



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

“PERFIL SEROLÓGICO FRENTE A PROTEÍNAS DE
MEMBRANA EXTERNA DE *Brucella abortus* EN
BOVINOS VACUNADOS CON LA CEPA RB51”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

AMÉRICA RÍOS TEJAS

ASESOR:

DR. JOSÉ FRANCISCO MORALES ÁLVAREZ

COASESOR:

DR. EFREN DÍAZ APARICIO

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO. 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis esta dedicada a los seres más importantes en mi vida: mi mamá por que sin su ayuda, amor y estímulo habría sido muy difícil concretar mi carrera, a mi esposo por su apoyo y comprensión y a ellos que mas que mis mascotas fueron y son miembros de mi familia.

PREFACIO

La inquietud de realizar esta tesis surgió de la pregunta que se hace acerca del resultado de la vacunación con RB51 en ganado vacuno ya que son insuficientes las investigaciones sobre la respuesta inmunológica de la vacuna RB51 a PME de *Brucella abortus*.

Agradezco a mi mamá por su ayuda y estímulo incondicional que siempre me ha mostrado.

A mi esposo por que con amor y paciencia me ha acompañado en la realización de esta.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y profesorado que la integra por que contribuyeron a mi formación profesional.

Al Dr. José Francisco Morales Alvarez por su amistad y apoyo en la realización de esta tesis.

Al Dr. Efrén Díaz Aparicio por su colaboración y paciencia al apoyarme en la redacción de esta.

Al personal del Inifap en Palo alto, gracias por su amistad.

A mis colegas y amigos por que a su lado fue más placentera e inolvidable mi estancia en la Facultad.

Por último y más importante, a Dios que me dio un alma y un lugar en el cual habitar.

ÍNDICE	Pág.
Resumen.....	1
I. Introducción	
1.1 Generalidades.....	3
1.2 Historia.....	4
1.3 Características del agente.....	7
1.4 Supervivencia de <i>Brucella abortus</i> en diversos medio.....	9
1.5 Estructura microscópica y composición química del género <i>Brucella</i>	10
1.6 Proteínas de membrana externa.....	12
1.7 Patogénia	14
1.8 Vacunas.....	16
1.9 Biopeligrosidad.....	19
II. Justificación.....	20
III. Objetivos.....	21
IV. Materiales y métodos	
4.1 Muestras serológicas para determinar la presencia de anticuerpos contra proteínas de membrana externa de <i>Brucella sp</i>	22
4.2 Antígenos a base de PME de <i>Brucella sp</i>	22
4.3 Cultivo e inactivación de <i>Brucella sp</i>	22
4.4 Fragmentación por medio de ultracongelación y sonicación de las diferentes cepas de <i>Brucella abortus</i>	23

4.5	Extracción de proteínas de membrana de <i>Brucella</i> sp. por medio de ultracentrifugación.....	23
4.6	ELISA–indirecta para la determinación de anticuerpos contra PME de <i>Brucella</i> sp.....	24
4.7	Montaje del gel en el equipo de electroforesis y la separación electroforética.....	25
4.8	Inmunotransferencia.....	26
V.	Resultados	
5.1	Resultados de las pruebas bacteriológicas realizadas a las cepas de <i>Brucella abortus</i> aislada de leche, RB51 y de campo.....	28
5.2	Estandarización de la técnica de ELISA-indirecta	28
5.3	Determinación de anticuerpos contra las PME de las cepas de <i>Brucella abortus</i> en sueros de bovinos vacunadas.....	28
5.4	Separación y visualización electroforética de PME.....	29
5.5	Reconocimiento por inmunoblot de las PME de cepa Aislada a partir de leche, cepa de campo y cepa vacunal RB51.....	29
5.6	Resultados de animales no vacunados.....	33
VI.	Discusión.....	35
VII.	Conclusiones.....	38
	Bibliografía.....	39

RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad infecciosa, que afecta tanto al hombre como a las diferentes especies animales. Se calcula que las altas prevalencias en el ganado lechero ocasionaron pérdidas de aproximadamente 600 millones de dólares anuales en América latina. Este trabajo tiene como objetivo evaluar la respuesta serológica de las proteínas de membrana externa de *Brucella abortus*; para cumplir con este objetivo se evaluaron sueros obtenidos de 14 bovinos, provenientes de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo (prevalencia de 39.2%), muestreados a los 120, 150, 180 y 270 días post vacunación; a partir de vacas que habían sido vacunadas por vía subcutánea con 2.0 ml de la cepa RB51, a una concentración 3×10^9 UFC/ml (Brucel RB51 Plus del Laboratorio PRONABIVE®), La determinación de anticuerpos contra las PME se realizó mediante la técnica de ELISA-Indirecta. Seleccionando los sueros con mayores cantidades de anticuerpos y posteriormente se realizó la prueba de inmunotransferencia, utilizando antígeno de una cepa de campo, una cepa vacunal y por último una cepa aislada de leche. En esta prueba observamos un reconocimiento para las proteínas de la cepa aislada de leche con un peso de 71.96 kDa obtenida a los 120 días post vacunación que coincide con otra del mismo peso, pero obtenida de la cepa vacunal RB51 en los muestreos a los 150, 180 y 210 días post vacunación, y la 33.03 kDa concuerda con otra de la cepa de campo a los 210 días post vacunación, en el caso de la cepa vacunal RB51 existen dos bandas principales cuyo peso molecular fue de 71.96 y 18.43 kDa respectivamente. En lo que respecta a la cepa de campo los pesos principales reconocidos fueron 108.46, 96.3 y 37.89 kDa. Los resultados del estudio, indican que existe un reconocimiento cruzado para las diferentes cepas, lo que indica la similitud en el perfil de

PME expresadas por *Brucella abortus* de diferente origen. En el caso de la cepa vacunal RB51 hubo un reconocimiento para la PME de 47.63 kDa y 18.43 kDa que no expresan las otras cepas, por esta razón la expresión de esta proteína podría ser una característica diferencial entre cepas vacunal y cepas de campo, además de que se demostró la capacidad inmunológica de las PME de *Brucella abortus* de diferente origen, lo que podría tener implicaciones positivas para el diagnóstico y la elaboración de nuevas vacunas.

Palabras clave: bovino, *Brucella abortus* RB51, proteínas de membrana externa, cepa de campo, cepa aislada a partir de leche y cepa vacunal RB51.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades.

La brucelosis es una enfermedad infecto contagiosa causada por bacterias del género *Brucella*, que se agrupa en ocho especies, y se pueden diferenciar entre sí por su virulencia. Se sabe que *Brucella abortus* (nueve biotipos) infecta preferentemente al ganado bovino y se caracteriza por producir abortos en el último tercio de gestación, reduce el porcentaje de fertilidad, nacimiento de crías débiles, en los machos produce orquitis y epididimitis con eliminación de la bacteria a través del semen, mientras que *Brucella melitensis* (tres biotipos) infecta al ganado caprino y ovino, *Brucella ovis* al ovino, *Brucella suis* (cinco biotipos) al porcino, *Brucella neotomae* a la rata del desierto, *Brucella canis* a perros (Blasco, 1994), y recientemente *Brucella pinipedae* y *Brucella cetacidae* a mamíferos marinos. El contagio al hombre suele ser accidental. Las más virulentas para el hombre son *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella abortus*, aparentemente *Brucella ovis*, no así el caso de *Brucella neotomae* y se desconoce si *Brucella pinipedae* y *Brucella cetacidae* pudiera infectarlo (Murray, 2003). Existen publicaciones que describen la infección por *Brucella canis* en el hombre (Morisset, 1969; Swenson, 1972; Blankenship, 1975); Sin embargo es escasa la información referente al verdadero significado de la enfermedad desde el punto de vista de salud pública. Los estudios serológicos practicados en las muestras de 203 pacientes seleccionados al azar, en el hospital General de México, revelaron un 13.3% de reactores positivos, con títulos de aglutinación superiores a 1:200; con todo, hasta la fecha en México no se ha logrado aislar *Brucella canis* en el hombre (Flores, 1975).

Actualmente se reconoce a la brucelosis como una enfermedad de distribución mundial, y se considera enzoótica en México (Güemes, 2001) Además es la que mayores pérdidas económicas ha producido en la

ganadería causando hasta el 65% de los abortos en vacas, cerdos, ovejas y cabras (Klevezas, 1999; Leal, 2003).

1.2 Historia.

La Brucelosis es una enfermedad que se conoce desde hace aproximadamente 2400 años en la época de Hipócrates y las primeras descripciones de la enfermedad fueron realizadas por Cleghorn en 1751; posteriormente durante la guerra de Crimea en 1854-1856 se observaron numerosos casos de fiebres prolongadas que no podían compararse con otras enfermedades conocidas, por lo que se sospechó se trataba de una enfermedad nueva. Esta sospecha se confirmó con la aparición de casos cada vez más numerosos en los países mediterráneos y posteriormente en la isla de Malta. (Ruiz Castañeda, 1971).

Años después, Marston en 1859 realizó estudios referentes a los aspectos clínicos y patológicos de la fiebre del mediterráneo y hasta 1863 hizo una descripción detallada de la enfermedad tal y como ocurría en Malta. En el año de 1886, Bruce aisló por primera vez el agente etiológico de la brucelosis, a partir del bazo de un soldado que murió de la infección, llamándolo *Micrococcus melitensis* además pudo reproducir la enfermedad en monos a través de infecciones experimentales. (Ruiz Castañeda, 1971).

En 1897, Huges presentó una de las descripciones más completas de la enfermedad y en ese mismo año Wright y Semple (Wright, 1887) desarrollaron un método diagnóstico basado en la propiedad aglutinante del suero sanguíneo de los enfermos. (Ruiz Castañeda, 1971).

Simultáneamente, con las primeras observaciones de brucelosis humana, Bang en Dinamarca, llevó a cabo estudios sobre la infección bovina, presentando su notable trabajo sobre etiología del aborto

contagioso (Bang 1897). El agente de esta infección fue llamado Bacilo de "Bang" y con este nombre guardó su incógnito para la patología humana durante poco más de 20 años. (Ruiz Castañeda, 1971).

En 1904, se nombró una comisión en Inglaterra, la cual presidió el mismo Bruce, para investigar la forma de transmisión al humano y al año siguiente, 20 años después el primer aislamiento *del Micrococcus melitensis*, se determinó la forma de contagio para el humano. Esto gracias a los trabajos de Zammit quien determinó anticuerpos aglutinantes en el suero de cabra y de Horrocks quien aisló el germen causal de la fiebre del Mediterráneo a partir de la leche y orina de cabras. (Zammit 1905; Ruiz Castañeda, 1971).

El tercer miembro del grupo de las brucelas fue aislado por Traum en 1914 cultivando órganos de fetos abortados por cerdas, descubrió que se trataba de un germen más relacionado al bacilo de Bang que al de *M. melitensis*. La importancia del nuevo germen en la economía ganadera fue reconocida, desde luego, pero no fue sino hasta 1924, cuando Keefer demostró el primer caso de brucelosis humana producido por un germen diferente al *M. melitensis*. (Traum 1914; Ruiz Castañeda, 1971)

En 1918, Evans demostró la relación taxonómica entre *B. abortus* y *M. melitensis* e identificó a la primera Brucela de origen humano en los EUA. (Evans, 1918; Evans, 1947; Ruiz Castañeda, 1971).

Posteriormente Malvin realzó la importancia de la brucelosis transmitida por la leche de vacas infectadas al referir la alta incidencia de aislamientos del agente causal a partir de la leche (11%) de la extensa distribución de la enfermedad al aislarse del 19% de los establos que distribuyen el producto. (Ruiz Castañeda, 1971).

Actualmente se considera a la brucelosis como una enfermedad de distribución mundial. En algunos países los programas de control y

erradicación que se han ido desarrollando, han permitido su eliminación total como es el caso de Inglaterra, Noruega, Suecia, Dinamarca y Finlandia; o bien en otros países se ha logrado reducir considerablemente su incidencia, como lo es en Japón, Nueva Zelanda, Australia, Alemania y Estados Unidos. (Suàrez 2001)

En América Latina fue hasta la segunda mitad del siglo XX cuando se extendió por todo el continente (Blasco, 1994); Las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad en ganado lechero se calcula que son de aproximadamente 600 millones de dólares anuales. (Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca, 2010).

En México ha sido reportada en casi todos los estados, sin embargo la prevalencia de la enfermedad es más alta en ganado lechero, en sistemas de manejo intensivos, que en ganado de carne bajo crianza en sistemas semi o extensivos, donde las características ecológicas permiten altos índices de agostaderos y propician una baja densidad en la población, siendo por lo tanto, las zonas relacionadas con los centros de producción lechera las que presentan tasas de infección bovina más altas. (Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca, 2010).

En el estado de Yucatán, el Comité de Fomento y Protección Pecuaria, reportó en 1998 una seroprevalencia en bovinos de 1.54% utilizando la prueba de rosa de bengala y rivanol. En la actualidad debido a la campaña de erradicación que realiza las autoridades sanitarias la seroprevalencia es cada vez más baja. (Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca, 2010).

México se encuentra entre los países de América latina con mayor incidencia de brucelosis principalmente en bovinos, ovinos y caprinos. Las pérdidas que ocasiona se calculan en millones de dólares anuales por concepto de eliminación de animales infectados, abortos, infertilidad y

productos contaminados. (Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca, 2010).

En México, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) estimó en 1995, pérdidas en la ganadería bovina de carne de aproximadamente \$16,255,433 y en ganadería lechera, alrededor de \$22,477,752 considerando que las vacas con brucelosis reducen su producción láctea en un 20%. Se estima que la brucelosis produce durante un ciclo productivo una pérdida de 217 litros promedio por vaca, y un índice de fertilidad del 65-70%. Esto arrojó un costo negativo de aproximadamente \$59,994,008 poniendo en manifiesto la importancia sanitaria y económica de la enfermedad en México. (Secretaría de Agricultura Ganadería y Pesca, 2010).

1.3 Características del agente.

Las especies de *Brucella* son Gram negativas, patógenas intracelulares facultativas inmóviles y no esporuladores que se observan al microscopio de luz como bacilos cortos o cocobacilos de 0.5 a 0.7 μm de diámetro y de 0.5 a 1.5 μm de largo. Las colonias aparecen de forma aislada o en grupos. Son aerobios, carboxílicos; positivos a catalasa y ureasa, y no producen ácido a partir de carbohidratos en medios peptónicos convencionales con un pH de entre 6.6 a 7.4. No son productores de indol (Corbel, 1984; Alton, 1988; Koneman, 2001).

Las colonias de *Brucella* spp. en aislamiento primario sobre medios selectivos no suelen ser visibles hasta las 72 horas de incubación, ello facilita la observación de contaminación por hongos y bacterias de crecimiento rápido (Marín y Blasco 1996).

Las colonias de *B. ovis* y de *B. canis* son siempre rugosas, mientras que *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, y *B. neotomae* son lisas. La

identificación a nivel de especie se realiza rutinariamente mediante lisis por bacteriófagos específicos y pruebas bioquímicas sencillas (oxidasa y ureasa). Para la identificación de la biovariedad, se recurre a cuatro pruebas complementarias:

Requerimiento en dióxido de carbono (CO₂)

Producción de sulfuro de Hidrógeno (H₂S).

Sensibilidad a los colorantes (tionina, fucsina básica y safranina).

Aglutinación con sueros monoespecíficos anti-A y anti-M.

Al observar las colonias estas son traslúcidas, convexas, circulares y con bordes delimitados. Por encima de los cuatro días de incubación, las colonias se hacen mayores tomando un color de miel, pero permanecen traslúcidas generalmente. Con iluminación oblicua las colonias lisas presentan un aspecto traslucido mientras que las colonias rugosas son amarillentas y granulosas. Un procedimiento que permite una mejor diferenciación de las colonias lisas de las rugosas en este sistema de iluminación oblicua, consiste en realizar una tinción colonial, inundando las placas con una solución acuosa de cristal violeta y oxalato amónico (Alton *et al*, 1988).

1.4 Supervivencia de *Brucella abortus* en diversos medios.

Brucella spp. son bacterias que poseen una gran capacidad para sobrevivir y persistir en el ambiente bajo condiciones apropiadas, si se compara con muchas otras bacterias patógenas no esporulantes. Bajo condiciones adecuadas de temperatura, humedad y protección contra el sol, las brucelas pueden sobrevivir en ambientes diversos por largos

períodos, aunque no existe evidencia de que los organismos se repliquen significativamente bajo éstas condiciones en el suelo, agua o estiércol. En los restos de animales congelados, las bacterias sobreviven por muchos años. Cuando se desecan en presencia de exceso de proteínas y se protege de la luz solar, puede retener su infectividad por muchos años. (Canning, 1990).

En contraposición, son muy sensibles al calor, así una suspensión diluida de brucelas, se destruye rápidamente al ser sometidas a la pasteurización o al exponerlas a temperaturas de 60°C por 30 minutos (Canning, 1990). Sin embargo, una suspensión densa es más difícil de inactivar y se debe prolongar el tiempo de exposición al calor o someterla a temperaturas más elevadas. *Brucella spp.* es muy sensible a la radiación ionizante y se mueren con rapidez al exponerla a la luz ultravioleta. También son sensibles, a la mayoría de los desinfectantes de uso común a dosis recomendadas. Como sucede con otras bacterias, la susceptibilidad se reduce en presencia de materia orgánica o a bajas temperaturas. El etanol, isopropanol, yodoforos, hipoclorito diluido y los fenoles sustituidos son eficaces para desinfectar la piel expuesta a *Brucella spp.* (Canning, 1990).

1.5 Estructura microscópica y composición química del género *Brucella*.

El género *Brucella spp.* tiene la estructura clásica de las bacterias Gram negativas, vistas al microscopio electrónico de fuera hacia dentro: la envoltura celular formada por la membrana externa, el espacio periplásmico y la membrana citoplasmática que rodea al citoplasma (Dubray, 1977; Moriyón, 1998).

La membrana citoplasmática consta de una bicapa de fosfolípidos y proteínas de diversos tipos, es una estructura muy vulnerable a los cambios osmóticos y del medio ambiente. Entre la membrana citoplásmica y la membrana externa se encuentra el espacio periplásmico que contiene enzimas que degradan agentes nocivos procedentes del medio, proteínas relacionadas con el transporte de nutrientes, varias de las enzimas sobre las que actúan los antibióticos β -lactámicos y como componente estructuralmente más importante, un gel glucopeptídico (mureína o peptidoglicano) responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria (Cloeckaert, 1996; Moriyón, 1998). El peptidoglicano se encuentra fuertemente asociado a la membrana externa a través de moléculas de lipoproteína unidas por ligadura covalente, esto le proporciona una mayor estabilidad. Además existen otras proteínas asociadas en forma no covalente al peptidoglicano. Las proteínas llamadas porinas, funcionan como canales transmembranales, que permiten la difusión de compuestos de cierto peso molecular (Cloeckaert, 1996).

La membrana externa en su región apolar (hidrófoba) tiene un grosor de 4.5 nm y forma una barrera estructural y funcional entre el periplasma y el exterior de la célula (Moreno, 1981).

La membrana externa contiene distribuidos asimétricamente fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS). Es precisamente esta asimetría lo que hace que *Brucella spp.* sea diferente al resto de los Gram negativos típicos por ello es relativamente permeable a agentes hidrófobos como los colorantes, detergentes, sales biliares y es resistente a los péptidos catiónicos bactericidas presentes en lisosomas y fluidos corporales (lisozima, lactoferrinas, defensinas etc., así como a otros policationes bactericidas como la polimixina B (Moreno, 1981; Moriyón, 1998).

La envoltura de *Brucella spp.* contiene, entre otros fosfolípidos, fosfatidil-colina, lo que es poco común en patógenos Gram negativos, y lípidos de ornitina (Moreno, 1981; Moriyón, 1998).

Como en otras bacterias Gram negativas, el LPS consta de una parte Glucolípídica (lípidos A), inserta en la membrana externa y otra polisacáridica dirigida hacia el exterior. Esta última se divide en dos secciones: el núcleo, más interno, y la cadena O. Hay especies de *Brucella* (*B. ovis*, *B. canis*) que de forma natural siempre carecen de cadena O auténtica siendo por lo tanto, especies rugosas y otras que característicamente la poseen (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotoma*) siendo por lo tanto especies lisas, aunque pueden perderla accidentalmente por mutación dando origen a mutantes rugosos o R. (Moriyón, 1998).

Las brucelas habitualmente patógenas para el hombre (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) poseen lipopolisacárido en fase lisa (LPS-S) y éste es marcadamente inmunodominante en la respuesta serológica. Por esta razón, la mayoría de las pruebas serológicas detectan anticuerpos frente al LPS-S (Moriyón, 1998).

El lípidos A está formado por un disacárido de diaminoglucosa sustituido con β -hidroxiácidos y otros ácidos grasos de cadena larga. A esta composición diferente se debe el que algunas de las actividades características de los LPS relacionadas con la endotoxicidad, sean diferentes en *Brucella*. Como antígeno, el lípidos A no parece tener relevancia diagnóstica (Moriyón, 1998).

Del núcleo del LPS, si bien se sabe que contienen 2-ceto, 3-deoxioctulosonato (KDO), glucosa, galactosa y quinovosamina, y que carece de heptosa, aunque de las dos últimas se desconoce el orden y el número exacto de unidades (Moriyón, 1998).

La cadena O (polisacárido O) contiene los epítopes relevantes en el diagnóstico serológico realizado con las pruebas que detectan anticuerpos frente al LPS-S. Este polisacárido está formado sólo por un tipo de azúcar, la N-formil-perosamina sin ramificaciones (Moriyón, 1998).

Además de la cadena O del LPS, las brucelas en fase S contienen un segundo polisacárido habitualmente llamado hapteno nativo. Salvo en la unión al núcleo del LPS, el hapteno nativo es químicamente idéntico a la cadena O (Cloekaert, 1995;Moriyón, 1998).

1.6 Proteínas de la membrana externa (PME).

Las PME son de gran interés porque las han relacionado con la protección. Como en otras bacterias Gram negativas, la membrana externa de *B. abortus* contiene varias proteínas cuantitativamente mayoritarias en las condiciones habituales de cultivo (Moriyón, 1998). Sus características se resumen a continuación:

Grupo 1. De peso molecular entre 88 - 94 KDa cuya concentración es menor a la de los otros grupos y posiblemente este relacionada con ciertas funciones de la biosíntesis de la propia envoltura (Moriyón, 1998).

Grupo 2. De peso molecular entre 36 -38 KDa, son equivalentes a las porinas de otros Gram negativos, formando un estado nativo agrupaciones triméricas por las que penetran ciertos solutos. Dos genes, *omp2a* y *omp2b*, codifican estas porinas, pero sólo el segundo parece expresarse in vitro (Ficht, 1990; Cloekaert, 1995; Ficht, 1996; Moriyón, 1998).

Grupo 3. De peso molecular entre 25-31 KDa y codificadas en los genes *omp2* (único expresado en brucela) y *omp31*. Se han descrito interacciones muy fuertes con el LPS, pero su papel es desconocido (Ficht, 1990; Cloekaert, 1995; Ficht, 1996; Moriyón, 1998).

En la actualidad como resultado de la clonación y secuenciación de los genes que codifican para estas PMEs, se les ha ido asignando otra nomenclatura: *omp25*, *omp31* y *omp2b*. Otras *omps* han sido identificadas por medio de anticuerpos monoclonales, por ser menos abundantes, se les denomina proteínas menores y presentan masas moleculares de 10, 16.5, 19 y 89 kDa. Con base en estudios genéticos y de su secuencia de aminoácidos, las de 10, 16.5 y 19 kDa, se han identificado como lipoproteínas asociadas al peptidoglicano presentes en bacterias Gram negativas. Aparentemente existen proteínas homólogas a las *omp10* y *omp19* en *Ochrobactrum anthropi* y otras bacterias relacionadas genéticamente a *Brucella*. La *omp1* de 89 kDa se encuentra expuesta en la superficie de la célula. Finalmente, se ha puesto de manifiesto la existencia de acuaporinas en la membrana externa, que son proteínas transmembranales con canales para agua y que pertenecen a la familia de las proteínas intrínsecas mayores (Dubray, 1977; Verstrete 1982; Douglas, 1984; Ficht, 1990; Cloeckert, 1995; Ficht, 1996; Moriyón, 1998;).

Las *omp* mayores o principales se encuentran expuestas en la superficie de la membrana externa, sin embargo, estarían menos accesibles en las cepas lisas que en las rugosas, debido al impedimento estérico que causan las largas y abundantes cadenas O del LPS en las cepas lisas (Dubray, 1977; Verstrete, 1982; Moriyón, 1998;).

Otras proteínas han sido descritas, como la periplásmica (Dubray, 1977) la cual tiene un componente denominado A2, que es una glicoproteína resistente al calor, empleada para el diagnóstico en los bovinos; las de 16 a 18 kDa usadas como antígenos en reacciones intradérmicas; la proteína citoplásmica de 18 kDa, con secuencia descrita (Verstrete, 1982; Ficht, 1990; Moriyón, 1998).

Numerosas proteínas de membrana externa, interna, citoplásmica y periplásmica han sido caracterizadas. Algunas son reconocidas por el sistema inmune, durante la infección y sólo se han reportado en *Brucella*, por lo que sería de gran utilidad estudiarlas en futuras pruebas diagnósticas para ser consideradas en las nuevas vacunas (Verstrete, 1982; Ficht, 1990; Moriyón, 1998).

1.7 Patogenia.

La bacteria ingresa al organismo principalmente por la vía oral, aunque también puede hacerlo por la vía conjuntival, por inhalación, a través de heridas e incluso en el semen, la forma congénita de la enfermedad de igual forma es posible. La bacteria es fácilmente fagocitada por los macrófagos pero resiste la destrucción celular posterior, por lo tanto permanece a salvo de los mecanismos de defensa por largos periodos, pudiéndose multiplicar dentro del fagocito por ser un parásito que puede vivir dentro y fuera de las células (Nicoletti, 1999; Díaz, 2001; Koneman, 2001).

Poco después de haber entrado en el organismo por cualquier vía, los microorganismos son fagocitados por macrófagos en cuyo interior sobreviven, se multiplican y son transportados a los linfonodos regionales, ahí siguen multiplicándose, posteriormente tras su diseminación hematogena, se localizan en los macrófagos y en el tracto reproductor cuando la hembra esta preñada (Nicoletti, 1999; Díaz, 2001; Koneman, 2001).

La inducción del aborto se da por la acción de la endotoxina y por la multiplicación abundante del microorganismo en los cotiledones placentarios, corion y líquidos fetales, su multiplicación es favorecida por la presencia de eritritol, el cual es un polisacárido que estimula el crecimiento de las brucelas. En consecuencia las bacterias tienden a

localizarse abundantemente en los tejidos que lo producen, originan lesiones en la pared del útero provocando endometritis ulcerosa en los espacios intercotiledonarios y la destrucción de las vellosidades causando la muerte y expulsión del feto (Enright, 1990; Díaz, 2004).

Si el animal no esta gestante, la localización usual es la ubre, donde se producen mastitis intersticial y afecta los linfonodos adyacentes. También se pueden localizar en hígado, pulmón, linfonodo y bazo donde se producen focos granulomatosos. Las vacas quedan infectadas de por vida. La bacteria permanece a salvo de los mecanismos de defensa por largos periodos pudiéndose multiplicar dentro del fagocito, esta relación huésped- parásito es muy compleja y debido a esto el periodo de incubación es variable y depende de la fase de gestación, número y virulencia de las bacterias, la edad de los animales y vacunaciones previas (Enright, 1990; Price, 1990; Díaz, 2001).

1.8 Vacunas.

Para inmunizar el ganado bovino contra brucelosis se empleaba tradicionalmente la cepa S19 viva atenuada de *Brucella abortus*, que se aisló inicialmente como una cepa virulenta de la leche de una vaca Jersey en 1923 y se dejó a temperatura ambiente en un laboratorio durante un año. Fue descrita por J. M. Buck en 1930 y en México se ha elaborado desde 1951 (Flores, 1994), Es una cepa atenuada y estable, de inmunogenicidad relativamente alta, de morfología lisa, incapaz de crecer en presencia de eritritol. Aunque es de baja virulencia para el ganado, la vacunación del bovino gestante puede causar aborto, en forma esporádica, oscilando entre el 1 y el 2.5 % en condiciones de campo. Algunas bacterias de la cepa S19 de *Brucella abortus* aisladas de abortos, son capaces de crecer en presencia de eritritol (Saldarriaga, 2002).

La vacuna RB51 fue seleccionada a partir del crecimiento de la cepa 2308 de *B. abortus* en presencia de rifampicina. Se empleó para denominarla la "R" por ser una cepa rugosa, la "B" por el género *Brucella* y "51" corresponde a una nomenclatura interna del laboratorio que la desarrolló. La cepa RB51 de *Brucella abortus* está desprovista de la cadena O, es rugosa y muy estable tras numerosos pases *in vitro* e *in vivo* a través de varias especies animales. Dado que carece de cadena O, no induce anticuerpos anti-O de forma detectable por los métodos serológicos convencionales o el ELISA, independientemente de la edad de los animales, dosis o frecuencia de las inoculaciones, por lo que no causa interferencia con el diagnóstico. Cuando se emplea en protocolos de vacunación de una sola dosis, su capacidad protectora en el vacuno es similar a la de la cepa S19 de *Brucella abortus*. Recientes experimentos de campo, llevados a cabo en áreas de alta y baja prevalencia de brucelosis, indican que la inmunidad inducida por la vacuna RB51 en el bovino (al menos un año tras la vacunación) es semejante o mejor que la inducida por la cepa S19 de *Brucella abortus*. El ensayo en ratón indica que la respuesta protectora inducida por la vacuna RB51 está mediada únicamente por las células T, puesto que la transferencia a otro animal de anticuerpos inducidos por la vacuna RB51 no protege, mientras que la de células T sí lo hace. La vacunación con RB51 induce la formación de células T citotóxicas específicas, capaces de destruir los macrófagos infectados con brucela. Los estudios en el ratón indican que la cepa RB51 de *Brucella abortus* puede proteger contra las infecciones por *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. ovis*. Los trabajos en marcha con varias especies animales confirman una actividad protectora en cerdos contra la infección por *B. suis* en condiciones de campo (Lord *et al*, 1998) y ha demostrado que la vacuna RB51 puede proteger hasta al 93% de las cabras vacunadas, contra la infección por *B.*

melitensis (Schuring, 1991; Cheville, 1993; Cheville, 1996; Olsen, 1999; Olsen, 2000; Blasco, 2003).

Existen observaciones no publicadas sobre la eficacia protectora que sugieren que la inmunización debe comenzar en animales “no” menores de 4 meses. El bovino gestante se puede vacunar con seguridad por vía subcutánea con 1×10^9 UFC/ml de RB51, sin que se produzca aborto o placentitis. La inoculación intravenosa de bovino gestante con 1×10^{10} UFC/ml provocó infección placentaria y fetal pero no aborto, lo que sugiere que la vacunación del bovino adulto no gestante con una dosis completa, debería ser segura. Sin embargo, informes no publicados de la *Colorado Serum Company*, que fabrica la vacuna en USA indican que la vacunación de bovinos gestantes con una dosis reducida de (1×10^9) de la cepa RB51 de *Brucella abortus* puede dar abortos en un 0.5% de los vacunados y por lo tanto, la vacunación de hembras gestantes debe ser evitada o empleada solo en áreas de alta incidencia al comienzo del programa de erradicación (Schuring, 1991; Cheville, 1993; 1996; Olsen, 1999; 2000; Blasco, 2003).

Desde 1996, la cepa RB51 de *B. abortus* es la vacuna oficial en USA para la profilaxis de la brucelosis en el ganado bovino y el empleo de la cepa S19 ha sido prohibido. Otros países donde la vacuna ha recibido aprobación oficial y se emplea actualmente son: Argentina, Chile, Colombia, Costa Rica, Paraguay y Venezuela. Cada país usa métodos ligeramente diferentes para administrar la vacuna. En México la vacunación con la RB51, se lleva a cabo una vez en la vida entre los 3 a 6 meses con la dosis becerro (1×10^{10} UFC) o después de los ocho meses aplicando la dosis reducida para vacas (3×10^9 UFC), de manera práctica en zonas endémicas de brucelosis en nuestro país, solo se recomienda aplicar una vez la revacunación con RB51 (Schuring, 1991; Cheville, 1993; Cheville, 1996; Olsen, 1999; Olsen, 2000; Blasco, 2003).

La experiencia de campo indica que la vacunación de hembras gestantes puede inducir un pequeño porcentaje de abortos, en particular si los animales no se han vacunado como terneras. Sin embargo, parece que la RB51 tiene menor potencial abortivo que la cepa S19. La vacuna se puede aplicar varias veces si se quiere, sin inducir anticuerpos reactivos en pruebas serológicas tanto si se emplean células completas como el antígeno liso LPS (Schuring, 1991; Cheville, 1993; Cheville, 1996; Olsen, 1999; Olsen, 2000; Blasco, 2003).

La administración oral de la RB51 a ratones y bovinos ha inducido también inmunidad protectora, abriendo así un campo de estudio para la inmunización de la fauna salvaje (Schuring, 1991; Cheville, 1996; Cheville, 1993; Olsen, 2000; Olsen, 1999; Blasco, 2003).

Recientemente, RB51 se ha aislado de la leche y de exudado vaginal de las vacas vacunadas (Elsevier, 2003)

Aunque investigaciones han demostrado que no es un problema serio de salud pública (Leal, 2003).

1.9 Biopeligrosidad.

Parece que la cepa RB51 tiene, poca o nula virulencia para las personas con su sistema inmunitario normal, ya que no ha sido descrita oficialmente ninguna infección humana aunque se han producido numerosas inoculaciones accidentales por pinchazos de agujas al manipularla, algunos autores han considerado que esta cepa tiene potencial para el desarrollo de una vacuna humana. Sin embargo sí se han observado reacciones de hipersensibilidad que aparecieron en algunas personas unas pocas horas tras la inoculación accidental. Dado que la cepa RB51 es muy sensible a la tetraciclina, se ha recomendado

emplearla de forma preventiva en las inoculaciones accidentales (Olsen, 1999; Olsen, 2000).

La OIE en su manual de estándares para diagnósticos y vacunas dice al respecto que: “La cepa S19 de *Brucella abortus*, aunque atenuada es aún capaz de provocar enfermedad en los humanos. Los cultivos celulares y las suspensiones deben manejarse bajo las condiciones adecuadas de contención de biopeligrosidad. Los residuos de vacuna y el equipo de inyección debe descontaminarse con un desinfectante adecuado (un preparado fenólico, yodóforo o aldehídico) a la concentración recomendada y se deben seguir las indicaciones del médico en caso de exposición accidental.” Sobre la RB51 dice que: “No se dispone de información suficiente para valorar la virulencia de la cepa RB51 de *Brucella abortus* para los humanos, no obstante, no se han descrito infecciones accidentales. Es recomendable manejar la cepa RB51 con las mismas precauciones que la S19. (Olsen, 1999; Olsen, 2000).

II. JUSTIFICACIÓN

Este trabajo es con el fin de investigar el comportamiento antigénico de la cepa vacunal RB51 ya que se ha visto que en un pequeño porcentaje causa aborto, ya que en estudios recientes se ha aislado a la cepa RB51 de *Brucella abortus* en leche y en vacas primíparas vacunadas con ésta, pero estas investigaciones no han comparado el perfil de proteínas de membrana externa reconocidos por anticuerpos de bovinos vacunados. Dada la popularidad que ha tenido la vacuna RB51 en estos últimos años por su facilidad para diferenciar animales enfermos de sanos, resulta necesario hacer una valoración de la respuesta inmunológica para que en investigaciones posteriores pueda estudiarse su capacidad protectora.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar mediante inmunoblot el perfil de proteínas de membrana externa reconocidos por anticuerpos de bovinos vacunados con RB51 de *Brucella abortus*.

Objetivos particulares

Obtención de proteínas de membrana externa, de membrana interna y citosol de *Brucella abortus* cepa RB51, cepa aislada de leche y cepa de campo.

Desarrollo y estandarización de la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos contra proteínas de membrana externa de *Brucella abortus* cepas RB51, aislada de leche y de campo.

Elaboración del inmunoblot para determinar el perfil de reconocimiento hacia las proteínas de membrana externa de la cepa RB51, cepa aislada de leche y cepa de campo.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Muestras serológicas para determinar la presencia de anticuerpos contra proteínas de membrana externa de *Brucella sp.*

Para esta investigación se utilizaron 14 bovinos provenientes de la cuenca lechera de Tizayuca Hidalgo, la cual tiene una prevalencia de enfermedad del 39.2%. De estos animales se obtuvieron sueros a los 120, 150, 180 y 270 días posvacunación con RB51 dando un total de 56 sueros; todas fueron vacunadas por vía subcutánea con 2.0 ml de la cepa RB51, a una concentración 3×10^9 UFC/ml (Laboratorio PRONABIVE). Además 14 sueros en un solo muestreo en el centro de enseñanza de la UNAM, Martínez de la Torre en Veracruz por contar con una prevalencia nula.

4.2 Antígenos a base de PME de *Brucella sp.*

Las proteínas de membrana externa fueron obtenidas a partir de una cepa de campo, una cepa aislada a partir de leche de vaca y la cepa vacunal RB51 de *Brucella abortus*. El proceso de obtención de estas proteínas se describe más adelante.

4.3 Cultivo e inactivación de *Brucella sp.*

Cada una de las cepas de campo, RB51 vacunal y la cepa aislada a partir de leche, se sembraron en placas de Agar Tripticasa Soya (TSA), y se incubaron por 72 h a 37°C en estufa de CO₂. Una vez crecidas y antes de ser cosechadas se les realizaron las siguientes pruebas: Tinción con cristal violeta, TSI, MRVP, Citrato y tinción de Gram; posteriormente fueron recolectadas en ácido H-2 hidroxietilpiperazina-N-etanosulfónico 10 mM pH 7.5. (HEPES) y fueron inactivadas por calor a 60° C durante 1 h, finalmente se les adicionó una mezcla comercial de inhibidores de proteasas que contiene inhibidores de serino, cisteino y metalo proteasas.

4.4 Fragmentación por medio de ultracongelación y sonicación de las diferentes cepas de *Brucella abortus*.

Esta suspensión de bacterias se sumergió en nitrógeno líquido por 5 min. para ser ultra congeladas y sonicadas 8 veces a una potencia real de 100 wats, empleando un generador Sonifier-450 equipado con una micro punta, durante 1 min por 1 min de descanso. Posterior a esto fueron, sometidas a un último ciclo de 2 min ambos procedimientos se repitieron 8 veces. Entre cada ciclo las muestras fueron ultracongeladas y mantenidas en hielo.

4.5 Extracción de proteínas de membrana de *Brucella sp* por medio de ultra centrifugación.

Para extraer las proteínas, las muestras sonicadas se centrifugaron a 4,424 xg durante 15 min a 4°C para remover los restos celulares. Se recuperó el sobrenadante y se ultracentrifugó a 150,000 xg por una hora a 4°C. Se recupero el sedimento con las secciones de membrana externa y membrana interna, desechándose el sobrenadante con las proteínas del citosol. La pastilla se resuspendió en N-Lauroil-Sarcosina al 1% (Sarcosyl 1%) que se mantuvo en agitación suave durante 30 min. a temperatura ambiente.

Posteriormente esta suspensión se centrifugó nuevamente a 150,000 xg por una hora a 4°C, obteniendo en el sedimento, las proteínas de la membrana externa y en el sobrenadante las proteínas de la membrana interna. La pastilla se resuspendió en 300 µl de HEPES (ácido H-2-hidroxietyl piperazine-N-2-etanosulfónico) 10mM con un pH 7.5 con inhibidor de proteasas, por medio de un homogenizador manual (Vortex).

Para la separación cuantitativa de las proteínas unidas a compuestos orgánicos, se tomaron 100 µl de la fracción y se le

agregaron 400 de metanol, se agitó y centrifugó por 10 seg a 9,500 xg posteriormente se adicionaron 100 μ m de cloroformo y nuevamente se agitó y centrifugó.

Para la separación de la fase orgánica se le agregaron 300 μ m de metanol, se agitó y centrifugó por dos min. a 9,500 xg. El sobrenadante se removió y se desechó. El paquete de PME se secó con flujo de aire y se guardó a -70°C hasta su uso.

4.6 ELISA–indirecta para la determinación de anticuerpos contra PME de *Brucella sp.*

Esta prueba se llevó a cabo para elegir los sueros con anticuerpos con PME de brucela para la realización de las pruebas de inmunoblot.

Para la estandarización de la prueba de ELISA-Indirecta se realizaron diluciones de 1:50, 1:100, 1:150, 1:200 del antígeno (PME de las cepas de *B. abortus*, RB51, RB51 aislada a partir de leche y cepa de campo). Para los sueros controles positivos y negativos las diluciones fueron de 1:20, 1:40, 1:80, en PBS 1x.

La ELISA-Indirecta se llevó a cabo en microplacas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano con las fracciones de PME de las cepas de *Brucella abortus*: RB51, cepa de campo y RB51 aislada a partir de leche, como antígeno, en solución buferada de carbonato–bicarbonato pH 9.6 a una dilución de 1:100, estos antígenos se fijaron de manera separada en el fondo de las placas por incubación toda la noche a 4° C (sensibilización de la placa), sellando las microplacas con plástico para evitar la evaporación. Una vez que se adhirió el antígeno a las microplacas, se colocaron 50 μ l de una solución bloqueadora de leche descremada al 2%, se incubó a 37° C por 30 minutos y se procedió al lavado con la solución TRIS ELISA BUFFER PH 7.4. A continuación se depositaron 50 μ l

de los sueros problema diluidos 1:20 en cada uno de los pozos de la microplaca, por 30 min.

Los pozos fueron lavados 3 veces con la solución TRIS ELISA BUFER PH 7.4, después se añadieron 50 µl de proteína G conjugado con peroxidasa diluido en proporción 1:1000 en solución de TRIS ELISA BUFER PH 7.4, la microplaca se incubó 30 minutos a 37° C. Después del segundo lavado, se agregaron 100 µl a cada pozo de la solución sustrato de ácido cítrico, peróxido de hidrógeno y ABTS. Se procedió a agitar la microplaca durante 10 minutos hasta que el color verde de los controles apareció y se detuvo la reacción agregando 100 µl de ácido sulfúrico 3M. Se determinó el desarrollo de color por medidas de absorbancia a 405 nm. La técnica descrita anteriormente se aplicó utilizando conjugados anti-IgG conjugado con peroxidasa.

4.7 Montaje del gel en el equipo de electroforesis y la separación electroforética.

Este procedimiento se realizó con las PME de las cepas de *Brucella abortus*: RB51 vacunal, cepa de campo y cepa aislada a partir de leche, en geles de acrilamida y bisacrilamida usando una cámara de electroforesis como se describe a continuación:

Se preparó el gel de poliacrilamida que es el gel separador, se deja polimerizar y posteriormente se vierte el gel concentrador y de inmediato, se inserta un peine limpio en la solución del gel concentrador hasta rellenar completamente los espacios del peine.

Al completarse la polimerización, se colocaron las placas de vidrio en el aparato de electroforesis agregando la solución Búfer SDS- Page 5X, y se preparó la solución de referencia con anhidrasa carbónica y albumina sérica bovina en el primer pozo y las soluciones de prueba en el siguiente orden: los tres primeros pozos con PME de cepa aislada a partir de leche, los siguientes tres con cepa de

campo y los últimos tres con cepa vacunal RB51 y posteriormente se desarrolló la electroforesis. La relación intensidad/voltaje, fue de 80 volts los primeros 30 minutos y 120 volts hasta que se desplazó completamente el indicador en el gel, inmediatamente estos fueron sumergidos en una solución de Comassie durante toda la noche, al siguiente día fueron decolorados con una solución de decoloración, hasta que las bandas de proteínas teñidas contrastaron nítidamente sobre un fondo claro.

4.8 Inmunotransferencia

Las PME de las cepas de *Brucella abortus*: RB51, cepa de campo y RB51 aislada a partir de leche, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa por el método de transferencia semiseco usando una cámara Trans-Blot SD. Se procedió a montar la inmunotransferencia utilizando como metodología el sistema de emparedado. La transferencia se corrió a 15 voltios durante una hora y media. Terminado el tiempo de transferencia la membrana fue bloqueada con leche descremada al 2% por 24 horas; se retiró la leche descremada y la membrana se cortó a la mitad, las mitades se lavaron con PBS Tween 20 tres veces y dos veces con solución buffer fosfatos (PBS 1x) estos lavados se repitieron entre cada paso de la técnica. Posteriormente, se incubó toda la noche a 4° C con una mezcla de sueros de las vacas vacunadas con la cepa RB51 de *B. abortus*. Después la membrana fue incubada con conjugado de proteína G peroxidada diluida a 1:500 por dos horas a temperatura ambiente en agitación y por último, se revelaron las proteínas con 3,3-Diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno.

V. RESULTADOS

5.1 Resultados de las pruebas bacteriológicas realizadas a las cepas de *Brucella abortus* aislada de leche, RB51 y de campo.

Se obtuvieron colonias características de *Brucella abortus* a las 72 hrs de incubación, la tinción con cristal violeta diferenció la cepa RB51 de las otras cepas de prueba, a la tinción de Gram, las tres cepas mostraron bacilos cortos Gram negativos y fueron negativas a las pruebas de TSI, MRVP y Citrato.

5.2 Estandarización de la técnica de ELISA-Indirecta.

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

5.3 Determinación de anticuerpos contra las PME de las cepas de *Brucella abortus* en sueros de bovinos vacunadas.

Se seleccionaron 9 sueros que mostraron en ELISA una DO de en promedio 0.250 los resultados sirvieron para determinar el nivel de anticuerpos presentes en los sueros de las vacas vacunadas contra *Brucella*, considerando que la DO es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos presentes.

5.4 Separación y visualización electroforética de PME.

Al realizar el análisis cualitativo del perfil de PME en las cepas de campo, aislada a partir de leche y cepa RB51 vacunal de *Brucella abortus*, se observó que el perfil electroforético en las diferentes cepas fue homogéneo.

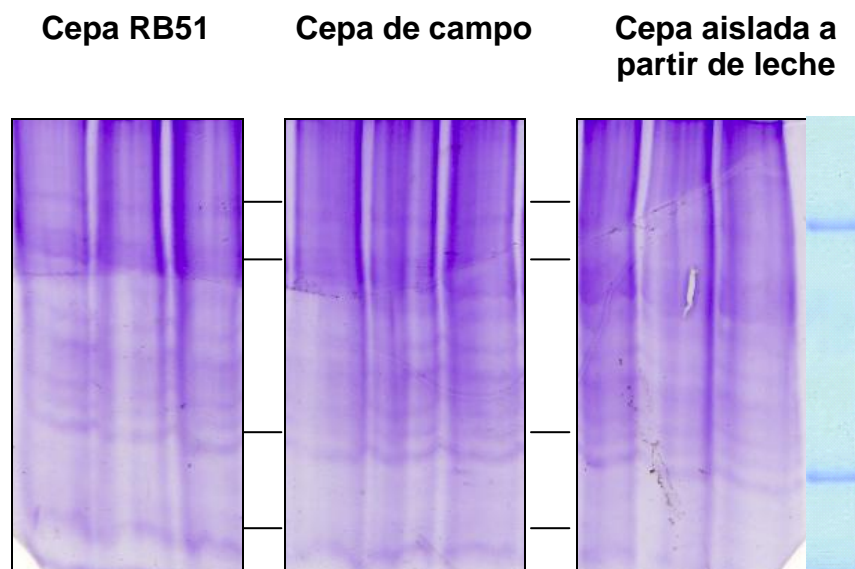


Fig. 1 Proteínas de membrana externa en gel de Poli-acrilamida y teñidas con azul de Comassie, la banda azul claro de la derecha demuestra los marcadores de pesos moleculares y las líneas indican el corrimiento electroforético de las proteínas.

5.5 Reconocimiento por inmunoblot de las PME de cepa aislada a partir de leche, cepa de campo y cepa vacunal RB51.

Para realizar el inmunoblot se seleccionaron los sueros que mostraron en ELISA una DO en promedio de 0.250 encontrándose tanto diferencias como similitudes en cuanto al perfil de PME en los diferentes muestreos como en las diferentes cepas.

En el primer muestreo a los 120 días pos vacunación como se muestra en la Tabla 1, existe una diferencia en los pesos de las PME, debido a que los anticuerpos reaccionan con los antígenos que son reconocidos en las diferentes cepas de *Brucella abortus*, en la cepa aislada existe un marcado reconocimiento de la proteína de 71.96 kDa y un ligero reconocimiento de la proteína de 25.73 kDa. A diferencia de la cepa RB51 que tiene un reconocimiento marcado de la proteína de 79.26 kDa y ligero en las otras tres proteínas de 59.8, 33.03 y 18.43 kDa.

Tabla 1. Reconocimiento de PME de las Cepas aislada, RB51 y de campo de *Brucella abortus* por sueros de bovinos obtenidos a los 120 días pos vacunación.

Cepa aislada (kDa)	Cepa RB51 (kDa)	Cepa de Campo (kDa)
71.96	79.26	108.46
25.73	59.8	101.16
	33.03	84.13
	18.43	42.76

En el segundo muestreo a los 150 días pos vacunación (Tabla 2) se puede observar que no hay similitudes en cuanto al peso molecular de las proteínas reconocidas entre las diferentes cepas, no obstante para la cepa RB51 existe un reconocimiento en la proteína 18.43 kDa y para la cepa de campo en la proteína 84.1 y 108.46 kDa como en el muestreo anterior.

Tabla 2. Reconocimiento de PME de las Cepas aislada, RB51 y de campo de *Brucella abortus*

por sueros de bovinos obtenidos a los 150 días pos vacunación.

Cepa aislada kDa	Cepa RB51 kDa	Cepa de Campo kDa
67.1	81.7	108.46
35.46	71.96	96.3
	40.33	84.1
	18.43	69.5
		37.89

En el muestreo a los 180 días pos vacunación, como se observa en la Tabla 3, el peso molecular de la proteína 23.29 kDa de la cepa aislada es el mismo de una de las proteínas reconocidas de la cepa RB51, y para la cepa RB51 se repite la 71.96 kDa del muestreo anterior, lo mismo que para la proteína 37.89 y la 96.3 kDa de la cepa de campo aunque la proteína 108.46 kDa se repite también en los dos muestreos anteriores.

Tabla 3. Reconocimiento de PME de las Cepas aislada, RB51 y de campo de *Brucella abortus* por sueros de bovinos obtenidos a los 180 días pos vacunación.

Cepa aislada kDa	Cepa RB51 kDa	Cepa de Campo kDa
23.29	71.96	108.46
	64.6	96.3
	47.63	37.89
	23.29	

Y para el último muestreo (Tabla 4), en la cepa aislada existe un reconocimiento en la proteína de 64.66 kDa igual que en la cepa RB51 del muestreo anterior, en la cepa RB51 se repite el peso molecular 71.96

kDa de los dos muestreos anteriores y para la cepa de campo se repite la 96.3 kDa de los dos últimos muestreos, así como la 71.96 kDa de la cepa RB51.

Tabla 4. Reconocimiento de PME de las Cepas aislada, RB51 y de campo de *Brucella abortus* por sueros de bovinos obtenidos a los 210 días pos vacunación.

Cepa aislada kDa	Cepa RB51 kDa	Cepa de Campo kDa
64.66	71.96	96.3
33.03	47.63	71.96
6.26	37.89	33.03
		13.56

En resumen, los resultados obtenidos en el análisis cualitativo de las proteínas de las cepas de campo, aislada de leche y vacunal RB51 reconocidas por inmunotransferencia, como se muestra en la Tabla 5, fue en base a el reconocimiento en la cepa aislada de seis bandas de las cuales la 71.96 kDa obtenida a los 120 días pos vacunación coincide con otra del mismo peso, pero obtenida de la cepa vacunal RB51 en los muestreos a los 150, 180 y 210 días pos vacunación, y la 33.03 kDa concuerda con otra de la cepa de campo a los 210 días pos vacunación, en el caso de la cepa vacunal RB51 existen dos bandas principales cuyo peso molecular fue de 71.96 y 18.43 kDa respectivamente. En lo que respecta a la cepa de campo los pesos principales reconocidos fueron 108.46, 96.3 y 37.89 kDa.

Tabla 5. Resumen del reconocimiento de PME de las Cepas aislada, RB51 y de campo de *Brucella abortus* por sueros de bovinos obtenidos.

Cepa aislada kDa	Cepa RB51 kDa	Cepa de Campo kDa
71.96	71.96	33.03
	18.4	108.46
		96.3
		37.89

5.6 Resultados de animales no vacunados.

Los animales no vacunados negativos a *Brucella* no tuvieron reacción alguna a Elisa y al realizar el inmunoblot no hubo ningún reconocimiento hacia las proteínas.

Vacas vacunadas con RB51
a los
120 150 180 210

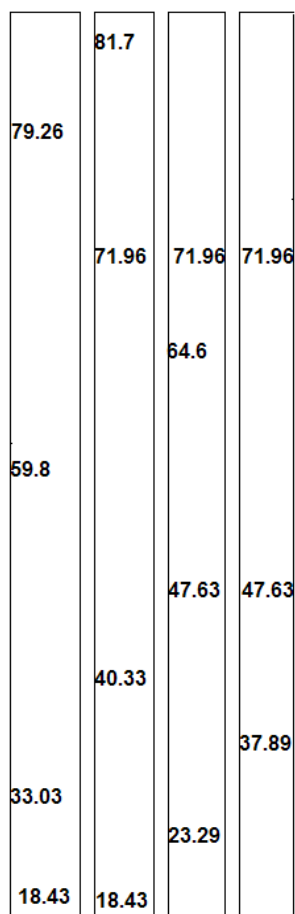


Fig. 2. Esquema representativo de las proteínas que se repitieron con mayor frecuencia en las muestras de los sueros de las vacas vacunadas con la vacuna RB51 obtenidos a los 120, 150, 180 y 210 días pos vacunación.

Es importante recalcar que los resultados de esta investigación fueron evaluados de forma cualitativa por lo que no es aplicable algún método estadístico; Las proteínas que se observan en la figura 2 fueron las que se repitieron con mayor frecuencia en las muestras de los sueros obtenidos a los 120, 150, 180 y 210 días pos vacunación. Lo que indica que las proteínas con peso molecular de 71.96 y 47.63 podrían ser importantes en la inmunidad protectora.

VI. DISCUSIÓN

En algunas investigaciones, se menciona que las proteínas de membrana externa de *Brucella* son muy resistentes, y que se requiere de condiciones muy drásticas para su extracción. Además, las fuertes interacciones entre las proteínas y el lipopolisacárido dificultan su purificación. Estos inconvenientes no han impedido la obtención de las PME, su análisis mediante ensayos de electroforesis en gel de poliacrilamida, o bien mediante técnicas autorradiográficas e inmunoenzimáticas (Ficht, 1990).

En esta investigación el método de extracción de proteínas tuvo éxito, ya que al comenzar el trabajo se utilizó el método simple de sonicación y no se obtuvieron proteínas; pero al combinar el congelamiento rápido y la sonicación se pudo fragmentar la bacteria hasta obtener proteínas que se pudieron observar con la electroforesis y la tinción de Coomassie. Mejía (2001) comenta que, la cantidad de proteína de membrana externa que se utiliza como antígeno para diferentes pruebas, depende en gran medida de las concentraciones de las mismas, aunado a la técnica de extracción basada en la utilización de detergentes como la L-lauril sarcosina permitió el análisis de las mismas, como la prueba de ELISA indirecta y para el Inmunoblot, lo que coincide con el trabajo realizado por Mc Vicker y Tabatabai (2002), quienes obtuvieron antígeno suficiente usando la misma técnica. Sin embargo, se han realizado diversos estudios donde se evalúan diferentes métodos para la obtención de PME; tal es el caso de Paravis *et al*, (1995) quien menciona dos métodos de obtención de proteínas: ultracentrifugación y autoclave a través de vapor fluente, obteniendo en ambos un buen rendimiento del antígeno para la realización de pruebas de inmunotransferencia.

A través de la técnica de ELISA indirecta hubo una clara detección de anticuerpos hacia las PME de las diferentes cepas de *Brucella abortus* lo cual coincide con Leal (2003) y Mejía (2004), quienes utilizan la prueba de ELISA para la detección de PME con diferentes agentes, entre los que destacan, *Brucella ovis*,

Actinobacillus seminis, *A. pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica*.

El inconveniente que tiene la técnica de ELISA, a pesar de ser una prueba de gran utilidad para el diagnóstico, es la dificultad de obtener antígenos purificados y la posibilidad de tener reacciones cruzadas con otras bacterias Gram negativas. Además de que la técnica de ELISA indirecta también tiene mayor costo y trabajo operacional (Mejía 2004); En el caso de *Brucella*, Nielsen (1990), ha demostrado la reacción cruzada con *Salmonella* 0:30, *Francisella tularensis* y *Vibrio cholerae* 0:1, y sobre todo el serotipo 0:9 *Yersinia enterocolitica*. Estas reacciones cruzadas se deben principalmente a la similitud en sus LPS. La utilización de otros antígenos sobretodo de naturaleza proteica, puede ser una alternativa para contrarrestar estos efectos, como lo señala González (2002), pero es necesario contar con más estudios. Sin embargo, ya estandarizada la técnica y contando con antígenos apropiados, representa una herramienta útil para el diagnóstico de diversas enfermedades.

Se han realizado investigaciones utilizando diversos componentes como la envoltura celular de *Brucella*, el lipopolisacárido, el peptidoglicano, los fosfolípidos, y las proteínas de membrana externa con resultados variables, como lo señalan Stevens (1995) y Montaña (1998).

Las proteínas que se reconocieron en los tres grupos pero en diferentes tiempos fueron, la 71.96 de cepa aislada de leche obtenida a los 120 días pos vacunación, que coincide con otra de la cepa vacunal RB51 en los muestreos a los 150, 180 y 210 días pos vacunación, y de la cepa de campo a los 210 días posvacunación, en lo que respecta a la 33.26 de la cepa RB51 concuerda con otra de la cepa de campo a los 210 días pos vacunación.

En trabajos anteriores (mencionados abajo); no se han descrito proteínas de alto peso molecular (más de 100 kDa) similares a la reconocida en este estudio y por lo tanto se desconoce su implicación biológica.

Verstreat (1982), menciona que en *B. abortus* hay dos grupos de proteínas de pesos moleculares que van del rango 25 a 27 kDa y 36 a 38 kDa. Es posible que el fuerte reconocimiento observado hacia estas proteínas en los animales vacunados, sea indicativo de su participación en la patogénesis de la enfermedad.

En este trabajo, se determinó el reconocimiento de las PME en animales vacunados, por lo que se demuestra su alto poder inmunogénico en animales vacunados y representa una herramienta alternativa para el diagnóstico de brucelosis, por otra parte su posible utilidad para la creación de nuevas vacunas para la prevención de la brucelosis en México. Por ejemplo Chávez (2004), en un trabajo sobre PME concluye que éstas pueden ser buenas candidatas para la elaboración de inmunogenos contra la brucelosis ovina.

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

VII. CONCLUSIONES

- En animales vacunados con la cepa RB51 de *Brucella abortus* existe un reconocimiento hacia las PME obtenidas a partir de diferentes cepas de la bacteria.
- Las principales proteínas reconocidas fueron cepa aislada, de campo y vacunal.
- Existe un reconocimiento cruzado para las diferentes cepas, lo que indica la aproximación estructural en el perfil de PME expresadas por *Brucella abortus* de diferente origen.
- En el caso de la cepa vacunal RB51 hubo un reconocimiento para la PME de 47.63 kDa y 18.43 kDa que no fueron reconocidas en las otras cepas, por esta razón el reconocimiento de estas proteínas podrían ser una característica diferencial entre cepas vacunal y cepas de campo.
- Se demostró la capacidad antigénica de las PME de *Brucella abortus* de diferente origen, lo que podría tener implicaciones positivas para el futuro diagnóstico y la elaboración de nuevas vacunas.

BIBLIOGRAFÍA

Alton G.G; Jones L.M; Angus R.D; Verger J.M. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Institutur National de la Recherche Agronomique, Paris.

Bang B. 1897. Aetiologie des seuchanhaften (infectiosen) verioerfens. Zeitachs. F. Thiermed. Jena.

Blasco JM 1997. A review of the use of B. melitensis Rev. 1 vaccine in adult sheep and goats. Preventive Veterinary Medicine.

Brooks G. F; Stephen A. M; Butel J. S. 1999. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Manual Moderno. México D.F. 306-309 p.

Canning P. C. 1990. Phagocyte inflamaction in resistance to brucellosis "Advances in brucellosis research", Texas. A&M. University Press College Station. USA. 151-163 p.

Cloeckaert A; Verger J.M; Grayon M; Grépinet O. 1995. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of Brucella. Microbiology. Vol. 141; 2111-2121 p.

Cloeckaert A; Verger J.M; Grayon M. and Vizcaíno N. 1996. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of Brucella. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters. Vol. 145; 1-8 p.

Crespo L. F. 1994. Brucelosis ovina y caprina. Office International des Epizooties, Murcia. España.

Corbel M.J. and Morgan B.W. 1984. Genus *Brucella* in "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". William & Willkin, Baltimore, London. 377-388 p.

Cheville N.F; Olsen S.C; Jensen A.E; Stevens M. G. and Pal M. V. 1996. Effects of age at vaccination on efficacy *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis. American Journal of Veterinary Research 1153-1156 p.

Cheville N.F; Stevens M.G; Jensen A.E; Tatum F.M. and Halling S.M. 1993. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. American Journal of Veterinary Research; 1591-1597 p.

Diario de la Federación. 20 de agosto de 1996. Norma Oficial Mexicana NOM-041- ZOO-1995 Campaña nacional contra la brucelosis en los animales.

Diario de la Federación. 28 de octubre de 1997. Norma Oficial Mexicana NOM-053- ZOO-1995 Requisitos mínimos para las vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de la brucelosis en los animales. Secretaria de Agricultura y Ganadería.

Díaz A.E; Hernandez A.L; Valero A.G. y Arellano R.B. 2001. Brucelosis Diagnóstico de brucellosis animal. Instituto Nacional de Investigación y Fomento Agropecuario - Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. 34-35 p.

Douglas J.T; Rosenterg E.Y; Nikaido H; Verstrete D.R; Winter A.J. 1984. Porin of *brucella* species. Infect. Immun.16-21p.

Dubray G. and Plommet M. 1977. Structure et constituans des Brucella: propriétés biologiques et caractérisation des frations. *Developmental Biology Standard*. 68-91 p.

Evans A.C. 1918. Further studies on *Bacterium abortus* and related bacteria. *Journal Infectious Diseases*. 4 p.

Evans A.C. 1918. Comparison of *Bacterium abortus* with *Bacterium bronchisepticus* and with the organism which causes Malta Fever. *Journal Infectious Diseases*. 5 p.

Enright F.M. 1990. Mechanisms of self cure in *Brucella abortus* infected cattle. In *Advances in brucellosis research*. University Press. College Station. USA. 151-163 p.

Ficht T.A; Bearden S.W; Sowa B.A; Marquis H. 1990. Genetic variation at the omp2 porin locus of the *Brucella* species-specific markers. *Molecular Microbiology*; Vol. 4; 1135-1142 p.

Ficht T.A; Hussein H.S; Derr J; Bearden S.W. 1996. Species-specific sequences at the omp2 locus of *Brucella* type strains. *International Journal Systematic Bacteriology* 329-331 p.

Harmon B.G; Adams L.G; Frey M. 1989. Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. *American Journal Veterinary Research* 1092-1097 p.

Joklik W.K; Willett H.P; Bernard D; Wilfert C.M. 1998. *Microbiología. Médica Panamericana*. 20^a ed Buenos Aires, Argentina. 828-833 p.

Koneman E.W; Allen S.D; Janda W.M; Schreckenberger P.C. y Winn W.C. 2001. Diagnóstico Microbiológico. Médica Panamericana. 5ª ed. Madrid, España.424-430 p.

Leal H.M. 2003. Respuesta inmune en bovinos vacunados con RB51, a la exposición natural con *Brucella abortus* y eliminación de la cepa vacunal en leche y exudado vaginal. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de maestría. México. D.F.

Leal H.M; Klevezas, D.S; Barbosa; Pliego A; Flores; Trujillo M; López, M. A. y Martínez J. P. 1999. Epidemiología molecular de un foco primario de brucelosis en el estado de México. Biotecnología Aplicada. 149-153 p.

Leonard B.A; López G.I; Baldwin C.L. 1997. *Brucella abortus* siderophore 2,3-dihydroxybenzoic acid protects *Brucellae* from killing by macrophage. Veterinary Research. Vol. 28; Num. 1. 87-92 p.

Marín C.M; Alabart J.L; Blasco J.M. 1996. Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. ovis*. Journal Clinical Microbiology. Vol. 34; Num. 2. 426–42 p.

Mejía S.P; Díaz A.E; Salas T.E. y Tenorio G.R.V. 2004. Identificación de las proteínas de 35 y 38 Kda específicas de *Brucella ovis*. Técnica Pecuaria Mexicana.

Montaña S.N; Rueda L.O.E; Calderón P.C.P; Ortega A; Puentes A.R; Gallego M.M.I. y Marino J.O.C. 1998. Medición de respuesta inmune humoral y celular frente a antígenos de *Brucella abortus* RB51 en bovinos. Archivos de Medicina Veterinaria 109-123 p.

Moreno E.D; Berman T; Boettcher LA. 1981. Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infection and immunity*. 362-370 p.

Moriyón I; López G.I. 1998. Structure and properties of the outer membrane proteins of *Brucella*. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 1-8 p.

Murray P.R. y Rosenthal. K.S. 2003. *Microbiología médica*. 4ª ed. Elsevier. España. 308 -311 p.

Nicoletti P. 1999. Epidemiología de la brucelosis. III Master Internacional de Atención al Medio. Instituto de Salud Pública. Pamplona. Navarra.

Nielsen K. 1990. The serological response of cattle immunized with *Yersinia enterocolitica* 0.9 or to *Yersinia* and *Brucella abortus* antigens in enzyme immunoassay, *Veterinary Immunology Immunopathol*. 373-382 p.

Olsen S.C; Bricker B; Palmer M.V; Jensen A.E. 1999. Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: serology, clearance and efficacy. *Research Veterinary Science*. 101-105 p.

Olsen S.C. 2000. Immune responses and efficacy after administration of a commercial *Brucella abortus* strain RB51 vaccine to cattle. *Veterinary Therapeutics*. 183-191 p.

Price R.F; Templeton J.W; Adams G.S. 1990. Of smooth rough and transposon mutant strains of *B. abortus* in bovine mammary macrophages. *Veterinary Immunology Immunopathology*. 353-356 p.

Ruiz Castañeda. 1971. Brucelosis 3a edición. Ediciones Cientificas. La Prensa Medica Mexicana. S.A.

Saldarriaga O.A. y Rugeles M.T. 2002. Inmunobiología de la infección por *Brucella* spp. Fundamentos para una estrategia vacunal. Revista Ciencia Pecuaria. 15 p.

Secretaria de Agricultura, Ganaderia y Pesca de Gobierno del Estado de Sinaloa. 01 de Mayo 2010. Sinaloa México.

Schurig G.G; Pringle A.T; Breese S.S. 1981. Localization of *Brucella* antigens that elicit a humoral response in *Brucella abortus* infected cattle. Infect Immun 1000-1007 p.

Schuring G.G; Roop R.M; Bagchi T; Boyle S; Buhrman O; Sriranganathan N. 1991. Biological properties of RB51, a stable rough strain of *Brucella abortus*. Veterinary Microbiology. 171-188 p.

Stevens M.G; Olsen S.C; Cheville N.F. 1995. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. Veterinary Immunology Immunopathology 223 p.

Traum J. 1914. infectious abortion investigation in pigs. Ann. Rep. Of the Chief, Bureau of Animal Industry. U. S. Depart. Of Agriculture. 5 p.

Verstreat D.R; Creasy M.T; Caveney N.T; Baldwin C.L; Blab M.W; Winter A.J. 1982. Outer membrane proteins of *brucella abortus* isolation and characterization. Infect Immun. 979 p.

Wright A.E. and Semple D. 1887. On the employment of dead bacteria in the serum diagnosis of typhoid and Malta fever. British. Medical Journal. 2 p.

Zammit T. 1905. Preliminary note on the examination of the blood of goats suffering from Mediterranean fever. Rep. Of Royal Soc. Commission of Mediterranean Fever. Tomado de Huddleson. 3 p.