMUNT., S. BERNARD., G. DUBRAY. 1995a. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect. Immun.* **63:** **3945-3956.**

BOWDEN, R.A., A. CLOECKAERT, M.S. ZYGMUNT., S. BERNARD., G. DUBRAY. 1995b. Outer membrane protein and rough lipopolysaccharide specific monoclonal antibodies protect mice against *Brucella ovis*. *J. Med. Microbiol.* **43:** **344-347.**

BOWDEN, R.A., J.M. VERGER, M. GRAYON, A. CLOECKAERT. 1997. Rapid identification of rough *Brucella* isolates by a latex coagglutination assay with the 25-kilodalton outer membrane protein and rough-lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **4:** **611-614.**

BUDDLE, M.B. 1983. Studies on *Brucella ovis*, a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *J. Hyg.* **54:** **351-364.**

BULGIN, M.S and B.C. ANDERSON. 1983. Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. *JAVMA* **182:** **372-374.**

BULGIN, M.S. 1990a. *Brucella ovis* excretion in semen of seronegative, clinically normal breeding rams. *JAVMA* **196:** **313-315.**

BULGIN, M.S. 1990b. *Brucella ovis* epizootic in virgin lambs. *JAVMA* **196:** **1120-1128.**

BULGIN, M.S. 1990c. Epididymitis in rams and lambs. *Vet. Clin. North Am, Food Anim. Pract.* **6:** **683-690.**

CORBEL, M.J. and W.J. BRINGLEY-MORGAN. 1984. Genus *Brucella*. Meyer and Shaw. Bergey's manual of systematic bacteriology. The Williams and Wilkins Co. Baltimore. Vol. 1.

CLOECKAERT, A., M.S. ZYGMUNT, P. DE WERGIFOSSE., G. DUBRAY., J.N. LIMET. 1992. Demonstration of peptidoglycan-associated *Brucella* outer-membrane proteins by use of monoclonal antibodies. *J. Gen. Microbiol.* **138:** **1543-1550.**

CLOECKAERT, A., J.M. VERGER., M. GRAYON., M.S. ZYGMUNT, O. GRÉPINET. 1996a. Nucleotide sequence and expression of the gene encoding the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella ovis* : evidence for antigenic shift, compared with other *Brucella* species, due to a deletion in the gene. *Infect. Immun.* **64:** **2047-2055.**

CLOECKAERT, A., J.M. VERGER, M. GRAYON, M.S. ZYGMUNT, N. VIZCAÍNO. 1996b. Minireview: Molecular and immunological characterization of the major membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiol. Lett.* 145: 1-8.

DÍAZ, R. et N. BOSSERAY. 1973. Identification d'un composé antigénique spécifique de la phase rugueuse des *Brucella*. *Ann. Rech. Vétér.* 4: 283-292.

DUBRAY, G. ET M. PLOMMET. 1976. Structure et constituants des *Brucella*: propriétés biologiques et caractérisation des fractions. *Dev. Biol. Standard.* 31: 68-91.

ESTEIN, S.M., R.A. BOWDEN, A. CLOECKAERT., M.S. ZYGMUNT, G. DUBRAY. 1996. Identificación de epitopes protectores en *Brucella ovis* por medio de anticuerpos monoclonales. 11° Jornadas de los Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico, Azul, Buenos Aires, Argentina. pp. 49.

FENSTERBANK, R. 1982. Le diagnostic allergique de la brucellose. *Bull. Acad. Vét.* Fr. 55: 47-52.

FENSTERBANK, R. 1986. Brucelosis bovina, ovina y caprina: diagnóstico, control, vacunación. *Rev. Sci. tech. Off. Epiz.* 5: 619-633.

GAMAZO, C., A.J. WINTER, I. MORIYÓN, J.I. RIEZU-BOJ, J.M. BLASCO., R. DÍAZ. 1989. Comparative analyses 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.

GARCÍA CARRILLO, C., A. CUBA CAPARÓ, D.M. MYERS. 1974. Susceptibilidad comparada de cabritos y carneros a la infección causada por *Brucella ovis*. Estudios serológicos, bacteriológicos y patológicos. *Gac. Vet.* 36: 355-374.

GOLDBAUM, F.A., J. LEONI, J.C. WALLACH., C. FOSSATI. 1993. Characterization of an 18-kilodalton *Brucella* cytoplasmic protein which appears to be a serological marker of active infection of both human and bovine brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2141-2145.

GÓMEZ- MIGUEL, M.J. and I. MORIYÓN. 1986. Demonstration of a peptidoglycan-linked lipoprotein and characterization of its trypsin fragment in the outer membrane of *Brucella spp.* *Infect. Immun.* 53: 678-684.

GÓMEZ-MIGUEL, M.J., I. MORIYÓN., J. LÓPEZ. 1987. *Brucella* outer membrane lipoprotein shares antigenic determinants with *Escherichia coli* Braun lipoprotein and its exposed on the cell surface. *Infect. Immun.* 55: 258-262.

HOMSE, A.C., A.P. CASARO, C.M. CAMPERO. 1995. Infertilidad en ovejas por *Brucella ovis*. *Vet. Arg.* **12**: 243-249.

JIMÉNEZ DE BAGUÉS, M.P., C.M. MARÍN, M. BARBERÁN, J.M. BLASCO. 1993. Evaluation of vaccines and of antigen therapy in a mouse model for *Brucella ovis*. *Vaccine* **11**: 61-63.

JIMÉNEZ DE BAGUÉS, M.P., P.H. ELZER, J.M. BLASCO, C.M. MARÍN, C. GAMAZO, A.J. WINTER. 1994a. Protective Immunity to *Brucella ovis* in BALB/c mice following recovery from primary infection or immunization with subcellular vaccines. *Infect. Immun.* **62**: 632-638.

JIMÉNEZ DE BAGUÉS, M.P., P.H. ELZER, S.M. JONES, J.M. BLASCO, F.M. ENRIGHT, G.G. SCHURIG, A.J. WINTER. 1994b. Vaccination with *Brucella abortus* rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, and *Brucella ovis*. *Infect. Immun.* **62**: 4990-4996.

JIMÉNEZ DE BAGUÉS, M.P., M. BARBERÁN., C.M. MARÍN., J.M. BLASCO. 1995. The *Brucella abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine* **13**: 301-304.

KITTELBERGER, R., M.F. HANSEN., F. HIL BINK, G.W. DE LISLE, A. CLOECKAERT. 1995b. Selective extraction of bacterial macromolecules by temperature-induced phase separation in Triton X-114 solution. *J. Microbiol. Meth.* **24**: 81-92.

KITTELBERGER, R., B.J. LAYBOURN, M.P. REICHEL, G.P. ROSS, G.W. DE LISLE, M.A. JOYCE. 1996. Attempted definition by immunoblotting of the causes of reactivity in suspected false-positive sera in the *Brucella ovis* complement fixation test. *N. Z. Vet. J.* **44**: 170-174.

KITTELBERGER, R., D.S. DIACK., G.P. ROSS., M.P. REICHEL. 1997. An improved immunoblotting technique for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infections. *N. Z. Vet. J.* **45**: 75-77.

KITTELBERGER, R., D.S. DIACK, N. VIZCAÍNO, MS. ZYGMUNT, A. CLOECKAERT. 1998. Characterization of an immuno-dominant antigen in *Brucella ovis* and evaluation of its use in an enzyme linked immunosorbent assay. *Vet. Microbiol.* **59**: 2-3.

MARICRUZ, REYES, A. (2002) Determinación de vesículas de Actinobacillus seminis y Brucella ovis mediante microscopía electrónica de barrido y de -transmisión. Tesis para obtener la licenciatura de Q.F.B. UNAM.

MARÍN, C.M., M. BARBERÁN., M.P. JIMÉNEZ DE BAGUÉS., J.M. BLASCO. 1989a. Efficacy of long acting oxytetracycline alone or in combination with streptomycin for treatment of *Brucella ovis* infection of rams. *Am. J. Vet. Res.* **50**: 560-563.

MARÍN, C.M., M.P. JIMÉNEZ DE BAGUÉS, J.M. BLASCO, C. GAMAZO, I. MORIYÓN., R. DÍAZ. 1989b. Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *Vet. Rec.* **125**: 504-508.

MARÍN, C.M., M. BARBERÁN, M.P. JIMÉNEZ DE BAGUÉS., J.M. BLASCO. 1990. Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of Rev 1. vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. *Res. Vet. Sci.* **48**: 209-215.

MERCHANT, I.A. y R.A. PACKER. 1975. Géneros *Brucella* y *Bordetella*. Bacteriología y virología veterinaria. 3^{er} ed. Acribia. Zaragoza.

MEYER, M.E. 1982. *Brucella ovis*, in Handbach der bakteriellen infektionen bei tiernen. Blobel and Scheleba. Jena. Germany.

MORENO, E., L.M. JONES, D.T. BERMAN. 1984. Immunochemical characterization of rough *Brucella* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* **43**: 779-782.

MORENO, E., E. STACKEBRANDT, M. DORSCH., J. WOLTERS, M. BUSCH., H. MAYER. 1990. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 3569-3576.

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

RIEZU BOJ, J.I., I. MORIYÓN, J.M. BLASCO, C. GAMAZO, R. DÍAZ. 1990. Antibody response to *Brucella ovis* outer membrane proteins in ovine brucellosis. *Infect. Immun.* **58**: 489-494.

ROBLES, C.A., A. LA TORRACA, M. SANCHOLUZ., F.A. UZAL., E. EVANS. 1993. Brucellosis ovina en majadas Merino de la provincia de Chubut, Argentina. *Vet. Arg.* **10**: 458-461.

ROSSETTI, O.L., A.I. ARESE., M.L. BOSCHIROLI., S.L. CRAVERO. 1996. Cloning of *Brucella abortus* gene and characterization of expressed 26 kDa periplasmic protein : potential use for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 165-169.

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

TEIXEIRA-GOMES, A.P., A. CLOECKAERT, G. BÉZARD., R.A. BOWDEN., G. DUBRAY., M.S. ZYGMUNT. 1997. Identification and characterization of *Brucella ovis* immunogenic proteins using two-dimensional electrophoresis and immunoblotting. *Electrophoresis* **18**: 1491-1497.

VELASCO, J., R. DÍAZ, M.J. GRILLÓ, M. BARBERÁN, C. MARÍN, J.M. BLASCO, I. MORIYÓN. 1997. Antibody and delayed-hypersensitivity responses to *Ochrobactrum anthropi* cytosolic and outer membrane antigens in infections by smooth and rough *Brucella spp.* *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **4**: 279-284.

VERSTREATE, D.R., M.T. CREASY, N.T. CAVENEY, C.L. BALDWIN., M.W. BLAB., A.J. WINTER. 1982. Outer membrane proteins of *Brucella abortus* : Isolation and characterization. *Infect. Immun.* **35**: 979-989.

VIGLIOCCO, A.M., P.S. SILVA PAULO, J. MESTRE., G.C. BRIONES, G. DRAGHI, M. TOSSI., K. NIELSEN. 1997. Development and validation of an indirect enzyme linked immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. *Vet. Microbiol.* **54**: 357-368.

WEST, D.M. 1978. Epiphysitis in rams following vaccination against *Brucella ovis* infection. *N. Z. Vet. J.* **26**: 133-134.

ZUNDEL E., J.M. VERGER, M. GRAYON, R. MICHEL. 1992. Conjunctival vaccination of pregnant ewes and goats with *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine: safety and serological responses. *Ann. Rech. Vét.* **23**: 177-188.

ZYGMUNT, M.S., S. BAUCHERON, N. VIZCAÍNO, R. A. BOWDEN, S.M. ESTEIN., C. GONZÁLEZ, A CLOECKAERT. 1997. Purification and evaluation of recombinant BP26 protein for serological diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. 50th Brucellosis Research Conference Special Anniversary Meeting Congress Hotel, Chicago, Illinois.