



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL.**

“CARACTERIZACIÓN DE LA HEMOLISINA DE *Bacillus spp* RCC7
RESPONSABLE DE LA LISIS SELECTIVA DE ERITROCITOS DE AVE
(*Gallus gallus*) EMPLEADA EN DOS TÉCNICAS HEMATOLÓGICAS”
TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS.

PRESENTA:

Adriana Beatriz Álvarez Pérez.

TUTOR:

Dr. Juan Carlos Del Río García.

UNAM FES-Cautitlan

Comité tutorial:

Dr. Guillermo Valdivia Anda.

UNAM FES-Cautitlan

Dr. Ernesto Ávila González.

UNAM-FMVZ

México D.F. a Mayo 2014



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.

La autora de la presente, agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante dos años, con el número de registro 420492.

JURADO DE EXAMEN

ASESORES DE TESIS

Dr. Juan Carlos del Río García.

Universidad Nacional Autónoma de México,
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campus 4.
FES-Cuautitlán UNAM
UNIGRAS
Unidad de Investigación Multidisciplinaria.
Laboratorio 14 "Alimentos-Micotoxinas-Micotoxicosis".

Dr. Guillermo Valdivia Anda

Universidad Nacional Autónoma de México,
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campus 4.
Unidad De Investigaciones Multidisciplinarias, Laboratorio 3.
Cuautitlán, Edo. de México.

Dr. Ernesto Ávila González.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Autónoma del Estado de México.

DEDICATORIAS

AGRADECIMIENTOS

DATOS BIOGRÁFICOS

Adriana Beatriz Álvarez Pérez

Estudiante del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Realizó la Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia 2005-2010 en la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Estado de México.

Ha participado como ponente en diferentes congresos: 6° Curso internacional de Medicina Veterinaria aplicada a reptiles y anfibios y 3° congreso internacional de Medicina Veterinaria de reptiles y anfibios en la modalidad de participación oral, Noviembre 2011 con el trabajo "Evaluación de la capacidad hemolítica del sobrenadante de *Bacillus cereus* sobre eritrocitos de *Iguana iguana*" en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.

Es autora de un artículo de divulgación: "Evaluación de la capacidad hemolítica del sobrenadante de cultivo de cepas de *Bacillus cereus* sobre eritrocitos de Iguana (*Iguana iguana*)" en Avedila N° 63. 2013. Madrid España.

Estancia en la Universidad Complutense de Madrid del 01 de Marzo de 2013 a 01 de Julio de 2013 en la Unidad de Salud Animal en el laboratorio de COVEMI.

CONTENIDO

DEDICATORIAS.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
INDICE DE FIGURAS.....	III
INDICE DE CUADROS.....	IV
ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	
I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. ANTECEDENTES.....	10
III. JUSTIFICACIÓN.....	12
IV. HIPÓTESIS.....	13
V. OBJETIVOS.....	14
V. a Objetivos generales.....	14
V. b Objetivos particulares.....	14
VI. Metodología, Resultados y Discusión de Caracterizar bioquímicamente la cepa de <i>Bacillus</i> RCC7	15
.....	
VI. a Metodología.....	15
VI. b Resultados.....	15
VI. c Discusión.....	16
VI. d Conclusión.....	16
VII. Metodología, Resultados y Discusión sobre la Estandarización de la prueba de actividad hemolítica de <i>Bacillus</i>.....	17
VII. a Metodología.....	17

VII. b Resultados.....	18
VII. c Discusión.....	18
VII. d Conclusión.....	19
VIII. Metodología, Resultados y Discusión sobre la Separación de la proteína con actividad hemolítica de <i>Bacillus</i>.....	19
VIII. a Metodología.....	31
VIII. b Resultados.....	35
VIII. c Discusión.....	41
VIII. d Conclusión.....	42
IX. Metodología, Resultados, Discusión y Conclusión de establecer la concentración ideal de la hemolisina para lisar eritrocitos de ave (<i>Gallus gallus</i>) sin afectar a los leucocitos.....	45
IX. a Metodología.....	45
IX. b Resultados.....	45
IX. c Discusión.....	46
XI. d Conclusión.....	46
X. Metodología, Resultados, Discusión y Conclusión de Determinar el uso de la actividad hemolítica en la técnica manual y comparar y comparar el método manual tradicional con el automatizado.....	46
X. a Metodología de la investigación.....	46
X. b Resultados.....	47
X. c Discusión.....	60
X. d Conclusión.....	63
XI LITERATURA CITADA.....	29
XII ANEXO	
XII. A Figuras	
XII. b Cuadros	

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Grupos celulares en la sangre de: a) pollo, <i>Gallus gallus</i> (Heterófilo), (E) Eosinófilo, (B) basófilo, (M) monocito, (L) linfocito y (T) trombocito.....	35
Figura 2. Gráfica de fragilidad osmótica.....	35
Figura 3. Cinética de absorción a 340 nm de glóbulos rojos suspendidos en agua deionizada y PBS.....	36
Figura 4. Cinética de absorción a 450 nm de glóbulos rojos suspendidos en agua deionizada y PBS.....	37
Figura 5. Cinética de absorción a 540 nm de glóbulos rojos suspendidos en agua deionizada y PBS.....	38
Figura 6. Cinética de absorción a 690 nm de glóbulos rojos suspendidos en agua deionizada y PBS.....	39
Figura 7. Relación entre la cantidad de glóbulos rojos de ave y la absorbancia a 690 nm.....	40
Figura 8. Cinética de absorción a 340, 450 y 690 nm de glóbulos rojos utilizando el sobrenadante de <i>Bacillus cereus</i> cepa RCC7.....	41
Figura 9. Filtración en columna con sephadex.....	42
Figura 10. Titulación de hemólisis en microplaca de fondo en U de los sobrenadantes de la cepa RCC7 de <i>Bacillus cereus</i> en sangre completa al 2 % de <i>Gallus gallus</i> con diferentes tiempos de congelación.....	43
Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida del sobrenadante de cultivo de la cepa RCC7 de <i>Bacillus cereus</i> teñido con nitrato de plata.....	44
Figura 12. Titulación de hemólisis en microplaca de fondo en U de los precipitados 50%, 60% y 70% de la cepa RCC7 de <i>Bacillus cereus</i> en sangre completa al 2 % de <i>Gallus gallus</i>	45
Figura 13. Titulación de hemólisis en microplaca de fondo en U de las combinaciones de precipitados 50%+60%, 50%+70%, 60%+70% de la cepa RCC7 de <i>Bacillus cereus</i> en sangre completa al 2 % de <i>Gallus gallus</i>	46

Figura 14. Gel de electroforesis de la fracción 50% y del precipitado 25.....	47
Figura 15. Frotis de eritrocitos de ave (<i>Gallus gallus</i>) tratados con la fracción 25 del precipitado al 50%.....	48
Figura 16. Fragilidad osmótica de eritrocitos de ave (<i>Gallus gallus</i>) utilizando como anticoagulante Heparina.....	49
Figura 17. Fragilidad osmótica de eritrocitos de ave (<i>Gallus gallus</i>) utilizando como anticoagulante citrato de sodio.....	50
Figura 18. Fragilidad osmótica de eritrocitos de ave (<i>Gallus gallus</i>) utilizando como anticoagulante EDTA.....	51
Figura 19. Correlación de la cantidad de glóbulos rojos del método manual con el método automatizado utilizando 70 µL de lisante.....	52
Figura 20. Correlación de la cantidad de glóbulos rojos del método manual con el método automatizado utilizando 110 µL de lisante.....	53
Figura 21. Correlación de la cantidad de glóbulos blancos del método manual con el método automatizado utilizando 70 µL de lisante.....	54
Figura 22. Correlación de la cantidad de glóbulos blancos del método manual con el método automatizado utilizando 110 µL de lisante.....	55
Figura 23. Correlación de la cantidad de linfocitos del método manual con el método automatizado utilizando 70 µL de lisante.....	56
Figura 24. Correlación de la cantidad de linfocitos del método manual con el método automatizado utilizando 110 de lisante.....	57
Figura 25. Correlación de la cantidad de monocitos del método manual con el método automatizado utilizando 70 µL de lisante.....	58
Figura 26. Correlación de la cantidad de monocitos del método manual con el método automatizado utilizando 110 µL de lisante.....	59
Figura 27. Correlación de la cantidad de granulocitos del método manual con el método automatizado utilizando 70 µL de lisante	60
Figura 28. Correlación de la cantidad de granulocitos del método manual con el método automatizado utilizando 110 µL de lisante.....	61

Figura 29. Gráfica de medias para intervalos HSD de Tukey para Glóbulos rojos de aves (<i>Gallus gallus</i>) sometidos a diferentes tratamientos.....	62
Figura 30. Gráfica de medias para intervalos HSD de Tukey para Glóbulos blancos de aves (<i>Gallus gallus</i>) sometidos a diferentes tratamientos.....	63
Figura 31. Gráfica de medias para intervalos HSD de Tukey para linfocitos de aves (<i>Gallus gallus</i>) sometidos a diferentes tratamientos.....	64
Figura 32. Gráfica de medias para intervalos HSD de Tukey para monocitos de aves (<i>Gallus gallus</i>) sometidos a diferentes tratamientos.....	65
Figura 33. Gráfica de medias para intervalos HSD de Tukey para granulocitos de aves (<i>Gallus gallus</i>) sometidos a diferentes tratamientos.....	66

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Morfología y características de tinción de las distintas células sanguíneas.....	67
Cuadro 2. Valores hematológicos.....	68
Cuadro 3. Comparación de los resultados de las pruebas bioquímicas de <i>Bacillus</i> cepa RCC7 con los de la cepa de <i>Bacillus cereus</i> de referencia.....	69
Cuadro 4. Actividad específica del sobrenadante de cultivo de <i>Bacillus cereus</i>	70
Cuadro 5. Actividad específica de las fracciones del sobrenadante de cultivo de la cepa RCC7 de <i>Bacillus cereus</i>	71
Cuadro 6. Actividad específica de la combinación de fracciones obtenidas del sobrenadante de cultivo de la cepa RCC7 de <i>Bacillus cereus</i>	72
Cuadro 7. Actividad específica de la combinación de fracciones obtenidas del sobrenadante de cultivo de la cepa RCC7 de <i>Bacillus cereus</i>	73
Cuadro 8. Eritrocitos incubados a diferentes tiempos con sobrenadante y fracción 26.....	74

ABREVIATURAS

BM: Bandas marginales

IBV: Virus de Bronquitis infecciosa.

AST: Agar Soya Trypticaseína

MIO: Motilidad, Indol Ornitina

LIA: Lisina Hierro Agar

TSI: Triple Azúcar Indol

CHT: Caldo Todd Hewitt

PBS: Solución buffer fosfato.

UIMSA: Unidad de Investigación multidisciplinaria de salud animal.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue comparar el método manual tradicional con el método automatizado utilizando la hemolisina de *Bacillus spp* cepa RCC7 que causa lisis selectiva de eritrocitos de *Gallus gallus*.

Se utilizaron 12 muestras de sanguíneas provenientes del laboratorio de diagnóstico DIVET ® de Cuautitlán Edo. de México, las muestras de sangre se les realizó el conteo de leucocitos y eritrocitos mediante 4 métodos. El conteo manual tradicional mediante la técnica de Natt y Herrick, el conteo manual utilizando la hemolisina de *Bacillus cereus* cepa RCC7, en un contador electrónico de manera convencional como en los mamíferos, utilizando la hemolisina como prelisante, De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que en el contador automatizado se puede realizar la cuenta de eritrocitos sin usar algún prelisante y para los leucocitos utilizando la hemolisina HBL de *Bacillus cereus* se puede realizar el conteo de leucocitos, sin embargo, es necesario purificar la hemolisina.

Palabras clave: *Bacillus cereus*, leucocitos, *Gallus gallus*, hemolisina.

I. INTRODUCCIÓN

La biometría hemática es el estudio de las células sanguíneas en los animales en vivo, este estudio incluye determinaciones de eritrocitos, leucocitos y plaquetas o trombocitos.¹

En la actualidad las determinaciones pueden ser realizadas por métodos manuales o mediante contadores electrónicos. En ambos métodos se requiere que los eritrocitos sean lisados para permitir el conteo de los leucocitos, en el caso de los mamíferos que tienen eritrocitos sin núcleo este proceso es relativamente sencillo, sin embargo, en el resto de las especies animales la lisis de eritrocitos es difícil llevar a cabo, por lo que se requieren acciones indirectas para poder calcular el número de leucocitos. Tinciones como Wright's y May-Grunwald-Giemsa son más útiles y proveen mejor diferenciación de leucocitos, trombocitos y eritrocitos inmaduros.¹

HEMATOLOGÍA AVIAR

Eritrocitos

Los eritrocitos de las aves son de forma elíptica con núcleo oval, localizado en el centro, típicamente los eritrocitos tienen un color uniforme.

Los eritrocitos y trombocitos sanguíneos tienen núcleo. La vida media de un eritrocito de aves es 35 días.²

La función principal asociada con estas células es el transporte de oxígeno, pero también se le atribuye la interacción con el sistema inmunológico. Algunos estudios reportan que los eritrocitos de los vertebrados son capaces de respuestas funcionales a la infección viral.³

En aves de un día de nacimiento la sangre representa un 8.7% del peso corporal y este porcentaje va disminuyendo con la edad, siendo de un 4.6% del peso vivo al momento de alcanzar su madurez sexual.⁴

Se han realizado distintos estudios acerca del citoesqueleto de eritrocitos nucleados, utilizando eritrocitos de *Galeorhinus galeus* (cría de tiburón) donde evaluaron las bandas marginales (BM), en donde los resultados apoyan la idea de

que la principal función de las BM en los eritrocitos maduros, es resistir la deformación.⁵

Leucocitos

Los leucocitos (Figura 1) cumplen una función defensiva frente a la entrada de partículas extrañas en el organismo. La cantidad de ellos en la sangre se mantiene constante en casos normales por que los productos resultantes de su desintegración, ejercen una acción estimulante en la neoformación, esta constancia de células constituye la formula leucocitaria normal, pudiendo estar alterada bajo condiciones anormales por ejemplo las que ocurren con severas toxemias o asociadas con una infección aguda.

La leucocitosis es provocada por bacterias, hongos, pueden ser el resultado de traumas en tejidos con necrosis masiva, neoplasia con necrosis extensiva en tejidos.

En contraste una heterofilia con una leucocitosis total es posiblemente un indicador de una infección subaguda.

La leucocitosis puede resultar del uso de glucocorticoides o como resultado del estrés, sin embargo, en este caso la leucocitosis es usualmente de leve a moderada, si la heterofilia es dominada por heterófilos inmaduros puede indicar una severa infección la cual destruye un gran número de la población de heterófilos maduros resultando en la rápida movilización de las células inmaduras de tejido hematopoyético en la cavidad medular.⁶

Heterófilos

Los heterófilos son células polimorfonucleares, en tejido vivo usualmente son redondos, presentan cuerpos fusiformes o baciloides dentro del citoplasma, que adquieren una coloración ácida con distintas tinciones rutinarias.⁶

Los heterófilos forman la primera línea de defensa contra la invasión de patógenos microbianos, tienen capacidad fagocítica, en sus gránulos contienen fosfatasa ácida, β -glucoronidasa, esterase inespecífica, pero en contraste a lo neutrófilos de mamíferos, carecen de mieloperoxidasa y dependen primariamente de mecanismos no oxidativos para la actividad antimicrobiana. Las betas

defensinas encontradas en gránulos de heterófilos pueden matar una gran variedad de bacterias patógenas.⁷

La activación de heterófilos es por patógenos o por citoquinas que inducen la expresión de varias citoquinas proinflamatorias las IL-1, IL-6 e IL-8.⁸

Durante la entrada de microbios a el pulmón, hay una entrada de heterófilos, y componentes complementarios de la sangre. La entrada de heterófilos es la primera línea de defensa celular en el tracto respiratorio debido a la ausencia de fagocitos pulmonares.⁹

También, heterófilos recuperados por lavados respiratorios aumentan a partir del 1 día de infección post-IBV y llegan a un pico a los 3 días después de la infección.¹⁰

Heteropenia: Este puede ocurrir como una temprana infección viral.¹¹

Monocitos

Proviene de la médula ósea en donde se encuentran en forma de promonocitos, ocasionalmente están en tejidos para una posterior diferenciación a macrófagos maduros⁶, son células grandes, su citoplasma es poco abundante y su núcleo de contorno irregular¹², tienen una exitosa respuesta a infecciones de bacterias. Sin embargo un monocito tarda de 4 a 5 días en madurar; estas son células que relativamente tienen una larga vida y pueden sobrevivir hasta 45 días. *Chlamydoiphila* puede ser fagocitada por estas células sin embargo permanece viable dentro de los monocitos alrededor de 45 días.¹¹

Eosinófilos

Los eosinófilos poseen gránulos redondos, citoplasma azulado. Las aves rapaces sanas poseen un número elevado de eosinófilos.

Un incremento en eosinófilos, no necesariamente indica una infestación parasitaria. Esto también puede ser indicativo de un retraso de hipersensibilidad.

Basófilos

Célula de pequeño tamaño con gránulos intensamente basófilos.

Este leucocito se cree que lleva la misma función en aves como en mamíferos, empiezan involucrados en la fase temprana de inflamación aguda y reacciona en neoplasmas.¹³

Linfocitos

Posee un núcleo normalmente redondo y central, con cromatina condensada. Citoplasma basófilo. Se diferencian tres poblaciones celulares (medianos, pequeños y grandes).

Linfopenia: Este usualmente indica una infección viral crónica que pudo ser causada por estrés continuó exceso de corticoides

Trombocitos.

Trombocitosis. Es respuesta a una infección bacteriana o como resultado de una hemorragia excesiva.

Trombocitopenia: Resultado de una severa septicemia o pobre colección en la técnica de obtención de sangre.¹¹

Conteo de leucocitos

El sistema Unnopette 365877 se desarrolló originalmente para determinar los eosinófilos en hematología humana, pero se ha empleado para hacer el conteo de leucocitos totales en aves. En este sistema se utilizan 25 µL de sangre completa y 0.755 mL de diluyente Floxina B al 1%, a una dilución de 1:32.

Para hacer el conteo diferencial y el conteo absoluto de leucocitos, el frotis debe examinarse 1,000 x. La zona topográfica recomendada es el borde del frotis de sangre.

En términos generales deben contarse 100 leucocitos y clasificarse según las características morfológicas y de tinción. El conteo de leucocitos diferencial se expresa como un porcentaje de los grupos de células individuales. El porcentaje de cada grupo celular se convierte en números absolutos haciendo referencia a los leucocitos totales utilizando la siguiente formula:

$$\frac{\% \text{ de leucocitos contados} \times \text{leucocitos totales}}{100} = n^{\circ} \text{ absoluto} \times 10^9 \text{L}$$

Las tinciones que se utilizan habitualmente incluyen Wright, Giemsa, Wright-Giemsa, Leishman, Wright-Leishman, Grünwald y May-Grünwald-Giemsa.

Conteo de trombocitos.

El conteo de trombocitos se realiza cuando se hace el conteo diferencial de leucocitos.

Fragilidad osmótica del eritrocito.

Es la medida de resistencia de los eritrocitos a la hemólisis por estrés osmótico. La capacidad de los glóbulos rojos de mamíferos para resistir la hipotonicidad viene dada por su forma bicóncava, lo que le permite que la célula pueda aumentar su volumen hasta un 70% antes que la membrana celular expandida se lise.¹⁴

La fragilidad osmótica puede ser expresada como la concentración de NaCl que causa el 50% de hemólisis (Figura 2).

Bacillus cereus

Es un bacilo gram positivo esporulado, anaerobio facultativo, β hemolítico en agar sangre de carnero, la destrucción tisular está mediada por enzimas citotóxicas como la cereolisina y la fosfolipasa C.¹⁵

Las hemolisinas son proteínas que pueden alterar las membranas de las células huésped debido a un efecto enzimático o detergente. Esta actividad hemolítica se demuestra en el laboratorio por la lisis que tiene lugar alrededor de las colonias de bacterias cuando crecen en agar sangre. Para los microorganismos es importante la capacidad de producir hemolisina para alterar la membrana citoplasmática de los fagocitos, comprometiendo así la acción de estas células.¹⁶

Bacillus cereus produce varios factores de virulencia, entre los cuales se incluyen: la enterotoxina Nhe es sintetizada y liberada durante la fase de crecimiento logarítmico a una temperatura de 32° a 37°¹⁷, está compuesta de tres genes *NheA*, *NheB* y *NheC*, un incremento de la *NheC* reduce la actividad toxica¹⁸, la actividad citotóxica de Nhe en células epiteliales ha sido demostrada debido a una lisis osmótica coloidal seguida la formación de poros en la membrana plasmática.¹⁹

La hemolisina BL es un sistema lítico de membrana, compuesto de 3 proteínas antigénicamente distintas llamadas B, L₁, L₂ (35, 36, y 45 KDa,

respectivamente)²⁰, estas tres proteínas son secretadas independientemente y las tres son necesarias para la máxima actividad biológica, se ligan a los eritrocitos independientemente y la asociación en la membrana de los componentes BL forman un complejo de ataque, que causa lisis por un mecanismo de colóide osmótico²¹, en donde el componente B se liga a la célula blanco permitiendo al componente L ligarse y aumentar la permeabilidad resultando en hemólisis²⁰.

La Cereolisina O (Hemolisina I) es una toxina formadora de poros largos, tiene la propiedad de adherirse selectivamente al colesterol en la membrana de las células eucariotas, consiste en formar una interacción como monómero, con las células blanco por su receptor de colesterol, siguiendo una subsecuente oligomerización y la inserción en la membrana celular. Este proceso resulta en serios daños a la membrana, con la formación de poros largos excediendo 150 Å que hace a la membrana celular permeable a pequeños solutos y largas macromoléculas, así conduce a la célula a una muerte rápida²², ésta emplea un amplia acción citolítica *in vitro* en células de mamífero, *in vivo* es hemolítica y con frecuencia tiene efectos sublécticos importantes en leucocitos y en la función de los macrófagos.²³

Hemolisina II (Toxina β-barril) es formadora de poros de la familia α – hemolisina de estafilococo, por lo general su actividad no es afectada por el colesterol²⁴, interactúa con macromoléculas de liposomas para formar heptámeros ordenados uniéndose con un poro de un diámetro interior de 1.5 a 2 nm y un diámetro exterior de 6 a 8 nm. Esta hemolisina es dependiente de la temperatura y las estructuras que forman poros varían entre la temperatura de 4 °C y 37 °C. Los canales formados por Hemolisina II son selectivos de aniones en bicapas de lípidos y muestran una creciente conductancia conforme la concentración de sal se incrementa. La primera interacción de la hemolisina II con la membrana no depende de la temperatura, en el primer tiempo si hay una alta concentración de sal los poros de la hemolisina II inducen un bajo voltaje y se observa un bajo potencial negativo²⁵.

Hemolisina III es dependiente de la temperatura, se une y forma poros y lisa eritrocitos²⁶.

Citotóxina K es una proteína citotóxica de 34 kDa necrótica y hemolítica similar a la α -hemolisina de *Staphylococcus aureus* ²⁷. Esta citotoxina puede estar en 2 formas la CytK 1 y CytK 2.¹⁸

Esfingomielinasa induce hemólisis en eritrocitos de oveja los cuales contienen grandes cantidades de esfingomielina ²⁸.

Cereolisina AB es un complejo citolítico de fosfatidilcolina hidrolasa y esfingomielinasa que actúan juntos en la hemólisis ²⁹, fosfatidilcolina y esfingomielinasa, rompen las porciones lipídicas que sirven para fijar las proteínas de la superficie celular, comprometiendo la integridad de la membrana celular y alterando las capacidades regenerativas de las células lesionadas ³⁰; la acción cooperativa de la fosfatidilcolina y la esfingomielinasa son necesarias para la lisis de eritrocitos de cerdos y humanos (22-31% fosfatidilcolina y 28-25% esfingomielinasa).

La Fosfatidilcolina aumenta el efecto hemolítico de BL solo en células que contienen una cantidad significativa de fosfatidilcolina (cerdos 22%; humanos 31%) ³¹, la fosfatidilcolina inhibe el efecto hemolítico de BL en eritrocitos de oveja (<2% fosfatidilcolina) y aumenta el modelo de hemólisis discontinuo que es característico de BL en agar sangre de carnero ³¹; la Fosfolipasa es similar a la α -toxina de *Clostridium perfringes*.³²

Enterotoxina T tiene una actividad biológica similar a BL y a la Nhe. ³³

Toxina emética su producción ocurre en la fase estacionaria ³⁴. Esta toxina actúa como un ionoporo catión, se va a la valinomicina, y después inhibe la actividad mitocondrial por inhibición de la oxidación ácida de la grasa ³⁵.

Anticoagulantes

EDTA

Ejerce una acción uniendo con fuerza el calcio iónico del plasma, lo que bloquea de forma eficaz la coagulación y la agregación de plaquetas, los cuatro hidrógenos simétricos de este pueden sustituirse por potasio, sodio o litio para formar sales más solubles.

Efecto quelante sobre el Ca ++, fijándolo pero sin llegar a precipitarlo ³⁶.

En algunas aves y reptiles la sangre se hemolisa cuando se recolecta con EDTA. En estas especies suele emplearse heparina como anticoagulante. El inconveniente de emplear heparina es que los leucocitos no se tiñen tan bien y que las plaquetas se agregan más que en la sangre conservada en EDTA ³⁷.

Heparina.

Es el único anticoagulante fisiológico. Sin embargo existe de manera sintética en forma Li, Na, K o amonio. Actúa como antitrombina, evitando la formación de trombina y por lo tanto de fibrina. Los leucocitos no se tiñen tan bien, y las plaquetas se agregan más que en la sangre conservada con EDTA.

La unión de la heparina a la antitrombina III acelera mucho la inhibición de la trombina por ello la coagulación; también se inhiben los factores de coagulación IXa, Xa y el complejo VII-TNF ³⁷.

Citrato de sodio.

Forma complejos con el calcio del plasma. El citrato ayuda a evitar el rápido deterioro de los factores lábiles de la coagulación, como los factores V y VII.

Produce contracción eritrocitaria con lo cual diluye el plasma. No sirve para ver morfología celular, ya que desarrolla con rapidez eritrocitos dentados, artefactos y deformación de células sanguíneas

II. ANTECEDENTES

Mast *et al.*, 1998 realizaron la diferenciación de monocitos de ave por citometría de flujo. ³⁸

Post *et al.*, 2003 evaluaron el método automatizado utilizando el Cell-Dyn 3500 para determinar la cantidad de glóbulos blancos en relación con la corticosterona. Donde encontraron diferencias significativas entre conteos microscópicos y conteos en el automatizado para el porcentaje de monocitos y basófilos.³⁹

Uchiyama *et al.*, 2005 Realizaron un estudio en células de *Gallus gallus*, en donde las células sanguíneas de codorniz fueron teñidas con colorantes fluorescentes lipofílicos (DiOC₆(3)), el conteo absoluto de eritrocitos, granulocitos, monocitos, fue obtenido por citómetro de flujo, en este método se observó que no se pudo distinguir entre linfocitos y trombocitos; debido a que hay afinidad distinta por las membranas para los diferentes grupos celulares, y de acuerdo a lo reportado puede ser aplicado a diferentes especies de aves.⁴⁰

Viertlboeck y Göbel en 2007, utilizan un colorante fluorescente específico anion-lipofílico DiOC₆ (3) para la diferenciación y conteo de trombocitos de codorniz y células sanguíneas de pollo.⁴¹

Boever *et al.*, en 2009 identifican por citometría de flujo las subpoblaciones de leucocitos de sangre de pollo y trombocitos para este trabajo se desarrolló un anticuerpo anti-pollo CD45 marcado con ficoeritrina para distinguir los leucocitos de núcleos de eritrocitos. Los leucocitos y trombocitos eran identificados mediante una combinación de su positividad CD45 y su dispersión lateral.⁴²

La identidad de las células CD45+ fue confirmada por la clasificación de subpoblaciones y posterior evaluación por microscopía de luz.

Weiss (2010) reporta que la citometría de flujo ha sido utilizada para el conteo de glóbulos blancos en codornices, gansos y gallinas. La técnica se basa en la diferente afinidad de los eritrocitos y los tipos de leucocitos por los tintes lipofílicos tal como la 3,3-dyhexylocarbocyanine (DiO) 6(3), permitiendo la

separación de las células de acuerdo a su fluorescencia. La incorporación de esta rutina en hematología es limitada por la necesidad de anticuerpos específicos de especie para los antígenos de leucocitos y la necesidad de tener un citómetro de flujo.⁴³

Cofas 2011 evaluó diferentes métodos de lisis selectiva en células sanguíneas de ave, para permitir la destrucción de eritrocitos nucleados sin afectar a los leucocitos, en este trabajos se aisló y caracterizó la cepa bacteriana RCC7 de *Bacillus cereus* que causó la hemólisis deseada, sin afectar a los leucocitos, logrando obtener un método de lisis distinto, para la cuantificación de leucocitos de aves, a partir de hemolisinas obtenidas.⁴³

En el 2011, Álvarez evaluó el sobrenadante de cultivo de 3 cepas diferentes de *Bacillus cereus* en sangre de *Iguana iguana*, obteniendo un mejor efecto con la cepa RCC7 de *Bacillus cereus*, sin embargo el sobrenadante de cultivo alteraba la forma de los glóbulos blancos.⁴⁴

III. JUSTIFICACIÓN

La biimetría hemática en *Gallus gallus* se realiza de forma manual, de tal manera que en la actualidad no se realiza el conteo mediante aparatos automatizados, debido a que el núcleo de los eritrocitos de aves provoca que el método automatizado utilizado en otras especies con eritrocitos anucleados provoque lecturas erróneas.

IV HIPÓTESIS

La hemolisina HBL de *Bacillus spp* RCC7 causará la lisis selectiva de eritrocitos sin afectar los leucocitos de ave (*Gallus gallus*), lo que permitirá realizar conteos de leucocitos en equipos automatizados.

V. OBJETIVOS

V. a Objetivo general

Obtener la hemolisina de *Bacillus spp* cepa RCC7 que causa lisis selectiva de eritrocitos de *Gallus gallus*, para realizar el conteo leucocitario mediante aparatos automatizados.

V. b Objetivos particulares

1. Caracterizar bioquímicamente la cepa de *Bacillus spp* RCC7
2. Estandarizar una prueba de determinación de la actividad hemolítica de *Bacillus spp*.
3. Separar la proteína con actividad hemolítica de *Bacillus spp* cepa RCC7, que causa lisis selectiva de eritrocitos de ave (*Gallus gallus*).
4. Establecer la concentración óptima adecuada de la hemolisina para lisar eritrocitos de ave (*Gallus gallus*) sin afectar morfológicamente a los leucocitos.
5. Determinar el uso de la actividad hemolítica en la técnica manual y comparar el método manual tradicional con el método automatizado utilizando la hemolisina de *Bacillus spp* cepa RCC7.

VI. METODOLOGÍA, RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

CARACTERIZAR BIOQUÍMICAMENTE A LA CEPA DE *Bacillus spp* RCC7

El presente trabajo se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (UNAM) en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en Salud Animal (UIMSA) en el laboratorio 3 y 14; en el Laboratorio Clínico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y en el laboratorio 2 de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de Veterinaria y Zootecnia ubicados en la carretera Teoloyucan. Estado de México.

VI. a Metodología

La cepa de *Bacillus spp* RCC7 fue obtenida del cepario del laboratorio 3 de la UIMSA aislada de las heces de un ave (*Gallus gallus*) por Cofas⁴³ esta cepa se encontraba en un vial de medio especial de mantenimiento, fue resembrada por estría en medio sólido Agar Soya Trypticaseína (AST) BBL® preparado de acuerdo a las especificaciones del fabricante; esta cepa se identificó mediante las siguientes pruebas: tinción de Gram, motilidad Indol Ornitina (MIO) BBL®, Lisina Hierro Agar (LIA) BBL®, Triple azúcar hierro (TSI) BBL®, licuefacción de gelatina BBL®, citrato de Simmons®, MR-VP, urea, glucosa, manitol, arabinosa, xilosa⁴⁶, degradación de lecitina en Agar yema de huevo de acuerdo con la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas ICMSF 2000 de cada observación se realizaron 6 repeticiones.

El laboratorio 5 (COVEMI) de la Universidad Complutense de Madrid donó una cepa de *Bacillus cereus* que fue aislada de un animal con diarrea, a esta cepa se le realizaron las mismas pruebas que a la cepa de *Bacillus spp* RCC7 y fue usada como cepa de referencia.

VI. b Resultados.

La morfología que se observó de la cepa de *Bacillus spp* RCC7 al ser sembrada en AST fue de colonias de 2 a 4 mm de diámetro, redondas, elevadas, irregulares, blancas, opacas, mucoides, se observaron bacilos Gram negativos. Mientras que al ser sembradas en MYH se observó un halo blanquecino alrededor de las colonias, el medio sin variación de color, en agar sangre se observó un halo

hemolítico alrededor de las colonias, los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas se observan en la Cuadro 3.

VI. c Discusión

De acuerdo con Mc Faddin ⁴⁵ *Bacillus cereus* es indol negativo, lecitinasa positivo, manitol negativo, citrato de Simmons positivo, ureasa variable, VP, positivo, son móviles excepto *Bacillus var. Mycoides* que es inmóvil, fermentación de hidratos de carbono negativo, en las pruebas realizadas a la cepa de *Bacillus spp* RCC7 se obtuvo una reacción negativa a indol, lecitinasa positivo, citrato se obtuvo crecimiento pero no viró el color en un 66.6% de las pruebas, y en el 33% de las pruebas se obtuvo crecimiento y hubo cambio de color en el pico de flauta, sin embargo, de acuerdo con Koneman ⁴⁶ la prueba también puede considerarse positiva sin que haya color azul, es decir, si hay desarrollo visible en la estría de siembra, se considera la prueba positiva, esto es válido porque para que el desarrollo sea visible, el microorganismo debió haber ingresado en la fase logarítmica del crecimiento, lo que solo es posible si ha asimilado carbono y nitrógeno; ureasa positivo, fermentación de hidratos de carbono negativo, esto indica que puede ser un *Bacillus cereus var. Mycoides*; de acuerdo con la ICMSF la degradación de lecitina, en con base a las pruebas bioquímicas es un *Bacillus cereus*, de acuerdo al manual Bergey ⁴⁷ debe ser catalasa positivo, VP +, manosa, manitol, arabinosa, xilosa negativo, citrato positivo, degradación de lecitinasa positivo, oxidasa negativo, sin embargo, el hecho de que no concuerde con todas las pruebas es porque de acuerdo con Ripabelli ⁴⁸ se reconocen 42 serovariedades, por lo tanto, es necesario realizar metodologías complementarias como PCR gyr B o detección de enterotoxinas para su identificación ⁴⁹.

VI. d Conclusión.

De acuerdo a las pruebas practicadas, la cepa con la que se realizó el trabajo corresponde con *Bacillus cereus*, sin embargo, no pudo ser determinada la variedad.

VII ESTANDARIZAR UNA PRUEBA DE DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLITICA DE *Bacillus cereus spp* cepa RCC7.

Para estandarizar una prueba de determinación de la actividad hemolítica, así como saber si la lisis del sobrenadante de cultivo lo hace a través de la formación de poros; se colectó sangre de *una gallina (Gallus gallus)* de la vena radial con una jeringa que contenía heparina a una concentración de 25 UI/mL.

De la sangre colectada se lavaron los glóbulos rojos, en un tubo se le agregaron 2.5 mL de PBS, el tubo se invirtió lentamente varias veces, se centrifugó a 7 gravedades por 10 minutos, se aspiró el PBS y la capa leucotrombocítica del tubo, se llenó nuevamente el tubo con 2.5 mL de PBS, se repitió el ciclo de lavado y centrifugado 2 veces más, finalmente, se preparó una suspensión de eritrocitos al 2% en PBS.

En una microplaca de 96 pozos de fondo plano, se colocaron 100 µL de PBS en cada pozo, se colocaron 100 µL de la suspensión de eritrocitos al 2% en el primer pozo y se efectuaron diluciones dobles seriadas, se realizó la lectura en el lector de ELISA a 340 nm, 450 nm, 540 y 690 nm, este experimento se repitió 6 veces (Figuras 3, 4, 5, 6).

En otra microplaca de 96 pozos de fondo plano, se colocaron 100 µL de agua desionizada en cada pozo, se colocaron 100 µL de una solución de sangre al 2% en el primer pozo y se realizaron diluciones dobles seriadas se realizó la evaluación en el lector de ELISA a 340 nm, 450 nm, 540 y 690 nm de longitud de onda, este experimento se repitió 6 veces (Figuras 3, 4, 5 y 6).

Para determinar la actividad hemolítica del sobrenadante de *Bacillus cereus spp* cepa RCC7 se utilizó otra microplaca de 96 pozos de fondo plano, se colocaron 100 µL de PBS en cada pozo, 100 µL del sobrenadante de cultivo de *Bacillus cereus spp* cepa RCC7 en el primer pozo y se realizaron diluciones dobles seriadas, se agregaron 100 µL de una suspensión de glóbulos rojos al 2% y se le realizó la evaluación en el aparato lector de ELISA a una longitud de onda de 690 nm utilizando sobrenadante, agua deionizada y PBS este experimento se repitió 6 veces (Figura 8). Las lecturas de absorbancia fueron promediadas y graficadas con su desviación estándar para cada longitud de onda.

Con la finalidad de observar la relación entre la turbidez a 690 nm y la cantidad de eritrocitos se realizó un conteo manual en el hemocitómetro en el líquido a las diferentes absorbancias, se graficó su correlación, agregando una línea de tendencia (Figura 7).

VII. b Resultados.

Se observaron distintos comportamientos en las distintas longitudes de onda (Figura 3, 4 y 5) donde a 340, 450 y 540 nm la absorbancia para glóbulos rojos y hemoglobina es muy similar, mientras que a 690 nm la hemoglobina no se observan diferencias a lo largo de las diferentes diluciones, mientras que para los glóbulos rojos si se observan diferencias en las distintas diluciones.

La relación entre la cantidad de glóbulos rojos de ave y la absorbancia a 690 nm es de 0.99; al realizar la comparación a 690 nm entre la sangre tratada con sobrenadante, sangre tratada con PBS se observa un comportamiento inversamente proporcional, mientras que la sangre tratada con agua deionizada no se observa diferencia de comportamiento a lo largo de las distintas diluciones.

VII. c Discusión

Al evaluar el comportamiento en las gráficas de los diferentes tratamiento de los glóbulos rojos en las longitudes de onda 340, 450, 540 (Figura 3, 4 y 5) se observa la hemoglobina libre en la solución y los glóbulos rojos la densidad óptica es similar, de manera que las curvas se observan paralelas sin embargo, en una longitud de 690 nm (Figura 6) se observa que la hemoglobina libre en la solución de glóbulos rojos su densidad óptica es alta mientras que para la hemoglobina en solución es baja y no se perciben cambios a lo largo de las distintas diluciones, sin embargo no se encontró estudio alguno en donde se empleara esta metodología para la determinación de hemólisis en el lector de ELISA, sin embargo, Mohler ⁵⁰, desarrolló un ensayo espectrofotométrico para el número de células en las suspensiones de células de cultivo de tejidos . Para cada tipo de célula probado, la absorbancia entre 650 y 800 nm era linealmente dependiente de la densidad celular en un intervalo de 50 veces y era independiente del color o la composición del medio en el que las células están suspendidas, lo que nos puede indicar que la absorbancia ideal para las células esta entre 650 y 690 nm.

VII.d Conclusión

La lectura ideal para los glóbulos rojos de gallina (*Gallus gallus*) es a 690 nm.

VIII. SEPARAR LA PROTEÍNA CON ACTIVIDAD HEMOLITICA DE *Bacillus spp* cepa RCC7 QUE CAUSA LISIS SELECTIVA DE ERITROCITOS DE GALLINA (*Gallus gallus*).

VIII. a Metodología de la investigación.

Para la producción de hemolisina se utilizó el Caldo Todd Hewitt (CHT) BBL® se preparó de acuerdo a las especificaciones del fabricante, una asada de la cepa de *Bacillus cereus* cepa RCC7 fue colocada en un tubo de ensayo que contenía 3 mL del medio, se incubó por 18 h a 37°C, los 3 mL fueron colocados en 47 mL del mismo medio en un matraz, éste se incubó a 37°C por 6 horas⁴⁴.

Una vez transcurrido el tiempo, el cultivo fue centrifugado (Eppendorf centrifuge 5403®) a 7 G por 10 minutos y se separó el sobrenadante del sedimento⁴³; con la finalidad de determinar si la actividad del sobrenadante se veía afectada por la conservación en congelación, el sobrenadante se conservó en congelación por 4 meses, se descongeló (a temperatura ambiente) 3 veces y se comparó la actividad con un sobrenadante recién obtenido, como control se utilizó el sobrenadante de *Escherichia coli* del cepario del laboratorio 3 de la UIMSA; en una microplaca de 96 pozos con fondo en "U", se colocaron 100 µL de PBS en cada pozo, 100 µL del sobrenadante de cultivo de *Bacillus cereus* cepa RCC7 sin congelar se realizaron diluciones dobles seriadas, se agregaron 100 µL de una solución de sangre al 2%¹⁹, esta microplaca se incubó por 2 horas a 37°C, se realizó una lectura visual, este procedimiento se realizó con los 3 sobrenadantes descongelados y la cepa control, a los sobrenadantes se les midió la cantidad de proteína por el método de Bradford⁵², se calcularon las unidades hemolíticas como se observa en el Cuadro 5 y se le realizó una electroforesis⁵¹, el gel se tiñó con nitrato de plata (Figura 11).

El sobrenadante de cultivo fue precipitado con sulfato de amonio saturado (761 g en un litro) al 50%, 60% y 70% de acuerdo con Beecher y Mac Millan ²⁰ con algunas modificaciones.

Para el precipitado con sulfato de amonio se colocaron 20 mL de sobrenadante de cultivo en un tubo de centrifuga, se agregaron 20 mL de sulfato de amonio saturado se agregó por goteo mediante un embudo de decantación a 0°C, se homogenizó, después se colocó a una temperatura de 4°C por 18 h, transcurrido el tiempo, se centrifugó a 7 gravedades por 20 minutos, se retiró el sobrenadante, y el sedimento del tubo se resuspendió en 5 mL de PBS.

Una vez resuspendido el sedimento, se colocó en una membrana de diálisis® preparada de acuerdo al fabricante, se lavó la membrana de diálisis de 12 cm en agua corriente por 3 horas para remover la glicerina, posteriormente, ésta se colocó en sulfito de sodio al 0.3% a 80°C por un minuto, inmediatamente se lavó con agua a 60°C por 2 minutos y finalmente se agregó ácido sulfúrico al 2%, esta membrana fue colocada en 1 litro de agua corriente por 3 h, transcurrido el tiempo se cambió el agua corriente por TRIS-HCl a 50 Mm a pH de 6.0 por 12 h, posteriormente, se filtró a través de un poro de 0.22 µm y se obtuvo el precipitado al 50%

A 36 mL del precipitado al 50 % obtenido, se le agregaron 4 mL de sulfato de amonio por goteo mediante un embudo de decantación para llevarlo al 60%, a 0°C, se homogenizó, después se colocó a una temperatura de 4°C por 18 h, transcurrido el tiempo se centrifugó a 7 gravedades por 20 minutos, se retiró el sobrenadante, y el sedimento se resuspendió en 5 mL de PBS.

Una vez resuspendido el sedimento, se colocó en una membrana de diálisis preparada de acuerdo al fabricante (Se lavó la membrana de diálisis de 12 cm en agua corriente por 3 horas para remover la glicerina, posteriormente esta se colocó en sulfito de sodio al 0.3% a 80° C por un minuto, inmediatamente se lavó con agua a 60°C por 2 minutos y finalmente se agregó ácido sulfúrico al 2%) esta membrana fue colocada en 1 litro de agua corriente por 3 h, transcurrido el tiempo se cambió el agua corriente por TRIS-HCl a 50 Mm a pH de 6.0 por 12 h, posteriormente se filtró a través de un poro de 0.22 µm y se obtuvo el precipitado

al 60%. Igual manera que el precipitado al 50%, a 36 mL del precipitado al 60% se realizó igual procedimiento para llevarlo al 70%.

A los precipitados 50%, 60% y 70 % se les midió la cantidad de proteína ⁵², se calcularon las unidades hemolíticas como se observa en el Cuadro 5.

En una microplaca de 96 pozos con fondo plano y en otra placa de fondo en “U”, se colocaron 100 de PBS en cada pozo, 100 μ L del precipitado 50% fueron colocados en el primer pozo y se realizaron diluciones dobles seriadas, se agregó 100 μ L de una solución de sangre al 2% ¹⁹, esta placa se incubó por 2 horas a 37°C, a ésta se le realizó una lectura visual en la placa de fondo en “U” y a la placa de fondo plano se le realizó una evaluación en un lector de ELISA a una longitud de onda de 690 nm, el procedimiento anterior se repitió 6 veces, simultáneamente se tomaron 20 μ L de cada pozo y se realizaron frotis y se tiñeron con Giemsa. El procedimiento anterior se repitió con los precipitados 60%, 70% y se realizaron combinaciones 50% + 60%, 50% + 70%, 60% + 70%(Figura 13 y Cuadro 6)

Filtración en columna

En una columna de vidrio se colocó fibra de vidrio (1 cm de grosor), 1 cm de grosor de arena fina, se le agregaron 50 mL de Sephadex G:80 lavado ⁵⁴, se esperó el empaquetamiento, posteriormente se le agregó arena de mar estéril (1 cm de grosor) se equilibró la columna con 50 mL de Tris-HCL a pH 6.0 (figura 9), una vez equilibrada la columna, se le adicionó 10 mL del precipitado al 50% y con un embudo de decantación se le agregaron 300 mL de Tris-HCL a pH 6.0 por goteo, se recuperaron 2 mL en tubos Eppendorf. Este paso anteriormente descrito se realizó con las fracciones 60% y 70%. A cada fracción obtenida se le midió la cantidad de proteína por el método de Bradford ⁵² y se calculó la actividad específica de cada fracción (Cuadro 5). En este trabajo solo se muestran los resultados significativos de este experimento.

Las fracciones obtenidas se colocaron en 2 microplacas de 96 pozos una con fondo en U y otra de fondo plano, en cada una, se colocaron 100 μ L de cada fracción en un pozo, y 100 μ L de una solución de sangre al 2% ¹⁹, se incubó por 2 horas a 37°C los resultados se observan en la figura 13, y se realizó una

determinación en el lector de ELISA, de cada fracción, se realizaron frotis y se tiñeron con Giemsa. En este trabajo solo se reportan los resultados significativos de este experimento (Figura 15).

Resultados.

El sobrenadante de cultivo de *Bacillus cereus* spp cepa RCC7 no se observaron diferencias a los diferentes tiempos de descongelamiento (Figura 11); en el gel de electroforesis del sobrenadante (Figura 12) se observa la presencia de distintas proteínas con un peso molecular que van desde 10 kD hasta 250 kD; mientras que al comparar al actividad de las precipitados 50%, 60% y 70% (Figura 13 y Cuadro 6) se observan distintas actividades donde la mayor cantidad de proteína es en el precipitado 50%, mientras que en el precipitado 70% se observa una mayor actividad específica, y al realizar la combinación de los distintos precipitados la mayor cantidad de proteína es en la combinación 50%+60%, la actividad específica es mayor en la combinación de la fracción 50%+70%, y en la combinación 60%+70% no existe actividad específica (Figura 14 y Cuadro 7).

En el filtrado 26 al realizar el frotis se (Figura 17) se observó la presencia de leucocitos intactos, pero no se observaron eritrocitos, también en el frotis se observaron distintos puntilleos en el fondo del frotis.

VIII. c DISCUSIÓN

Como se observa en la figura 11 el sobrenadante de cultivo de *Bacillus cereus* tiene una actividad hemolítica igual al congelarlo por 4 meses, porque no hay actividad de las proteasas y es estable a esta temperatura.

Una unidad hemolítica es definida como la cantidad de proteína que causa un 50 % de lisis a los eritrocitos ⁵⁴, la hemólisis es diferente en las distintas fracciones como se puede observar en la figura 13 hay mayor hemólisis en la fracción 50%, sin embargo, la mayor actividad específica es en la fracción 70%, esto se puede deber a que la proteína se concentra más en esta fracción. Sin embargo, al realizar precipitados y filtración en columna se obtienen distintas proteínas ²⁰ y al realizar combinaciones de las fracciones se obtiene un efecto inhibitorio por la existencia de mayor cantidad de alguna proteína ³¹, para algunas proteínas existe el fenómeno de zona, el cual consiste en que si hay un exceso de

alguna fracción de la proteína causa inhibición de la actividad y esto puede ser lo que está sucediendo al combinar las precipitaciones ,por lo tanto, disminuye la actividad

De acuerdo a lo observado en el gel de electroforesis figura 15 en la fracción 25 se observan bandas 30, 50, 70 y 100 kd lo que indica que podrían ser la proteína HBL de *Bacillus cereus* ya que la fracción B es de 45 KDa, L1 36 KDa y la L2 de 45 KDa ²⁰ pero también se observan otro tipo de bandas también pueden contribuir a la hemólisis de eritrocitos como son las citotoxinas que también pueden afectar a los leucocitos y resultar en conteos equivocados.

VIII. d Conclusión.

El sobrenadante sometido a varios procesos de descongelamiento no pierde la actividad hemolítica.

La hemolisina que causa lisis selectiva en eritrocitos de ave, es un conjunto de proteínas en las que destaca la HBL. Se requiere purificar la proteína.

IX ESTABLECER LA CONCENTRACIÓN IDEAL DE LA HEMOLISINA PARA LISAR ERITROCITOS DE GALLINA DOMÉSTICA (*Gallus gallus*) SIN AFECTAR LEUCOCITOS.

IX. a Metodología de investigación

Para poder utilizar la fracción 26 en el aparato automatizado es necesario establecer el tiempo y la concentración óptima y el tiempo en el cual se realiza la lisis de eritrocitos sin afectar a los leucocitos; para esto se obtuvo sangre contenida en heparina de la vena radial de una gallina doméstica (*Gallus gallus*) a una razón de 25 UI/mL.

La sangre de ave se aspiró en la pipeta de Thoma para glóbulos rojos hasta la marca 0.5, se limpió la parte exterior de pipeta y se aspiró sobrenadante hasta la marca 101 (Dilución 1:200), a la par en otra pipeta de glóbulos rojos se aspiró sangre hasta la marca 0.5, se limpió la parte exterior de la pipeta y se aspiró la fracción 25 hasta la marca 101 (Dilución 1:200), estas pipetas de glóbulos rojos se incubaron 4 horas a 37°C, a los 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos, 240

minutos, 480 minutos, se tomó una gota de estas pipetas y se realizó un frotis que fue teñido con Giemsa, a estos frotis se evaluó la morfología celular y se muestran los resultados más significativos de la morfología celular (Cuadro 7), este procedimiento se repitió con la fracción 26.

Resultados IX. b

A una concentración de 1/200 de sobrenadante, se observó que con el sobrenadante hasta los 120 minutos había lisis total de eritrocitos pero también se encontraba deformación de leucocitos, mientras que a una concentración de 1/200 con la fracción 26 había lisis a los 60 minutos sin presentar deformación de leucocitos (Cuadro 8)

XI. c Discusión.

De acuerdo a lo observado en la Cuadro 8 el sobrenadante tiene mayor cantidad de proteína, pero el de mayor actividad específica está en la fracción 26, esto puede ser porque en la fracción 26 se concentra toda la actividad, en el Cuadro 9 se observan los distintos comportamientos a diferentes tiempos esto se puede deber a que en la fracción 26 se encuentran distintos tipos de hemolisinas que actúan en distintos tiempos y a la afinidad de las hemolisinas a distintos componentes de los eritrocitos ⁵⁵, ya que la gallina doméstica (*Gallus gallus*) tiene de 125-200 mg de colesterol por cada 100 mL en suero, esto puede favorecer a la acción de algunas proteínas citolíticas que son dependientes del colesterol, y por lo tanto, que actúen primero sobre el eritrocito y después de algunos minutos puede empezar actuar una citotoxina que probablemente afecte a los glóbulos rojos de ave ³⁴.

XI. d Conclusión.

El tiempo óptimo de la fracción 26 para realizar la lisis sin afectar leucocitos es a los 60 minutos utilizando una dilución 1/200.

X. DETERMINAR LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA EN LA TÉCNICA MANUAL Y COMPARAR EL MÉTODO MANUAL TRADICIONAL CON EL MÉTODO AUTOMATIZADO UTILIZANDO LA HEMOLISINA DE *Bacillus spp* CEPA RCC7.

X a. Metodología de la investigación

Para realizar las pruebas para el uso de la fracción en el contador de células automatizado y para evaluar cómo es que realiza la destrucción de glóbulos rojos con el sobrenadante se realizó la prueba de fragilidad osmótica, para esto se utilizaron 3 muestras de sangre de gallina doméstica (*Gallus gallus*) de 0.4 mL de sangre completa de la vena radial, utilizando heparina como anticoagulante a razón de 25 UI/mL de sangre en una jeringa de 1 mL. En una serie de 10 tubos de 7 mL se colocaron 5 mL de NaCl a distintas concentraciones (0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%), a cada tubo se le agregaron 20 µL de sangre, se dejaron actuar por 10 minutos, transcurrido el tiempo se centrifugó a poner en g por 5 minutos; el sobrenadante fue decantado y colocado en una cubeta para su lectura en un espectrofotómetro a una longitud de 540 nm ⁵⁶. El porcentaje de hemólisis en cada concentración fue calculado realizando una regla de 3 en donde el valor de 100% de hemólisis se obtuvo colocando 20 µL de sangre en 5 mL de agua desionizada, los resultados obtenidos de las 3 repeticiones se promediaron y con los resultados se realizó la curva de fragilidad osmótica ⁵⁶ (Figura 16). Este procedimiento se repitió usando sangre con EDTA (Figura 17) a razón de 1,5 mg/mL de sangre y Citrato de Sodio (figura 18), de cada experimento se repitió 6 veces el promedio de las repeticiones se graficaron.

Una vez determinado el anticoagulante se colectaron 12 muestras de sangre de gallina doméstica (*Gallus gallus*) obtenidas de la vena radial contenidas en heparina a una razón de 25 UI/mL, estas muestras fueron procesadas el

analizador hematológico Abacus®, utilizando 3 cantidades de lisante que fueron 0.70 μL y 110 μL de lisante, a la par se realizó el conteo de glóbulos rojos, glóbulos blancos, monocitos, linfocitos y granulocitos por el método de Natt y Herrick y se realizó una prueba de correlación del método manual por el método de Natt y Herrick con el analizador hematológico Abacus® de los glóbulos rojos (Figura 19 y 20), linfocitos (Figura 23 y 24), monocitos (Figura 25 y 26), granulocitos (Figura 27 y 28), una vez determinada la cantidad de lisante en una pipeta de glóbulos rojos se aspiró sangre hasta la marca 0.5, se limpió la parte exterior de la pipeta y se aspiró la fracción 26 hasta la marca 101 (Dilución 1:200), se incubó a 37°C por 2 horas, se realizó la lectura de glóbulos rojos y blancos con en el analizador hematológico Abacus® usando 70 μL de lisante, a la par se realizó una lectura de glóbulos rojos, blancos por el método manual utilizando la técnica de Natt y Herrick. Se realizó una comparación con el método manual y el método automatizado y se realizó una prueba estadística de HSD de Tukey para glóbulos rojos (Figura 29), glóbulos blancos (Figura 29), granulocitos (Figura 30), monocitos (Figura 31) y linfocitos (Figura 32).

X. b Resultados

De los 3 anticoagulantes evaluados se observó un comportamiento similar en la prueba de fragilidad osmótica que van desde 0.55 % hasta 0.58% (Figura 16, Figura 17 y Figura 18).

Al realizar la correlación de glóbulos rojos, glóbulos blancos, monocitos, linfocitos y granulocitos se observó que para glóbulos rojos, glóbulos blancos, linfocitos y granulocitos con un 70 μL de lisante se observa un alta correlación entre el método manual y el método automatizado, mientras que para los monocitos no se observó ninguna correlación entre el método manual y las diferentes concentraciones de lisantes.

Al utilizar el método automatizado para el conteo de los glóbulos rojos y comparar con el método manual no se observaron diferencias, mientras que para los glóbulos blancos se observaron diferencias al comparar el método manual con el método automatizado, pero al realizar una prelisas con la fracción 26 y realizar la

medición en el automatizado no se observan diferencias entre el método manual y el método automatizado (Figura 29, Figura 30, Figura 31, Figura 32, Figura 33).

IX. c Discusión

De los 3 anticoagulantes evaluados, se observó un comportamiento similar en la prueba de fragilidad osmótica es muy similar ya que se obtuvieron los siguientes resultados que fueron 0.55 % para heparina, 0.54 % citrato de sodio 0.54% y 0.58% EDTA. Al comparar estos resultados con Benford ⁵⁶ donde este realizó un trabajo con eritrocitos de avestruz comparando a la heparina y al EDTA en este estudio se observó que la fragilidad osmótica es muy diferente entre estos dos anticoagulantes, reporta que en heparina es de entre 0.50% y 0.55%, mientras que en EDTA es de 0.85%, esto se puede deber a la diferente composición de los eritrocitos de los avestruces, también se han hecho otros estudios con eritrocitos nucleados en la carpa común (*Cyprinus carpio*) comparando entre el EDTA y la heparina en ese estudio se obtiene discrepancia entre los resultados obtenidos y entre los obtenidos en este trabajo, menciona que el EDTA induce un hinchazón en los eritrocitos y de las células que son destruidas se libera el núcleo y este cambia de forma oval a redonda ⁵⁷, también se demostró que el EDTA causa daño gradual a los eritrocitos ⁵⁷, lo que indica que depende la composición del eritrocito ya que en un estudio en patos demuestran que la contracción osmótica de los eritrocitos de pato induce una absorción neta de soluto a través de Na-K-2Cl co-transporte en un proceso que está regulado por una proteína sensible a la quinasa ⁵⁸ y esto se puede deber también principalmente a la cantidad de Ca que contienen los eritrocitos ya que los efectos del EDTA y el Ca afectan en el sistema de transporte de la membrana de las avestruces y en el efecto de las hormonas de transporte ⁵⁸.

Para evaluar la función inmune en las aves silvestres se emplea con frecuencia el conteo de leucocitos principalmente la relación heterófilos / linfocitos (H / L), sin embargo es importante procesar en el menor tiempo posible las muestras sanguíneas ya que de acuerdo con Andrew ⁵⁹ hay un aumento no significativo en las proporciones de heterófilos leucocitos con el tiempo, sin embargo,

Existen distintos tipos de aparatos que realizan el conteo de eritrocitos y leucocitos de manera automatizada, en este trabajo fue mediante impedancia. En este método se ha encontrado un coeficiente de variación (CV) <5% en mamíferos. Para las plaquetas de la CV fue <15%. CV de los diferenciales oscilaron entre 3% para grandes y 60% para las pequeñas poblaciones (monocitos). Se detectó una muy buena precisión entre los métodos para todos los mesurandos de eritrocitos y leucocitos. Plaquetas y diferenciales mostraron buena precisión en los caballos y los perros (excepto para los monocitos), mientras que para los gatos se requiere mejorar el software. En caso de resultados patológicos un control microscópico es obligatorio en perros, gatos y caballos.

En recién nacidos los conteos de leucocitos en aparatos automatizados que utilizan el principio de impedancia donde se observan lecturas erróneas por los números elevados de eritrocitos nucleados presentes durante el período neonatal, lo que puede ocurrir con la sangre de ave, ya que los eritrocitos son nucleados y tienen mayor resistencia, además de que al realizar el prelisado en la sangre de ave se pueden liberar núcleos y estos ser contados como leucocitos así como los trombocitos que también pueden ser contados como leucocitos.

Sin el empleo de la fracción 26 hay concordancia en el conteo de eritrocitos.

En las gráficas se observa que el contador hematológico electrónico, no sirve para el conteo de leucocitos ya que la lectura se incrementa debido a la liberación de los núcleos de los eritrocitos, mientras que aplicando el filtrado 26, la lectura de leucocitos es más aproximada a la lectura manual. El sobrenadante afecta a los leucocitos ya que hay una disminución de éstos en comparación del método manual. Utilizando la hemolisina en el método manual, en los granulocitos es donde se observa más diferencia entre tratamiento, esto puede deberse a la composición de los granulocitos como puede ser la cantidad de fosfolípidos en la membrana celular, así como al englobar distintas células el error aumenta, ya que el aparato podría estar contando algunos núcleos como granulocitos. Sin embargo, si hay elevada correlación.

IX. d Conclusión

Los anticoagulantes EDTA, heparina, citrato de sodio en gallinas domésticas (*Gallus gallus*) no afectan las características morfológicas y fisiológicas de los eritrocitos por lo que no influyen sobre los resultados.

El anticoagulante de elección para la toma de muestras es heparina, sin embargo, ninguno de los anticoagulantes en sangre de gallina doméstica por hemólisis influyen en los resultados, por tanto, para esta investigación se puede utilizar cualquier anticoagulante.

El filtrado 26 del precipitado 50% del sobrenadante de cultivo de la cepa RCC7 de *Bacillus cereus* permite efectuar el conteo de leucocitos por medio de contador de células automatizado. Es necesario purificar la proteína que realiza la lisis selectiva, ya que al realizar el gel de electroforesis se observa la presencia de diferentes proteínas de 30, 50, 70 y 100 kd para poder hacer una producción a nivel industrial y que su obtención sea de manera rápida.

X.I Literatura citada

1. Campbell TW, Ellis CK. Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology, 3°ed. USA: Blackwell Publishing Professional, 2007.

2. Stevens L., Avian Biochemistry and Molecular Biology Cambridge University 2004.

3. Morera D, Mackenzie SA. Is there a direct role for erythrocytes in the immune response. Vet. Res. 2011;42:89.

4. Angulo EA. Fisiología aviar. Español. 1 ed. Universidad Lleida 2009.

5. William DC, Bartelt D, Jaeger R, Langford G, Nemhauser. The cytoskeletal system of nucleated erythrocytes. Composition and function of major elements. Biol.1982;93(3): 828.

6. Andreasen JR, Andreasen CB, Anwer M, Sonn AEA. Heterofil chemotaxis in chicken with natural Staphiloccocus avian. Avian Dis. 1993; 37(2):284-289.

7. Barry G., Avian Heterophils in Inflammation and Disease Resistance. Poult. Sci. 1998;77:972–97.

8. Davison F., Kaspers B., Karel. AS. Avian Immunology. Elsevier 2008.

- 9. Harmon GB.**, Avian Heterophils in inflammation and disease resistance. Poult. Sci. 1998;77:972–977.
- 10. Fulton RM., Reed WM, Thacker HL.** Cellular response of the respiratory tract of chickens to infection with Massachusetts 41 and Australian T infectious bronchitis virus. Avian Dis. 1993;37:951–960.
- 11. Doneley B.** Avian Medicine and surgery in practice. Companion and aviary birds. Masson. Publishing 2010
- 12. Tizard.** Inmunología veterinaria. Interamericana 1989.
- 13. Coles B.** Avian Medicine & Surgery 2007
- 14. Greer JP., Foerster J., Rodgers MG., Parazkevas F., Glader B., Arber DA., Means RT.** Wintrobe's Clinical Hematology. Volume 1. USA. 2009.
- 15. Murray RM., KEN RS., Michael PA.,** Microbiología Médica 5º ed. España: Elsevier Mosby S.a., 2006.
- 16. Struthers JK, Westran PR.** Bacteriología Clínica 1º ed. Barcelona: Masson S.A., 2003
- 17. Spira WM, Goepfert JM,** *Bacillus cereus*-induced fluid accumulation in rabbit ileal loops. Appl. Microbiol. 1972;24:341-348.
- 18. Fagerlund A., Ween O., Lund T., Hardy SP., Granum PE.,** Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. Microbiol. 2004;150(8):2689-97.
- 19. Fagerlund, A.; Lindbäck, T.; Storset, A.K.; Granum, P.E.; Hardy, S.P.** *Bacillus cereus* *Nhe* is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. Microbiol. 2008;154:693–704
- 20. Beecher DJ, MacMillan JD,** Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Infect. Immun. 1991;59(5): 1778–1784.
- 21. Beecher DJ, Wong AC,** Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interactions and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. Biol. Chem. 1997. 272(1):233-9.
- 22. Cossart P, Boquet P, Normaik S, Rappuoli R,** Cellular microbiology 2º ed Washington D.C. 2005.

- 23. Drobniowski AF**, *Bacillus cereus* and related species. Clin. Microbiol. Reviews. 1993.
- 24. Coolbaugh JC, Williams RP**, Production and characterization of two hemolysins of *Bacillus cereus*. Can J Microbiol. 1978;24(11):1289-95.
- 25. Andreeva IZ, Nesterenko FV, Fomkina GF, Ternovsky IV, Suzina EN, Bakulina YA**. The properties of *Bacillus cereus* hemolysin II pores depend on environmental conditions. Biochim. Biophys. Acta-Biomembr. 2007; 253-263.
- 26. Baida GE., Kuzmin NP**. Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*. Biochim. Biophys. Acta. 1996;1284:122-24.
- 27. Lund T., Buyser ML., Granum PE**. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. Mol. Microbiol. 2000;38: 254.
- 28. Odaa M, Takahashia M, Matsunoa T, Uooa K, Nagahamaa M, Sakurai J**, Hemolysis induced by *Bacillus cereus* sphingomyelinase. Department of Microbiology. 2010;1798(6):1073-80.
- 29. Gilmore MS, Cruz-Rodz AL, Leimeisterwächter MJ, Goebel WA**. *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes: nucleotide sequence and genetic linkage. Bacteriol., 1989;171(2):744-753.
- 30. Allen W. Koneman J. Schreckenberger P**. Diagnostico microbiologico 6° ed. Panamericana, 2008.
- 31. Douglas JB, Wong CLA. Cooperative**, synergistic and antagonistic hemolytic interactions between hemolysin BL, phosphatidylcholine phospholipase C sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. Microbiology 2000.
- 32. El-sayed MY, Roberts MF**. Lanthanide derivatives of phospholipase C from *Bacillus cereus*. Biochim. Biophys. 1983;4(6):324-338.
- 33. Choma C., Granum PE**. The enterotoxin T (BcET) from *Bacillus cereus* can probably not contribute to food poisoning. FEMS Microbiol. Lett. 2002;217(1):115-9.
- 34. Shaheen R., Andersson MA., Apetroaie C., Schulz A., Ehling-Schulz M., Ollilainen VM., Salkinoja-Salonen MS**. Potential of selected infant 48 food

formulas for production of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. Int. J. Food Microbiol. 107, 2006:107(3):287-94

35. Dierick K, Van CE., Swiecicka I., Meyfroidt G, Devlieger H., Meulemans A. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. Clin. Microbiol. 2005:43(8): 4277–4279.

36. Vives JL., Vives C., Bascompte A. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. 3° a ed. Masson. 2006.

37. Meyer D.J. Medicina laboratorial veterinaria interpretación y diagnosis. Manuales practicos. 3 ° ed. 2007.

38. Mast J., Goddeeris B., Peeters K., Vandesande F., Berghman L., Characterization of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01. Veterinary Immunology and Immunopathology, 1998:61:343-357.

39. Post JT, Hummer M. Automated Blood Cell Count: A Sensitive and Reliable Method to Study Corticosterone-Related Stress in Broilers. 2003 Poult. Sci. 2000:82(4):591-5

40. Uchiyama R., Morimoto, T Kai, O., Uwatoko K., Inoue, Y Nakanishi, T. Counting absolute number of lymphocytes in quail whole blood by flow cytometry. Avian Pathol. 2005:67:441-444.

41. Viertlboeck BC., Göbel TW. Chicken thrombocytes express the CD51/CD61 integrin. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2007:119, 137-141. 2007.

42. Boever CS, Demeyere KL, Backer PM. Flow cytometric differentiation of avian leukocytes and analysis of their intracellular cytokine expression. Avian Pathol. 2010:39:41-46.

43. Cofas R.C. Establecimiento de métodos de lisis de eritrocitos para el conteo de los leucocitos de ave. (Tesis de licenciatura), México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, 2011.

44. Álvarez AP. Evaluación de la capacidad hemolítica del sobrenadante de las cepas de *Bacillus cereus* sobre eritrocitos de Iguana iguana. (Tesis de licenciatura), México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, 2011.

45. **Mc Faddin** Diagnostico Microbiologico. 6° edición. Ed panamericana. 1980
46. **Koneman, Winn A., Jenda P., Schreckenberger W.**, Diagnostico Microbiológico Texto y atlas en color. 6° edición. Ed panamericana 2006.
47. **Bergey**, Manual of Systematic Bacteriology. 2° edition, volumen 3. 2009
48. **Ripabelli G, McLaughlin J, Mithani V, Threlfall EJ.** Epidemiological typing of *Bacillus cereus* by amplified fragment length polymorphism. Appl. Microbiol 2000:358-363.
49. **Quispe MJ, Calderon RI.** Identificación de aislamientos de *Bacillus cereus* procedentes de papilla utilizando PCR como complemento a metodologías de cultivo convencional. Informe 61. Instituto Nacional de Salud. 2007:61.
50. **Mohler WA, Charlton CA, Blau HM.** Spectrophotometric quantitation of tissue culture cell number in any medium. BioTechniques 1996:21(2):260-2.
51. **Hussain, A Carlino, M J Madonna and J O Lampen.** Cloning and sequencing of the metallothioprotein beta-lactamase II gene of *Bacillus cereus* 569/H in *Escherichia coli*. 1985:164(1): 223–229.
52. **Bradford M.M.**, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - Dye Binding, Anal. Biochem. 1976:72:248-254.
53. **Dieter HH, Gómez J, Lascano EC.**, 2006. Segundo Taller. Taninos en la Nutrición de Rumiantes en Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 2006.
54. **Yadav SP, Ahmad A, Pandey BK, Singh D, Asthana N, Verma R, A** peptide derived from the putative transmembrane domain in the tail region of *E. Coli* toxin hemolysin E assembles in phospholipid membrane and exhibits lytic activity to human red blood cells: Plausible implications in the toxic activity of the protein. INDIA: Molecular and structural biology division, central drug research institute. 2008.
55. **Gradinski-Vrbanac, B., Z. Stojević, S. Milinković- Tur, T. Balenović, J. Piršljín and M. Zdelar-Tuk.** *In vitro* susceptibility of duck, chicken, and pig erythrocyte lipids to peroxidation. Vet. Med. – Czech, 2002:47:303-308.

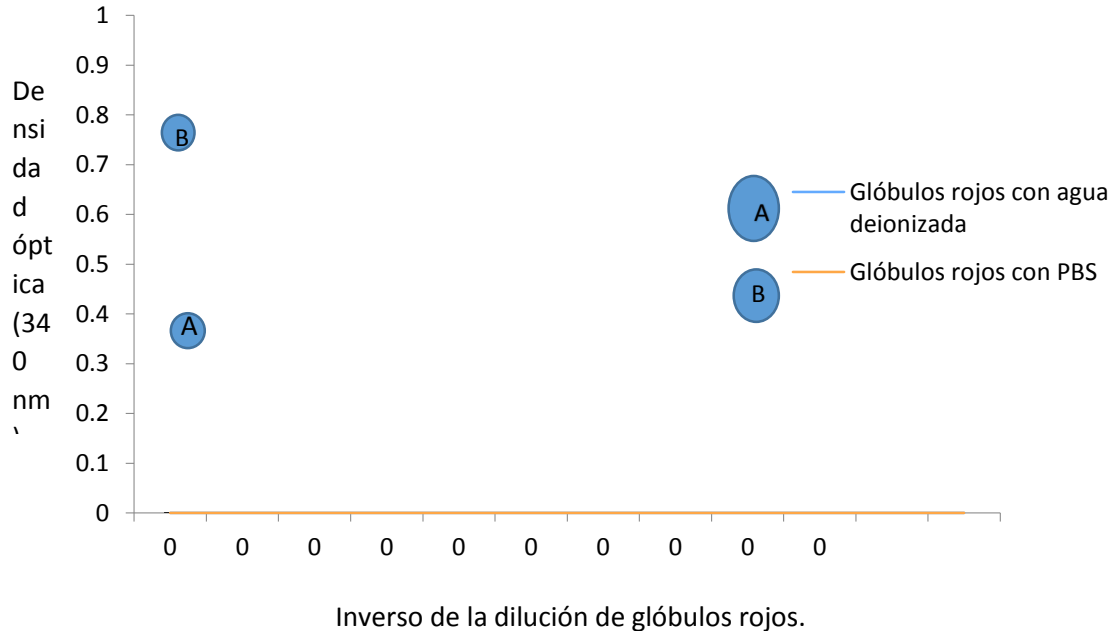
56. Benford M. Kennedy HE., The effect of EDTA, heparin and storage on the erythrocyte osmotic fragility, plasma osmolality and hematocrit of adult ostriches. (*Struthio camelus*). Veterinarski arhiv. 2007:77(5):427-434.

57. Turk T. Disodium EDTA used as anticoagulant causes hemolysis in common carp blood Turk. Vet. Anim. 2011:35(2):99-104.

58. Lyttle

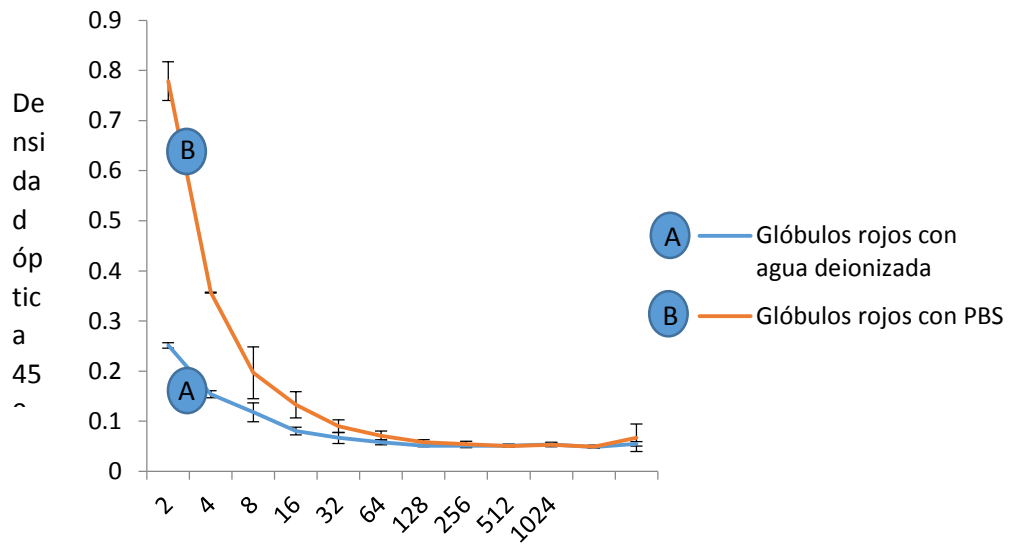
59. Andrew KD. Effect of handling time and repeated sampling on avian white blood cell counts. Field Ornithol. 2005:76(4):334-338

Figura 3. Cinética de absorción a 340 nm de glóbulos rojos suspendidos en agua desionizada y PBS.



Se realizaron diluciones dobles seriadas de glóbulos rojos, empleando agua deionizada y PBS y se determinó la densidad óptica a 340 nm; se graficó el promedio de las 6 repeticiones con su desviación estándar.

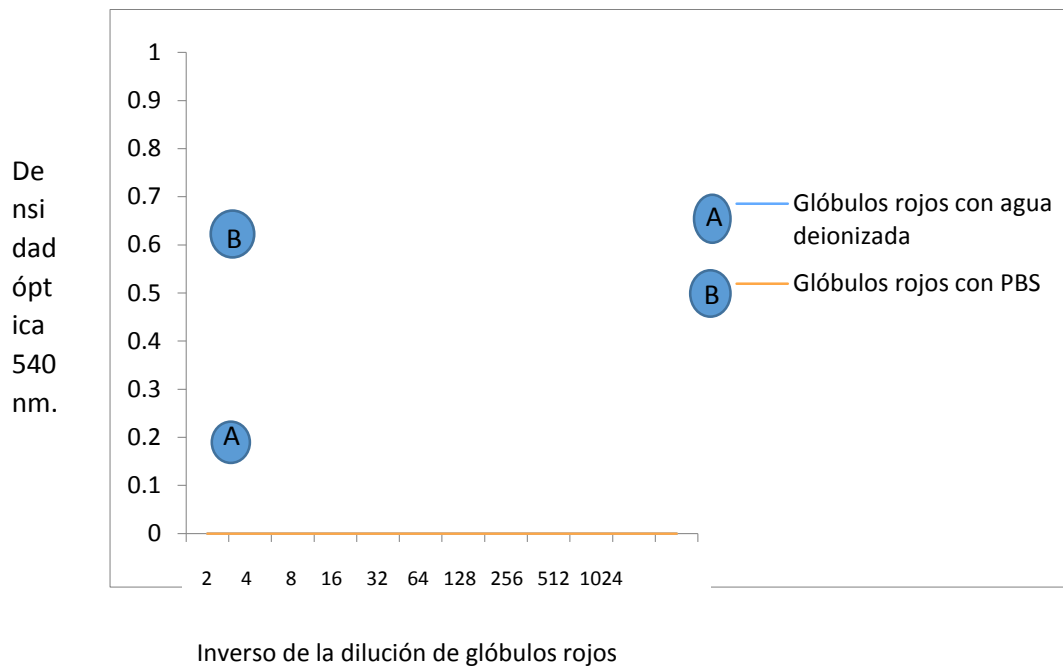
Figura 4. Cinética de absorción a 450 nm de glóbulos rojos suspendidos en agua desionizada y PBS.



Inverso de la dilución de glóbulos rojos.

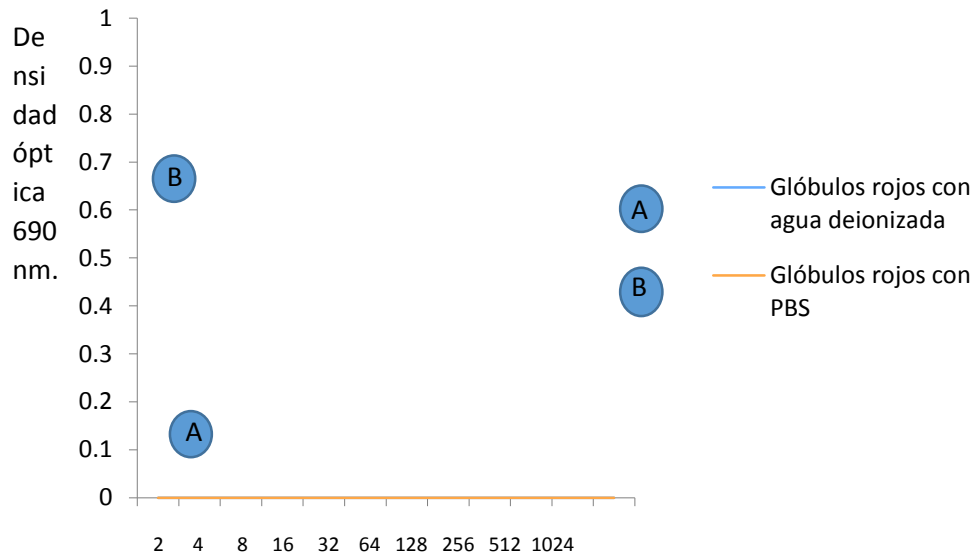
Se realizaron diluciones dobles seriadas de glóbulos rojos, empleando agua desionizada y PBS y se determinó la densidad óptica a 450 nm; se graficó el promedio de las 6 repeticiones con su desviación estándar.

Figura 5. Cinética de absorción a 540 nm de glóbulos rojos suspendidos en agua deionizada y PBS.



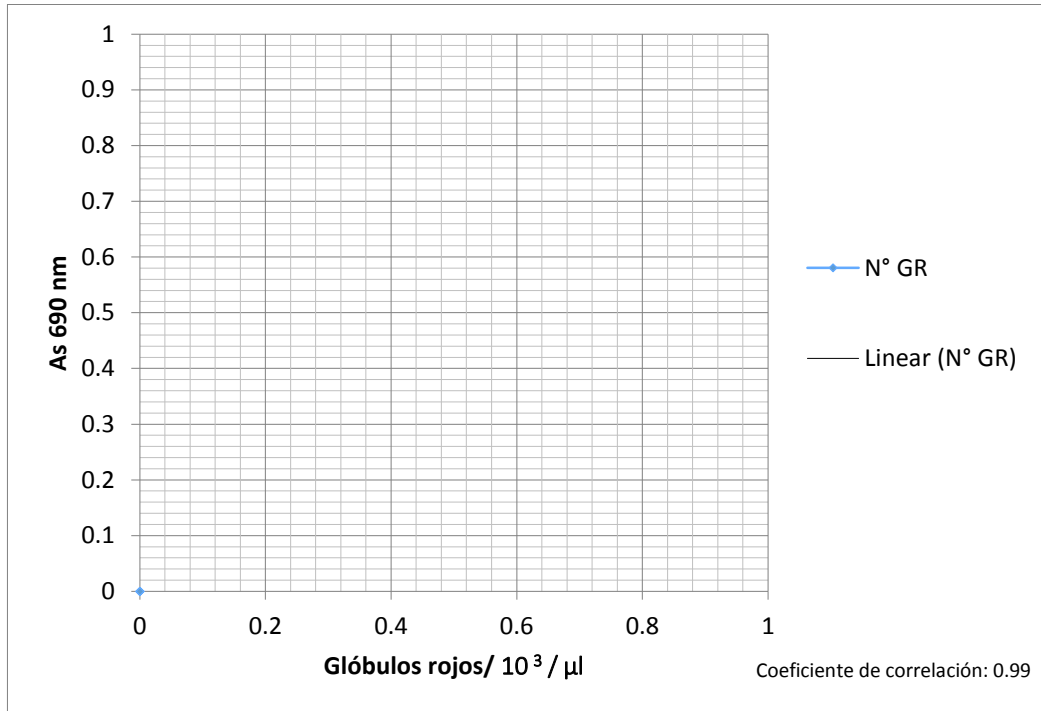
Se realizaron diluciones dobles seriadas de glóbulos rojos, empleando agua deionizada y PBS y se determinó la densidad óptica a 540 nm; se graficó el promedio de las 6 repeticiones con su desviación estándar.

Figura 6. Cinética de absorción a 690 nm de glóbulos rojos suspendidos en agua deionizada y PBS.



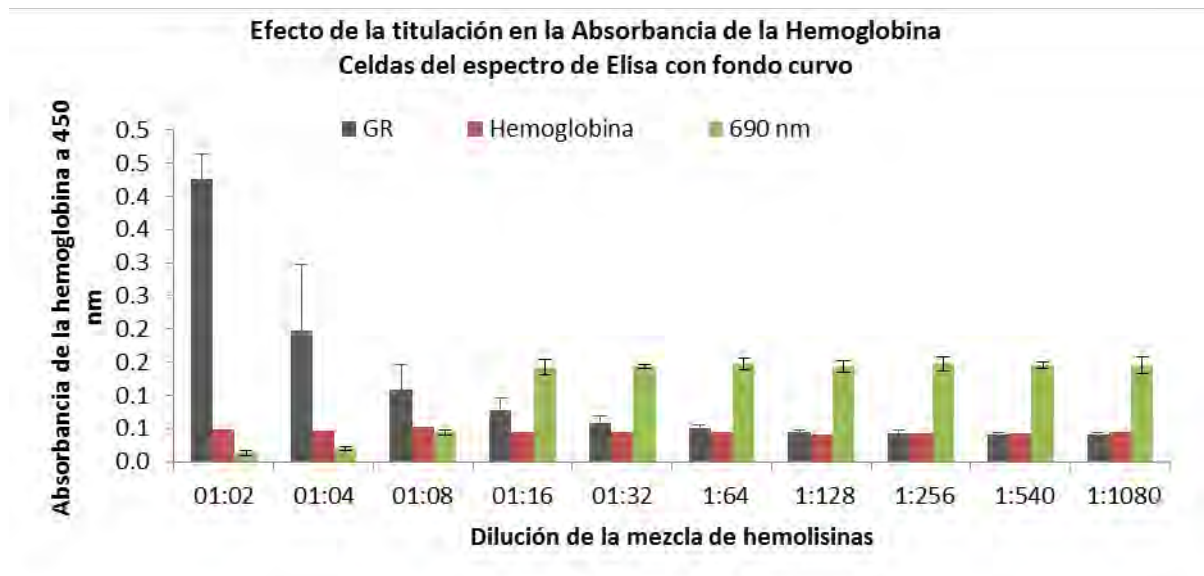
Se realizaron diluciones dobles seriadas de glóbulos rojos, empleando agua desionizada y PBS y se determinó la densidad óptica a 690 nm; se graficó el promedio de las 6 repeticiones con su desviación estándar.

Figura 7. Relación entre la cantidad de glóbulos rojos de gallina (*Gallus gallus*) y la absorbancia a 690 nm.



Se determinó el coeficiente de correlación mediante la prueba de Pearson.

Figura 8. Cinética de absorción a 340, 450 y 690 nm de glóbulos rojos tratados con el sobrenadante de *Bacillus cereus* cepa RCC7.



Se realizaron diluciones dobles seriadas de glóbulos rojos empleando sobrenadante de *Bacillus cereus* cepa RCC7 y se determinó la absorción a 340, 450 y 690 nm.

Figura 9. Esquema de la filtración en columna con sepadhex G:80.

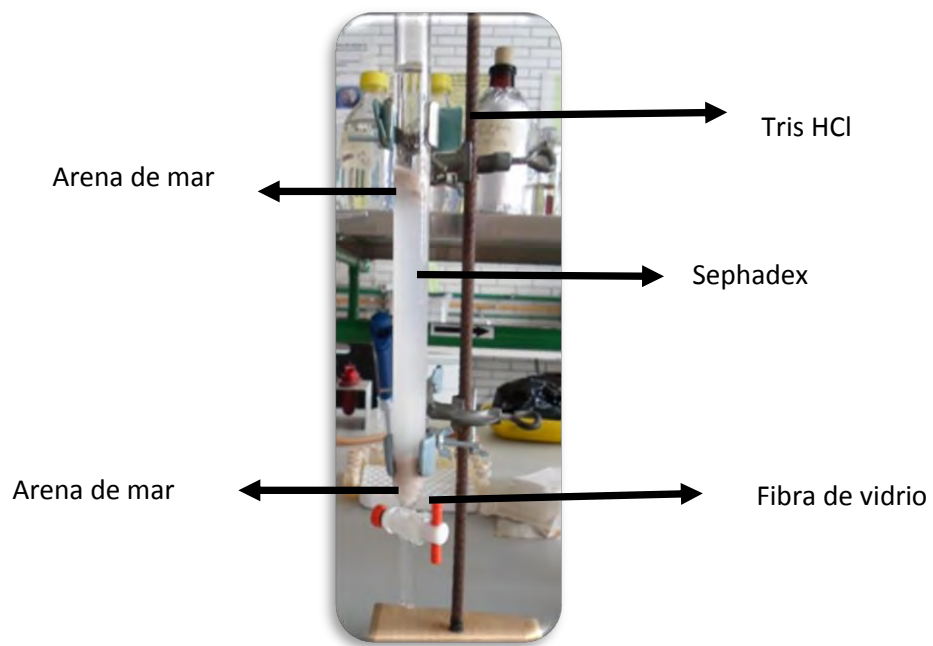
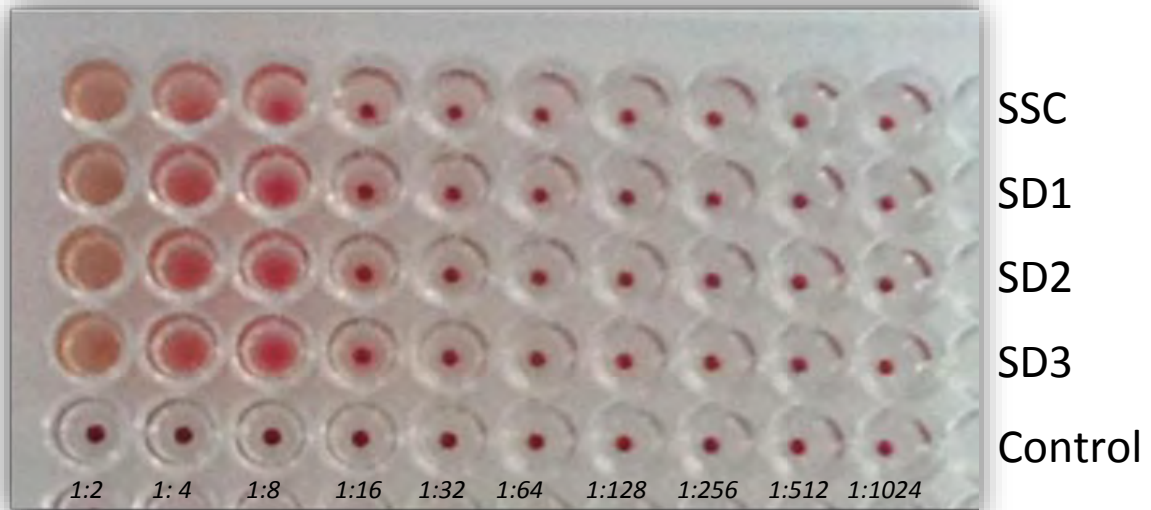
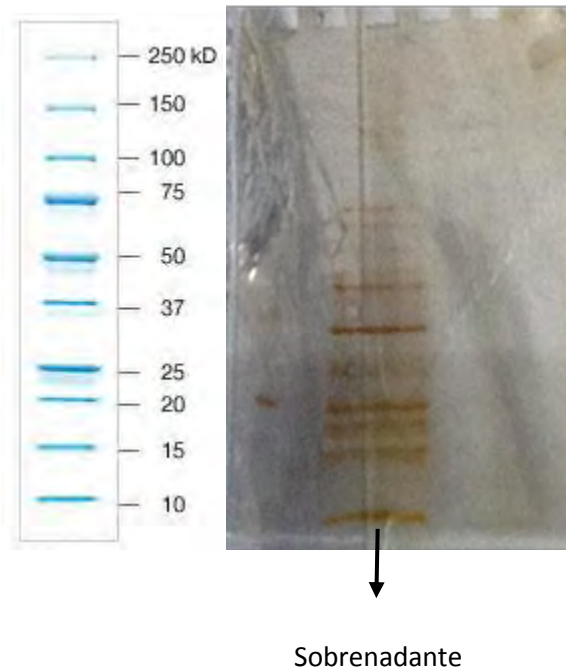


Figura 10. En una microplaca de fondo en “U” se realizaron diluciones dobles seriadas con sobrenadante de cultivo de *Bacillus cereus* cepa RCC7 descongelado a diferentes tiempos de cultivo de *Bacillus cereus* utilizando sangre de gallina (*Gallus gallus*) al 2%.



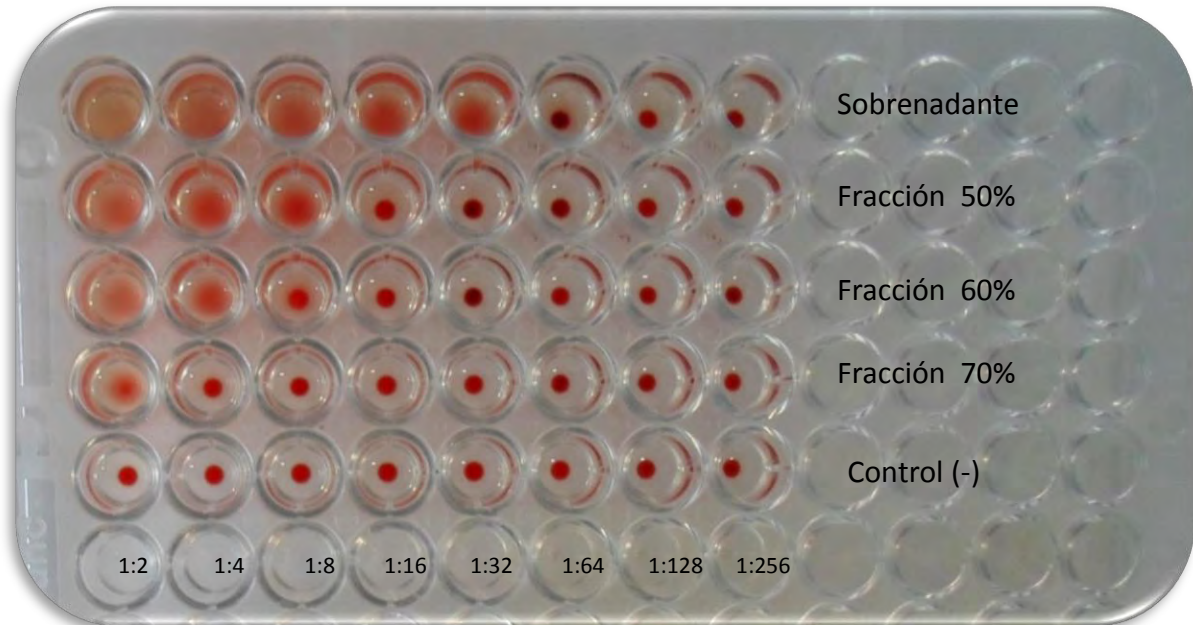
SSC: Sobrenadante sin congelar.
SD1: Sobrenadante descongelado 1 vez.
SD2: Sobrenadante descongelado 2 veces.
SD3: Sobrenadante descongelado 3 veces.

Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida del sobrenadante de cultivo de la cepa RCC7 de *Bacillus cereus* teñido con nitrato de plata.



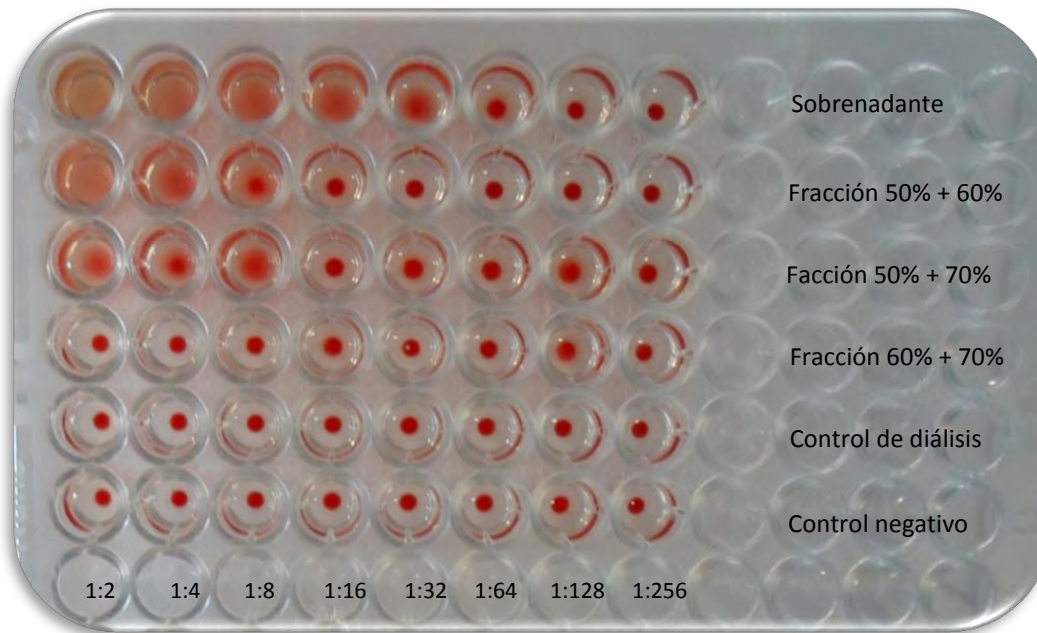
El sobrenadante de cultivo de *Bacillus cereus* cepa RCC7 fue colocado en gel de electroforesis, y teñido con nitrato de plata.

Figura 12. Titulación de hemólisis en microplaca de fondo en “U” de los precipitados 50%, 60% y 70% de la cepa RCC7 de *Bacillus cereus* en sangre completa al 2 % de gallina (*Gallus gallus*).



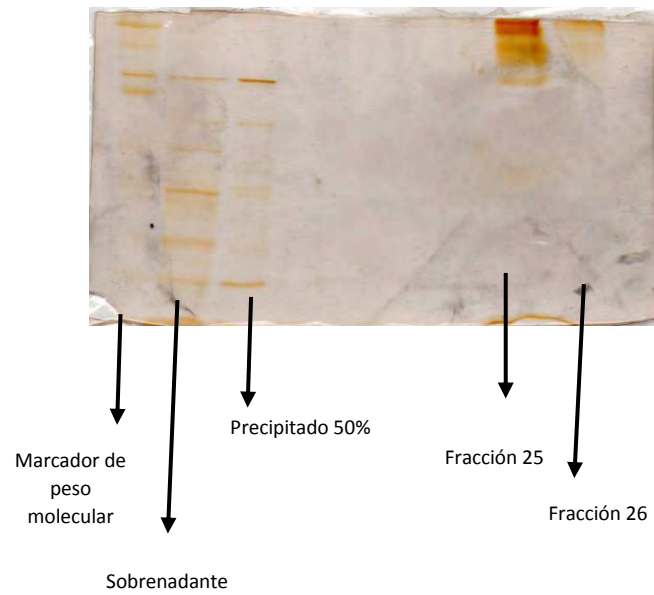
La lisis se observó en una placa de fondo en “U” a las 2 horas de incubación con las diferentes fracciones de la cepa RCC7 de *Bacillus cereus* sobre sangre de gallina (*Gallus gallus*) al 2%.

Figura 13. Titulación de hemólisis en microplaca de fondo en “U” de las combinaciones de precipitados 50%+60%, 50%+70%, 60%+70% de la cepa RCC7 de *Bacillus cereus* en sangre completa al 2 % de gallina (*Gallus gallus*).



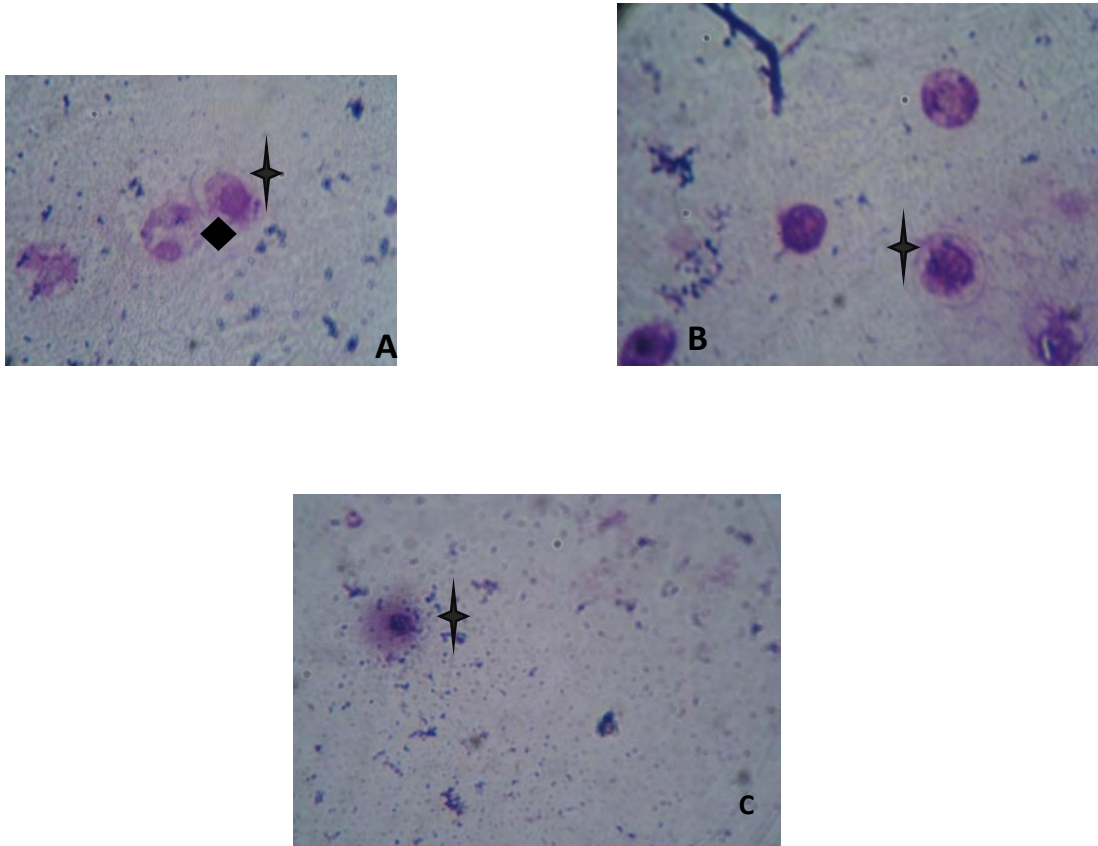
La lisis se observó en una placa de fondo en “U” a las 2 horas de incubación con la combinación de las diferentes fracciones de la cepa RCC7 de *Bacillus cereus* sobre sangre de gallina (*Gallus gallus*) al 2%.

Figura 14. Gel de electroforesis del precipitado al 50% y de la fracción 26.



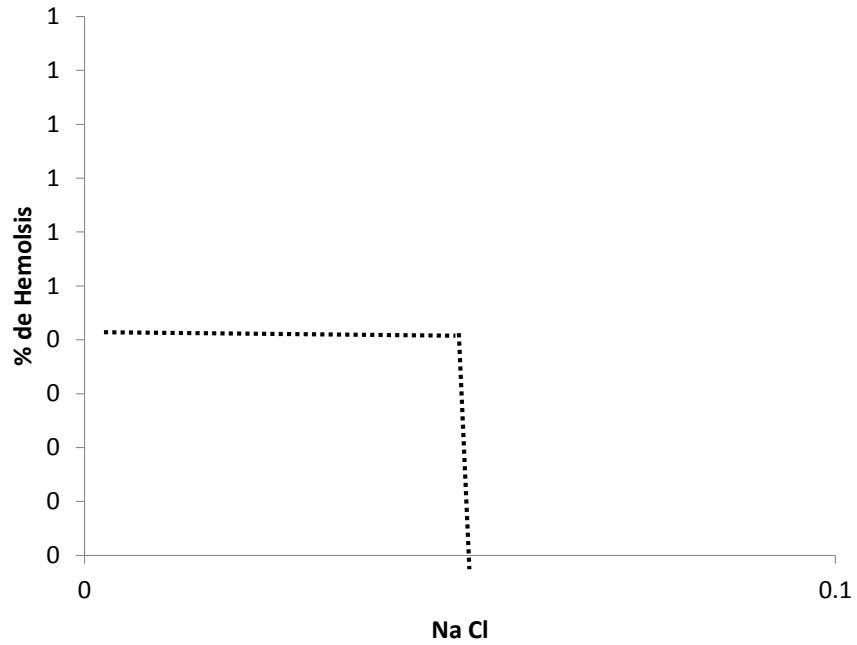
Sobrenadante, precipitado al 50 %, fracción 25 y 26 en gel de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata.

Figura 15. Frotis de eritrocitos de gallina doméstica (*Gallus gallus*) tratados con la fracción 26 del precipitado al 50%.



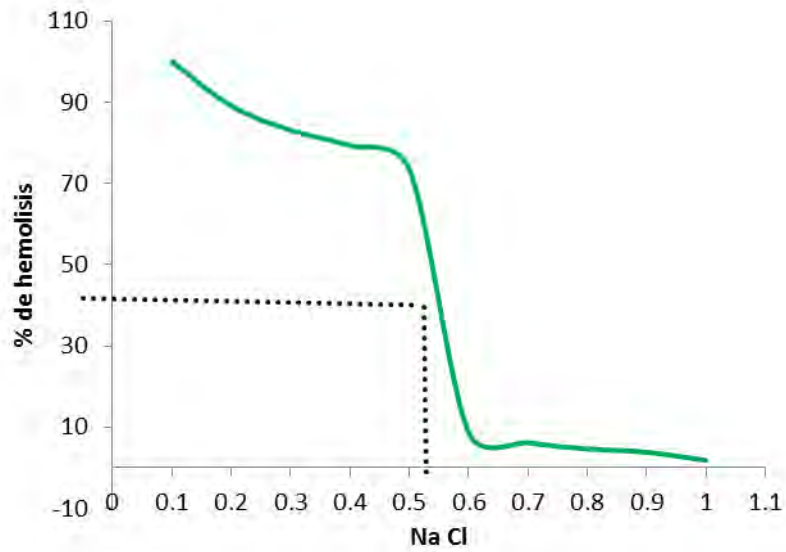
Sangre de gallina doméstica (*Gallus gallus*) teñida con Giemsa en la figura **◆** A se observa **★** heterófilo, Eritrocito. En la figura C se observa **★** un núcleo de eritrocito.

Figura 16. Fragilidad osmótica de eritrocitos de gallina doméstica (*Gallus gallus*) utilizando heparina como anticoagulante.



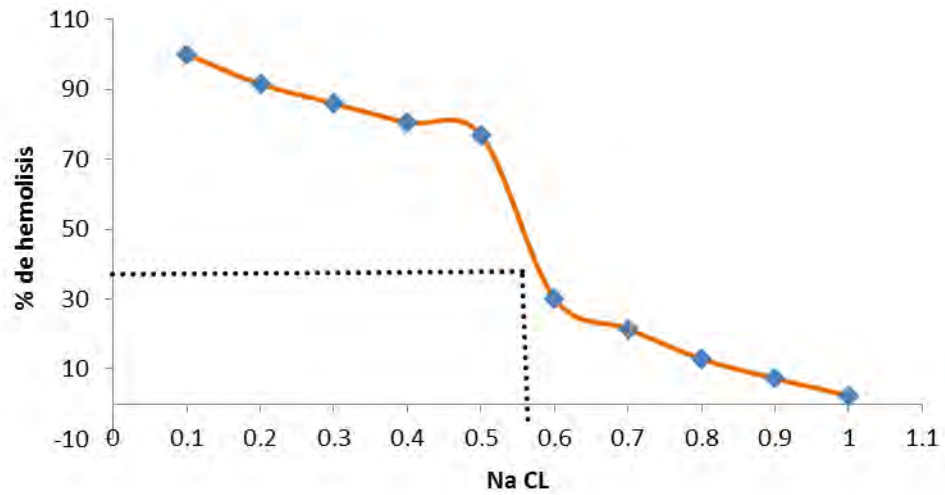
Se graficaron las medias de 6 repeticiones, el 50% de hemólisis es a 0.55% de NaCL.

Figura 17. Fragilidad osmótica de eritrocitos de gallina doméstica (*Gallus gallus*) utilizando citrato de sodio como anticoagulante.



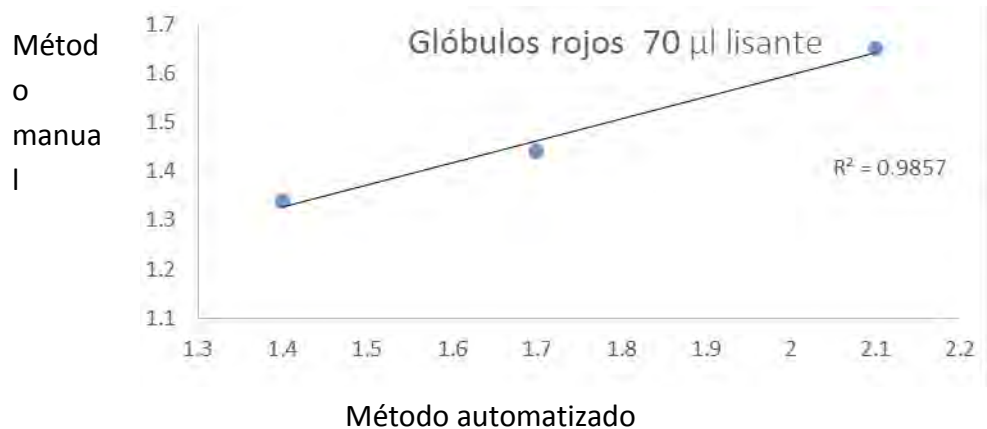
Se graficaron las medias de 6 repeticiones, el 50% de hemólisis es a 0.54% de NaCl.

Figura 18. Fragilidad osmótica de eritrocitos de gallina doméstica (*Gallus gallus*) utilizando EDTA como anticoagulante.



Medias de 6 repeticiones, el 50% de hemólisis es a 0.58% de NaCl

Figura 19. Correlación de la cantidad de glóbulos rojos del método manual con el método automatizado utilizando 70 μ l de lisante



Se realizó el cálculo de glóbulos rojos 12 muestras de sangre completa en el ABACUS utilizando 70 µl, realizando a la par el conteo de glóbulos rojos con el método manual Natt y Herrick.

Figura 20. Correlación de la cantidad de glóbulos rojos del método manual Natt y Herrick con el método automatizado ABACUS utilizando 110 µl de lisante.

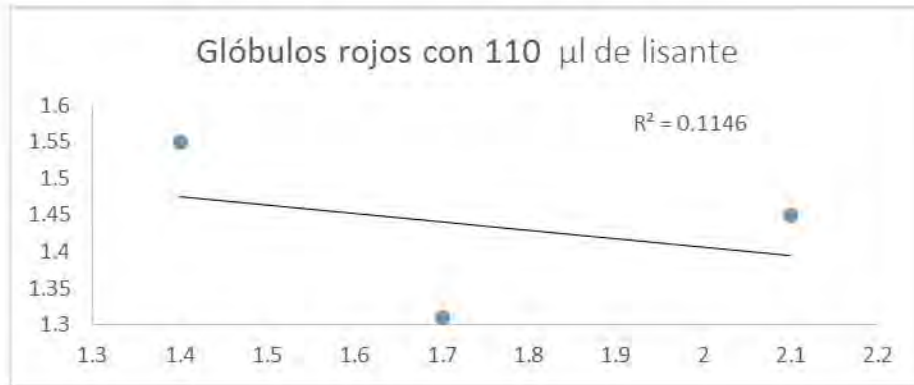
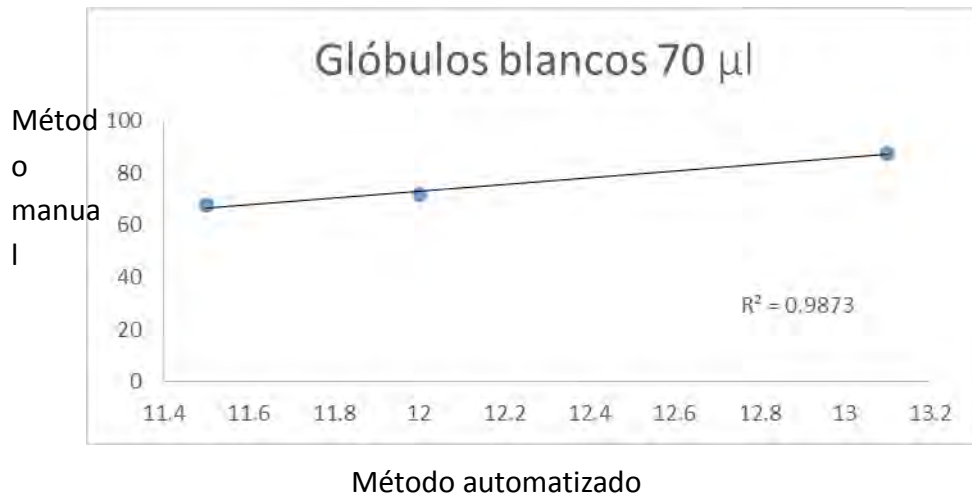
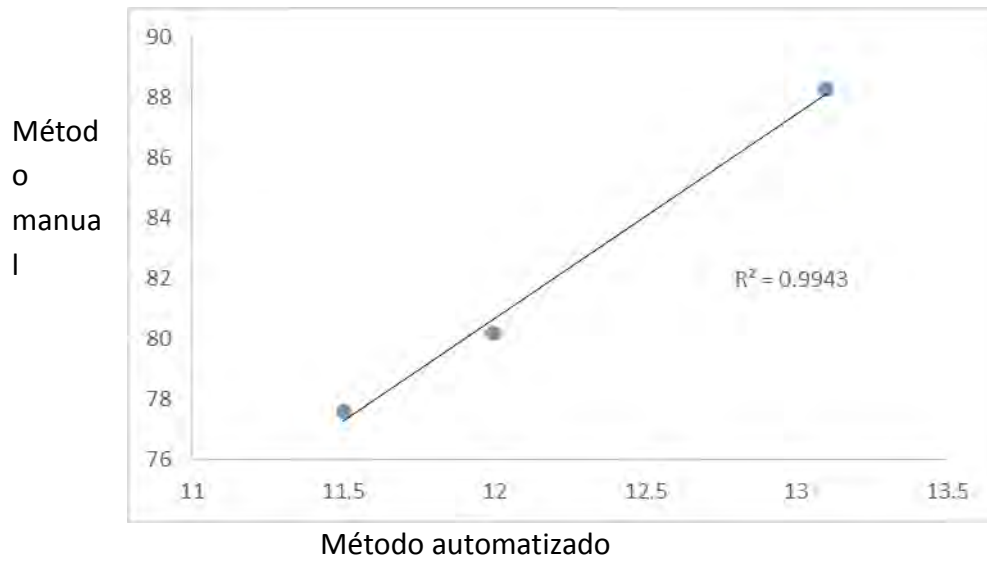


Figura 21. Correlación de la cantidad de glóbulos blancos del método manual con el método automatizado utilizando 70 µL de lisante.



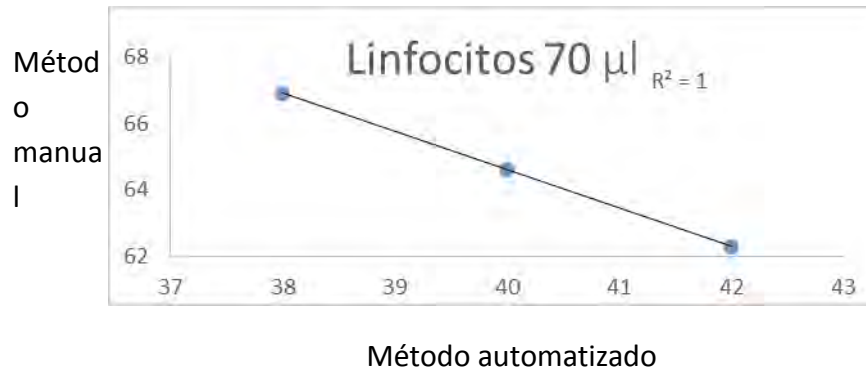
Se realizó el conteo de glóbulos blancos de 12 muestras de sangre tanto manualmente como con un contador de células electrónico utilizando 70 µL de lisante.

Figura 22. Correlación de la cantidad de glóbulos blancos del método manual con el método automatizado utilizando 110 µL de lisante.



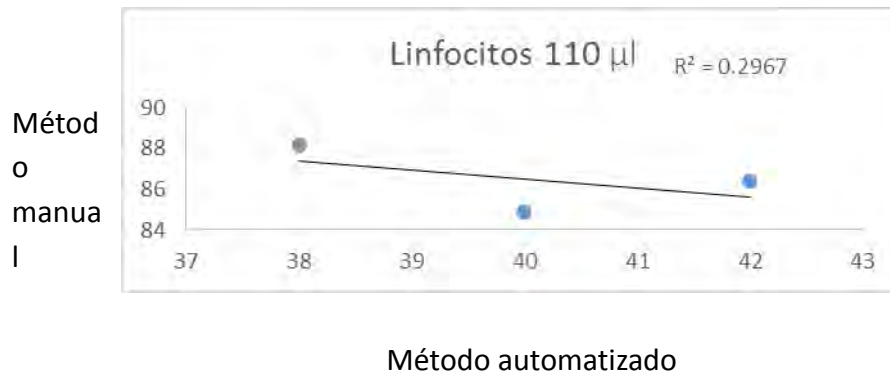
Se realizó el conteo de glóbulos blancos de 12 muestras de sangre tanto manualmente como automatizado utilizando 110 μL .

Figura 23. Correlación de la cantidad de linfocitos del método manual con el método automatizado utilizando 70 μL de lisante.



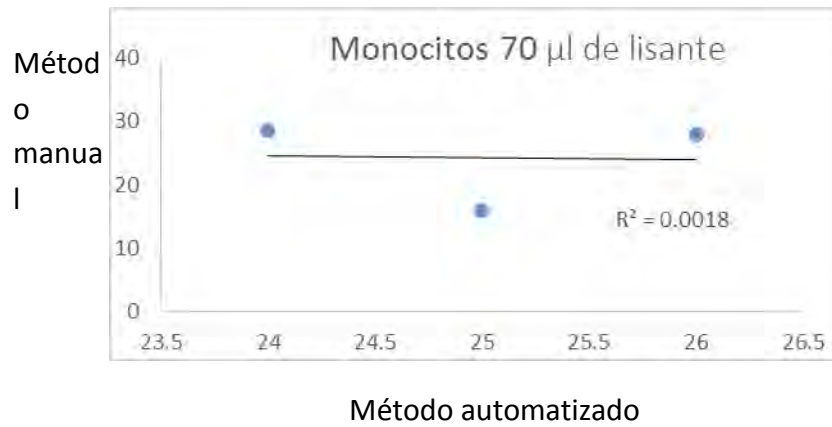
Se realizó el conteo de linfocitos 12 muestras de sangre por el método automatizado utilizando 110 µL, realizándolo también con el método manual de Natt y Herrick.

Figura 24. Correlación de la cantidad de linfocitos del método manual con el método automatizado utilizando 110 µL de lisante (describirlo completo).



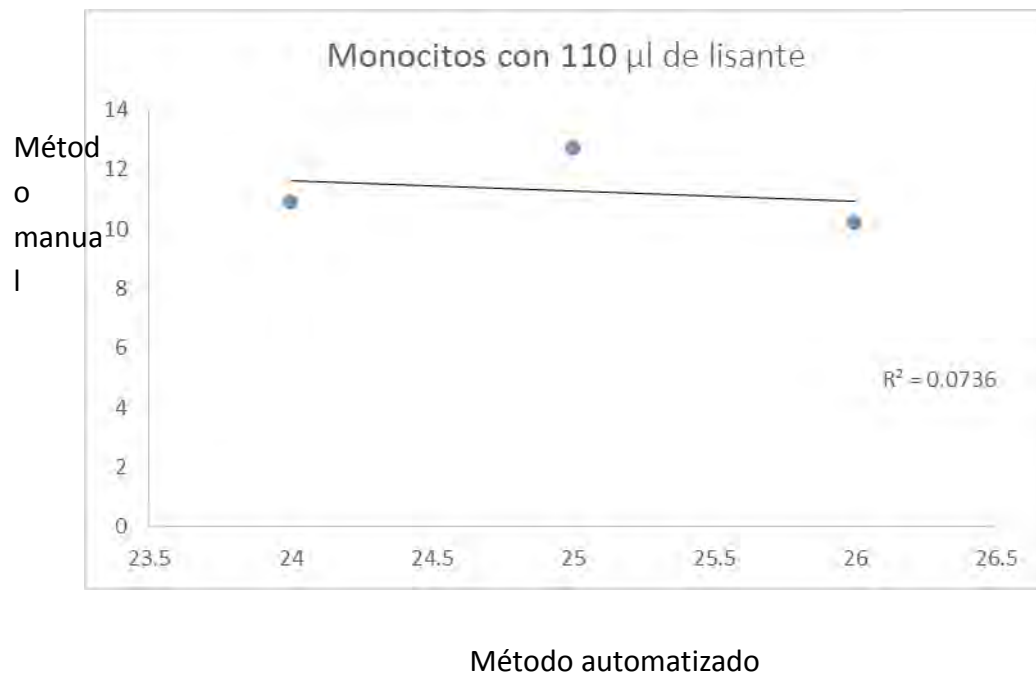
Se realizó el conteo de linfocitos en 12 muestras sanguíneas en el ABACUS utilizando 110 μ L, realizando a la par el conteo de linfocitos Natt y Herrick.

Figura 25. Correlación de la cantidad de monocitos del método manual con el método automatizado utilizando 70 μ L de lisante.



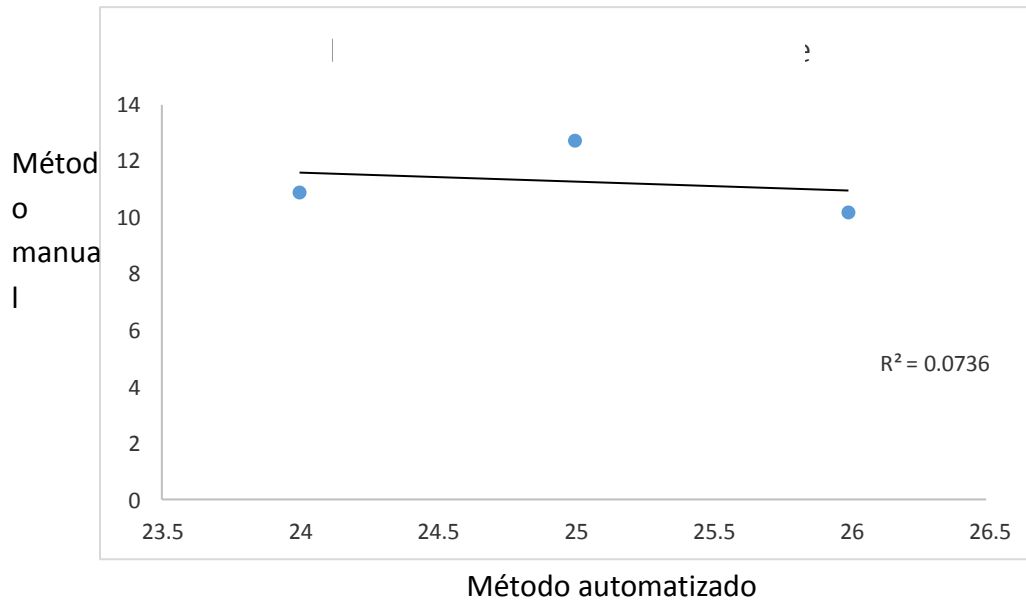
Se realizó el conteo de monocitos en 12 muestras sanguíneas por el método automatizado utilizando 110 µL, realizándolo también con el método manual de Natt y Herrick.

Figura 26. Correlación de la cantidad de monocitos del método manual con el método automatizado utilizando 110 µL de lisante.



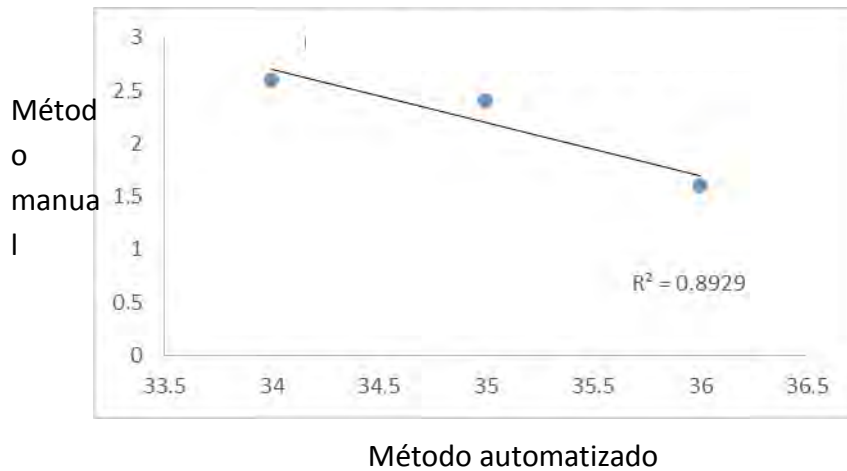
Se realizó el conteo de monocitos en 12 muestras sanguíneas por el método automatizado utilizando 110 µL, realizándolo también con el método manual de Natt y Herrick.

Figura 27. Correlación de la cantidad de granulocitos del método manual con el método automatizado utilizando 110 µL de lisante.



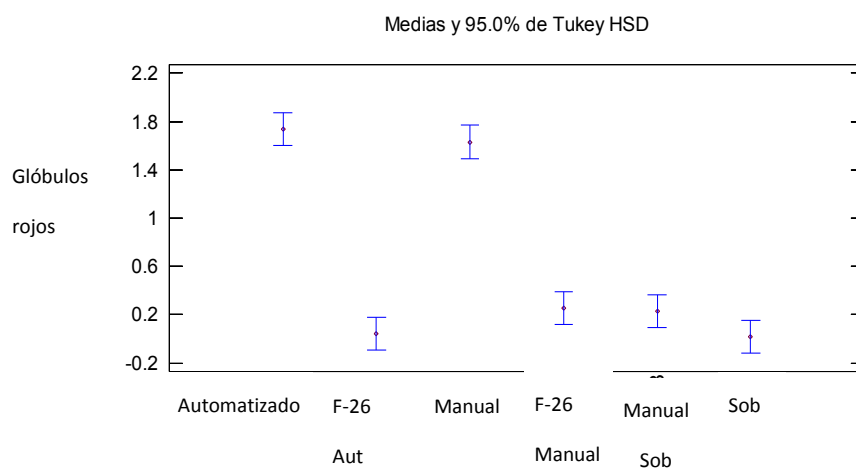
Se realizó el conteo de granulocitos en 12 muestras sanguíneas por el método automatizado utilizando 110 μL , realizándolo también con el método manual de Natt y Herrick.

Figura 28. Correlación de la cantidad de granulocitos del método manual con el método automatizado utilizando 70 μL de lisante...



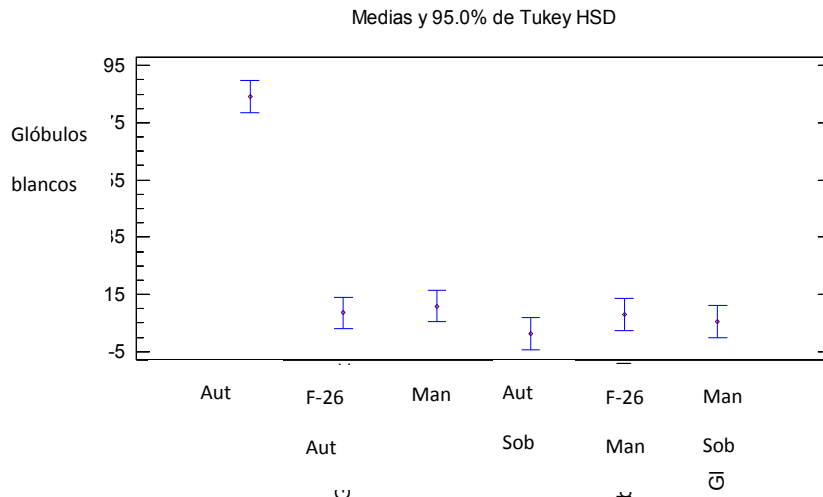
Se realizó el conteo de granulocitos en 12 muestras sanguíneas por el método automatizado utilizando 110 μL , realizándolo también con el método manual de Natt y Herrick.

Figura 29. Grafica de medias para intervalos HSD de Tukey para Glóbulos rojos de aves (*Gallus gallu*) sometidos a diferentes tratamientos.



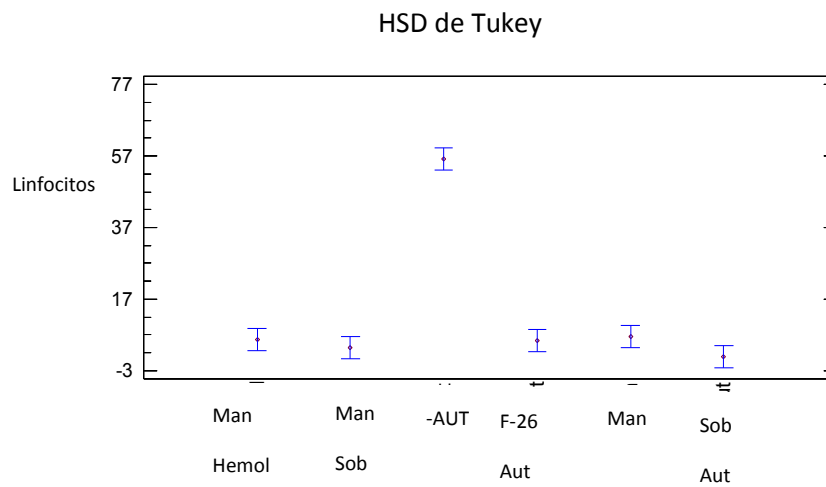
Comparación de medias de los diferentes tratamientos de glóbulos blancos utilizando HSD de Tukey.

Figura 30. Gráfica de medias para intervalos HSD de Tukey para glóbulos blancos de gallina domestica (*Gallus gallus*) sometidos a diferentes tratamientos.



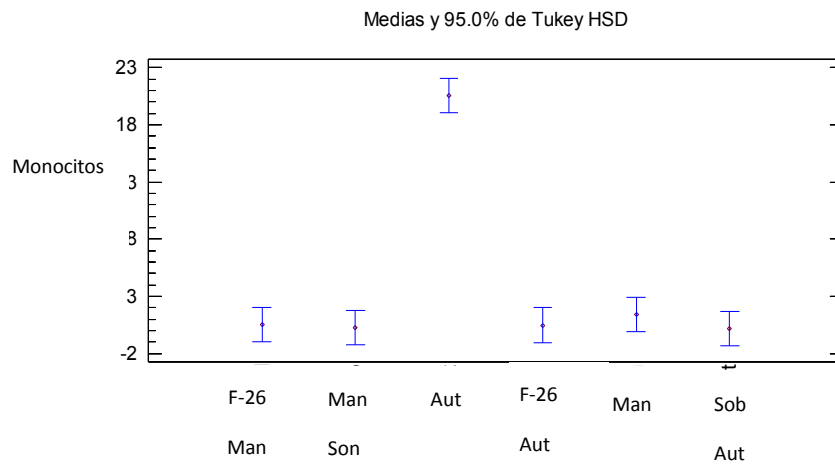
Comparación de medias de los diferentes tratamientos de glóbulos blancos utilizando HSD de Tukey.

Figura 31. Gráfica de medias para intervalos HSD de Tukey para linfocitos de gallina domestica (*Gallus gallus*) sometidos a diferentes tratamientos



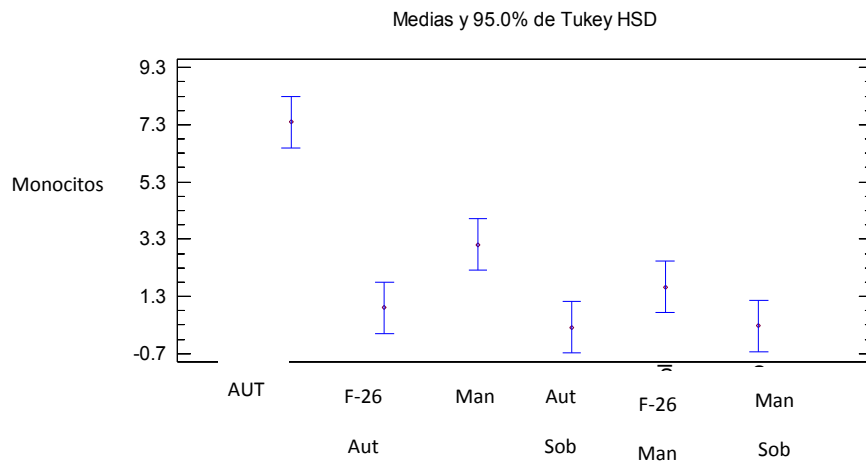
Comparación de medias de los diferentes tratamientos de linfocitos utilizando HSD de Tukey.

Figura 32. Gráfica de medias para intervalos HSD de Tukey para monocitos de gallina doméstica (*Gallus gallus*) sometidos a diferentes tratamientos



Comparación de medias de los diferentes tratamientos de monocitos utilizando HSD de Tukey.

Figura 32. Gráfica de medias para intervalos HSD de Tukey para granulocitos de gallina doméstica (*Gallus gallus*) sometidos a diferentes tratamientos lisantes.



Comparación de medias de los diferentes tratamientos de granulocitos utilizando HSD de Tukey.

CUADROS DE RESULTADOS

Cuadro 1. Características de tinción de las distintas células sanguíneas.

	Características morfológicas	Características de tinción
Eritrocitos	Células maduras Tamaño mediano, forma ovalada, alargada, núcleo central ovalado, alargado.	Citoplasma se tiñe uniformemente de color naranja pálido a rosa rojizo. Núcleo, rojo violeta, condensado, cromatina aglutinada.
	Células inmaduras Más pequeñas que las células maduras; redondeadas o semiovaladas; núcleos relativamente más grandes.	Policromáticas; azul pálido a oscuro.
Heterófilos	Tamaño mediano; forma redondeada, núcleo bilobulado.	Citoplasma incoloro; con gránulos con forma de bastón a cigarro, de color rojo ladrillo a azul pálido.
Eosinófilos	Tamaño mediano; forma redondeada; núcleo bilobulado.	Citoplasma de color azul pálido, gránulos redondeados u ovalados, de color rojo ladrillo a azul pálido.
	Tamaño mediano; forma redondeada; núcleo monolobulado.	Citoplasma de color azul pálido, número variable de gránulos pequeños, medianos y grandes, de color violeta rojo oscuro.
Linfocitos	Tamaño pequeño a mediano; normalmente, forma redondeada a triangular; núcleo redondeado, grande, colocado centralmente; en general, 25 citoplasma 72 núcleos, condensado grueso con cromatina muy condensada.	Citoplasma de color azul pálido.
Monocitos	Tamaño grande; normalmente, forma redondeada, núcleo con forma de riñón, colocado excéntricamente; en general, 75 citoplasma, 25 núcleo; citoplasma con aspecto de lazo, con frecuencia con vacuolas de tamaño mediano, cromatina muy condensada	Citoplasma de color azul pálido a gris pálido
Trombocitos	Pequeños forma ovalada a rectangular; núcleo ovalado a rectangular.	Citoplasma de incoloro a azul pálido, vacuolas grandes, cromatina de color violeta oscuro-rojo muy condensada en el núcleo.

Principales características de células de la sangre con técnicas de Romanosky. (Samour 2010).

Cuadro 2. Valores hematológicos de *Gallus gallus*.

		Diámetro
<i>Eritrocito</i>	3-4 millones	10 -13 μ
<i>Leucocito</i>	16 000 – 25 000	
<i>Heterofilo</i>	25 – 45 %	7 – 10 μ
<i>Eosinofilo</i>	1 – 7 %	6 – 9 μ
<i>Basófilo</i>	0.5 – 3 %	7 – 10 μ
<i>Linfocito</i>	35 – 60 %	5 – 9 μ
<i>Monocito</i>	3 – 6 %	8 – 11 μ
<i>Trombocito</i>	25 000 – 30 000	5 – 9 μ

Total de leucocitos por microlitro de sangre y porcentaje de cada leucocito. (Arizabal 2002)

CUADRO 3. Comparación de los resultados de las pruebas bioquímicas de *Bacillus spp* cepa RCC7 y *Bacillus cereus* de COVEMI.

PRUEBAS BIOQUIMICAS	<i>Bacillus cepa spp</i> RCC7	<i>Bacillus cereus</i> (COVEMI)
Gram	Bastones	Bastones
Catalasa	+	+
Movilidad.	+	+
Nitratos.	+	+
Voges Proskauer	-	-
Rojo de metilo	-	-
Oxidación – Fermentación	Fermentación	Fermentación
Lecitinas.	+	+
Arabinosa	-	-
Xilosa	-	-
Manitol	-	-
Crecimiento aerobios	+	+
Triple azúcar hierro	K/K	K/K
Lisina hierro agar	K/A	K/A
UREA	+	+
Citrato	+ *	- *
Gelatina	-	-
Motilidad	+	+
Indol	-	-
Ornitina	-	-

Cuadro 4. Actividad específica del sobrenadante de cultivo de *Bacillus cereus* cepa RCC7.

SOBRENADANTE

Proteína $\mu\text{g/mL}$	UH/ 100 mL	Actividad específica
70.707	320	4.5

La actividad específica se calculó: UH/100 mL de proteína.

Cuadro 5. Actividad específica de las fracciones obtenidas del sobrenadante de cultivo de la cepa RCC7 de *Bacillus cereus*.

Fracciones	Proteína µg/mL	Inverso de la dilución UH/ mL en sangre de gallina	Actividad específica en sangre de gallina
Fracción 50 %	40.174	80	1.9
Fracción 60 %	8.855	40	4.5
Fracción 70 %	2,939	20	6.8

La actividad específica se calculó: UH/100 µg de proteína.

Cuadro 6. Actividad específica de la combinación de fracciones obtenidas del sobrenadante de cultivo de la cepa RCC7 de *Bacillus cereus*.

Fracciones	Proteína µg/mL	UH/mL sobre sangre de gallina	Actividad específica en sangre de gallina
Fracción 50% + 60 %	24.4	80	3.2
Fracción 50% + 70 %	21.5	88	3.7
Fracción 60 % + 70%	11.79	0	0

La actividad específica se calculó: UH/100 µg de proteína.

Cuadro 7. Actividad específica del sobrenadante y de la fracción 25 de la cepa RCC7 de *Bacillus cereus*

Fracciones	Proteína a µg/mL	UH/ ml en sangre de gallina	Actividad específica en sangre de gallina
Sobrenadante	70.707	320	4.5
Fracción 25	1.81	320	170.67

La actividad específica se calculó: UH/100 µg de proteína.

Cuadro 8. Eritrocitos incubados a diferentes tiempos con sobrenadante y fracción 26.

Tiempo de incubación (minutos)	Sobrenadante		Fracción 26	
	Eritrocitos	Leucocitos	Eritrocitos	Leucocitos
30	Con citoplasma pequeño deformado.	No hay alteración	Completos, con citoplasma pequeño	No hay alteración
60	Con citoplasma pequeño deformado	No hay alteración.	Lisis	No hay alteración
120	Lisis	Deformación de membrana	Lisis	No hay alteración de forma
240	Lisis	Deformación	Lisis	Alteración de la forma
480	Lisis	Deformación	Lisis	Alteración de la forma

Se realizaron frotis de las diluciones, se tiñeron con Giemsa, se observaron al microscopio, evaluando la morfología de los eritrocitos y leucocitos a diferentes tiempos

-
-