



01672
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

1
2ij

**DETERMINACIÓN DE ISOTIPOS EN PERFILES
SEROLÓGICOS MEDIANTE UN INMUNOENSAYO
ENZIMÁTICO INDIRECTO EN CABRAS VACUNADAS
Y DESAFIADAS CON *Brucella spp.***

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO
DE MAESTRO EN CIENCIAS: MICROBIOLOGÍA**

**PRESENTADA POR
MVZ EDGAR ALFONSECA SILVA**

**ASESOR PRINCIPAL:
MVZ M. en C. PhD. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES**

**COASESORES:
MVZ M. en C. Dr. EFREN DÍAZ APARICIO
MVZ PhD. EDGARDO MORENO ROBLES**

MÉXICO, D.F. 1998



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

258652



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 está 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.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, en las instalaciones del CENID-Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP - SAGAR), y en el Laboratorio de Inmunología del Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET) de la Escuela de Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica.

Este proyecto de Tesis contó con financiamiento por parte del Proyecto PAPIIT IN504695, Brucelosis en pequeños rumiantes, Proyecto de Investigación CONACYT 3348P-139608 y Secretaria de Relaciones Exteriores de México.

Durante estos estudios de Posgrado el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

*Empieza por hacer lo necesario,
luego lo que es posible
y de pronto te encontrarás
haciendo lo imposible.*

S. F. Asis.

Agradecimientos

Agradezco a la FMVZ-UNAM la oportunidad que me brindo para realizar estos estudios.

Quiero expresar mi gratitud hacia mis asesores por su apoyo, consejos y amistad, de nuevo gracias:

Dr. Francisco Suárez Güemes
Dr. Efrén Díaz Aparicio
Dr. Edgardo Moreno Robles

A mi Honorable Jurado por sus valiosos comentarios en la revisión de esta investigación:

Dr. L. Garry Adams
Dr. Armando Mateos Poumian
Dr. Eduardo Posadas Manzano
M en C Francisco Basurto Alcántara
Dr. Efrén Díaz Aparicio

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Microbiología Molecular por hacer de estos años un momento agradable, por lo bueno y lo malo, en fin... que bien la pase. A todos ustedes: Alfredo, Toño, Oli, Rigo, Xochil, Ana Laura, Gerardo (Ernesto), Elvia, Rosy, Bety, Rocio, Mayra, Marino, Daniel, Chucho, Lydia y Hugo Gracias cuates!!!

Al personal de los Laboratorios del Programa de Investigación en Enfermedades Tropicales (PIET) de la Universidad Nacional de Costa Rica, por hacerme sentir como en casa. ¡Pura Vida!

Al MVZ Jaime Navarro, por la asesoría brindada en el análisis estadístico de los resultados de este trabajo.

A todo el personal académico y administrativo del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM por brindarme su amistad, consejos y apoyo para seguir adelante.

A mis amigos por disfrutar de lo mismo que yo disfruto, por compartir sus ideas y sus vidas, gracias.

Dedicatorias

Quiero dedicar este esfuerzo a mi familia:

A mi esposa Sandra por su amor y paciencia, y en especial por formar conmigo un hogar en el cual hemos dado vida a mis dos grandes tesoros.

A mis hijas Alexandra Nayeli y Ariadne, que son la razón de todo mi esfuerzo.

Como un ejemplo de superación, siempre sigan adelante y verán que las cumbres solo son altas viéndolas desde abajo

Las AMO.

A mis padres Jorge Alfonseca e Isabel Silva.
Madre siempre estoy contigo.

A mis hermanos Jorge y Caro
Alejandro, Arturo y Aarón

Vamos... sigamos siempre adelante!

Y a la más pequeña de mis sobrinas (y hermanita de mis hijas), que nos hace pasar momentos de alegría, estoy orgulloso de ti, continúa siendo siempre la mejor, te quiero Vale.

Edgar.

Tabla de Contenido	Página
Agradecimientos	II
Dedicatorias	III
Resumen	V
Summary	VI
I.- Introducción	1
Características del género	1
Componentes antigénicos y propiedades estructurales del género	4
Situación de la brucelosis en México	8
Objetivo general	12
Objetivos específicos	13
II.- Materiales y Métodos	14
Cepas bacterianas	14
Animales y diseño experimental	14
Purificación y caracterización inmunoquímica de anticuerpos	
$\gamma 1$ y $\gamma 2$ caprinos a partir de suero y calostro	16
Preparación de antígenos para el inmunoensayo enzimático	24
Inmunoensayos enzimáticos (ELISA)	27
Análisis estadístico	28
III.- Resultados	30
Pureza de las preparaciones de γ-globulinas caprinas	30
Anti-γ-globulinas caprinas	30
Titulación de los conjugados	30
Evaluación de la concentración de los diferentes isotipos de Inmunoglobulinas antibrucela en el suero de cabra	31
IV.- Discusión	36
V.- Referencias	45
VI.- Figuras	55

Resumen

El objetivo del presente estudio fue presentar el perfil de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas séricas en cabras infectadas y vacunadas con diferentes protocolos contra la brucelosis por medio de un inmunoensayo enzimático indirecto que utiliza el lipopolisacárido (LPS) de *Brucella melitensis* 16 M como antígeno de captura específico de los diferentes isotipos anti-LPS de *Brucella*. Los protocolos usados fueron: 1.- *B. melitensis* Rev 1 ruta conjuntival (10^8), 2.- *B. melitensis* Rev 1 en dosis reducida (5×10^4), 3.- *B. abortus* RB51 (2.5×10^6), 4.- *B. abortus* S2308::Tn5 (2.8×10^5), 5.- infección experimental por ruta conjuntival con *B. melitensis* biovariedad 3 (4×10^5) y 6.- grupo control negativo. La unión de los diferentes isotipos en suero de animales infectados y vacunados con *Brucella* fue significativamente mayor al del grupo control negativo ($P = 0.0001$), la diferencia entre grupos fue estadísticamente significativa ($P = 0.056$). En el grupo infectado experimentalmente las concentraciones de IgM e IgG totales fueron mayores en comparación con los demás grupos. La concentración de IgG totales siempre fue mayor a la de IgM en todos los grupos a lo largo del estudio. IgG₂ se presentó como el isotipo dominante en los grupos 1,2,3, y 5 en los días 30 a 90, observando que a mayor cantidad de LPS presente en las células mayor respuesta de IgG₂. IgG₂ se muestra como la subclase dominante en el grupo 5 mientras que en los grupos 1 y 2 a partir de día 90 se presenta el cambio a IgG₁. El grupo 4 no muestra niveles importantes de IgG₂ y la subclase dominante a lo largo de todo el estudio para ese grupo es IgG₁. En los grupos vacunados la mayor respuesta de IgM e IgG total la presentaron los animales vacunados con *B. melitensis* Rev 1 por ruta conjuntival (grupo 1). Se observó que las cabras reaccionan a *Brucella* (cepas de campo y vacunales) con una ligera respuesta de IgM que alcanza su máxima concentración entre los días 20-30 y una mayor respuesta de IgG con concentraciones máximas entre los días 30 a 60 después de la infección o vacunación.

Summary

The humoral immune response in goats vaccinated and infected with different protocols against brucellosis was evaluated using an i-ELISA test. The protocols used were: 1.- *B. melitensis* Rev 1 conjunctival route (10^9), 2.- *B. melitensis* Rev 1 reduced dose (5×10^4), 3.- *B. abortus* RB51 (2.5×10^8), 4.- *B. abortus* S2308::Tn5 (2.5×10^8), *B. melitensis* biovar 3 (4×10^5) and 6.- Negative control group. The lipopolissacharides (LPS) of *B. melitensis* was used to bind immunoglobulin. The binding of the different isotypes in sera from *Brucella*-infected and vaccinated animals was significantly greater than those in negative control group ($P = 0.0001$). The differences between groups was statistically significant ($P = 0.056$). In the artificially infected group the concentration of total IgG and IgM was higher than the others groups. The concentration of IgG total was higher than IgM in all groups, the response of IgM was discrete and never higher than IgG. In the vaccinated groups the greatest response of IgM and IgG was found in the group vaccinated with *B. melitensis* Rev 1 using the conjunctival route. IgG2 was the major isotype in groups 1,2,3 and 4 during 30 and 90 days. It was noticed a higher quantity of LPS in cells with better response of IgG2.

Introducción

La brucelosis es una enfermedad que se encuentra presente en casi todo el mundo, la distribución de las diferentes especies del género *Brucella* y sus biovariedades varía con las áreas geográficas, es característica de los animales y afecta de forma accidental al hombre (FAO/OMS 1986 ; Alton 1987).

La brucelosis es conocida desde 1861, fue descrita por Marston, en la isla de Malta, posteriormente Bruce en 1887 realizó el primer aislamiento del germen. Es una de las principales zoonosis bacteriana y afecta de manera importante a los países en vías de desarrollo, la prevalencia más alta en el hombre se encuentra en los países con altas tasas de brucelosis en los caprinos y ovinos como Rusia, países del Medio Oriente y en América Latina los países que registran el mayor número de casos son México, Argentina y Perú (FAO/OMS 1986; Alton 1987; Nagal et al 1994).

Características del Género

El género *Brucella*, de acuerdo al manual *Bergey (1984)*, esta comprendido dentro del grupo de cocos y bacilos aerobios Gram negativos. Esta clasificado en seis especies, cuatro lisas: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae*, y dos rugosas: *B. canis* y *B. ovis*; recientemente se ha propuesto que el genero *Brucella* contenga como única especie a *B. melitensis* y las especies clásicas sean nombradas como biovariedades (Halling 1997).

Las brucelas, son bacterias pequeñas de forma cocoide o cocobacilar de 0.5 - 0.7 μm x 0.5 - 1.5 μm que pueden presentarse en pares y sin agrupación definida, no móviles, no esporulados, son microorganismos aerobios, pero algunas especies requieren de CO_2 para su crecimiento. Tienen un sistema de transporte de electrones basado en citocromos con oxígeno o nitrato como aceptor final de electrones.

Muestran poca acción fermentativa sobre los carbohidratos en los medios de cultivo convencionales. Algunas cepas crecen en presencia de eritritol; son catalasa y oxidasa positivo, reducen el nitrato y la mayoría de las especies hidrolizan la urea, no producen indol, no licúan la gelatina, son negativas al rojo de metilo y no producen acetil-metil-carbinol. Crecen a temperatura de 37°C en un pH entre 6.6 y 7.4.

La variación en el comportamiento intraespecie lleva a la necesidad de clasificarlas en biovariedades (biotipos) que de acuerdo al manual de *Bergey (1984)* se aceptan 15 en la actualidad en 6 especies. Los criterios para lograr la identificación de las especies y biovariedades del género *Brucella* resultan de la combinación de la producción de ácido sulfhídrico, necesidades de CO_2 , producción de ureasa, crecimiento en medios de cultivo que contengan colorantes como tionina y fucsina, producción de catalasa y oxidasa, lisis en presencia de los diferentes fagos y aglutinación con antisueros monoespecíficos A y M. Para realizar las pruebas de aglutinación con sueros monoespecíficos se emplean sueros adsorbidos, ya sea con *B. melitensis* o *B. abortus*, proporcionados por los centros internacionales de referencia. Rutinariamente se emplean el A y el M, pero en caso de una cepa rugosa se emplea además el R. Algunas biovariedades de *B. abortus* tienen como antígeno dominante el A (biovariedades 1, 2, 3 y 6) o el antígeno M (biovariedades 4, 5 y 9)

o ambos (biovariedad 7) y por lo tanto no se puede concluir que una cepa que aglutina con anti-M necesariamente es *B. melitensis*. *B. suis* puede tener como antígeno dominante el A (biovariedad 1, 2 y 3) o ambos (biovariedad 4). *B. melitensis* puede tener como antígeno dominante al M (biovariedad 1) al antígeno A (biovariedad 2) o ambos (biovariedad 3) (Thoen 1986; Scanlan 1988; Sánchez 1993; Carter 1994).

Brucella abortus (Schmidt 1901) es el agente infeccioso de la brucelosis bovina y ocasionalmente de pequeños rumiantes que se encuentran en contacto con bovinos infectados. Esta enfermedad se encuentra diseminada en todo el mundo.

En la especie de *B. abortus* originalmente se propusieron nueve biovariedades que se distinguen entre ellos por reacciones bioquímicas y serológicas. Son catalasa y oxidasa positivos, requieren de CO₂ principalmente para su cultivo primario, producen ácido sulfhídrico, algunas biovariedades hidrolizan la urea y otras no, reducen los nitratos a nitritos, crecen en medios que contengan fucsina básica. Las cepas lisas tienen en su superficie los antígenos A y M.

Esta especie es lisada por los fagos Tb (Tbilisi), Wb (Weybridge), Fi (Firensi) y Bk (Berkeley), en la dilución habitual de prueba. Los cultivos rugosos son lisados por los fagos del grupo R.

Las cepas de referencia reconocidas son:

<i>B. abortus</i> 544 -----	biovariedad 1
<i>B. abortus</i> 86/8/59-----	biovariedad 2
<i>B. abortus</i> Tulya-----	biovariedad 3
<i>B. abortus</i> 299-----	biovariedad 4
<i>B. abortus</i> B 3/96-----	biovariedad 5
<i>B. abortus</i> 870-----	biovariedad 6
<i>B. abortus</i> 63/75-----	biovariedad 7*
<i>B. abortus</i> C 68 -----	biovariedad 9

B. abortus, biovariedad 8, fue suprimida de la lista en el año de 1978, ya que durante muchos años no había sido reportada y no se contaba con una cepa de referencia disponible.

Brucella melitensis (Hughes 1893) se encuentra en forma endémica en el litoral del Mediterráneo, al suroeste de Asia y en América Latina, constituyendo una grave zoonosis.

En los países donde la crianza de ovinos y caprinos ha sido intensiva, se ha notado un aumento en la prevalencia.

La mayoría de las razas caprinas son muy susceptibles a la enfermedad, pero es muy variada la susceptibilidad en las diferentes razas ovinas. En los países de las costas del Mediterráneo y el sureste de Asia, son los ovinos la especie más afectada, sin embargo en América Latina son los caprinos los más afectados.

* *B. abortus*, biovariedad 7, cepa de referencia 63/75 esta reportada como un cultivo mixto de las biovariedades 3 y 5. Desde hace algunos años no se presenta como un cultivo auténtico, por lo que se espera sea suprimido.

B. melitensis presenta tres biovariedades, es catalasa y oxidasa positivo, no requiere de CO₂ ni produce ácido sulfhídrico o a veces en pequeñas cantidades, algunas cepas son urea positivo, crecen en presencia de colorantes como fucsina y tionina. Reducen los nitratos y en las pruebas frente a los sueros monoespecíficos los cultivos lisos pueden reaccionar a ambos antígenos A y M.

En la fagotipificación las cepas lisas pueden ser lisadas por el fago Bk, pero no por los fagos Tb, Wb, Fi, en las diluciones habituales de prueba.

Las cepas de referencia son:

B. melitensis 16M ----- biovariedad 1
B. melitensis 63/9 ----- biovariedad 2
B. melitensis Ether ----- biovariedad 3

B. suis presenta cinco biovariedades. Es catalasa y oxidasa positivo, no requiere la presencia de CO₂ para su crecimiento, la Biovariedad 1 produce una gran cantidad de ácido sulfhídrico, así como otras biovariedades que no producen nada. Hidrolizan la urea en forma rápida. Generalmente crecen en presencia del colorante tionina pero la mayoría de las cepas son inhibidas por colorantes como fucsina y violeta de metilo.

En los cultivos lisos predomina el antígeno de superficie A, excepto en el biotipo 4 en cual reacciona de igual manera con los antisueros A y M y la biovariedad 5 reacciona solamente frente al antisuero monoespecífico M.

Los cultivos lisos son lisados por los fagos Wb, Bk en dilución habitual de prueba. Frente al fago Fi produce una lisis parcial.

Las biovariedades 1, 2 y 3 afectan a los cerdos y su distribución geográfica es la siguiente: la biovariedad 2 se encuentra localizada principalmente en Europa, existen reportes de su presencia en América, por ejemplo en Cuba, no se caracteriza por afectar al hombre, la biovariedad 3 es endémica de América del Norte y sur de China es muy semejante a la biovariedad 1 en cuanto a sus características epidemiológicas.

La biovariedad 1 es la más importante desde el punto de vista epidemiológico y económico, se encuentra en el sureste Asiático, las islas del pacífico y América Latina.

Algunas cepas de esta biovariedad presentan características atípicas en cuanto a su crecimiento en medios de cultivo que contienen colorantes.

Las cepas de referencias reconocidas son:

B. suis 1330 ----- biovariedad 1
B. suis Thomsen ----- biovariedad 2
B. suis 686 ----- biovariedad 3
B. suis 40 ----- biovariedad 4
B. suis 514 ----- biovariedad 5

Brucella neotomae (Stoern y Lackman 1957) se aisló de ratas del desierto (*Neotomae lepida*), en Utah, Estados Unidos y su distribución se limita a esta especie, sin haberse comprobado la infección en los animales domésticos o el hombre.

La *B. neotomae* es catalasa y oxidasa positiva, no requiere de CO₂ para su crecimiento, hidroliza rápidamente la urea, no crece en medios que contengan fucsina ni safranina, pero pueden crecer en presencia de tionina, reducen los nitratos a nitritos.

En los cultivos lisos el antígeno predominante es el A; y estos pueden ser lisados por los fagos Wb, Fi, Bk² en la dilución habitual de prueba. frente al fago Tb se produce una lisis parcial. Los cultivos rugosos o mucoides no son lisados por estos fagos. La cepa de referencia reconocida es *B. neotomae* 5K 33.

Brucella canis, fue originalmente descrita por Carmichel y Bruner en 1967 en los Estados Unidos, posteriormente se ha diagnosticado y aislado en otros países; por ejemplo existen focos endémicos en Argentina y México. Los cultivos se encuentran siempre en fase rugosa o mucoide en cultivo primario, la fase lisa no se ha observado.

La *B. canis* es catalasa y oxidasa negativo, no requiere CO₂ para su crecimiento ni produce ácido sulfhídrico, hidroliza rápidamente la urea, reduce los nitratos a nitritos. Su crecimiento se ve inhibido por fucsina pero crece en medios que contengan tionina a concentraciones estándares.

La cepa de referencia reconocida es *B. canis* RM6/66.

Brucella ovis (Buddle 1956) es el agente etiológico de la epididimitis de los carneros. Esta ampliamente difundida en todos los países donde la explotación ovina tiene importancia.

La *B. ovis* es catalasa y oxidasa positiva, requiere de CO₂ para su crecimiento. No produce ácido sulfhídrico ni hidroliza la urea, crece en presencia de fucsina y tionina en los medios de cultivo. No reduce los nitratos. Los cultivos primarios siempre están en fase rugosa. Los cultivos no son lisados por los fagos Tb, Wb, Fi, y Bk² en la dosis habitual de prueba, pero si son lisados por el fago del grupo R.

La cepa de referencia reconocida es *B. ovis* 63/290.

Recientemente se han descrito infecciones por bacterias del genero *Brucella* en mamíferos marinos.

Componentes antigénicos y propiedades estructurales del género *Brucella*

En las distintas especies de *Brucella* no se han detectado factores de virulencia clásicos como exotoxinas y cápsulas (Soto *et al*; 1991), por lo que su capacidad patogénica se debe más a fenómenos intracelulares. Se ha observado que las brucelas de tipo liso presenta especial habilidad para evadir los mecanismos de defensa del huésped, logrando sobrevivir y multiplicarse dentro de los leucocitos polimorfonucleares (PMN). Se sabe que esta habilidad esta mediada por componentes de superficie de la bacteria (Canning y Enright 1990).

Los miembros de este género poseen una envoltura celular característica del grupo de las Gram negativas formada por una membrana citoplasmática, un espacio periplásmico que

contiene al peptidoglucano y la membrana externa la cual es la primera estructura que entra en contacto con el sistema inmune (Martin y Hancock 1990, Díaz-Aparicio 1993).

Cápsula.- Oberti y col. (1982) mencionan la existencia de una capa externa, aparentemente capsular, por medio de electronografías en cepas en fase lisa aunque otros autores (Díaz-Aparicio 1993) mencionan que se puede tratar del LPS de la membrana externa.

Lipopolisacárido (LPS).- La molécula más abundante de la membrana externa de las bacterias Gram negativas es el LPS (del 2.5 - 3 % del peso seco de la bacteria) . El LPS esta compuesto por un lipido A, una región central o núcleo y una cadena polisacárida o antígeno "O". En las bacterias en fase lisa, el LPS cubre la mayor parte de la superficie externa, siendo el antígeno inmunodominante (Perry y Bundle 1990; Díaz-Aparicio 1993).

El lipido A de *Brucella* muestra gran diferencia en estructura con las bacterias entéricas contiene enlaces amido y residuos aciloxiacil, 3-O(16:O)12:O, 3-O(16:O)13:O, 3-O(16:O)14:O, 3-O(18:O)14:O, 3-OH-16:O, y 3-O-14:O y un inusual 2,3-diamino-2,3-dideoxi-D-glucosa como esqueleto de azúcar, el cual es similar al lipido A de varias bacterias fotosintéticas (Martin y Hancock 1990; Moriyón 1997).

La cadena "O" es un polisacárido que contiene los determinantes antigénicos responsables de la especificidad serológica entre las especies y serovariedades (Garin-Bastuji *et al*; 1990).

La molécula de LPS de cepas en fase lisa contienen los antígenos A y M, descritos por Wilson, Miles y Pirie en 1932, y considerados como los epitopos que se expresan predominantemente en la superficie de las células y sirven como característica diferencial de las diferentes especies de *Brucella*. Así se reconocían por medio de antisueros monoespecíficos especies A dominantes (*B. abortus*) y M dominantes (*B. melitensis*).

En la actualidad se sabe que el antígeno "O" de *B. abortus* 1119-3 esta constituido de un homopolímero lineal de unidades de D-manopiranosil, 4-6 dideoxi, 4-formamido unidos por enlaces alfa 1-2. La estructura del polisacárido "O" de *B. melitensis* también un homopolímero de D-manopiranosil, 4-6-dideoxi, 4-formamido (o perosamina) estructuralmente muy similar al de *B. abortus* lo cual explica la reacción cruzada entre estos microorganismos, pero no aclara la especificidad antigénica de A con respecto a M que se puede demostrar serológicamente (Alton 1975; Perry y Bundle 1990; López 1991).

Estudios detallados por resonancia magnética nuclear y electroforesis en geles de poliacrilamida realizados sobre el polisacárido-O del LPS producido por *B. melitensis* 16M (Perry y Bundle 1990; Garin-Bastuji *et al*; 1990) , encontraron diferencias entre los espectros de la cadena O del LPS de *B. abortus* 1119-3 y *B. melitensis* 16M, también se encontró que las cadenas-O estaban compuestas de residuos 4,6-dideoxi-4-formamido-D-manosa y la diferencia se encontraba en el sitio de la ramificación, otra diferencia se encontró en el patrón de electroforesis de la cadena-O de 16 M donde se encontraba una banda típica de LPS liso, compuesto de unidades de pentasacáridos; por lo que se determinó que el antígeno M es un polímero lineal formado por una unidad repetitiva de pantasacáridos integrada por una perosamina unida por enlace alfa 1,3 y cuatro perosaminas unidas por enlace alfa 1,2.

Otro dato interesante es que con la aplicación de ^1H y ^{13}C el análisis de la resonancia magnética nuclear mostró que el espectro de los polisacáridos-O de *B.abortus 1119-3* y *Y. enterocolitica O:9* son esencialmente idénticos.

Aunque el LPS de *Brucella* presenta la misma estructura general presenta diferencias con el de las enterobacterias, por ejemplo en su actividad biológica, este es menos activo que el de *E. coli*, ya que se requiere mayores cantidades para inducir efectos biológicos, tiene una baja actividad anticomplementaria y no induce reacción localizada de Schwartzman, por el contrario es tóxico para ratón y macrófagos, induce leucopenia temprana y leucocitosis; en los macrófagos tiene la habilidad de inducir la producción y liberación de interleucina-1, el factor de necrosis tumoral e interferón alfa. También presenta diferencias importantes en su extracción, cuando se utiliza la técnica de Westfal y col. (1952) de extracción agua-fenol, al contrario de lo que ocurre con el LPS de las enterobacterias el de las brucelas en fase lisa es extraído en fase fenólica.

Soto (1991) menciona que con esta técnica de extracción de LPS liso, la fracción 3 del LPS se obtiene en la fase acuosa y la fracción 5 del LPS se obtiene en la fase fenólica, además demostró que la fagocitosis por leucocitos PMN es igual en brucelas atenuadas y virulentas, pero las brucelas atenuadas son destruidas en mayor porcentaje que las virulentas y se observó que la fracción 5 tiene influencia en la sobrevivencia dentro del PMN.

Es necesario señalar que la fracción 5 difiere de la fracción 3 en que sólo la primera posee la cadena-O lo que hace pensar que esta fracción participa de alguna manera protegiendo a la bacteria de los lisosomas o bien inhibiendo algunos factores bactericidas del PMN. Varios autores coinciden en señalar al LPS como uno de los principales responsables de la evasión de la bacteria, sin que se haya aclarado el mecanismo exacto (Soto *et al.*; 1991; Díaz-Aparicio 1993). Canning (1990), Harmon y Glisson (1990) demostraron que sustancias de bajo peso molecular como la guanosina 5' monofosfato son estructuras secretadas por la bacteria que inhiben la formación del fagolisosoma y específicamente el sistema de la mieloperoxidasa- H_2O -haluro, bloqueando la iodinación de las proteínas de membrana externa.

Finalmente se ha demostrado en ratón que el LPS induce una gran respuesta primaria y secundaria, caracterizada por la producción de inmunoglobulinas de las clases IgM y de las cuatro subclases de IgG (Winter 1990).

Polisacáridos hapténicos.- El análisis inmunoelectroforético del LPS de células en fase lisa obtenido con fenol-agua, eter-agua o con ácido tricloroacético (Perry y Bundle 1990; López 1991; Díaz-Aparicio 1993) permite identificar además del LPS, un segundo componente conocido actualmente como poli B y es el equivalente del hapteno nativo de otras bacterias Gram negativas. Es posible que el poli-B sea el precursor biosintético de la cadena-O. El análisis estructural (Perry y Bundle 1990) lo han identificado como un polímero cíclico que contiene entre 17 y 24 residuos de glucosa.

Proteínas de membrana externa.- Existen tres grupos principales: el grupo 1 (85-94 kDa), de función desconocida, el grupo 2 (36-43 kDa) equivalentes a las porinas de *E. coli* y el grupo 3 (24-30 kDa) semejantes a la proteína OmpA de *E. coli*. Existe también una lipoproteína que ancla a través de un enlace covalente al peptidoglucano con la membrana externa (Martin y Hancock 1990; Sowa 1990).

Respuesta inmune humoral a los antígenos de *Brucella*.

La respuesta del huésped a una infección es variable y compleja, este hecho se ve reflejado en los diferentes grados de resistencia y susceptibilidad mostrado por cada uno de los miembros de una población. Estudios de control genético de resistencia a enfermedades infecciosas han demostrado que la herencia de esta resistencia natural es poligénica. Aunque los trabajos en esta área son recientes predicen una buena opción de obtener animales con resistencia natural a la brucelosis (Templeton y Adams 1990; Adams *et al.*; 1994).

El LPS por su localización externa en la célula son los primeros antígenos contra los que aparecen inmunoglobulinas de tipo M y G, tanto en la infección como en la vacunación. (Díaz-Aparicio 1993). La respuesta de inmunoglobulinas en bovinos, tiene una cinética clásica en las primeras etapas de la infección, después de la primera semana aparecen anticuerpos de clase IgM, que alcanzan su nivel más alto a las cuatro semanas. Progresivamente empieza a elevarse el título de IgG. Los niveles de IgM pueden permanecer altos por mucho tiempo. La respuesta por IgA es más tardía y recientemente se reportó que también se presenta una respuesta de IgE, con una cinética intermedia entre la IgM e IgG (FAO/OMS 1986; López 1991).

En brucelosis experimental en ratones Winter (1990) demostró que el suero hiperinmune o la fracción purificada de IgG total son protectores. El empleo de anticuerpos monoclonales que además de la especificidad del anticuerpo protector es determinante su isotipo, ya que no todas las subclases de IgG confieren protección (Montaraz *et al.*; 1986). La IgG1 en bovinos e IgG2 en ratones tiene efecto protector, en cambio la IgG2 bovina e IgG1 murina no confieren protección contra la infección por *Brucella*.

Una observación importante es que la protección dada exclusivamente por anticuerpos solo se logra si están presentes antes de la infección y si la carga infectante es pequeña (Winter 1990). La IgG2a es el anticuerpo protector que es específico contra la cadena-O del LPS (Montaraz *et al.*; 1986), pero es posible que también se formen contra proteínas (Cloekaer *et al.*; 1992).

Gómez-Miguel y Moriyón (1986) detectaron en bovinos anticuerpos contra proteínas de membrana externa, pero la respuesta humoral no fue comparable con la detectada para el LPS y el hapteno nativo, sin embargo la infecciones por brucelas rugosas, como menciona Díaz-Aparicio (1993) en la infección por *B. ovis* estimula una respuesta de IgG intensa contra proteínas del grupo 2 y otras proteínas menores (Suárez *et al.*; 1991). Zygmunt *et al.*; (1994) demostraron algo similar en la respuesta inmune hacia las proteínas de membrana externa con la vacuna de *B. melitensis* Rev 1 en ovinos. Estudios realizados con la cepa mutante de *B. abortus* la RB51 (Schurig *et al.*; 1991; Stevens *et al.*; 1995; Brees *et al.*; 1995) se ha observado que en bovinos también produce una respuesta importante contra proteínas de membrana externa y una pobre o nula respuesta contra el LPS.

El hapteno nativo y el poli-B se comportan en forma diferente al LPS, en animales de experimentación, la aparición de inmunoglobulinas precipitantes, dependen de la intensidad del estímulo dado por el antígeno (Díaz-Aparicio 1993).

Situación de la Brucelosis en México

México es un país con una gran diversidad geográfica y por tanto climática, posee una ganadería variada distribuida en todo el territorio nacional. La brucelosis bovina se encuentra distribuida por todo el país, sin embargo, el ganado bovino lechero se localiza principalmente en explotaciones intensivas o cuencas, localizadas en la parte centro y norte del país donde se ha registrado una gran incidencia (Casillas 1979; Del Río 1979).

La brucelosis caprina es considerada la más relevante en el país por el número elevado de casos humanos que genera (López 1991). En el contexto internacional, México ocupa el decimoquinto lugar en existencia de ganado caprino con 6.9 millones de cabezas, aproximadamente el 50 % del total de los caprinos se suman en los estados de Oaxaca 11.5 %, Coahuila 11.4 %, San Luis Potosí 10 %, Puebla 8.3 % y Nuevo León con 8 %¹. Este ganado está distribuido por todo el territorio nacional, encontrándose principalmente en los estados de la meseta central en explotaciones que van de tecnificadas a rústicas y como rebaños nómadas que se mueven en zonas extensas en los estados de Oaxaca, Veracruz y Puebla.

En estudios realizados por Flores-Castro (1976) se demostró la presencia de *B. canis* en la ciudad de México, en estos estudios se identificó por serología y aislamiento del microorganismo.

Para la brucelosis porcina se tiene una prevalencia estimada de 3.6 %, la cual debe ser tomada con reserva por las dificultades que presenta su diagnóstico serológico. En 1962 Velázquez y Vallarino realizaron un estudio por hemocultivo y espermocultivo en 121 cerdos del D.F. obteniendo 60 aislamientos.

B. ovis ha sido poco estudiada en el país, estudios recientes realizados por Nuñez *et al.*; (1995) encontraron una prevalencia por hato de hasta un 20 %.

Brucelas confirmadas en el territorio nacional por aislamiento y tipificación (FAO/OMS 1986):

Brucella abortus biotipos 1, 2, 3, 4 y 9

Brucella melitensis biotipos 1 y 3

Brucella suis biotipo 1

Brucella ovis

Brucella canis

Repercusión en la Población Humana.

Los problemas de salud pública provocados por bacterias del género *Brucella* se explican con facilidad si se considera que una gran parte de la población se encuentra en contacto estrecho con las especies domésticas transmisoras de *Brucella*. Además debemos considerar las actividades económicas y de subsistencia en las cuales se expende leche y derivados

¹ VII Censo Agropecuario 1991. Panorama Agropecuario, Estados Unidos Mexicanos. INEGI. 1991.

contaminados que no solo afectan a la población local, también contribuyen a la infección de un número considerable de individuos de otras comunidades (López 1991).

Se ha informado que existe mayor riesgo de adquirir brucelosis cuando la leche o subproductos están contaminados por *B. melitensis* que con *B. abortus*. Esta última es destruida más rápido por el jugo gástrico, además de ser poco resistente al ácido láctico de la leche, por esto es propuesto que para *B. abortus* la vía digestiva es un mecanismo de infección menos eficiente (Alton 1987; López 1991). En 1992, la producción nacional de leche fresca fue de 7,000 millones de litros aproximadamente, de los que solo el 20 % fue pasteurizado, el resto de la producción se destino: 40 % a la industria y sus derivados y el restante 40 % fue consumo de leche bronca (López 1991; Gurria 1994).

La endemia de la brucelosis en México se ha presentado en forma ascendente, en la década de los 80, la tasa promedio fue de 5 a 6 casos por cada 100,000 habitantes. Presentando en estados como Sonora y Coahuila tasas de 35.2, Guanajuato 40 y Querétaro hasta un 70 por cada 100,000 habitantes (Estadísticas de la Dirección General de Epidemiología de la S.S.A.), citadas por López (1991). Para 1994 y 1996 el total de casos acumulados fue de 3491 y 3362 respectivamente, siendo los estados de Guanajuato, Sonora Coahuila, Durango, Nuevo León, Sinaloa, Puebla y Zacatecas donde se presentaron el mayor número de casos².

En la misma década de los 80 el grupo más afectado oscilaba entre las edades de 15 y 44 años, seguido por el de 5 a 14 años. La brucelosis en humanos puede provocar estados muy graves de incapacidad física y como el grupo mayoritario que afecta es la población económicamente activa, entonces esta enfermedad tiene un grave impacto en la economía familiar; con respecto al sexo, el más afectado es el femenino (52.6 %), algunos autores mencionan que las brucelas pueden ser transmitidas a mujeres embarazadas provocando aborto (López 1991), mientras otros mencionan que no hay abortos por brucelosis en humanos (Salman 1995). Para la brucelosis se presentan casos en todo el año, pero se observa un aumento de ellos en los meses de mayo a octubre. Se da por hecho que existe un subregistro de la enfermedad sobre todo en el ambiente rural por la falta de atención médica y en la ciudad por no ser un agente prioritario de búsqueda, en consecuencia se desconoce la magnitud real de la morbilidad y mortalidad por brucelosis. Algunos autores mencionan un promedio de fatalidad del 2 % en pacientes sin tratamiento (Salman 1995).

Impacto económico

En 1970 las pérdidas económicas por brucelosis bovina se calcularon alrededor de los 800 millones de pesos (equivalentes a los 64 millones de dólares). En 1979, el programa de Sanidad Animal estimó las pérdidas en 2400 millones de pesos para ganado bovino y en 73 millones para ganado caprino (Casillas 1979).

En la actualidad México se ve obligado a importar grandes volúmenes de leche en polvo para cubrir sus necesidades, se calcula un déficit de alrededor de 12 millones de litros de leche al día, esto sumado a las mermas de producción de carne, esta enfermedad es

² Fuente: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. EPI-1-95. Procesó: DGE.

responsable de pérdidas millonarias. Por otro lado la brucelosis es una limitante para que los ganaderos puedan comerciar sus productos en otros países (Gurria 1994) .

A partir de 1993 se publicó en el Diario Oficial de la Federación, la Campaña Nacional contra la Brucelosis Animal en México, con carácter obligatorio, general y permanente en todo el territorio nacional. Pese a esto, la cobertura del hato caprino nacional (6.9 millones de cabezas) ha sido mínima.

Estadísticas de la Comisión Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis bovina y Brucelosis (CONETB) en el año de 1995, mencionan que el número de animales probados para el diagnóstico de la brucelosis fue de 230,454 y de estos 4, 689 fueron positivos; es importante mencionar que algunas entidades no presentaron datos y otras, en donde se realizaron las pruebas, no mencionaron el número de positivos.

Para el mismo año el número de animales vacunados fue de 400,097, apenas el 6 % del total del hato. La penetración de la vacuna *B. melitensis* Rev 1 en el país fue de 135,820 en dosis normal y 591,800 en dosis reducida, en el mismo periodo.³

El diagnóstico de la brucelosis se basa en el cultivo microbiológico y en pruebas serológicas que principalmente han sido diseñadas para el diagnóstico de la enfermedad en bovinos y se le ha restado importancia a los pequeños rumiantes, que como se ha mencionado, en nuestro país son la principal fuente de transmisión de la brucelosis a los humanos; un ejemplo de esto es un estudio reciente realizado por nuestro equipo de trabajo (Alfonseca y Suárez 1995 sin publicar) en una comunidad del municipio de Salamanca en el estado de Guanajuato, donde se muestreo un total de 250 cabras, las cuales no tenían antecedentes de vacunación, y resultaron con seropositividad de hasta un 75 % por hato. Asimismo se obtuvo suero de 8 personas adultas y 2 niños que habitan en la comunidad obteniéndose 9 seropositivos.

Es bien conocido que el diagnóstico serológico ofrece limitantes de especificidad y sensibilidad, ya que se han reportado reacciones cruzadas con otros antígenos y la gran mayoría no puede diferenciar animales vacunados de infectados, recientemente se han desarrollado técnicas inmunoenzimáticas indirectas o competitivas como la desarrollada por el Dr. Adams y colaboradores en la Universidad de Texas A&M⁴, esta ELISA-c presenta un anticuerpo monoclonal dirigido a un epítipo de *B. abortus* el cual es capaz de diferenciar animales vacunados con cepa 19 de infectados con cepa de campo (Overholt et al 1988; Adams y Mía 1991). Este equipo de diagnóstico se ha evaluado recientemente en las condiciones de nuestro país y ha probado ser efectivo en la diferenciación de animales vacunados de infectados (Alfonseca et al; 1995 a,b; Suárez et al; 1995).

En los últimos años se ha dado un desarrollo importante en las técnicas de microbiología molecular aplicadas al diagnóstico en microbiología, como la amplificación de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la actualidad es usada comúnmente para el diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas en los animales y el hombre (Barker 1990; Widjoatmodjo et al; 1994). Estudios previos han demostrado que el PCR puede ser utilizado para la detección de DNA de *Brucella* siendo altamente sensible, confiable y eliminando los riesgos de infección al personal de laboratorio (Ficht et al; 1989; Fekete et

³ Fuente: Reporte de los Coordinadores Estatales. CONETB-SAGAR, 1996.

⁴ *Brucella abortus* Antibody test Kit. SYNBIOTICS Corp.

al; 1992; Martínez-Soriano *et al;* 1993; Bricker *et al;* 1994; Leal- Klevezas *et al;* 1995 a,b; Romero *et al;* 1995 a,b; Matar *et al;* 1996; Ficht *et al;* 1996).

Alton (1987) y el Comité Mixto de Expertos en Brucelosis (1986) mencionan que la mejor estrategia o programa de control de la brucelosis en pequeños ruminantes en países como el nuestro con una alta prevalencia de la enfermedad es la vacunación masiva con la cepa Rev 1 de *Brucella melitensis*, lo cual contribuiría a disminuir la diseminación de la enfermedad, este tipo de programas deben estar respaldados por una adecuada infraestructura para el diagnóstico de la enfermedad, para poder seguir con un programa de erradicación.

La cepa Rev 1 es una mutante dependiente de estreptomycinina, la cual se origina de una cepa virulenta de *B. melitensis*, esta cepa tiene varias características de identificación y diferenciación de otras cepas de *B. melitensis*. La característica de crecimiento en presencia de los antibióticos penicilina y estreptomycinina es el mejor medio de diferenciación de Rev 1 de una cepa típica de *B. melitensis*: La cepa de campo crece en medio con 2.5 o 5 UI/ml de penicilina mientras que la Rev 1 es completamente inhibida por estas dos concentraciones. Por otro lado la Rev 1 crece en medios que contengan 2.5 ug/ml de estreptomycinina, concentración suficiente para inhibir el crecimiento de la cepa de campo (Alton 1990; Alton y Elberg 1967).

Existen controversias con el uso de la cepa Rev1, se sabe que el uso de dosis completa en cabras adultas puede inducir aborto además de que la respuesta serológica posterior a la vacunación puede persistir por largos periodos de tiempo, hasta cuatro años (Alton 1987), interfiriendo con el diagnóstico de la enfermedad. Las recomendaciones para el uso de la vacuna Rev 1 (FAO/OMS 1986; Alton 1987) es la vacunación de animales jóvenes 3 a 8 meses con dosis de 10^9 en un volumen de 2 ml por vía subcutánea y en los animales adultos con dosis reducida de 5×10^4 , no es recomendable revacunar.

En la actualidad diversos grupos de investigadores (Adams 1990; Schurig 1991) trabajan en la búsqueda de nuevos inmunógenos que confieran una buena protección y puedan ser diferenciados con las diversas pruebas serológicas. Dos de estos inmunógenos candidatos a ser utilizados como vacunas vivas en caprinos son:

1.- La cepa de *B. abortus* RB51, que es una mutante rugosa derivada por pases repetidos de la cepa virulenta *B. abortus* 2308 seleccionada por resistencia a rifampicina. La RB51 absorbe el cristal violeta y autoaglutina en suspensión, no contiene la cadena O-LPS, utiliza el eritritol como la 2308, la inoculación intraperitoneal en ratón produce una colonización en bazo el cual se limpia después de cuatro semanas posinfección, los animales vacunados no dan positivos en el estándar de aglutinación en tubo, tarjeta y fijación de complemento. La RB51 es menos virulenta que la cepa 19 y se elimina más rápido, no induce abortos en cabras (Schurig *et al;* 1991; Stevens *et al;* 1995; Soberón 1997).

2.- La cepa de *B. abortus* S2308::Tn5, que es una mutante rugosa derivada por mutagenesis mediada por transposon de la cepa virulenta *B. abortus* 2308. Es resistente a kanamicina, no sobrevive en macrófagos bovinos, carece de O-LPS, probado por falta de reacción con anticuerpos monoclonales monoespecíficos para O-LPS, tiene alteraciones en su superficie que pueden ser identificadas por la absorción de cristal violeta (Smith y Heffron 1987).

Existe una serie de requerimientos fundamentales de bioseguridad y eficacia para el desarrollo y uso de vacunas vivas de *Brucella*, además de que estas deben ir acorde a las necesidades de la industria pecuaria y a los programas nacionales de prevención y control, estos requerimientos son (Adams 1990):

- 1.- No producir enfermedades en los animales vacunados.
- 2.- Prevenir la infección en ambos sexos y a cualquier edad.
- 3.- Prevenir aborto y esterilidad.
- 4.- Proveer protección por largos periodos de tiempo contra la infección y aborto con una sola vacunación.
- 5.- No estimular la persistencia de anticuerpos que interfieran con las pruebas serodiagnósticas en el diagnóstico de infecciones de campo.
- 6.- Si la cepa vacunal se establece en una infección latente no debe ser transmitida a otros animales.
- 7.- Debe ser biológicamente estable, no debe revertir a virulenta bajo condiciones *in vitro* e *in vivo*.
- 8.- No debe ser patógena para el hombre.
- 9.- No debe contaminar carne ni productos lácteos.
- 10.- Debe ser fácilmente cultivada y estandarizada a gran escala bajo la tecnología de la fermentación.

Con base a la revisión aquí expuesta se puede evidenciar la necesidad que tiene México de reforzar sus investigaciones en el control de la brucelosis con especial énfasis en los caprinos por ser una especie de gran importancia económica para nuestro país, no existe información en la literatura consultada de como se va presentando la respuesta inmune humoral dada por las subclases de IgG, IgG1, IgG2 e IgM en los caprinos después de la infección y la respuesta a la vacunación con *B. melitensis* Rev1, *B. abortus* RB51 y *B. abortus* S2308::Tn5 mutante por transposición, estas dos últimas vacunas experimentales que no se conoce su comportamiento en cabras y el cual va a ser evaluado por primera vez en nuestras condiciones. México no cuenta con pruebas inmunoenzimáticas de desarrollo específico para el diagnóstico de la brucelosis en caprinos y a nivel mundial tampoco hay desarrollo de pruebas inmunoenzimáticas para evaluación y diagnóstico de las vacunas experimentales en caprinos.

Objetivo General

Evaluación de los perfiles serológicos de los diferentes isotipos en la respuesta inmune humoral (IgM, IgG, IgG1 e IgG2) en cabras vacunadas con diferentes protocolos y desafiadas experimentalmente con *B. melitensis*, mediante 2 tipos de inmunoensayos enzimáticos con LPS liso y rugoso como antígeno de captura.

Objetivos Específicos

- 1.- Estandarización de un inmunoensayo enzimático indirecto utilizando como antígeno de captura LPS completo de *B. melitensis* 16 M, para la detección de inmunoglobulinas antibrucela en cabras.
- 2.- Estandarización de dos inmunoensayos enzimáticos indirectos utilizando como antígeno de captura cepas rugosas de *B. abortus*: a) Bacteria completa de *B. abortus* S2308::Tn5 y b) bacteria completa de *B. abortus* RB51, para la detección de inmunoglobulinas antibrucela en cabras.
- 3.- Evaluación de los perfiles serológicos de IgM, IgG, IgG1 e IgG2 en cabras seguido de la vacunación de *B. melitensis* Rev. 1 por vía conjuntival y subcutánea, *B. abortus* RB51 y *B. abortus* S2308::Tn5 por vía subcutánea e infección experimental con *B. melitensis*.
- 4.- Evaluación de dos tipos de conjugados: a) anti-IgG caprina con peroxidasa y b) proteína G con peroxidasa, para la detección de IgG antibrucela en un inmunoensayo enzimático.
- 5.- Producción de conjugados monoespecíficos contra γ -globulinas caprinas: $\gamma 1$ y $\gamma 2$.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas

Se utilizaron las siguientes cepas:

- a) *B. melitensis* Rev 1 (fase lisa , atenuada) (PRONABIVE)⁵.
- b) *B. abortus* RB51 (fase rugosa, avirulenta) proporcionada por el Dr. G. Schurig.
- c) *B. abortus* S2308::Tn5 (fase rugosa, avirulenta) mutante por transposición proporcionada por el Dr. L. Garry Adams y Dr. Thomas A. Ficht.
- d) *B. melitensis* 16 M biovariedad 1 (fase lisa, virulenta) obtenida del cepario del Departamento de Microbiología e Inmunología, esta cepa fue utilizada para la extracción de antígenos (LPS).
- e) *B. melitensis* biovariedad 3 (fase lisa, virulenta) aislada a partir de órganos de cabras infectadas en un brote de campo en Torreón, México en 1995, y proporcionada por el Dr. Efrén Díaz (CENID-Microbiología, SAGAR/FMVZ-UNAM), esta cepa fue utilizada para la infección experimental.

Las cepas fueron cultivadas en agar *Brucella* y agar triptosa se colectaron y se mantuvieron congeladas a -80°C en leche semidescremada estéril.

El manejo de los biológicos se realizó dentro del Laboratorio de Bioseguridad del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM.

Animales y Diseño Experimental

Se seleccionaron 95 cabras criollas, 80 de ellas del municipio de Pánuco, Zacatecas, y las 15 restantes de Ajuchitlán, Querétaro. Con las siguientes características:

- cabras adultas
- sin antecedentes de vacunación.
- Negativas a brucelosis tanto por bacteriología de leche y exudados vaginales como por serología en las pruebas de fijación de complemento y tarjeta ácida al 3%.

La selección de los animales y la asignación a cada uno de los grupos se hizo en forma aleatoria.

Se formaron los siguientes grupos de animales:

- Grupo 1.- 15 cabras vacunadas por vía conjuntival con dosis normal (1×10^9) de *B. melitensis* Rev 1.
- Grupo 2.- 15 cabras vacunadas por vía subcutánea con dosis reducida (1×10^5) de *B. melitensis* Rev 1.
- Grupo 3.- 15 cabras vacunadas por vía subcutánea con dosis (2.5×10^8) de *B. abortus* RB51.

⁵ Productora Nacional de Biológicos Veterinarios.

Grupo 4.- 15 cabras vacunadas por vía subcutánea con dosis (2.8×10^8) de *B. abortus* S2308::Tn5.

Grupo 5.- 15 cabras control positivo sin vacunar e infectadas experimentalmente por vía conjuntival con dosis de 4×10^5 UFC de *B. melitensis* aislada de un brote en México.

Grupo 6.- 20 cabras control negativo sin vacunar ni infectar.

Los grupos 1 a 4 y 6 (80 cabras), de Zacatecas, fueron obtenidas a préstamo por dos pequeños caprinocultores. Estos hatos no tenían antecedentes de brucelosis ni de vacunaciones previas. Las cabras fueron identificadas con arete plástico en la oreja derecha, estos hatos son explotados extensivamente y se caracterizan por salir a pastoreo diario con la misma ruta, la alimentación se basa en el consumo de flora nativa durante nueve meses del año y en invierno se suplementan con esquilmos agrícolas, principalmente paja de frijol y nopal chamuscado.

El municipio de Pánuco, Zacatecas, tiene una superficie de 560 Km² y se localiza entre los 22° 56' 16" latitud norte y 102° 29' 8" longitud oeste, con una altura de 2240 msnm Al norte colinda con los municipios de Villa de Cos y Fresnillo, al oriente y sur con los municipios de Guadalupe y Vetagrande, al poniente con Calera y Morelos. La climatología de la zona es semi-seco templado. La precipitación pluvial media anual esta entre los 200 y 400 mm, donde la mayor incidencia de lluvias se registra en el mes de agosto, con oscilación entre 70 y 80 mm. Los meses más secos son febrero y marzo con una precipitación menor de 5 mm. La temperatura media anual es de 18°C. La máxima corresponde al mes de mayo y la temperatura mínima se presenta en enero con 10.5°C.⁶

Las 15 cabras del grupo 5 se compraron en el municipio de Ajuchitlán, Querétaro y se transportaron a la ciudad de México, se identificaron con arete plástico y dadas las características de este grupo, control positivo, que sufrieron la infección experimental con cepa de campo de *B. melitensis*, se alojaron en los corrales de aislamiento del CENID-Microbiología del INIFAP-SAGAR, ubicado en el Km 15 de la carretera federal México - Toluca.

Los grupos 1, 2, 3, 4 y 6 fueron muestreados los días 0, 30, 60, 90, 120 y 150 posvacunación. El grupo 5 fue muestreado en los días 0, 10, 20, 30, 45, 60 y 90 posinfección.

Colección y mantenimiento de muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción de yugulares en tubo y aguja vacutainer⁷ en los días establecidos, los tubos se centrifugaron para obtener el suero. El suero se alicuotó en tubos eppendorf y se mantuvo a -80°C en ultracongelador.

⁶ Síntesis Geográfica de Zacatecas, 1991.

⁷ Becton Dickinson.

Purificación e identificación inmunoquímica de anticuerpos $\gamma 1$ y $\gamma 2$ caprinos a partir de suero y calostro y producción de antisueros conjugados con peroxidasa (Fey *et al*; 1976; Harlow y Lane 1988).

Purificación de inmunoglobulinas con sulfato de amonio, ácido caprílico y filtración en gel.

El uso de columnas de cromatografía de intercambio iónico para la purificación de anticuerpos es recomendada con la combinación de los métodos de precipitación con sulfato de amonio y ácido caprílico para lograr una pureza de inmunoglobulina cercana al 100 %.

Procedimiento:

Precipitación con sulfato de amonio.

Se obtuvieron los siguientes volúmenes a partir de cabras:

- calostro 800 ml
- suero 1 (negativo a *Brucella*) 250 ml
- suero 2 (positivo a *Brucella*) 300 ml
- suero 3 (positivo a *Brucella*) 225 ml

1.- las muestras se centrifugaron a 2860 x g por 15 minutos a 4°C, se separó el sobrenadante, al calostro se le quitó la grasa, se colocaron en vasos de precipitado y se trabajaron en baño de hielo y agitación constante.

2.- se adicionó el sulfato de amonio saturado a 50 % de volumen final, se dejó en agitación constante por 24 horas a 4°C.

3.- se centrifugaron a 2860 x g por 15 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante, el precipitado se dializó contra agua y después contra agua destilada toda la noche a 4°C.

4.- El dializado se centrifugó a 2860 x g por 15 minutos.

5.- el sobrenadante del calostro fue sometido a acidificación con ácido clorhídrico (HCl) 0.5 M hasta un pH de 4.6 en agitación constante y goteo lento para precipitar la caseína, de inmediato se centrifugó a 2860 x g por 15 minutos a 4°C. La caseína precipitada se deshecho y el sobrenadante fue filtrado con papel Whatman número 1. Se le adicionó por goteo y en agitación constante hidróxido de sodio (NaOH) 0.5 M hasta alcanzar un pH de 7.0

6.- Los sobrenadantes de sueros y calostro se precipitaron nuevamente con volumen final de sulfato de amonio al 35 % durante toda la noche a 4°C.

7.- El precipitado se dializó contra agua por 24 horas, se centrifugó a 13800 x g por 15 minutos. El sobrenadante se identificó y se guardó a 4°C.

Precipitación con ácido caprílico

Los sobrenadantes de las muestras de suero y calostro se dializaron contra una solución de acetato de sodio 60 mM pH 4 - 4.8 por 24 horas a 4°C, la purificación con ácido caprílico requiere de un pH ácido. El pH final debe ser 4.8, ajustandose cuando fue necesario.

El ácido caprílico se calculó para que quedara a una concentración final del 5 %, además se debió realizar una corrección del volumen adicionado. El ácido caprílico fue adicionado por goteo y agitación constante.

	Volumen (ml)	5 % - Ác. Caprílico	- Corrección	Vol Final (ml)
Colostro	230	11.5	0.575	12.075
Suero 1	70	3.5	0.175	3.675
Suero 2	70	3.5	0.175	3.675
Suero 3	66	3.3	0.165	3.465

Las muestras se centrifugaron a 13800 x g por 15 minutos a 4°C, el sobrenadante (IgG) se dializó contra agua destilada por 48 horas a 4°C. Posteriormente se dializó contra Tris-HCl 0.01 M pH 8.5, hasta equilibrar el pH.

Se determinó la concentración de proteínas de cada muestra en una dilución de 1:500 con Tris-HCl 0.01 M con un espectrofotómetro a UV = 280 nm (A_{280}).

$$\text{mg/ml} = \frac{\text{D.O. (D.O.} \times \text{dilución)}}{1.4 \text{ (coef. de extinción molar)}}$$

Muestra	D.O (A_{280})	mg de proteína/ml
Calostro	0.312	111.42
Suero 1	0.130	46.42
Suero 2	0.189	67.5
Suero 3	0.118	42.142

Purificación de subclases de IgG por cromatografía de intercambio iónico con dietilaminoetil-Sephadex A-25 (DEAE Sephadex A-25)⁸.

Se pesaron 10 gramos de DEAE Sephadex-A25 que se hidrató con agua destilada por 24 horas, se decantó y se resuspendió en solución amortiguadora de Tris-HCl 0.01 M pH 8.5 hasta que la resina se equilibró con esta solución.

La resina de intercambio iónico se empacó en una columna (15 x 2) y se equilibró con la solución amortiguadora de Tris-HCl 0.01 M pH 8.5, previamente desgasada.

⁸ Sigma.

Separación de la fracción γ 1 a partir del purificado de calostro.

10 ml del dializado de calostro caprino contra Tris-HCl 0.01 M pH 8.5 fue colocado en la columna de DEAE-Sephadex A-25, con las siguientes condiciones: Absorbancia=1, 10 mV, 0.5 mm/min. La fracción no retenida (primer pico) fue colectada y rotulada. La fracción retenida (segundo pico) fue eluida con gradiente (0 - 0.5 M) de cloruro de sodio (NaCl) y se colectó en fracciones de 60 gotas (2 ml) con un Colector Automático Bio-Rad, se midió A_{280} , se mezclaron fracciones hasta dejar tres representativas.

Se realizó una corrida electroforética en gel de poliacrilamida con IgG bovina como marcador para control de calidad de cada fracción.

Se seleccionó la primer fracción, se concentró, se dializó contra Tris-HCl 0.05 M NaCl 0.5 M pH 7.5, se filtró (0.45 μ m) y se pasó por una columna de Proteína A sefarosa con la solución de equilibrio para la columna (Tris-HCl 0.05 M NaCl 0.5 M pH 7.5).

Se colectó el primer pico no retenido en fracciones de 30 gotas (1 ml) en 0.5 ml de solución neutralizante de Tris 1 M pH 8.5 (IgG1).

Se eluyó la fracción retenida con solución de glicina 0.1M pH 3 y se colectó en fracciones que se rotularon.

La fracción no retenida por Proteína A (IgG1) se concentró y se dializó contra una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4.

Separación de la albúmina por medio de cromatografía de afinidad con Sefarosa Azul (Blue Sepharose CL6B)⁹

Se pesaron 2.2 gramos de sefarosa que se dejaron hidratar en agua destilada por 24 horas, después se lavó exhaustivamente con agua destilada. El gel se empacó en una columna de 12 x 1 cm y se equilibró con solución amortiguadora PBS 10 mM pH 7.4.

El dializado de calostro no retenida por Proteína A se pasó por la columna de sefarosa azul con PBS.

La fracción no retenida libre de albúmina (IgG1 pura) se colectó en fracciones de 1 ml.

La albúmina retenida se eluyó con PBS 50 mM, 1.5 M NaCl pH 7.4, que se elimina, la columna se regenera con una solución de urea 6 M en PBS 10 mM 0.15 M NaCl pH 7.4.

Separación de la fracción γ 2 a partir del purificado de suero caprino.

10 ml del dializado de suero 1 caprino contra Tris-HCl 0.01 M pH 8.5 fue colocado en la columna de DEAE-Sephadex A-25, con las siguientes condiciones: Absorbancia=1, 10 mV, 0.5 mm/min. La curva ascendente del primer pico (no retenido) es IgG2 casi pura y fue colectado en fracciones de 60 gotas (2 ml) y se les midió A_{280} . Esta fracción se filtro por cromatografía en dos ocasiones, se concentró y se dializó contra agua destilada. Se realizó control de calidad con una electroforesis en gel de poliacrilamida.

La fracción retenida fue eluida con una solución de 0.5 M de NaCl, concentrada, dializada contra agua destilada y rotulada.

⁹ Pharmacia.

El concentrado de IgG2 se dializó contra solución amortiguadora de equilibrio de la columna de sefarosa azul (PBS 10 mM 0.15 M NaCl pH 7.4). Se paso por la columna de afinidad para separación de albúmina, la fracción no retenida, IgG2 pura, se concentró, dializó y se liofilizó.

La purificación de IgG2 para los sueros 1, 2 y 3 se realizó de la misma manera.

La pureza de las fracciones ($\gamma 1$ y $\gamma 2$) se comprobó por inmunoelectroforesis con suero comercial de conejo anti-IgG caprino¹⁰.

Inmunoelectroforesis.

Se utilizaron placas de vidrio de 5 x 7.5 cm con placa base de agarosa al 0.5 %. Por placa se prepara agarosa al 0.8 % en agua destilada (4 ml) y se mezcla en un volumen igual en solución amortiguadora de dietilbarbital (veronal) 2X pH 8.6 (9 gramos de dietilbarbiturato de sodio en 700 ml de agua destilada, agregar 65 ml de HCl 0.01 M y ajustar a pH 8.6, cbp 1000 ml, conservar a 4°C.

Se colocaron 20 μ l de cada una de las fracciones ($\gamma 1$ y $\gamma 2$) en los extremos. Se corrió la inmunoelectroforesis en solución amortiguadora de veronal por 1 hora a 10 mA. El conjugado anti-IgG caprina¹¹ (150 μ l diluida 1:5 en solución amortiguadora de veronal), se colocó en el pozo central. La placa se guardo en cámara húmeda por 24 horas.

La placa se lavó con PBS para eliminar el exceso de proteína y se reveló con la siguiente solución:

1.- 100 μ l de H₂O₂ al 30 % en 100 ml de PBS 10 mM pH 7.4 0.15 M NaCl.

2.- 60 mg de 4-cloro-naftol disuelto en 20 ml de metanol frío (-20°C).

Se mezcla y se revela por 2 minutos, la reacción se para con agua fría.

Preparación de los sueros anti- γ -globulinas caprinas

Se realizó control de calidad de las fracciones purificadas $\gamma 1$ de calostro y $\gamma 2$ de suero por electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunoelectroforesis.

Las preparaciones de $\gamma 1$ y $\gamma 2$ fueron diluidas a D.O. de 2.0 a A₂₈₀ y se emulsificó con adyuvante de Freund¹²: 0.6 ml de antígeno y 0.6 ml de adyuvante se inmunizaron 2 conejos vía subcutánea en diferentes sitios de la espalda con el siguiente calendario:

Semana	Inmunización	Ag	Adyuvante de Freund
1ª	1ª	0.6 ml	0.6 ml Completo
2ª	2ª	0.6	0.6 Incompleto
3ª	3ª	0.6	0.6 "
4ª	4ª	0.6	0.6 "
5ª	-	-	-
6ª	5ª	0.6	0.6 "

¹⁰ Sigma

¹¹ Sigma.

¹² Difco.

Los conejos se sangraron por punción cardíaca, se separó el suero y se determinaron los patrones por inmunolectroforesis y doble difusión en agar (Ouchterlony).

Purificación de suero anti- γ -globulinas de cabra.

Los sueros se diluyeron con dos volúmenes de solución amortiguadora de acetato de sodio 60 mM pH 4.0, con agitación magnética suave se adicionó ácido caprílico en relación de 0.75 ml por cada 10 ml de suero, se mantuvo por 30 minutos agitando a temperatura ambiente. Se centrifugó a 8820 x g por 15 minutos a 4°C y el sobrenadante se dializó contra agua y posteriormente contra PBS en frío toda la noche.

El dializado se precipitó con sulfato de amonio al 70 %, se centrifugó, el precipitado se resuspendió en 5 ml de agua destilada y se dializó toda la noche en frío contra agua y posteriormente contra PBS.

Purificación de anti- γ 1 y anti- γ 2 caprinas por columnas de Inmunofinidad.

Se pesaron 3 gramos de sefarosa activada con bromuro de cianógeno (4B CN Br)¹³ y se dejaron hidratar en 30 ml de HCl 1 mM por media hora.

El gel se lavó con un litro en solución amortiguadora de HCl 1 mM en un filtro de vidrio, previamente lavado con agua destilada caliente, después se lavó con 100 ml de solución amortiguadora de acoplamiento de carbonatos (Carbonato-bicarbonato de sodio) 0.1 M pH 8.3.

Se hicieron dos soluciones, una para cada una de las γ -globulinas purificadas, 30 mg de IgG1 en 20 ml de solución amortiguadora de acoplamiento y 20 mg de IgG2 en 20 ml de solución amortiguadora de acoplamiento, se midió la A_{280} , para γ 1 $A_{280}=1.08$ y γ 2 $A_{280}=1.071$.

Los geles se colocaron en un vaso de precipitado con solución amortiguadora y proteína de acoplamiento, se incubaron por dos horas en agitación suave a temperatura ambiente y se volvió a leer la A_{280} para determinar el porcentaje de proteína acoplada al gel.

Se bloquearon los sitios activos con solución amortiguadora de glicina 0.02 M pH 8 por 2 horas, el exceso de proteína y glicina se eliminó con 4 lavados alternados en solución amortiguadora de acetato de sodio 0.1 M NaCl 0.5 M pH 4.0 y solución amortiguadora de carbonatos, al final el gel se equilibró con PBS.

Se armó cada una de las columnas de inmunofinidad se equilibró con PBS, se les agregó timerosal y se refrigeraron a 4°C.

Estrategia de purificación:

Las fracciones de anti- γ -globulinas purificadas de los conejos se pasaron por las columnas de inmunofinidad (IA) de la siguiente forma:

Fracción anti- γ 1 se pasó por la columna de IA γ 2, el primer pico (fracción no retenida) se colectó y se pasó por la columna de IA γ 1, la fracción retenida se eluyó con solución

¹³ Sigma.

amortiguadora de glicina pH 2 que se recuperó en fracciones de 30 gotas (1 ml) en 0.5 ml de solución amortiguadora neutralizante de Tris-HCl 1 M pH 8.5 ("anti- γ 1 pura"). Esta fracción se concentró y se dializó contra PBS.

Fracción anti- γ 2 se pasó por la columna de IA γ 1, el primer pico (fracción no retenida) se colectó y se pasó por la columna de IA γ 2, la fracción retenida se eluyó con solución amortiguadora de glicina pH 2 que se recuperó en fracciones de 30 gotas (1 ml) en 0.5 ml de solución neutralizante de Tris-HCl 1 M pH 8.5 ("anti- γ 2 pura"). Esta fracción se concentró y se dializó contra PBS.

Conjugación de antisueros a peroxidasa.

Se disolvieron 10 mg de peroxidasa¹⁴ en 0.5 ml de solución amortiguadora de glutaraldehído 1.25 % - fosfato de sodio 100 mM pH 6.8, se dejó incubar toda la noche a temperatura ambiente, se dializó contra una solución amortiguadora de carbonatos (carbonato-bicarbonato de sodio) 100 mM pH 9.5.

Se adicionó 0.5 ml del anticuerpo (5 mg/ml en 0.15 M NaCl) a la enzima, revisar que el pH sea mayor de 9. Se incubó 24 horas a 4°C.

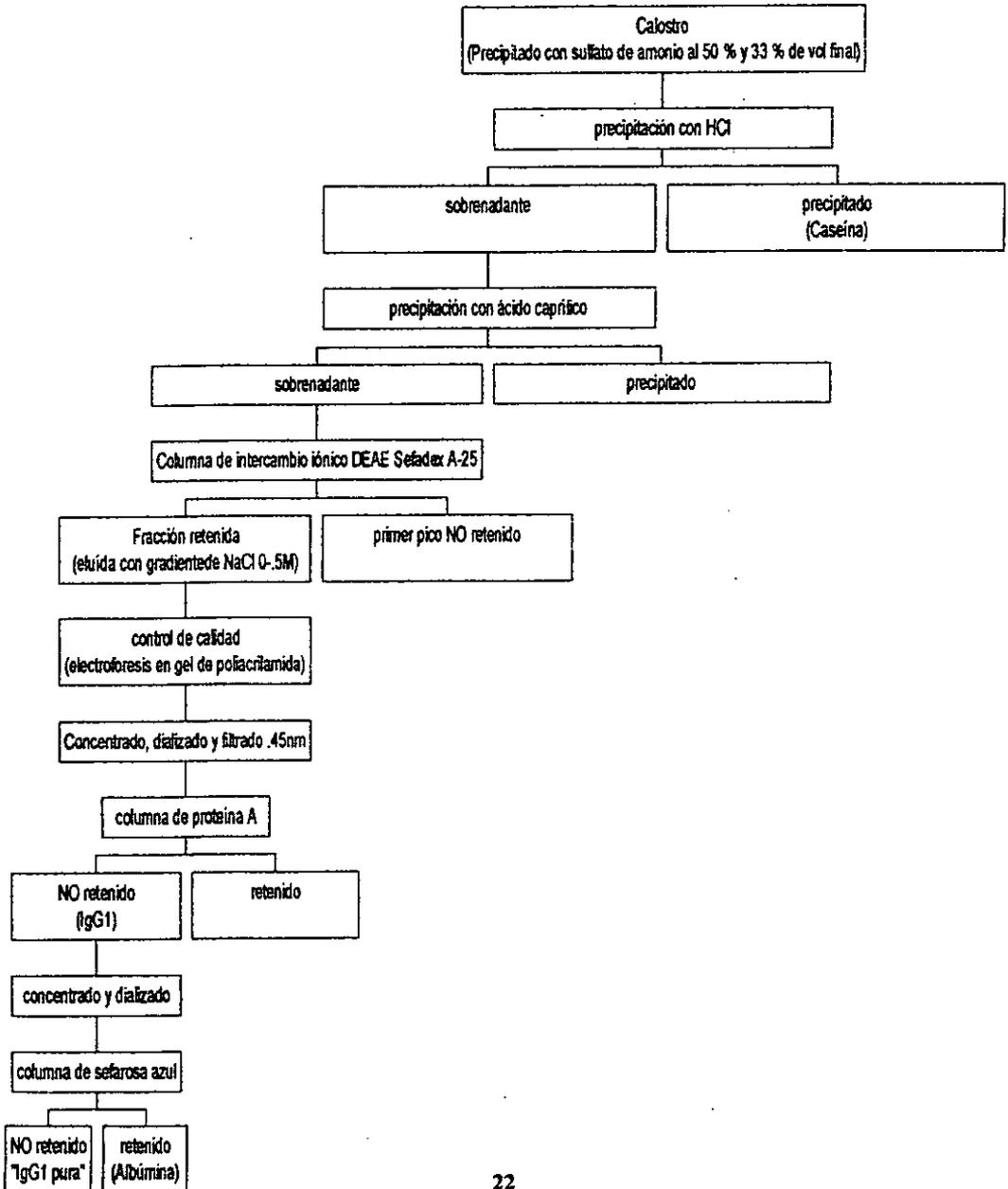
Se adicionó 0.1 ml de etanolamina 0.2 M pH 7.0 y se incubó por 2 horas a 4°C.

El conjugado se dializó contra PBS.

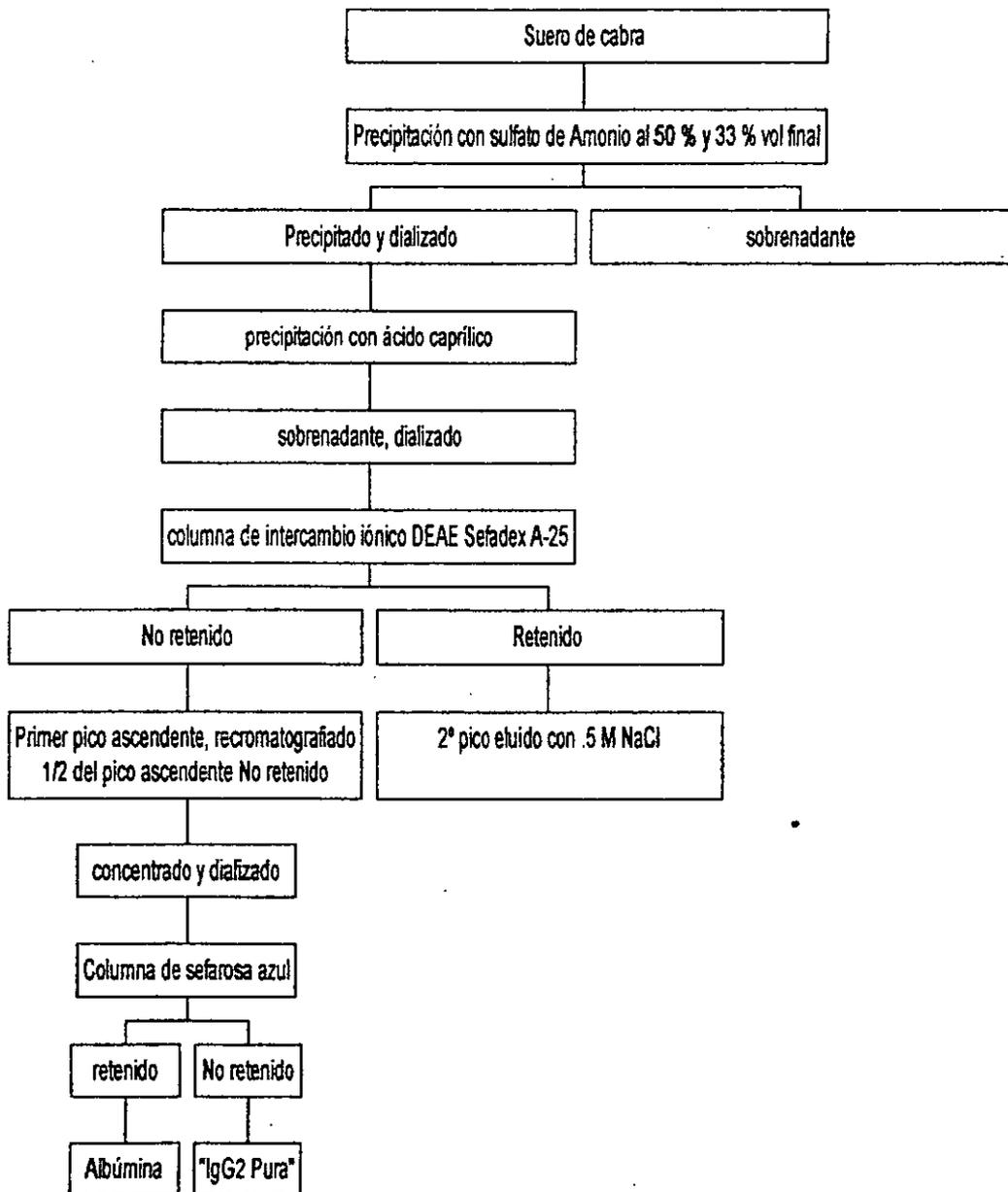
El control de calidad se realizó por inmunoelectroforesis y doble difusión. Los conjugados anti- γ 1 y anti- γ 2 caprinas se titularon por ELISA y doble difusión.

¹⁴ Sigma.

Esquema del protocolo para la obtención de γ 1 a partir de calostro de cabra



Esquema del protocolo para la purificación de $\gamma 2$ a partir de suero de cabra



Titulación de los conjugados anti- γ -globulinas caprinas.

En microplacas de 96 pozos Maxisorp¹⁵, se dividieron en dos y se pegó $\gamma 1$ y $\gamma 2$ en dilución desde 1:1.5 a 1:50, de una solución stock de 500 $\mu\text{g/ml}$, en cada una de las mitades de la placa, se hizo una titulación en bloque para cada uno de los conjugados utilizando las diluciones de 1:100, 1:500 y 1:1000 contra cada antígeno, para obtener la mejor dilución del conjugado.

- 1.- Adsorción del antígeno ($\gamma 1$ - $\gamma 2$) a la fase sólida, se incubó 2 horas a 37°C.
- 2.- Se agregó el conjugado en bloques a las siguientes diluciones en PBS-T 1:100, 1:500 y 1:1000, se incubó 2 horas a 37°C, se lavó tres veces con PBS-T.
- 3.- Se adicionó el cromógeno con el sustrato (ABTS- H_2O_2) y se hicieron lecturas desde los 10 minutos a los 60 minutos en un lector de microplacas¹⁶ a 405 nm.

Preparación de Antígenos para el Inmunoensayo Enzimático (ELISA).

Obtención de Antígenos LPS (Díaz-Aparicio 1993):

Para la obtención de LPS liso de *B. melitensis* 16M, se cultivaron las células en matraces de 500 ml conteniendo caldo *Brucella* a 37°C por 48 horas con agitación constante (125 rpm), después del crecimiento las células fueron lavadas y resuspendidas en agua destilada en la proporción de 30 gramos de peso húmedo por 100 ml. Esta suspensión fue inactivada por calor en autoclave a 120°C por 15 minutos. Una vez a temperatura ambiente, los restos celulares fueron eliminados por centrifugación a 12000 x g durante 15 minutos. Se obtuvo el sobrenadante y se precipitó primeramente con tres volúmenes de etanol (300 ml) al 95 %, manteniendo la muestra a 4°C durante 18 horas en agitación constante.

Se centrifugó a 50000 x g a 5°C por 5 minutos. El precipitado (rico en LPS) fue recolectado en agua destilada y dializado contra agua destilada (2 x 100 volúmenes) a 4°C y liofilizado para su conservación y posterior uso.

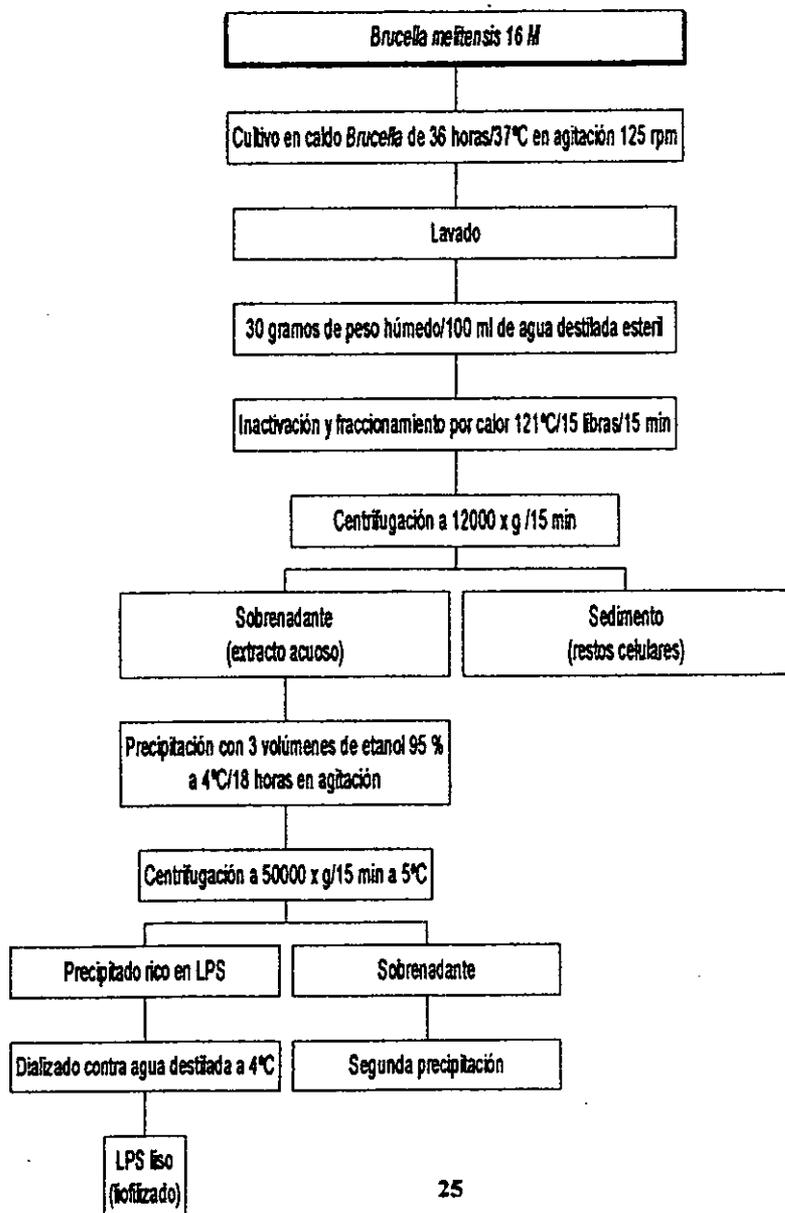
Al sobrenadante H_2O -etanol del primer precipitado se le agregó dos volúmenes (200 ml) de etanol al 95 % y la mezcla se mantuvo a -20°C durante 18 horas. El precipitado resultante (segundo) es recolectado por centrifugación (5000 x g 5°C, 5 min.) se dializó contra agua destilada y se liofilizó.

Las preparaciones de células completas de *B. abortus* RB51 y *B. abortus* S2308::Tn5 utilizadas como antígeno rugoso fueron inoculadas en 500 ml de caldo *Brucella* contenido en matraces Erlenmeyer que se mantuvieron en incubación a 37°C por 48 horas en agitación constante (125 rpm), el cultivo fue centrifugado en tubos Falcon de 50 ml a 2200 x g por 10 minutos, se realizaron 2 lavados con PBS estéril y el cultivo fue inactivado por calor 90°C por 15 minutos, se realizaron dos lavados más con PBS estéril; el antígeno fue estandarizado a una concentración celular del 4 % y fue titulado para su uso en los inmunoensayos.

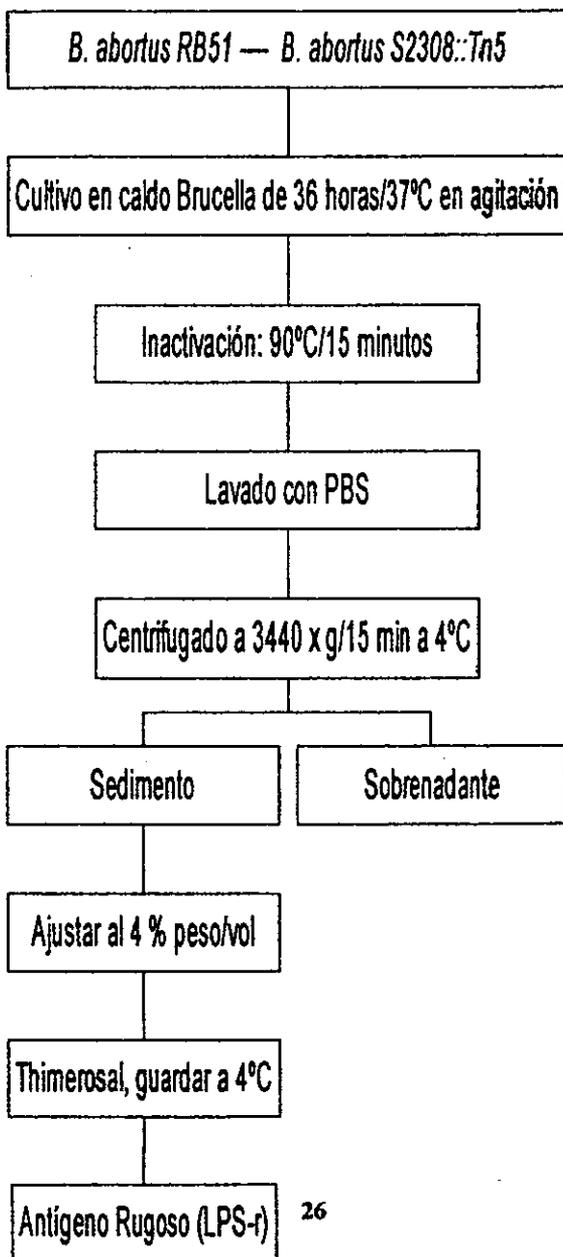
¹⁵ Nunc.

¹⁶ Bio-Rad 3550.

Esquema del protocolo de fraccionamiento del extracto acuoso a partir de células completas para la obtención de LPS completo



Esquema del protocolo para la obtención de antígeno rugoso (LPS-Rugoso)



Inmunoensayos enzimáticos (ELISA)

Protocolos para la realización de ELISA indirectos con antígenos de LPS liso de *B. melitensis* 16 M y antígeno rugoso de *B. abortus* RB51 y *B. abortus* S2308::Tn5.

Preparación del antígeno para la fase sólida o inmunoabsorbente.

Se utilizaron dos diferentes preparaciones de antígenos para pegar en la inmunoplaaca: Se utilizó LPS de *B. melitensis* 16 M en fase lisa liofilizado y bacteria completa inactivada por calor de *B. abortus* RB51 y S2308::Tn5 como antígenos rugosos.

Solución stock de LPS.- se prepara con 1 mg de LPS que se diluye con 1 ml de agua destilada estéril.

- 1.- La concentración final de LPS por pozo en la microplaca debe ser de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ en PBS
- 2.- De la solución stock de LPS se toma 25 μl en 10 ml de PBS (cantidad suficiente para cubrir una placa)
- 3.- Se colocan 100 μl de la solución del antígeno en cada pozo.
- 4.- Se tapa la microplaca con plástico autoadherible y se incuba a 4°C toda la noche.
- 5.- El antígeno se remueve por aspiración.
- 6.- Se seca bien la placa, se cubre con plástico autoadherible y se puede guardar en refrigeración a 4°C hasta por 6 meses.

La preparación de placas con antígeno rugoso se realizó de la misma manera, pero se utilizó una solución stock a una concentración celular del 4 % en PBS, la concentración final en el pozo se determinó por titulación del antígeno siendo de 1:128 para cada uno.

Realización de la técnica:

- 1.- Dilución de los sueros: Se probaron diferentes diluciones de los sueros comenzando con 1:25 hasta 1:3200 y se seleccionó la dilución más adecuada que fue de 1:200. Una vez seleccionada la dilución de los sueros se llenó la microplaca de la siguiente forma:
 - a) pozos A1 y B1 se dejan vacíos y se utilizan como blanco.
 - b) Adicionar 100 μl de los controles y las muestras por duplicado por orden de columnas comenzando con un control negativo en C1 y D1, control positivo en E1 y F1 y continuando con las muestras de los sueros.
- 2.- Cubrir la microplaca e incubar a 37°C por 1 hora
- 3.- Lavar tres ciclos con 100 μl de PBS-Tween en el lavador de microplacas.
- 4.- Conjugados, para:
 - a) anti-IgG caprina conjugada con peroxidasa¹⁷ dilución 1:4000, 1 hora a 37°C
 - b) Proteína G conjugada con peroxidasa¹⁸ dilución 1:4000, 1 hora a 37°C
 - c) anti-IgM caprina conjugada con peroxidasa¹⁹ dilución 1:500, 1.5 horas a 37°C

¹⁷ Sigma

¹⁸ Calbiochem

¹⁹ Bethyl

d) anti-IgG1 conjugada con peroxidasa dilución 1:1000, 2 horas a 37°C

e) anti-IgG2 conjugada con peroxidasa dilución 1:1000, 2 horas a 37°C

Poner 100 µl por pozo (incluir todos los pozos).

5.- Cubrir la placa e incubar a 37°C por el tiempo necesario para cada uno de los conjugados, durante este tiempo se preparará el sustrato y cromógeno.

6.- a) Sustrato: ABTS²⁰ 5.48 g en 50 ml de buffer de citrato.

b) Cromógeno: 5 µl de H₂O₂ en 120 µl de H₂O.

Mezclar 50 ml de a) y 19 µl de b) esta solución es de uso inmediato y sensible a la luz por lo que debe prepararse al momento de su uso y en frasco ámbar.

7.- Lavado: igual que el paso 3.

8.- Distribuir 100 µl en cada pozo con pipeta multicanales, incubar a temperatura ambiente, para:

a) anti-IgG 15 minutos

b) Proteína G 15 minutos

c) anti-IgM 45 minutos

d) anti-IgG1 45 minutos

e) anti-IgG2 45 minutos

Determinar la densidad óptica (D.O.) con el lector de microplacas a una sola longitud de onda de 405 nm utilizando como blanco el pozo A1. No es necesario detener la reacción.

Interpretación de resultados: Se obtuvo la media de la D.O. de cada suero, se obtuvieron promedios por grupo y se graficaron contra tiempo.

Análisis Estadístico

Se probaron supuestos básicos para la realización de un Análisis de Varianza con un Modelo para Mediciones Repetidas de 3 Factores con Repetición en uno de ellos, como diseño completamente aleatorizado. Se utilizó la estadística de Roy con $\alpha = 0.0001$.

Modelo para el ANOVA de Mediciones Repetidas de tres Factores con Repetición en uno de ellos.

$$Y_{ijklm} = \mu + V_i + G_j + S_k + M_l + \epsilon_{ijklm}$$

donde:

Y_{ijklm} = niveles de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas (IgG, IgM, IgG₁ e IgG₂).

μ = media general.

V_i = efecto de la vacuna.

G_j = efecto de la inmunoglobulina.

S_k = efecto del sujeto.

²⁰ Sigma.

M_i = efecto del mes.

ϵ_{ijklm} = error aleatorio.

Los datos se trabajaron con el programa Statistical Analysis System (SAS) para computadoras personales, el modelo mide el efecto de la interacción vacuna|inmunoglobulina (vac|Ig) y las repeticiones en meses. La variable respuesta son los valores en densidad óptica a 405 nanómetros (D.O._{405 nm}) que representa la concentración de inmunoglobulinas y la variable dependiente es el mes. Se seleccionó este modelo para no perder información en el tiempo y poder seguir la respuesta de cada individuo a lo largo de todo el experimento.

El programa en SAS fue el siguiente:

```
Data;  
INPUT suj vac$ Ig$ M1 M2 M3 M4 M5 M6;  
Cards; "Todos los datos"  
Proc ANOVA;  
Clases vac Ig;  
Model M1 M2 M3 M4 M5 M6 = vac|Ig / NOUNI;  
Repeat Mes;  
Means vac|Ig;  
Run;
```

Resultados

Pureza de las preparaciones de γ -globulinas caprinas

Cuando se purificó la fracción de γ_1 a partir de calostro por cromatografía en DEAE Sefadex A-25, se obtuvieron dos picos (figura 1), el primer pico eluido con solución de equilibrio contenían subclases de γ_2 y en la parte descendente contaminación por γ_1 , mientras que el segundo pico obtenido después de haber aplicado el gradiente de NaCl, contenía subclases de γ_1 en su parte ascendente, que fue la fracción seleccionada para la obtención de γ_1 . Cuando se purificó la fracción γ_2 a partir de suero también se obtuvieron dos picos (figura 2), el primero eluido con la solución amortiguadora de equilibrio contenía subclases de γ_2 pura en la porción ascendente de la curva y subclases de γ_1 y contaminación de γ_2 en el segundo pico eluido después de aplicar solución amortiguadora de NaCl 0.5 M. La separación de albúmina resultó ser adecuada por la columna de Sefarosa Azul, donde el primer pico no retenido y eluido con solución de equilibrio era la fracción de interés libre de albúmina (figura 3).

El procedimiento de purificación de las subclases de IgG (γ_1 y γ_2) logró un alto grado de pureza, el control de calidad de las preparaciones realizado por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% y 7.5%, utilizando IgG de bovino como marcador, mostró bandas bien definidas que correspondían a las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas y no mostraban contaminantes. Por inmunoelectroforesis la distinción entre la preparación de los dos antígenos se mostró la presencia de dos arcos claramente definidos con patrones electroforéticos diferentes al ser probados contra el suero comercial de anti-IgG caprina. En la (figura 4) se muestra que las globulinas γ_1 y γ_2 difieren en la movilidad electroforética hacia el ánodo.

Anti- γ -globulinas caprinas

El protocolo de inmunización que se llevó a cabo en conejos produjo antisueros de calidad contra γ_1 y γ_2 caprinas. La purificación de estas anti- γ -globulinas mostraron ser adecuados con las experimentos de inmunoelectroforesis, figuras (5 y 6) y doble difusión en agar, figuras (7 y 8).

Los diferentes isotipos de inmunoglobulinas séricas comparten determinantes antigénicos comunes, que se observan al exponer los antisueros producidos contra las subclases de IgG con inmunoglobulinas purificadas, con las técnicas de inmunoelectroforesis, figura (9) y doble difusión en agar, figuras (10 y 11). Con la técnica de ELISA se observó una ligera reacción cruzada, por lo que se realizaron diluciones de los antisueros hasta encontrar la óptima que permitiera una clara diferenciación.

Titulación de los conjugados.

Tanto conjugados comerciales como los preparados en este trabajo fueron titulados para obtener la mejor dilución y tiempo de trabajo, obteniéndose lo siguiente:

Cuando se utilizó el antígeno liso (LPS):

- 1.- Proteína G conjugada con peroxidasa²¹ dilución 1:4000, 1 hora a 37°C
- 2.- anti-IgG caprina conjugada con peroxidasa²² dilución 1:4000, 1 hora a 37°C
- 3.- anti-IgM caprina conjugada con peroxidasa²³ dilución 1:500, 1.5 horas a 37°C
- 4.- anti-IgG1 conjugada con peroxidasa dilución 1:1000, 2 horas a 37°C
- 5.- anti-IgG2 conjugada con peroxidasa dilución 1:1000, 2 horas a 37°C

Con el antígeno rugoso (LPS-r), la temperatura y las diluciones de los conjugados fueron las mismas que se usaron para el antígeno liso. El tiempo de incubación se estandarizó en 1.5 horas para todos.

Se evaluó la mejor dilución de conjugado en la que los antisueros se unían a los diferentes isotipos dirigidos contra el antígeno y en la cual se podía diferenciar entre sueros positivos de negativos y entre isotipos, además se evaluó el tiempo de lectura después de haber sido aplicado el cromógeno-sustrato y la longitud de onda para leer el inmunoensayo. La mejor lectura se realizó con una sola longitud de onda de 405 nm con tiempos de incubación de 15 minutos para proteína G y anti-IgG caprina y de 45 minutos para anti-IgM, anti- γ 1 y anti- γ 2.

Titulación de antígenos para los inmunoensayos.

El LPS liso de *B. melitensis* fue titulado a razón de 2.5 μ g/ml por pozo, se observó que no hay diferencia si se bloquea o no con albúmina después de la incubación del antígeno, esta titulación de LPS fue válida para suero de animales expuestos a cepas lisas y rugosas.

Para el antígeno rugoso LPS-r se observó una importante reacción inespecífica si se utilizaba el extracto acuoso de cepas rugosas (LPS-r). Al utilizar la bacteria rugosa completa inactivada con calor a concentración celular del 4 %, la mejor dilución de trabajo fue de 1:128, pero el antígeno debía de corresponder a la vacuna aplicada (vacuna RB51 contra antígeno de RB51 y vacuna de S2308::Tn5 contra antígeno de S2308::Tn5).

Evaluación de la concentración de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas antibrucela en el suero de cabra.

La evaluación de las inmunoglobulinas en los diferentes grupos cabras expuestas a *Brucella spp* se determinó a los 0, 30, 60, 90, 120 y 150 días para los grupos de cabras vacunadas con las cepas de *B melitensis* Rev 1 (vía subcutánea y conjuntival), *B. abortus* RB51 y *B. abortus* S2308::Tn5 y grupo testigo. Y a los 10, 20, 30, 45, 60 y 90 días para el grupo de cabras infectadas experimentalmente.

Los datos obtenidos por grupo e inmunoglobulina evaluada en cada muestreo utilizando el antígeno liso (LPS) se sumaron y se obtuvo un promedio que se graficó contra tiempo.

²¹ Calbiochem.

²² Sigma.

²³ Bethyl.

El análisis estadístico realizado a los datos obtenidos fue un análisis de varianza con un Modelo para Mediciones Repetidas de tres factores con repetición en uno de ellos donde se midió el efecto de la interacción vacuna-inmunoglobulina y las repeticiones en meses. Este modelo permitió tener un seguimiento global de cada individuo a lo largo de todo el experimento, desde el día 0 al día 150.

Los resultados obtenidos con el análisis de varianza para mediciones repetidas muestran que existen diferencias significativas para los efectos de mes, mes/vacuna, mes/inmunoglobulina y mes/vacuna/inmunoglobulina con la estadística de Roy ($P=0.0001$). El efecto vacuna fue estadísticamente significativo con un valor de $P=0.0563$.

En la figura 12 se muestra la respuesta de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas séricas detectada por LPS de *B. melitensis* 16 M, para el grupo vacunado con *B. melitensis* Rev 1 por vía conjuntival. Los títulos se incrementa en general en los primeros 60 días alcanzando su pico entre el día 30 y 60. Para IgM a partir del día 60 la curva decrece hasta el día 150. Para las subclases de IgG estas decrecen hasta el día 90 y en el caso de IgG medida con anti-IgG²⁴ sigue bajando hasta el día 120 para después volver a subir. Para $\gamma 1$ y $\gamma 2$ después del día 90 los niveles se incrementan hasta el día 120 para después volver a decrecer. Para IgG medida con Proteína G²⁵, a partir del día 90, los títulos se incrementan hasta el día 150.

En la figura 13 se muestra la respuesta de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas séricas detectada por LPS de *B. melitensis* 16 M, para el grupo vacunado con *B. melitensis* Rev 1 dosis reducida por vía subcutánea. Para IgM se observa un ligero ascenso hasta el día 90 donde sube hasta el día 120 para después descender. Para IgG medida con anti-IgG²⁶ alcanza su máximo pico en el día 60 y descende hasta el día 90 para después volver a subir hasta el día 120 y descender. Cuando se midió IgG con Proteína G²⁷, se observa un ascenso hasta el día 60 donde se mantiene por 30 días más para después alcanzar su máximo pico en el día 120 y descender. Para $\gamma 1$, alcanza su máximo pico en el día 90 donde comienza a descender, $\gamma 2$ asciende hasta el día 60 y descende lentamente.

En la figura 14 se muestra la respuesta de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas séricas detectada por LPS de *B. melitensis* 16 M, para el grupo vacunado con *B. abortus* RB51 por vía subcutánea. IgM se mantiene en ascenso hasta el día 150. IgG medida con conjugado Sigma sube rápidamente hasta alcanzar su pico en el día 30 baja lentamente al día 60 y después rápidamente hasta el día 90 de donde sube ligeramente para después descender. Para IgG demostrada con Proteína G muestra una curva similar, pero esta alcanza su mayor pico en el día 120. El isotipo $\gamma 1$ sube lentamente hasta el día 120 de donde empieza a descender. El isotipo $\gamma 2$ presenta dos picos en los días 60 y 120.

²⁴ Sigma.

²⁵ Calbiochem.

²⁶ Sigma.

²⁷ Calbiochem.

En la figura 15 se muestra la respuesta de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas séricas detectada por LPS de *B. melitensis* 16 M, para el grupo vacunado con *B. abortus* S2308::Tn5 por vía subcutánea. IgM aumenta al día 30, después desciende ligeramente al día 60 de donde comienza un ligero ascenso constante hasta el día 150. Para la IgG demostrada con el conjugado de Sigma presenta un rápido aumento hasta el día 30 donde alcanza su pico, después comienza a descender hasta el día 90 donde se mantiene por 30 días mas para después ascender nuevamente. Cuando se midió IgG por medio de la Proteína G, se observa un ligero ascenso hasta el día 90 para después subir rápidamente. Para $\gamma 1$ se observa un ligero ascenso al día 60 que se incrementa hasta el día 120 donde comienza a descender. Para $\gamma 2$ presenta un ligero ascenso hasta el día 120 donde comienza a descender.

En la figura 16 se muestra la respuesta de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas séricas detectada por LPS de *B. melitensis* 16 M, para el grupo infectado experimentalmente con *B. melitensis* biovariedad 3 por vía conjuntival. IgM se mantiene ascendiendo hasta el día 30 de donde comienza un ligero descenso. Para la IgG demostrada con conjugado Sigma se mantiene en ascenso constante hasta el día 45 después de este desciende ligeramente al día 60 para después volver a subir al día 90. Cuando se midió IgG con conjugado de Proteína G esta mostró un ligero ascenso al día 10, para después subir notoriamente hasta el día 45 de donde desciende ligeramente a día 60 para después volver a subir al día 90. El isotipo $\gamma 1$ muestra un ligero pero constante ascenso hasta el día 90. $\gamma 2$ también su ascenso es ligero, pero mayor a $\gamma 1$, del día 45 al 60 muestra un ligero descenso y a partir de este día vuelve a subir.

En todos los casos los grupos testigos se mantuvieron constantes, existiendo diferencia estadística con los diferentes grupos.

La figura 17 muestra la curva de IgG medida con conjugado de anti-IgG caprina con los diferentes grupos de cabras. En donde el título o nivel más alto de inmunoglobulina G se presenta en la vacunación con *B. melitensis* Rev 1 por vía conjuntival y este se observa en el día 30 posvacunación, seguida por la respuesta a la vacuna S2308::Tn5 de *B. abortus* y por último una respuesta similar de las vacunas de *B. melitensis* Rev 1 en dosis reducida y *B. abortus* RB51.

En la figura 18 se observa la curva de IgG medida con Proteína G con los diferentes grupos de cabras. Los animales vacunados con la cepa de *B. melitensis* Rev 1 en dosis reducida, presentan una mayor respuesta, en comparación con los otros grupos hasta el día 120 posvacunación; a partir del día 130, los animales vacunados con la cepa de *B. abortus* S2308::Tn5, presentan el título más alto de IgG.

La figura 19 presenta la curva de IgM con los diferentes grupos de cabras. Los mayores niveles de este isotipo, hasta el día 90, lo presenta el grupo vacunado con *B. melitensis* Rev 1 por ruta conjuntival. A partir del día 90 y hasta el día 120 posvacunal, el grupo vacunado con *B. melitensis* en dosis reducida, presenta un incremento en los títulos de IgM, mostrando los niveles más altos.

Las figuras 20 y 21 presentan las curvas de γ_1 y γ_2 respectivamente en los diferentes grupos de animales. Para γ_1 , en las cuatro vacunas, se presenta una curva relativamente similar. Los grupos vacunados con *B. melitensis* Rev 1 muestran los valores más altos entre los días 60 y 120. Para γ_2 , la respuesta de los grupos vacunados con *B. melitensis* Rev 1 por vía conjuntival y *B. abortus* RB51 se comportan de igual forma a lo largo de los 150 días de muestreo. El grupo vacunado con *B. melitensis* Rev 1 en dosis reducida alcanza niveles similares, a los dos grupos anteriores, hasta el día 60. El grupo vacunado con *B. abortus* S2308::Tn5 presenta los niveles más bajos de este isotipo.

La serie de figuras 22 a 26 muestran la comparación en la respuesta dada a cada vacuna y a la infección experimental de las subclases de inmunoglobulina G (γ_1 y γ_2). Donde se observa que γ_2 es mayor que γ_1 en el grupo de animales infectados experimentalmente, así como en los grupos vacunados con Rev 1 y RB51, entre los días 10 a 90 posvacunal. El isotipo γ_1 , a partir del día 60, comienza a incrementarse y llega a ser mayor a γ_2 , solo en los grupos vacunados.

Las figuras 27, 28 y 29 muestran los resultados obtenidos al evaluar la respuesta de las diferentes inmunoglobulinas en el grupo vacunado con la cepa rugosa de *B. abortus* RB51, utilizando antígeno rugoso (RB51) en los inmunoensayos; en donde se observa un incremento en los niveles séricos de todos los isotipos en el día 30, siendo mayor el presentado por IgG total. Los niveles de IgM, IgG1 e IgG2 se mantienen bajos, no así IgG total que se incrementa, esto es más notorio cuando este isotipo fue detectado por el conjugado comercial anti-IgG-peroxidasa²⁸. Hasta el día 90 γ_2 es mayor a γ_1 , a partir de este día γ_1 comienza a ser mayor que γ_2 .

Las figuras 30, 31 y 32 muestran la respuesta de las diferentes inmunoglobulinas a la vacuna rugosa de *B. abortus* S2308::Tn5, utilizando antígeno rugoso (S2308::Tn5) en los inmunoensayos. Donde se observa una menor respuesta de IgM al igual que una ligera respuesta de IgG total en los primeros 60 días, a partir de aquí, la respuesta comienza a incrementarse. Hasta el día 60 γ_1 es ligeramente mayor a γ_2 , después de este día, se observa el cambio de isotipo a γ_2 .

Al utilizar los antígenos rugosos los valores de densidad óptica (D.O) del día 0 y controles negativos son mayores que cuando se utilizó antígeno liso (LPS). Esta inespecificidad es más notoria al utilizar el conjugado comercial anti-IgG-peroxidasa²⁹.

La serie de figuras 33 a 38 compara la respuesta inmune humoral a los diferentes antígenos vacunales a lo largo de todo el experimento. Aquí se puede observar que los mayores niveles de IgG e IgM, hasta el día 60, se presentan en el grupo vacunado con *B. melitensis* Rev 1 por ruta conjuntival.

²⁸ Sigma.

²⁹ Sigma.

La serie de figuras 39 a 42 compara la respuesta inmune humoral debida a la vacunaci3n y a la infecci3n experimental del d1a 0 al 90 despu3s de la exposici3n al ant1geno. Los niveles de IgG (medida con prote1na G) e IgM son superiores a los presentados en los grupos vacunados.

La figura 43 presenta los diferentes isotipos en la respuesta inmune humoral debido a la infecci3n experimental con *B. melitensis* biovariedad 3, fase lisa virulenta, aislada de un brote de campo. Al medir IgG con prote1na G los niveles fueron superiores en comparaci3n con el conjugado comercial anti-IgG-peroxidasa. El isotipo IgG2 siempre fue mayor a IgG1 a lo largo de todo el muestreo.

DISCUSIÓN

Gray *et al* (1969) identificaron dos subclases de γ -globulinas en cabra que designaron $\gamma 1$ y $\gamma 2$. Su método de identificación se basó en la precipitación de γ -globulinas, a partir de suero de cabra, con sulfato de amonio, filtración en gel, movilidad electroforética y patrones de inmunodifusión. El método de Gray pudo diferenciar las dos subclases de γ -globulinas caprinas, pero no logró una pureza total de las fracciones, particularmente $\gamma 1$ que se encontraba mezclada con $\gamma 2$, además de otras proteínas séricas. Posteriormente Micusan *et al* (1975 y 1976) aíslan las subclases de IgG a partir de suero de dos grupos de cabras de las cuales un grupo fue alimentado con calostro y el otro se les privó de él en las primeras semanas de vida, en ese trabajo las fracciones se filtraron en columnas de cromatografía en dos ocasiones, como modificación al método de Gray, para lograr una mayor pureza. Micusan y Borduas (1977) describen las propiedades biológicas de las inmunoglobulinas G de la cabra y utilizan suero y calostro como fuente de purificación de las subclases de IgG, este método incluye la precipitación con sulfato de amonio y la recromatografía de cada una de las subclases en CM-celulosa y Sefadex G-200, cuando se trata del suero y precipitación de caseína con la recromatografía de cada una de las subclases en DEAE-Sefadex A-50 y Sefadex G-200, para el calostro.

Babú y Reddy (1992) mencionan que la precipitación con sulfato de amonio y la cromatografía en DEAE-celulosa son suficientes para producir IgG caprina en forma pura, encontramos que es necesario además eliminar algunas proteínas séricas como la albúmina.

Para la purificación de las subclases de γ -globulinas en este estudio se realizó una precipitación de las proteínas séricas con ácido caprónico adicional a la precipitación de inmunoglobulinas con sulfato de amonio, además las fracciones se pasaron por una columna de Sefarosa Azul para eliminar la contaminación por albúmina, que seguía presente después de la cromatografía por DEAE-Sefadex A-25 y demostrada por electroforesis de cada una de las fracciones. La pureza de las inmunoglobulinas y los antígenos es la parte medular de los inmunoensayos enzimáticos (Sánchez-Vizcaino y Cambra 1987; García *et al*; 1992; Nielsen *et al*; 1993). La purificación y caracterización inmunoquímica de las subclases de IgG ($\gamma 1$ y $\gamma 2$) desarrollados en este trabajo mostraron ser de buena calidad. La distinción entre las dos preparaciones de antígenos fue demostrada por la presencia de dos arcos claramente definidos cuando se probaron contra el antisuero comercial anti-IgG caprina³⁰.

Los antisueros anti-cabra $\gamma 1$ y $\gamma 2$ producidos en conejo y preparados en este estudio mostraron la presencia de dos arcos con diferencias en sus patrones inmunolectroforéticos al ser expuestos al antígeno correspondiente tal como lo mencionan Gray *et al* (1969) y Micusan y Borduas (1975). Pero además se observó que $\gamma 1$ y $\gamma 2$ comparten determinantes antigénicos, porque, aunque es claramente distinguible la formación de bandas de precipitación con el antisuero específico, esto es anti- $\gamma 1$ contra $\gamma 1$, existe una ligera interacción de anti- $\gamma 1$ con $\gamma 2$ y viceversa (figuras 5 y 6) y se puede observar que las inmunoglobulinas A y M caprinas también comparten determinantes antigénicos con las

³⁰ Sigma

subclases de IgG (Duncan *et al*; 1972). Lo anterior se demuestra en los estudios de inmunodifusión doble, realizados en este trabajo, cuando fueron probados los antisueros preparados en conejo contra diferentes isotipos (figuras 9, 10 y 11).

Gray *et al* (1969) menciona que los animales en los cuales se preparan los antisueros (ratón, rata, conejo, etc.) responden antigénicamente distinto al inmunógeno seleccionado. Binaghi, citado por Gray *et al* (1969) y Micusan *et al* (1976) proponen que los cuyes y ratas responden a clases específicas de determinantes para producir anticuerpos específicos de la fracción Fc de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, esto puede sugerir que las ratas y cuyes responden primariamente a los determinantes de la cadena pesada; y los conejos, aquí empleados, responden primariamente a los determinantes de la cadena ligera de las subclases de IgG (determinantes antigénicos individuales) y en forma secundaria a los determinantes antigénicamente similares (comunes) de estas γ -globulinas. Esto se puede demostrar cuando se prueban los antisueros por inmunoelectroforesis en donde se presentan una línea fuerte de precipitación con el antígeno correspondiente (anti- γ_1 contra γ_1 y anti- γ_2 contra γ_2) y una línea de precipitación débil con el antígeno y antígeno contrario.

Algunos autores (Lisowski *et al*; 1975a,b, Gray *et al*; 1969, Micusan y Borduas 1975 y 1977) han observado y demostrado que las cadenas pesadas y ligeras de las subclases de γ -globulinas pueden ser idénticas en su composición o solamente similares o hasta un mismo isotipo puede variar en sus propiedades fisicoquímicas dependiendo de si proviene de suero o de calostro, como lo reporta Lisowski *et al* (1975a,b).

En este estudio para eliminar al máximo la inespecificidad, los antisueros se sometieron a adsorciones cruzadas en columnas de inmuoafinidad con lo que se logró una buena diferenciación entre estos.

La titulación previa de sueros, antígenos y conjugados es un paso importante para la estandarización de los inmunoensayos (García *et al*; 1992).

La titulación se realizó en bloques y se seleccionaron las diluciones que permitieron una mejor lectura. Cabe mencionar que los mayores problemas se presentaron con el antígeno rugoso. Para la detección de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas en los grupos inmunizados con las vacunas rugosas (*B. abortus* RB51 y *B. abortus* S2308::Tn5) se intentó en un principio utilizar una extracción de lipopolisacárido rugoso (LPS-r) de *B. abortus* unido a la inmunoplaaca como antígeno de captura, pero se observó una inespecificidad muy alta no pudiendo diferenciar controles (+) de (-), por lo que se intentó utilizar bacteria completa, inactivada por calor, en suspensión al 4 % unida a la inmunoplaaca como antígeno de captura y se observó que la inespecificidad disminuía; aunque los valores de densidad óptica de los sueros negativos se mantenían altos, más si se utilizaba el conjugado comercial de anti-IgG caprina³¹ en lugar de Proteína G³² para la detección de IgG, sí fue posible observar la curva del incremento en el título de γ -globulinas de los animales vacunados. Además fue necesario utilizar como antígeno de captura el correspondiente al grupo

³¹ Sigma.

³² Calbiochem.

vacunado con esa cepa; el grupo vacunado con *B. abortus* RB51 utilizo como antígeno rugoso unido a la placa la preparación de bacteria completa de *B. abortus* RB51. Y el grupo vacunado con *B. abortus* S2308::Tn5 su antígeno rugoso unido a la placa fue la preparación de bacteria completa de *B. abortus* S2308::Tn5, con esto se lograron mejores resultados.

Al utilizar los antígenos rugosos se observó que disminuía la inespecificidad si se utilizaba la bacteria completa, cepa rugosa, en lugar de la preparación de lipopolisacárido rugoso (LPS-r). Posiblemente se den reacciones cruzadas cuando se utiliza solo el LPS-r y esta se ve disminuida y más específica al estar presente la bacteria completa ya que están presentes los determinantes o epitopos sobre los cuales se monta la respuesta. Schurig *et al* (1984); Jiménez y Bagüés (1994) mencionan que el uso de anticuerpos monoclonales contra el LPS-r son una buena alternativa para hacer más específica la reacción. Granfors *et al* (1981) observaron, para el caso de antígenos lisos, una mayor reactividad cruzada al utilizar la bacteria completa en comparación con el LPS y que esto esta relacionado a la especie animal en la que se preparó el antisuero.

Tres clases principales de inmunoglobulinas han sido caracterizadas en los rumiantes, IgG, IgA e IgM, algunos autores describen la existencia de un anticuerpo con propiedades fisicoquímicas similares a la IgE de otras especies. Una característica importante de las inmunoglobulinas de los rumiantes es que existen dos subclases de IgG, IgG1 e IgG2, que poseen propiedades fisicoquímicas y biológicas totalmente diferentes. La transferencia selectiva de una sola de las dos subclases de IgG, la IgG1, en grandes cantidades para secreciones exócrinas en mamíferos, como es el calostro, es un fenómeno que no se presenta en hembras de otras especies. Las propiedades fisicoquímicas varían de acuerdo a la fuente de purificación, así, las γ -globulinas purificadas a partir de suero son diferentes a las purificadas a partir de calostro. Esto ha sido demostrado por diversos investigadores que han realizado estudios comparativos observando diferencias en sus propiedades hidrodinámicas, composición de aminoácidos y contenido de carbohidratos; lo que ha sugerido que existe una síntesis local en la glándula mamaria de inmunoglobulinas además de la transferencia de suero (Duncan *et al*; 1972; Micusan y Borduas 1975; Lisowski *et al*; 1975a,b.; Micusan y Borduas 1977; Micusan *et al*; 1976; O'Brien y Sherman 1993a,b.; Kacskovics *et al*; 1995).

La mayoría de la literatura acerca de la respuesta inmune humoral de animales infectados y vacunados con *Brucella* se basa o concierne a *B. abortus* en el ganado bovino, pero se menciona que la respuesta inmune humoral en bovinos es generalmente similar a la que presentan otras especies (Sutherland and Searson 1990). La vacunación de la ternera con cepa 19 presenta, después de cinco días, la aparición de IgM, que alcanza su máximo nivel al cabo de trece días, mientras que las IgG aparecen casi simultáneamente, o poco más tarde, y alcanzan su máximo de 28 a 42 días posvacunales. La concentración sérica de IgM disminuye pero sin anularse. Las inmunoglobulinas G son las primeras en desaparecer (FAO/OMS 1986).

El patrón de la respuesta serológica en términos de producción de inmunoglobulinas ha sido poco estudiada en pequeños rumiantes, particularmente en cabras, pero algunos autores

sugieren una respuesta muy similar a la presentada por los bovinos (Alton y Elberg 1967; Varela-Díaz *et al*; 1971; Elberg 1981; Alton 1987; Alton 1990). La vacunación de cabritas menores de 8 meses de edad con la cepa de *B. melitensis* Rev 1 presenta un rápido desarrollo en el mes siguiente a la vacunación, IgM inicia primero a los 10 días seguido después por IgG. Durante los siguientes tres meses, la IgM cae a niveles bajos donde persisten. El nivel de IgG también cae y en algunos animales persisten hasta el cuarto mes posvacunal (FAO/OMS 1986; Alton y Elberg 1967; Zygmunt *et al*; 1994).

En la respuesta al desafío experimental en bovinos, IgM es la inmunoglobulina predominante que se produce inmediatamente después del desafío y se mantiene por 1 a 3 semanas. Después IgG empieza a ser dominante y usualmente es mayor IgG1 que IgG2; cantidades significantes de IgG2 han sido reportadas en algunos bovinos. (Lamb *et al*; 1979) sugieren medirlos niveles de IgG2 como medio para discriminar entre animales infectados y no infectados. Contrariamente a lo que sucede en la vacunación, disminuye únicamente la concentración de IgM, después, sobre todo en los casos crónicos, la clase principal y dominante es la IgG (FAO/OMS 1986; Sutherland y Searson 1990).

Alton (1990b) menciona que en la infección de cabras con *B. melitensis* la respuesta se presenta muy similar a lo observado en bovinos, producción de IgM seguida entre 1 a 2 semanas por el disparo de IgG, menciona que ambos isotipos se mantienen en niveles bajos con predominio de IgG. La bibliografía consultada no menciona la respuesta presentada por subclases de IgG en cabras debido a vacunación o a infección ni la participación de estas en la respuesta inmune

En este estudio se utilizaron cabras mayores de 1 año y se reporta el patrón de inmunoglobulinas séricas, incluyendo los isotipos IgG1 e IgG2 y la medición de IgG totales con dos tipos de conjugados, presentado por 4 vacunas de *Brucella* e infección experimental con *B. melitensis*.

Para el grupo 1.- *B. melitensis* Rev 1 por ruta conjuntival, presenta una respuesta de IgM que alcanza su máximo nivel en el día 30, a partir de aquí comienza a disminuir gradualmente sin desaparecer en los 150, días de muestreo. Esta vacuna presentó los títulos más altos de IgM hasta el día 90, en comparación con las otras vacunas.

Al día 30 posvacunal los niveles de inmunoglobulina G completa se presentan en sus niveles más altos. Al medir IgG completa con el conjugado anti-IgG-peroxidasa³³ las concentraciones, medidas en densidad óptica (D.O. 405 nm), son mayores que cuando se utilizó el conjugado de Proteína G-peroxidasa³⁴. Esto puede ser atribuido a una menor especificidad del primero con otros isotipos (Lisuwski *et al*; 1975). La concentración mayor de IgG se presentó con la vacuna Rev 1 por ruta conjuntival, seguido por la respuesta a la vacuna de *B. abortus* S2308::Tn5. Cuando se midió IgG con Proteína G el nivel de este isotipo es similar en las cuatro vacunas, siendo ligeramente mayor el presentado por la vacuna *B. abortus* RB51.

Los niveles de $\gamma 1$ y $\gamma 2$ comienza a incrementarse en las cuatro vacunas y presentan niveles similares hasta el día 30. La clase IgM muestra un incremento en sus niveles séricos, siendo mayores los producidos por la vacuna Rev 1 por ruta conjuntival seguido de la

³³ Sigma.

³⁴ Calbiochem.

vacuna S2308::Tn5. Por los días de muestreo no fue posible observar el día preciso de incremento de IgM, que se menciona es a partir del día 10 (FAO/OMS 1986), ni el cambio o disparo a IgG.

Para el día 60 posvacunal el nivel de IgG desciende ligeramente, al medirse con el conjugado anti-IgG, y se mantiene el grupo vacunado con Rev 1 ruta conjuntival con la concentración más alta de IgG. La concentración menor la presentó el grupo vacunado con Rev 1 en dosis reducida. Al utilizar Proteína G se observa un aumento en las concentración de IgG total sobre todo en los grupos vacunados con RB51 y Rev 1 ruta conjuntival. El grupo vacunado con Rev1 en dosis reducida sigue presentando el nivel más bajo de este isotipo, esto concuerda con los estudios realizados por Alton (1990a) donde menciona que la respuesta inmune humoral es menor en animales vacunados con Rev 1 en dosis reducida en comparación con los vacunados por ruta conjuntival. Los niveles de $\gamma 1$ se incrementan ligeramente en las cuatro vacunas. La concentración de $\gamma 2$ se incrementa al doble, en comparación con los primeros 30 días, en los grupos vacunados con Rev 1 y RB51. Las cuatro vacunas muestran un descenso en la concentración de IgM.

Para el día 90 las concentraciones de IgG son menores en comparación al muestreo anterior con excepción del grupo vacunado con Rev 1 en dosis reducida que se incrementa. El nivel de detección de los dos conjugados es similar. Los niveles de $\gamma 1$ continúan en ascenso, siendo el grupo Rev 1 en dosis reducida el que presenta la mayor concentración. $\gamma 2$ desciende en comparación con el muestreo anterior. La concentración de IgM se mantiene en niveles bajos en las cuatro vacunas.

En los días 120 y 150 posvacunales se observa un incremento en los niveles de IgG en las cuatro vacunas principalmente en los presentados por Proteína G. También un ligero incremento en los de IgM en los grupos vacunados con la cepa rugosa RB51 y Rev 1 en dosis reducida.

Los niveles de $\gamma 1$ y $\gamma 2$ con excepción del grupo vacunado con Rev 1 en dosis reducida siguen aumentando en comparación con el muestreo anterior. Los días 120 y 150 de muestreo corresponden a los meses de enero y febrero, esta época del año en la zona de estudio, las condiciones climáticas favorecen la presentación de infecciones respiratorias en los animales, suponemos que el aumento de inmunoglobulinas puede deberse a la exposición a antígenos capaces de producir una respuesta o reacción cruzada, lo cual ha sido demostrado con diversos microorganismos, principalmente bacterias Gram negativas (Lamb *et al*; 1979; Cherwonogrodzky *et al*; 1990).

A lo largo de los 150 días de muestreo los niveles de inmunoglobulina G siempre se mantuvieron arriba de los niveles de inmunoglobulina M, contrariamente a lo mencionado en la bibliografía con terneras vacunadas con cepa 19 y RB51 (FAO/OMS 1986; Schurig *et al*; 1991). Donde IgM es dominante en los animales vacunados e IgG es la primera en desaparecer, no obstante que no se realizó un muestreo en los días 15-21, donde se alcanzan los máximos niveles de IgM, se infiere que las concentraciones alcanzadas son discretas. El nivel de IgG alcanza su máximo nivel en el día 30, esto concuerda con los 28 a 42 días presentado en bovinos (Sutherland y Searson 1990).

Cuando la concentración de anticuerpos totales decrece, la concentración de $\gamma 1$ y $\gamma 2$ comienzan a incrementarse, esto también fue reportado por Micusan (1977). La presentación de estas subclases difiere dependiendo de la vacuna. En las vacunas Rev 1 y RB51 $\gamma 2$ se presenta como la principal subclase de IgG entre los 30 y 70 días posvacunación; alcanzando su mayor concentración en el día 60. Para las vacunas Rev1 el cambio de subclase a $\gamma 1$ se presenta entre los días 70 a 80, para alcanzar su máxima concentración entre los días 90 a 120 posvacunación. Para la vacuna RB51 la máxima concentración de $\gamma 1$ se presenta en el día 120, pero en este caso en particular $\gamma 1$ no fue mayor a $\gamma 2$, como en las vacunas de Rev1, Pero podríamos pensar que el comportamiento de las subclases de IgG en estas tres vacunas es muy similar y en el caso de RB51 donde fue superior $\gamma 2$ sobre $\gamma 1$ en el día 120 esto puede deberse a una reacción inespecífica, posiblemente sobre otro LPS bacteriano, que disparó a $\gamma 2$.

La vacuna S2308::Tn5 presentó un patrón de $\gamma 1$ y $\gamma 2$ diferente a las tres vacunas anteriores, entre el día 0 y 60 los niveles de estas subclases se mantienen en concentraciones similares y a partir de los días 60 al 50 la concentración de $\gamma 1$ siempre fue mayor a $\gamma 2$.

El grupo de animales infectados experimentalmente con *B. melitensis* biovariedad 3 presentó, hasta el día 90 posinfección, concentraciones de IgG mayores que IgM. La inmunoglobulina M alcanza su máxima concentración en el día 20 y esta se mantiene hasta el día 90 posinfección. IgG presenta su máxima concentración entre los días 45 a 90. Aunque la respuesta de IgM es mayor en comparación con los grupos vacunados, esta sigue siendo discreta en comparación con la respuesta de IgG y nunca mayor a esta, estos datos difieren a lo mencionado para bovinos, por el Comité de Expertos en brucelosis (1986).

El isotipo $\gamma 2$ es la subclase de IgG que predomina, sobre $\gamma 1$, en los 90 días del muestreo. Contrariamente a lo que sucede en bovinos donde $\gamma 1$ es la subclase predominante sobre $\gamma 2$. Aunque se han reportado cantidades significantes de $\gamma 2$ en algunos bovinos.

Este estudio muestra que tanto en infección experimental como en los grupos de animales vacunados la clase predominante de inmunoglobulina a lo largo de todo el experimento es IgG sobre IgM. La concentración de IgG total e IgM es mayor en el grupo infectado experimentalmente que en los grupos vacunados.

En los grupos de animales vacunados, la concentración de IgM nunca fue superior al de las subclases de IgG ($\gamma 1$ y $\gamma 2$). En el grupo infectado experimentalmente, la concentración de IgM fue mayor a la de IgG1 en los 90 días del muestreo y solamente mayor a IgG2 en los primeros 20 días.

La concentración de IgG2 fue mayor a IgG1 en el grupo infectado experimentalmente y en los grupos vacunados con Rev 1 y RB51 este isotipo predominó sobre $\gamma 1$ del día 30 al día 80 posvacunación. Lo que nos sugiere que este isotipo se presenta como principal subclase de IgG en los primeros días después de la infección y la vacunación.

El grupo vacunado con la cepa mutante rugosa de *B. abortus* S2308::Tn5, carente de la cadena O-LPS presentó un patrón de subclases de IgG diferente a la producida por otras cepas, donde las concentraciones de $\gamma 2$ son bajas y la subclase predominante es $\gamma 1$.

Las características estructurales de cada una de las cepas utilizadas hacen la diferencia en el isotipo producido en la respuesta inmune humoral en cada uno de los grupos. Estas diferencias se basan principalmente en la composición química de su envoltura celular y más específicamente en su lipopolisacárido (LPS). Esto se demuestra con los resultados presentados en este estudio, a mayor cantidad de LPS mayor es la respuesta debida a IgM, IgG totales y principalmente a IgG₂.

Se sabe que las cepas lisas son más resistentes a la muerte intrafagocitaria que las cepas rugosas (Harmon *et al*; 1988; Price *et al*; 1990) y dentro de cepas lisas existen diferentes susceptibilidades, las cepas vacunales de *B. abortus* cepa 19, *B. melitensis* Rev 1 y las cepas patógenas mantenidas en cultivos en el laboratorio son menos hábiles para resistir la muerte intracelular que las cepas virulentas de *Brucella* aisladas de abortos y placentas. Canning (1990) y Soto *et al* (1991) mencionan que existen fracciones del LPS de las cepas lisas de *Brucella* son las responsables de proteger a las bacterias dentro de los fagocitos. Estos componentes son nucleótidos o sustancias parecidas que inhiben la degranulación y la actividad del sistema antibacteriano de la mieloperoxidasa-H₂O, estas fracciones son la 3b (5'guanósina monofosfato) y 10 (adenina) del LPS que están asociadas a la superficie de las cepas virulentas y que inhiben esta actividad ya que *Brucella* es susceptible de ser destruida por la explosión oxidativa.

Las brucelas no evitan la fagocitosis pero es requisito indispensable la opsonización por complemento o por anticuerpos específicos, además la opsonización previa es requisito para estimular la explosión oxidativa (Harmon *et al*; 1988; Canning 1990). Las inmunoglobulinas opsonizantes contra *Brucella* están dirigidas principalmente contra el LPS.

Smith (1990) y Cherwonogrodzky *et al* (1990) mencionan que la respuesta inmune humoral del huésped contra *Brucella* es directa contra el LPS y en menor proporción contra otros antígenos celulares de superficie como el poly B, antígeno Z y proteínas covalentemente unidas al LPS.

Los LPS son inmunoestimuladores (Roitt 1994; Goodman y Parslow 1994; Oppenheim *et al*; 1994; Labro 1994; Proctor *et al*; 1995) pero se ha observado que el LPS de *Brucella* tiene un mayor efecto. Es un mitógeno de células B con especial preferencia en células B₁ capaz de producir una respuesta timo-independiente caracterizada principalmente por una ligera respuesta de tipo IgM, demostrada en este estudio, también se pudo observar que a mayor cantidad de LPS en las células mayor es la respuesta de este isotipo; así, el grupo infectado experimentalmente con *B. melitensis* aislada de un brote de campo, produjo la mayor concentración de IgM. La respuesta de IgM siempre fue discreta mostrando niveles menores en comparación con las IgG totales.

Los macrófagos y linfocitos B tienen receptores membranales para LPS-*Brucella* y estas bacterias tienen la tendencia de formar rosetas en su superficie. Los principales receptores descritos en los macrófagos son el CD18 que es capaz de fijar a la bacteria completa, el CD14 que fija las células de *Brucella* a las que se les ha unido en su LPS proteínas plasmáticas fijadoras de lipopolisacárido (PPFLPS) y receptores barredores de LPS libre (Roitt 1994). El LPS-*Brucella* es tóxico para los macrófagos e induce la liberación de TNF- α , IL-1 α e IL-6 y se ha reportado que induce mitosis en células de bazo de ratón y linfocitos B (Cherwonogrodzky *et al*; 1990).

Winter (1990) observó en el modelo murino que la inmunidad protectora contra *B. abortus* combina los efectos de las inmunoglobulinas y la inmunidad mediada por células. Esta interacción requiere del isotipo adecuado y que este sea de alta afinidad. IgG₂ es específico contra la cadena O-LPS de *Brucella* y de alta afinidad capaz de prevenir la infección con una cepa virulenta. Para los bovinos se menciona que IgG₁ es el isotipo dominante y protector después de la infección (Buttler *et al.*: 1986), pero investigadores como Estes *et al.* (1990), Templeton y Adams (1990) han reportado que los bovinos con resistencia natural contra la brucelosis expresan preferencialmente IgG₂ (alotipo A1) como anti-LPS, ya que IgG₂ en bovinos se expresa en dos formas alotípicas (A1 y A2).

Kacskovics *et al.* (1995) menciona que en ciertas enfermedades en el ganado bovino se expresan en forma preferencial un alotipo de IgG₂ y este va a diferir en su habilidad para opsonizar, fijar complemento y activar el mecanismo de citotoxicidad mediado por células dependientes de anticuerpo (Stites 1996a). Goodman *et al.* (1996) reportan que en los humanos la propensión de producir subclases de IgG es hereditario. Se ha reportado que la deficiencia de IgG₂ se relaciona con incapacidad de responder a antígenos polisacáridos y presentación de infecciones recurrentes (Stites 1996b; Amman 1990).

En cabras IgG₂ es de alta afinidad contra O-LPS de *Brucella*, su vida media es de 15-30 días y presenta una mayor actividad citofílica en comparación con IgG₁ (Micusan y Borduas 1977). Watson (1976) demostró que IgG₂ es la subclase predominante involucrada en fagocitosis y citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos en los bovinos y ovinos. En los humanos IgG₁ es la que presenta esta actividad (Goodman 1996).

La afinidad de IgG₂ caprina contra el LPS de *Brucella* se demuestra en el grupo infectado con cepa de campo de *B. melitensis*, donde esta subclase de IgG se mostró como dominante sobre IgG₁ a lo largo de todo el experimento. Igualmente los grupos vacunados con Rev 1 IgG₂ fue la principal subclase dentro de los 60 días posvacunación.

El grupo vacunado con la cepa rugosa de *B. abortus* RB51 presentó una respuesta importante por IgG₂, similar a los grupos vacunados con Rev 1, dentro de los 60 días posvacunales. Esta respuesta de IgG₂ no concuerda con la idea de que a mayor cantidad de LPS mayor respuesta de IgG₂, si pensamos en RB51 como cepa rugosa y carente de O-LPS, pero esta cepa tiene la característica de no carecer completamente de su cadena O, simplemente presenta una reducción de esta como lo menciona Schurig *et al.* (1991) y Stevens (1995), por lo que esta cepa puede presentar la fracción o epitopo al cual va dirigido la respuesta por este isotipo. Lo anterior se apoya en lo descrito por Cherwonogrodzky *et al.* (1990) donde menciona la existencia de dos tipos de inmunoglobulinas anti-LPS de *Brucella* que difieren en la especificidad del epitopo. Las inmunoglobulinas de Tipo 1 que se unen a los epitopos de cuerpo de la cadena O-LPS y las inmunoglobulinas de Tipo 2 que se unen a los epitopos de los extremos, por lo que la cepa vacunal de RB51 pudiera solamente estimular la respuesta de inmunoglobulinas de Tipo 1. La cepa vacunal rugosa mutante por transposición de *B. abortus* S2308::Tn5 carece de la cadena O-LPS y la respuesta por IgG₂ es mínima.

Los datos anteriores y los resultados de este estudio pueden sugerir que existe una relación entre el nivel de IgG₂ y la protección contra *Brucella* en las cabras.

La inmunidad mediada por células es crítica en la resistencia del huésped a la infección por parásitos intracelulares, la compleja interacción de citocinas que controlan la inducción de la inmunidad mediada por células comprende varios eventos entre los cuales esta la diferenciación de linfocitos T en dos subgrupos Th1 y Th2. Las células Th1 secretan IL-2, IFN- γ y factor de necrosis tumoral β (TNF β) que participan en la hipersensibilidad de tipo tardía y en los procesos de inmunidad celular, mientras las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 favoreciendo una respuesta por anticuerpos. La producción de IL-12 por macrófagos estimulados favorecen la secreción de IFN- γ por células NK y linfocitos T y se ha observado que estas dos citocinas sinergizan para el control de bacterias intracelulares mediante la activación de los macrófagos a un estado microbicida (Locksley y Scott 1991; Khan *et al.*: 1994; Cheers 1997).

Estudios recientes presentados por Cheers (1997) muestran datos interesantes en relación a las diferentes citocinas inducidas en la respuesta a bacterias vivas o muertas del genero *Brucella* y a las clases de inmunoglobulina formadas contra cada una de ellas. Las *Brucellas* vivas favorecen la producción de interferón- γ (IFN- γ) y este controla la formación de IgG2a, también se observó que interleucina 12 (IL-12) es producida solo durante la infección con bacterias vivas. Por otro lado, bacterias muertas estimulan la producción de IL-4 que favorece la producción de IgG1. En este sentido, podemos pensar que cepas de *Brucella* capaces de sobrevivir a la fagocitosis, como la cepa de campo, generarán una mayor respuesta por IgG2, tal como se ha presentado aquí.

Bibliografía citada

- Adams, L.G., 1990. Development of live vaccines. In Advances in Brucellosis research. (Edited by Adams L.G). First ed. Texas, USA. *Texas A & M University Press*, pp 250-276.
- Adams, L.G. and Mia, A.S., 1991. Field evaluation of "D-Tec *Brucella A*", a monoclonal antibody-based Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (cELISA) - for serodiagnosis of brucellosis in cattle. *Annual USAHA Meeting*, pp 92-112.
- Adams, G., Templeton, J.W. and Feng, J., 1994. Candidate genes controlling resistance to bovine brucellosis. *75 Th. annual meeting of the conference of research workers in animal diseases*, abstract. Chicago, Ill.
- Alfonseca-Silva, E.; Díaz-Aparicio, E., Hernández, A.L. Velázquez, Q.F. y Suárez-Güemes, F., 1995a. Comportamiento de un inmunoensayo-enzimático competitivo para diagnóstico de brucelosis en cabras. Memorias de la Reunión Anual de Investigación Pecuaria 1995. *Vet. Mex.* 26 sup. 2 p 52.
- Alfonseca-Silva, E.; Díaz-Aparicio, E., Hernández, A.L. y Suárez-Güemes, F., 1995b. Comportamiento de un inmunoensayo enzimático para el diagnóstico de brucelosis en diferentes grupos de bovinos. Memorias de la Reunión Anual de Investigación Pecuaria 1995. *Vet. Mex.* 26 sup. 2 p 138.
- Alton, G.G. and Elberg, S.S., 1967. Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine - a review of ten years of study-. *Vet. Bull.* 37(11): 793-800.
- Alton, G.G., Jones, L.M. and Pietz, D.E., 1975. Laboratory Techniques in brucellosis. 2nd edition. Geneva: *World Health Organization*.
- Alton, G.G., 1987. Control of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats - a review. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 19: 65-74.
- Alton, G.G., (1990a). *Brucella melitensis* 1887 to 1987. In Animal brucellosis. (Edited by Nielsen and Duncan). Boca Raton , Florida, USA. *CRC Press, Inc.* pp. 378-382.
- Alton, G.G., 1990. *Brucella melitensis*. In Animal brucellosis. (Edited by Nielsen and Duncan). Boca Raton , Florida, USA. *CRC Press, Inc.* pp. 383-410.
- Ammann, A.J., 1996. Transtornos por inmunodeficiencia de anticuerpos (células B), En Inmunología básica y clínica. (Editores Stites, D.P., Terr, A.I. y Parslow, T.G.). 8a ed. México. *Ed. El Manual Moderno*. pp. 337-353.

- Babu, N.G. R. and Reddy, Y.K., 1992. Isolation of whole IgG from goat serum. *Int. J. Anim. Sci.* 7: 105-107.
- Barker, R.H., 1990. DNA probe diagnosis of parasitic infections. *Exp. Parasitol.* 70: 494-499.
- Brees, D., Stevens, M.G., Olsen, S.C. and Cheville, N.F., 1995. Isolation of antigenic outer membrane proteins from *Brucella abortus* RB51 by lectin affinity chromatography. 76th annual meeting of the conference of research workers in animal diseases, abstract. Chicago, Ill.
- Bricker, B.J. and Halling, S.M., 1994. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1,2 and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32 (11): 2660-2666.
- Butler, J.E., Seawright, G.L., McGivern, P.L. and Gilsdorf, M., 1986. Preliminary evidence for a diagnostic immunoglobulin G1 response among culture-positive cows vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 and challenged with a field strain. *Am. J. Vet. Res.* 47: 1258-1264.
- Canning, P.C., 1990. Phagocyte function in resistance to brucellosis. In Advances in Brucellosis research. (Edited by Adams L.G). First ed. Texas, USA. *Texas A & M University Press.* pp. 151-163.
- Carmichael, L.E. and Bruner, D.W., 1968. Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *Cornell Vet.* 58: 579-592.
- Carter, G.R. y Chengappa, M.M., 1994. Cap 24: *Brucella*. En Bacteriología y micología veterinaria. México, D.F. Ed. *El manual moderno.* pp. 351-360.
- Casillas, F.M., 1979. Impacto de la brucelosis en la salud pública en México. *En Foro nacional contra la brucelosis*, México, D.F.
- Cheers, C., 1997. Cell mediated immunity to murine brucellosis and the rol of cytokines. 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference, Nov 8-9 Chicago. pp 37-43
- Cherwonogrodzky, J.W.; Dubray, G.; Moreno, E. and Mayer, H., 1990. Antigens of *Brucella*. In Animal brucellosis. (Edited by Nielsen and Duncan). Boca Raton , Florida, USA. *CRC Press, Inc.* pp. 19-64.
- CloECKaert, A., Jacques, Y., Bosserey, N., Limet, J.N., Bowden, R., Dubray, G. and Plommet, M., 1991. Protection conferred on mice by monoclonal antibodies directed against outer-membrane-protein antigens of *Brucella*. *J. Med. Microbiol.* 34: 175-180.

- CloECKaert, A., Kerkhofs, P., Limet, J., 1992. Antibody response to *Brucella* outer membrane proteins in bovine brucellosis: immunoblot analysis and competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 30 (12): 3168-3174.
- Corbel, M.J. and Brinley-Morgan, W.J., 1994. In Bergey's manual of Systematic bacteriology, Vol 1. Editor Krieg, N.R. and Holt, J.G. Williams & Wilkins. Baltimore, USA. pp. 377-388.
- Del Río, V.J., 1979. Importancia de la brucelosis en México, *En foro nacional contra la brucelosis*. México, D.F.
- Díaz-Aparicio, E. 1993. Diagnóstico serológico de la Brucelosis caprina. Tesis doctoral. *Universidad de Navarra*, España.
- Duncan, J.R., Wilkie, B.N., Histan, F. and Winter, A.J. 1972. The serum and secretory immunoglobulins of cattle: characterization and quantitation. *J. Immunol.* 108 (4): 965-975.
- Elberg, S.S. 1981. Rev 1 *Brucella melitensis* vaccine. Part II 1968-1980. *Vet. Bull.* 51(2): 67-73.
- Estes, D.M., Templenton, J.W. and Adams, L.G., 1990. Monoclonal antibodies to the bovine immunoglobulin G2a allotypes A1 and A2. *Anim. Genet.* 21: 181-190.
- FAO/OMS., 1986. Comité mixto de expertos en brucelosis. Sexto informe, OMS, Ginebra.
- Fekete, A., Bantle, J.A. and Halling, S.M., 1992. Detección of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 79-83.
- Ficht, T.A., Bearden S.W., Sowa, B.A. and Adams, L.G., 1989. DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 57 (11): 3281-3291.
- Ficht, T.A., Husseinen, H.S., Derr, J. and Bearden, S.W., 1996. Species-specific sequences at the *omp2* locus of *Brucella* strains. *Int. J. Systematic Bacteriol.* 46 (1): 329-331.
- Fey, H.; Pfister, H; Messerli, J.; Sturzenegger, N. and Grolimund, F., 1976. Isolation, purification and quantification of the bovine immunoglobulins. A technical review. *From the Veterinary Bacteriological Institute of the University of Bern*. pp. 1-42.
- Flores-Castro, R. and Segura, R., 1976. A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in México. *Cornell Vet.* 66 (3): 347-352.

García, L.E.; López, S.R.; Cancino, D.M.; Cedillo, B.L.; Domínguez, L.L. y Moreno, L.M., 1992. Técnicas inmunoenzimáticas de aplicación en la microbiología. *Asociación Mexicana de Microbiología. Escuela de Ciencias Biológicas, IPN*. pp. 1-22.

Garin-Bastuji, B., Bowden, A., Dubray, G. and Limet, J.N., 1990. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting analysis of smooth-lipopolysaccharide heterogeneity among *Brucella* biovars related to A and M specificities. *J. Clin. Microbiol.* 28 (10): 2169-2174.

Gómez-Miguel, M.J. and Moriyón, I., 1986. Demonstration of a peptidoglycan-linked lipoprotein and characterization of its fragment in the outer membrane of *Brucella* spp. *Infect. Immun.* 53(3): 678-684.

Goodman, J.W. and Parslow, T.G., 1996. Inmunoglobulinas, En Inmunología básica y clínica. (Editores Stites, D.P., Terr, A.I. y Parslow, T.G.). 8a ed. México. *Ed. El Manual Moderno*. pp 85-100.

Granfors, K.; Viljanen, M.K. and Toivanen, A., 1981. Measurement of immunoglobulin M, immunoglobulin G and immunoglobulin A antibodies against *Yersinia enterocolitica* by enzyme-linked immunosorbent assay: comparison of lipopolysaccharide and whole bacterium as antigens. *J. Clin. Microbiol.* 14(1): 6-14.

Gray, G.D., Mickelson, M.M. and Crim, J.A., 1969. The demonstration of two γ -globulin subclass in the goat. *Immunochemistry.* 6: 641-644.

Gurria, T.F., 1994. Introducción general y situación actual de la tuberculosis y brucelosis en México, en las memorias del Curso de capacitación de coordinadores estatales y supervisores distritales en tuberculosis bovina y brucelosis, México, *FMVZ-SARH-CONETB*. pp 3-10.

Halling, S.M., 1997. The organism: genetics. *50 th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference*, Nov 8-9 Chicago. pp 19-25

Harlow, E. and Lane, D., 1988. Antibodies a laboratory manual. USA. *Cold Spring Harbor Laboratory*. pp. 283-358.

Harmon, B.G., Adams, L.G. and Frey, M., 1988. Survival of rough and smooth strain of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. *Am. J. Vet. Res.* 47 (7): 1092-1097

Harmon, B.G. and Glisson, J.R., 1990. Disassociation of bactericidal and fungistatic activities from the oxidative burst of avian macrophages. *Am. J. Vet. Res.* 51 (1): 71-75.

Innis, M.A. and Gelfand, D.H., 1990. Optimization of PCRs. In PCR protocols. Ed. Innis, M.A. et al. *Academics Press, Inc.* Calif. USA.

Jiménez, de Bagüés, M.P.; Elzer, P.H.; Jones, S.M.; Blasco, J.M. Enright, F.M.; Schurig, G.G. and Winter, A.J., 1994. Vaccination with *Brucella abortus* rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*. *Infect. Immun.* 62(1): 4990-4996.

Kacskovics, I., Wittum, T.E., Butler, E.T. and Littledike, E.T., 1995. The heterogeneity of IgG2. VII. The phenotypic distribution of the A1 and A2 allotypes of IgG2a among beef cows with known clinical history. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 48: 89-96.

Khan, I.A., Matsuura, T. and Kasper, L.H., 1994. Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. *Infect. Immun.* 62: 1639-1642

Labro, M.T., 1994. Defensas corporales e infección. Estados Unidos. *Marcel Dekker, Inc.* pp 17-23.

Lamb, V.L., Jones, L.M., Schurig, G.G. and Berman, D., 1979. Enzyme-linked immunosorbent assay for bovine immunoglobulin subclass-specific response to *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* 26 (1): 240-247.

Leal-Klavezas, D., López-Merino, A. and Martínez-Soriano, J.P., 1995a. Molecular detection of *Brucella spp.*: rapid identification of *B. abortus* biovar 1 using PCR. *Archives of Med. Research.* 26 (3): 263-267.

Leal-Klavezas, D S., Martínez-Vazquez, I.O., López-Merino, A. and Martínez -Soriano, J.P., 1995b. Single-Step PCR for detection of *Brucella spp* From blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.* 33 (12): 3087-3090

Lisowski, J., Janusz, M., Tyran, B., Morawiecki, A., Golab, S. and Bialkowska, H., 1975a. Immunoglobulins of colostrum-II: comparative studies of ovine serum and colostrum IgG1 and IgG2. *Immunochemistry.* 12:159-166.

Lisowski, J., Janusz, M., Tyran, B., Morawiecki, A., Golab, S. and Bialkowska, H., 1975b. Immunoglobulins of colostrum-IV: comparative studies of bovine serum and colostrum IgG1 and IgG2. *Immunochemistry.* 12:167-172..

Locksley, R.M. and Scott, P., 1991. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. *Immunoparasitology today* 49: A58-A61

López, M.A., 1991. Brucelosis avances y perspectivas. México. *Publicación técnica del INDRE* No. 6.

Martin, N.L. and Hancock, R.E., 1990. Function and structure of the major components of the outer membrane of Gram-negative bacteria: In *Advances in Brucellosis research*. (Edited by Adams L.G.). First ed. Texas, USA. *Texas A & M University Press*. pp. 55-75.

Martínez-Soriano, J.P.; Cab, B.E., Tamez, G.R. y Leal, K.D.S., 1993. Detección de la *Brucella abortus* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica 4* (XVIII): 10-16.

Matar, G.M., Khneisser, Y. A. and Abdelnoor, A.M., 1996. Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. *J. Clin. Microbiol.* 34 (2): 477-478.

Micusan, V.V. and Borduas, A.G., 1975. Papain hydrolysis of goat IgG immunoglobulins: a means of subclass characterization. *Immunochem.* 12: 345-347.

Micusan, V.V., Boulay, G. and Borduas, A.G., 1976. The role of colostrum on the occurrence of immunoglobulin G subclass and antibody production in neonatal goats. *Can. J. Comp. Med.* 40: 184-189.

Micusan, V.V. and Borduas, A.G., 1977. Biological properties of goat immunoglobulins G. *Immunology* 32: 373-381.

Montaraz, J.A., Winter, A.J., Hunter, D.M., Sowa, B.A., Wu, A.M. and Adams, L.G., 1986. Protection against *Brucella abortus* in mice with O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 5 (3): 961-963

Moriyón, I., 1997. Structure of the cell envelope. *50 th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference*, Nov 8-9 Chicago. pp 3-18

Nagal, K.B., Katoch, R., Sharma, M., Sambyal, D. and Kumar, N., 1994. *Brucella melitensis* abortions in a dairy herd. *Indian J. Anim. Sc.* 64(2): 132-134.

Nielsen, K.H.; Kelly, L.; Gall, D.; Balsevicus, S.; Bosse, J.; Nicoletti, P. and Kelly, W., 1993. Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Agriculture Canada, Animal diseases Research Institute*. pp. 1-30.

Núñez, T. E.; Díaz, A. E. y Velázquez, Q. F., 1995. Presencia de anticuerpos contra *Brucella ovis* y *Brucellas* lisas en machos ovinos jóvenes. *Memorias de la Reunión Anual de Investigación Pecuaria 1995. Vet. Mex.* 26 sup. 2. p 55.

- O'Brien, J.P. and Sherman, D.M., 1993a. Serum immunoglobulin concentrations of newborn goat kids and subsequent kid survival through weaning. *Small Rumin. Res.* 11: 71-77.
- O'Brien, J.P. and Sherman, D.M., 1993b. Field methods for estimating serum immunoglobulin concentration in newborn kids. *Small Rumin. Res.* 11: 79-84.
- Oppenheim, J.J., Ruscetti, F.W. y Faltynek, C. (1996). Citocinas, En Inmunología básica y clínica. (Editores Stites, D.P., Terr, A.I. y Parslow, T.G.). 8a ed. México. *Ed. El Manual Moderno*. pp. 133-156.
- Overholt, K., Adams, L.G., Templeton J.W. and Smith, R., 1988. Evaluation of a competitive ELISA assay as a diagnostic test for bovine and bison brucellosis. *Annual USAHA Meeting*.
- Perry, M.B. and Bundle, D.R., 1990. Lipopolisaccharide antigens and carbohydrates. In *Advances in Brucellosis research*. (Edited by Adams L.G.). first ed. Texas, USA. *Texas A & M University Press*. pp. 76-88.
- Price, R.E., Templeton, J.W. and Adams, L.G., 1990. Survival of smooth, rough and transposon mutant strain of *Brucella abortus* in bovine mammary macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 26:353-365
- Proctor, R.A., Denlinger, L.C and Bertics, P.J., 1995. Lipopolysaccharide and bacterial virulence. In *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. (Edited by Minion, F.C.). second ed. USA. *ASM Press*. pp. 173-194.
- Reyes, P.R.; Díaz-Aparicio, E.; Pérez, G.R.; Licéa, V.A.; Velázquez, Q.F. y Jaramillo, M.L., 1995. Evaluación de la sensibilidad y especificidad de diferentes pruebas serológicas para el diagnóstico de la brucelosis bovina. *Memorias de la Reunión Anual de Investigación Pecuaria 1995. Vet. Mex.* 26 sup. 2 p 57.
- Roitt, I., 1994. *Essential immunology*. 8th Ed. Oxford. *Blackwell Scientific Publication*. pp. 243-271.
- Romero, C., Gamazo, C., Pardo, M. and López-Goñi, Y., 1995a. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33 (3): 615-617.
- Romero, C., Pardo, M., Grillo, M.J., Díaz, R., Blasco, J.M. and Lopez-Goñi, 1995b. Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk for diagnosis of brucellosis in dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 33 (12): 3198-3200.

- Salman, M.D., 1995. Epidemiology of brucellosis. Memorias magistrales del simposio internacional de brucelosis caprina. Zacatecas, México. *FMVZ-UAZ/Asoc. Mex. de Producción Caprina*. pp. 35-37
- Sánchez, G. I., 1993. Conceptos fundamentales del género *Brucella*. Apuntes del curso internacional de diagnóstico de la brucelosis por ELISA 1993. La Habana, Cuba.
- Sánchez-Vizcaino, J.M. y Cambra, A.M., 1987. Técnicas inmunoenzimáticas ELISA en patología animal y vegetal 2a.Ed, *Office International des Epizooties*, serie técnica No. 7.
- Scanlan, M.C., 1988. Parte 11. Cocos y bacilos Gram negativos aerobios: Género *Brucella*. En Introducción a la bacteriología veterinaria. Ed. *Acribia*. Zaragoza, España. pp. 219-225
- Schurig, G.G.; Hammerberg, C. and Finkler, B.R., 1984. Monoclonal antibodies to *Brucella* surface antigens associated with the smooth lipopolysaccharide complex. *Am. J. Vet. Res.* 45: 967-971.
- Schurig, G., Roop, R.M. II, Bagchi, T., Boyle, S., Buhrman, D. and Sriranganathan, N., 1991. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* 28: 171-188.
- Smith, L.D. and Heffron, F., 1987. Transposon Tn5 mutagenesis of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 55 (11): 2774-2776.
- Smith, R. III., 1990. T lymphocyte-mediated mechanism of acquired protective immunity against brucellosis in cattle. In *Advances in Brucellosis research*. (Edited by Adams L.G). First ed. Texas, USA. *Texas A & M University Press*. pp. 164-190.
- Soberon, M.A., 1997. Protección conferida por la vacuna RB51 de *Brucella abortus* en cabras expuestas a la infección experimental por *Brucella melitensis*. Tesis de Maestría. *FMVZ-UNAM*. México 1997.
- Soto, L., Rojas, X. y Alonso, O., 1991. Estudio *in vitro* del efecto de las fracciones de pared celular de *Brucella* sobre la actividad de leucocitos polimorfonucleares en bovinos. *Arch. Med. Vet.* XXIII (7): 27-33.
- Sowa, B.A., 1990. Membrane proteins of *Brucella spp.* In *Advances in Brucellosis research*. (Edited by Adams L.G). First ed. Texas, USA. *Texas A & M University Press*. pp 89-105.
- Stevens, M.G., Olsen, S.C. and Chevillie, N.F., 1995. Comparative analysis of immune responses in cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or strain RB51. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 44: 223-235.

Stites, D.P., 1996a. La respuesta inmunitaria, En *Inmunología básica y clínica*. (Editores Stites, D.P., Terr, A.I. y Parslow, T.G.). 8a ed. México. *Ed. El Manual Moderno*. pp. 51-64.

Stites, D.P., 1996b. Evaluación en el laboratorio de la inmunosuficiencia, En *Inmunología básica y clínica*. (Editores Stites, D.P., Terr, A.I. y Parslow, T.G.). 8a ed. México. *Ed. El Manual Moderno*. pp. 321-332.

Suárez, C.E., Pacheco, A. and Viglioco, M., 1991. Immunochemical studies on a *Brucella ovis* protein antigen. *Vet. microbiol.* 27: 125-131.

Suárez-Güemes, F., Alfonseca-Silva, E., Díaz-Aparicio, E. and Hernández, L., 1995. Evaluation of a competitive ELISA kit for the diagnosis of brucellosis in ruminants in Mexico. *76 Th. annual meeting of the conference of research workers in animal diseases, abstract*. Chicago, Ill.

Sutherland, S.S. and Searson, J., 1990. Immune response to *Brucella abortus* - The humoral response. In *Animal brucellosis*. (Edited by Nielsen and Duncan). Boca Raton, Florida, USA. *CRC Press, Inc.* pp. 65-82.

Templeton, J.W. and Adams, L. G., 1990. Natural resistance to bovine brucellosis. In *Advances in Brucellosis research*. (Edited by Adams L.G). First ed. Texas, USA. *Texas A & M University Press.*, pp. 144-150.

Thoen, C.O. and Enright, F., 1986. Chapter 20 : *Brucella*. In *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Ames, USA. *Iowa state university press/Ames*. pp. 160-171.

Varela-Díaz, V.M., Jones, L.M. and Pérez-Esandi, M.V., 1971. *Brucella melitensis* Rev. 1 and *Brucella abortus* 45/20 vaccines in goats: pattern of immunoglobulin production after vaccination and challenge. *Am. J. Vet. Res.* 34 (2): 203-207.

Watson, D.L., 1976. The effect of cytophilic IgG2 on phagocytosis by ovine polymorphonuclear leukocytes. *Immunology.* 31:159-165.

Widjoatmodjo, M.N., Fluit, A. C. and Verhoef, J., 1994. Rapid identification of bacteria by PCR-single-strand conformation polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 32 (12):3002-3007

Winter, A.J., 1990. Mechanisms of protective immunity against *Brucella abortus* in the mouse model system of infection. In *Advances in Brucellosis research*. (Edited by Adams L.G). First ed. Texas, USA. *Texas A & M University Press*. pp. 137-143.

Zygmunt, M.S., Debarh, H.S., Cloeckert, A. and Dubray, G., 1994. Antibody response to *Brucella melitensis* outer membrane antigens in natural infected and Rev 1 vaccinated sheep. *Vet. Microbiol.* 39: 33-46.

D.O. 260 nm
Ab= 1, 10 mV, .5mm/min.

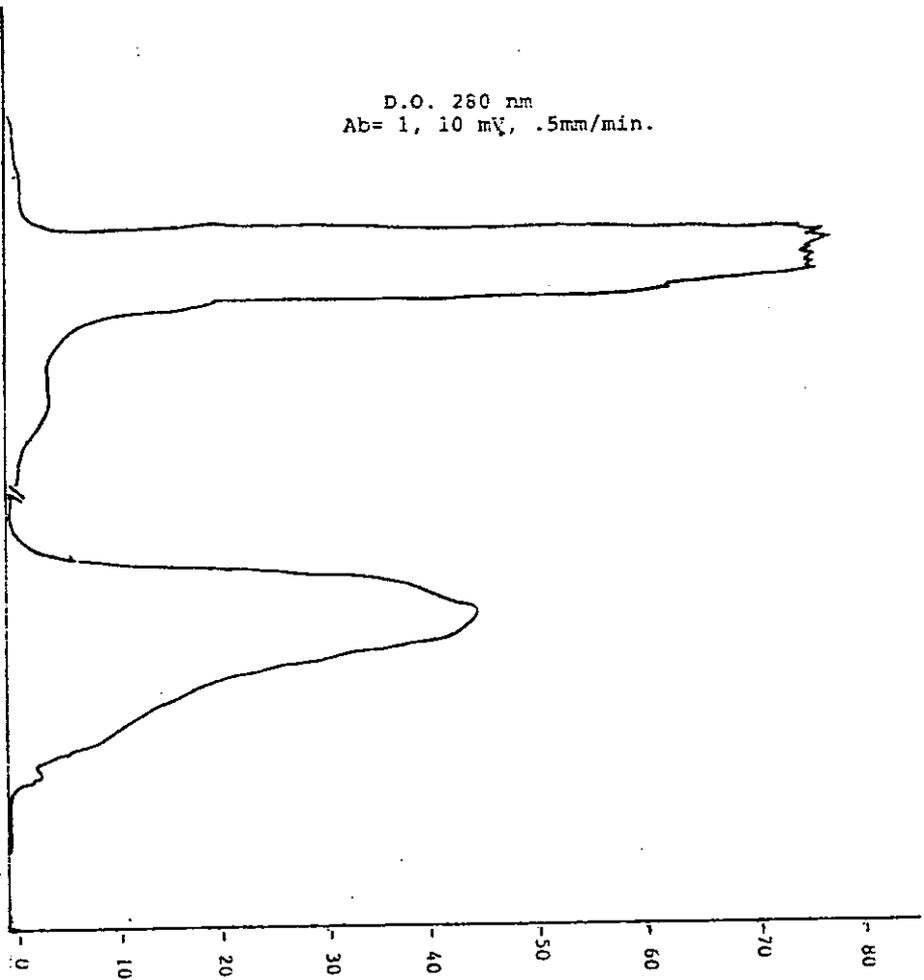


FIGURA 1.- Purificación de IgG1 caprina a partir de calostro por Cromatografía en DEAE sefadex-A25. Equilibrio de columna y elución del primer pico (mezcla de IgG1/IgG2) con Tris-HCl 10 mM pH 8.5. Elución del segundo pico (IgG1 en pico ascendente) con gradiente de NaCl 0-.5 M en Tris 10 mM.

D.O. 280 m μ
Ab= 1, 10 mV, .5mm

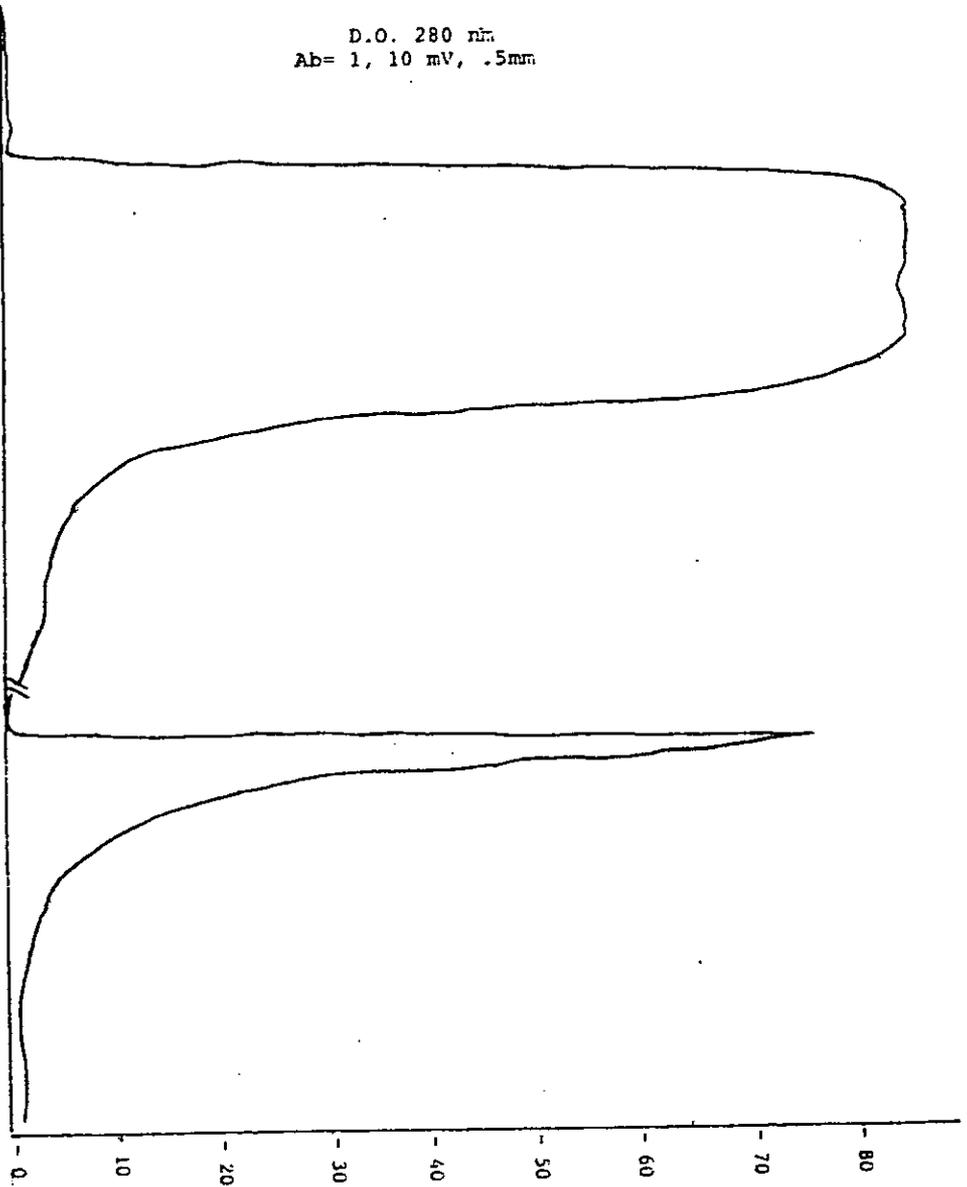
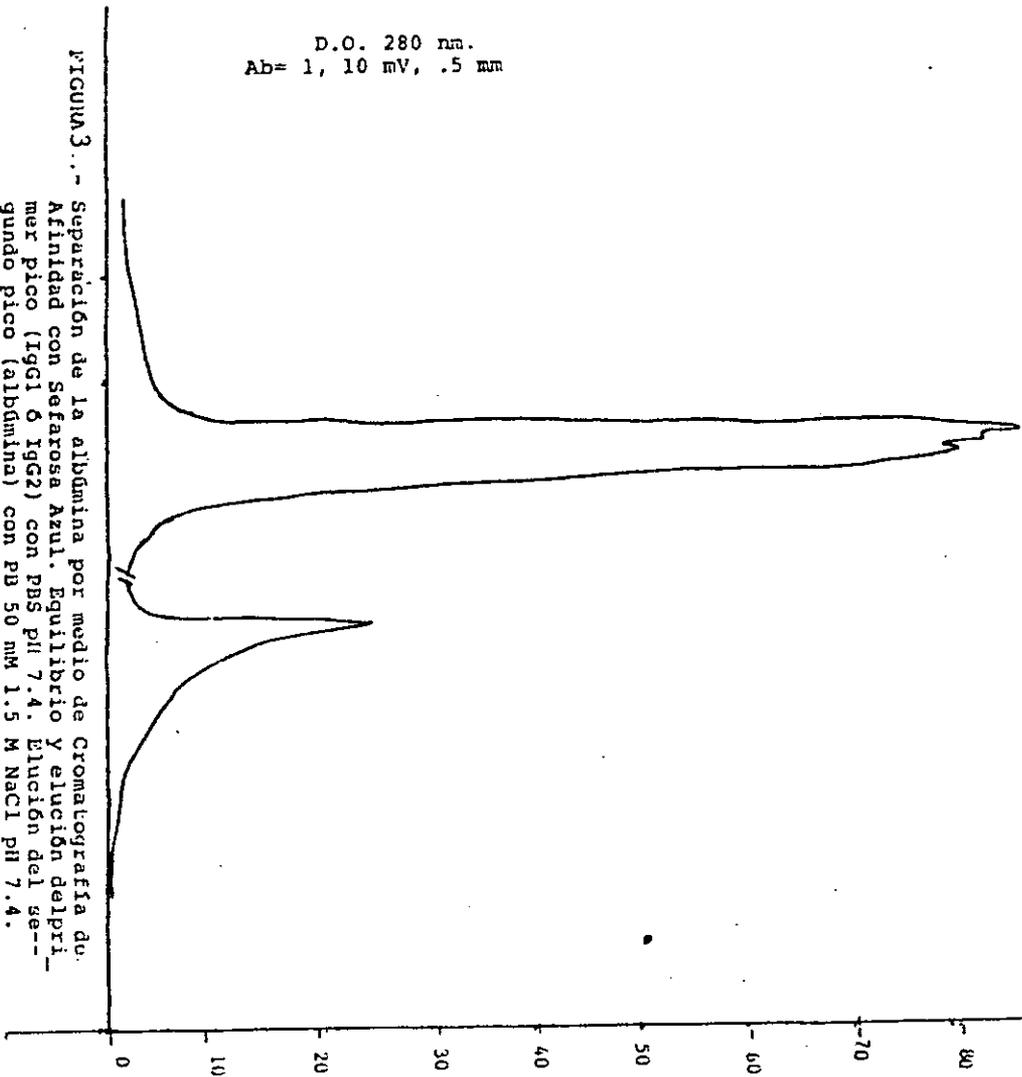


FIGURA 2.- Purificación de IgG2 caprina a partir de suero por Cromatografía en DEAE Sefadex-A25. Equilibrio de columna y elución del primer pico (IgG2, en pico ascendente) con Tris-HCl 10 mM pH 8.5. Elución del segundo pico (mezcla de IgG1 e IgG2 + proteínas séricas) con .5 M NaCl en Tris 10 mM. La columna se estabilizó con 1 M NaCl.

D.O. 280 nm.
Ab= 1, 10 mV, .5 mm

FIGURA 3

Separación de la albúmina por medio de Cromatografía de Afinidad con Sefarosa Azul. Equilibrio y elución del primer pico (IgG1 & IgG2) con PBS pH 7.4. Elución del segundo pico (albúmina) con un 50 mM 1.5 M NaCl pH 7.4. Regeneración de la columna con Urea 6 M en PBS.



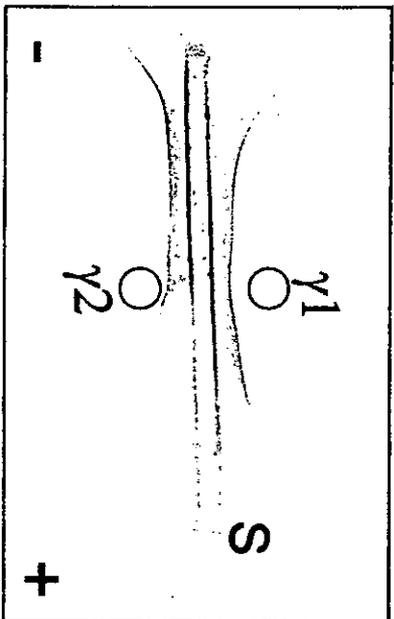


Figura 4.- Immunoelectroforesis que muestra la migración de las dos subclases de IgG caprina. $\gamma 1 = \text{IgG}_1$, $\gamma 2 = \text{IgG}_2$, S = anti-IgG caprina.

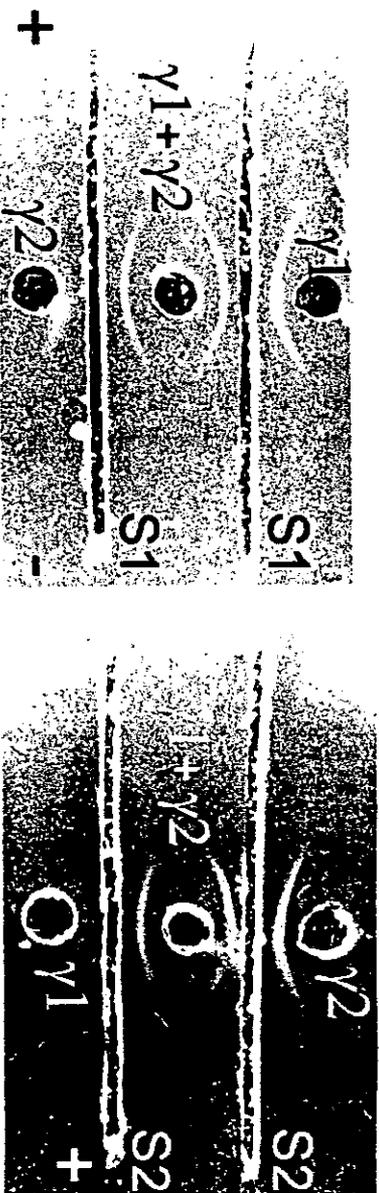
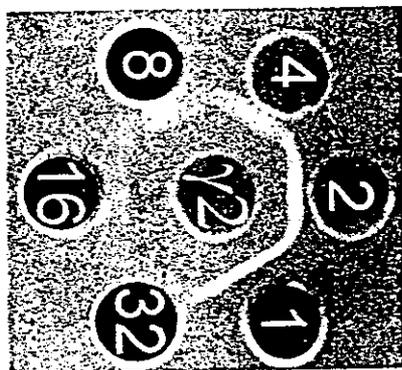
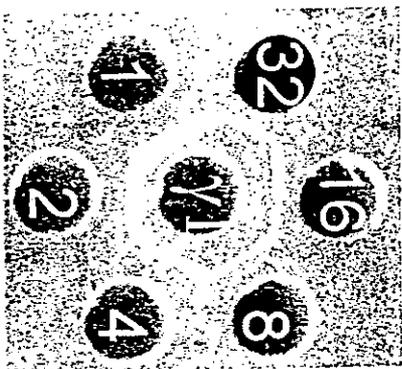


Figura 5 y 6.- Immunoelectroforesis donde se muestra la pureza de los antisueros producidos en conejos contra las subclases de IgG caprina. $\gamma 1 = \text{IgG}_1$, $\gamma 2 = \text{IgG}_2$, S1 = anti-IgG₁, producido en conejo, S2 = anti-IgG₂, producido en conejo.



Figuras 7 y 8.- Doble difusión en agar, donde se muestra la titulación de los antisueros producidos en conejos contra las subclases de IgG caprina. γ_1 = IgG₁, γ_2 = IgG₂.

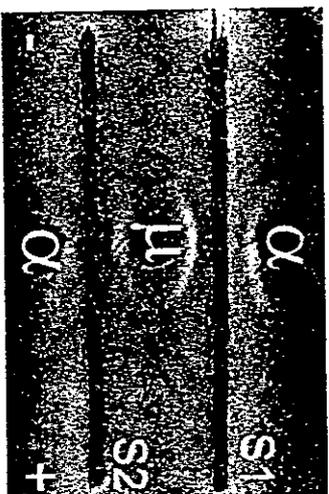
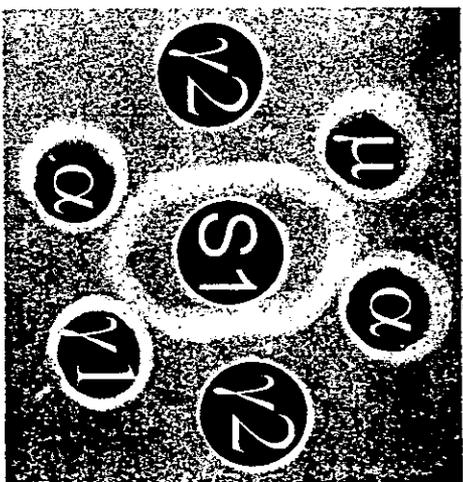
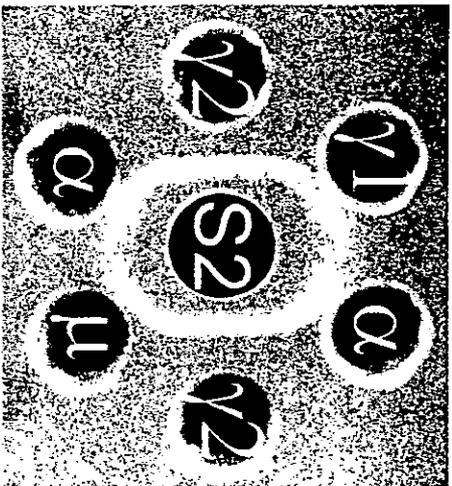


Figura 9.- Inmunoelectroforesis donde se muestra la reacción de los antisueros producidos en conejos contra diferentes tipos de inmunoglobulinas. α = IgA, μ = IgM, S1 = anti-IgG₁, S2 = anti-IgG₂.



Figuras 10 y 11.- Doble difusión en agar que muestra la identidad de los antisueros producidos en conejo contra las subclases de IgG caprina en contra de diferentes isotipos de inmunoglobulinas caprinas. γ_1 = IgG₁, γ_2 = IgG₂, α = IgA, μ = IgM, S1 = anti-IgG₁, S2 = anti-IgG₂.

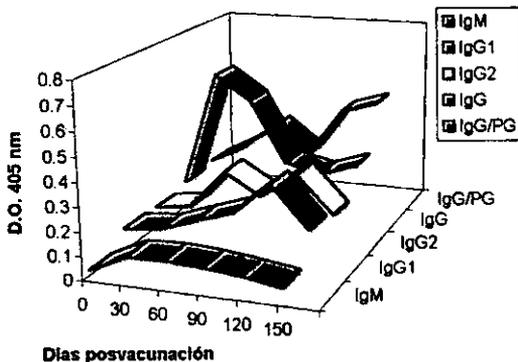


Figura 12.- Niveles de isotipos inducidos por la vacuna *B. melitensis* Rev 1 ruta conjuntiva.

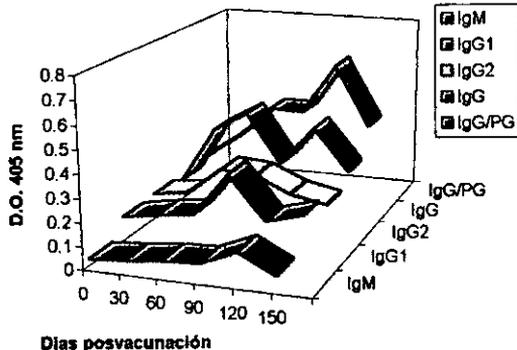


Figura 13.- Niveles de isotipos inducidos por la vacuna *B. melitensis* Rev 1 dosis reducida

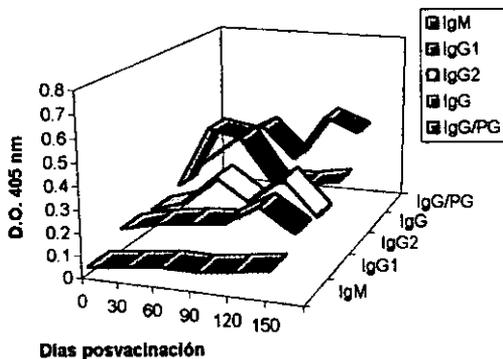


Figura 14.- Niveles de isotipos inducidos por la vacuna *B. abortus* RB51

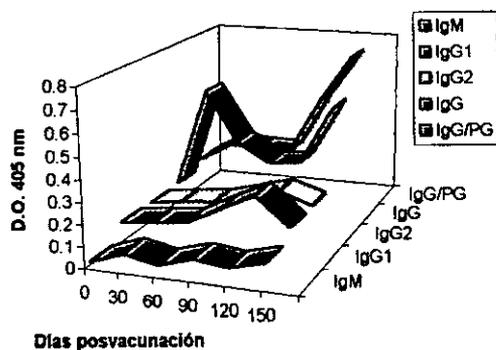


Figura 15.- Niveles de isotipos inducidos por la vacuna *B. abortus* S2308::Tn5

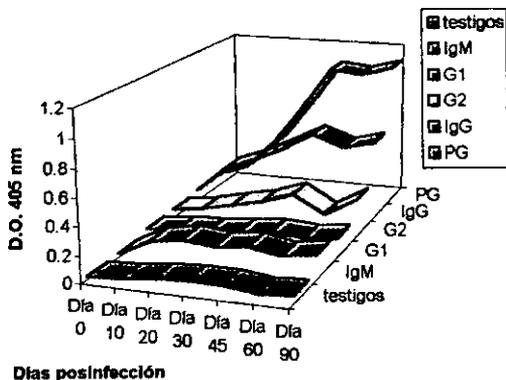


Figura 16.- Niveles de isotipos inducidos por la infección Experimental (*B. melitensis* biovar 3)

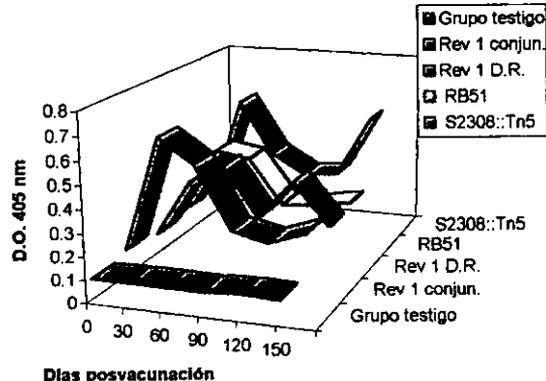


Figura 17.- Niveles de IgG (anti-IgG) inducidos por las diferentes vacunas

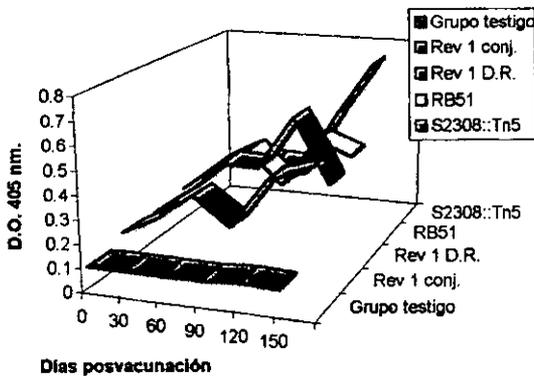


Figura 18.- Niveles de IgG (Prot. G) inducidos por las diferentes vacunas

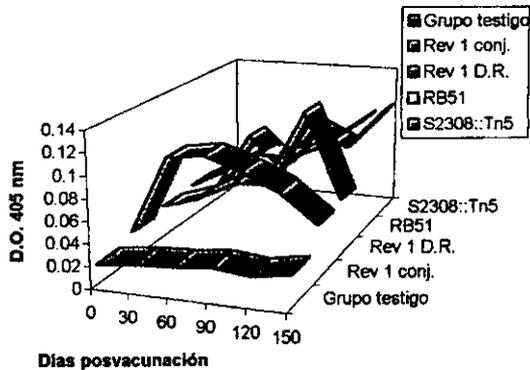


Figura 19.- Niveles de IgM inducidos por las diferentes vacunas

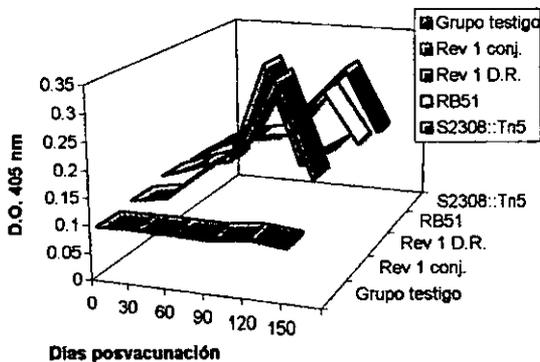


Figura 20.- Niveles de IgG1 inducidos por las diferentes vacunas

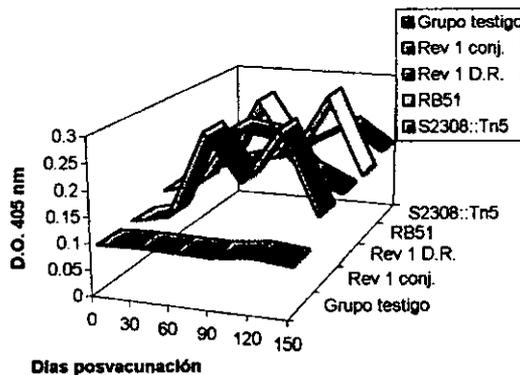


Figura 21.- Niveles de IgG2 inducidos por las diferentes vacunas

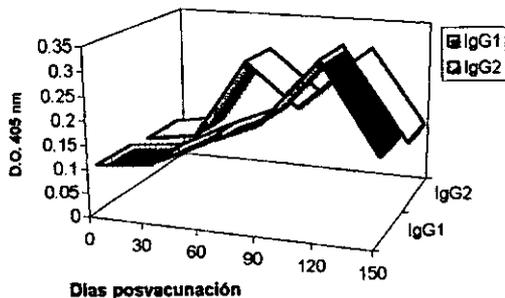


Figura 22.- Comparación de los niveles de IgG1 e IgG2 inducidos por la vacuna *B. melitensis* Rev 1 ruta Conjuntiva

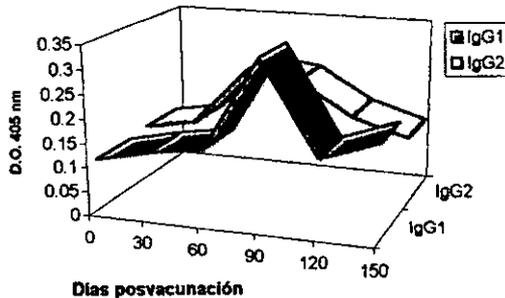


Figura 23.- Comparación de los niveles de IgG1 e IgG2 inducidos por la vacuna *B. melitensis* Rev 1 dosis reducida

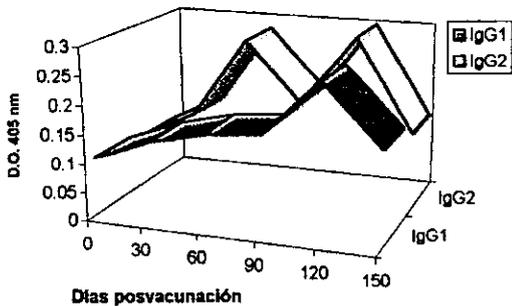


Figura 24.- Comparación de los niveles de IgG1 e IgG2 inducidos por la vacuna *B. abortus* RB51

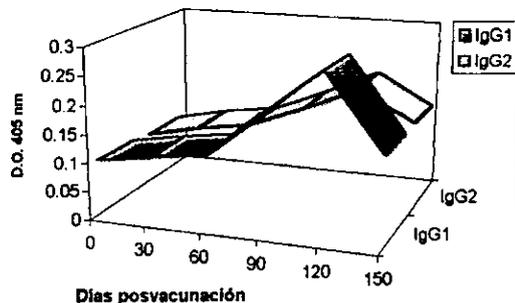


Figura 25.- Comparación de los niveles de IgG1 e IgG2 inducidos por la vacuna *B. abortus* S2308::Tn5

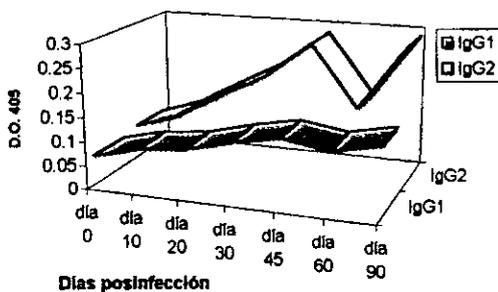


Figura 26.- Comparación de los niveles de IgG1 e IgG2 inducidos por la infección experimental

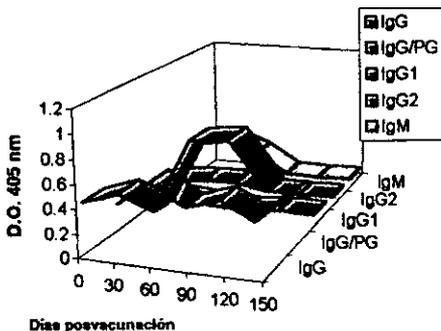


Figura 27.- Niveles de isotipos inducidos por la vacuna *B. abortus* RB51 con LPS-r

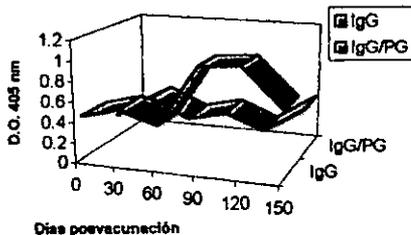


Figura 28.- Comparación de los niveles de IgG (anti-IgG contra Proteína G) inducidos por la vacuna *B. abortus* RB51 con LPS-r

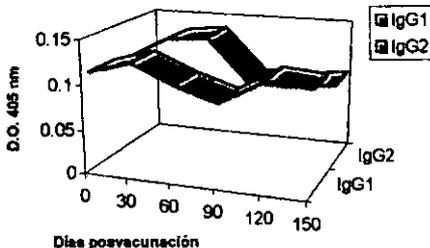


Figura 29.- Comparación de los niveles de IgG1 e IgG2 inducidos por la vacuna de *B. abortus* RB51 con LPS-R

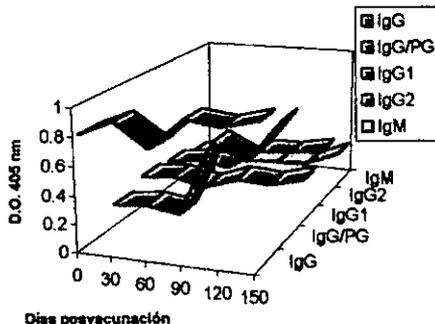


Figura 30.- Niveles de isotipos inducidos por la vacuna *B. abortus* S2308::Tn5 con LPS-r

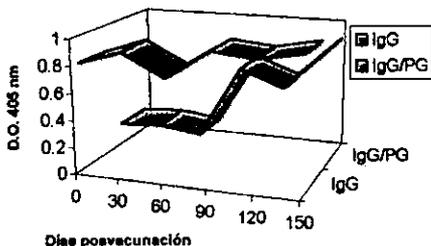


Figura 31.- Comparación de los niveles de IgG (anti-IgG contra Proteína G) inducidos por la vacuna *B. abortus* S2308::Tn5 con LPS-r

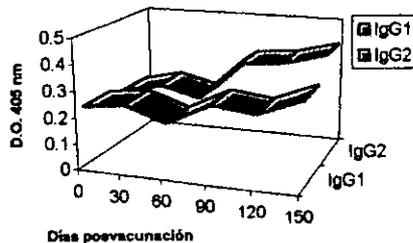


Figura 32.- Comparación de los niveles de IgG1 e IgG2 inducidos por la vacuna *B. abortus* S2308::Tn5 con LPS-r

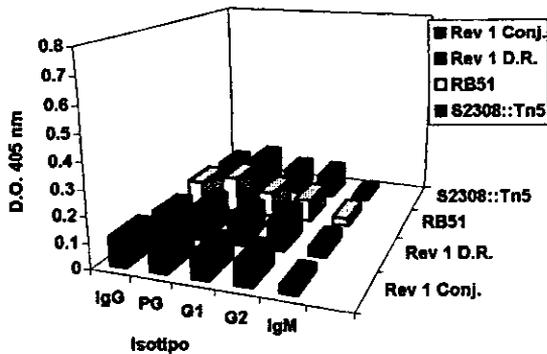


Figura 33.- Respuesta Inmune humoral en cabras vacunadas al día 0

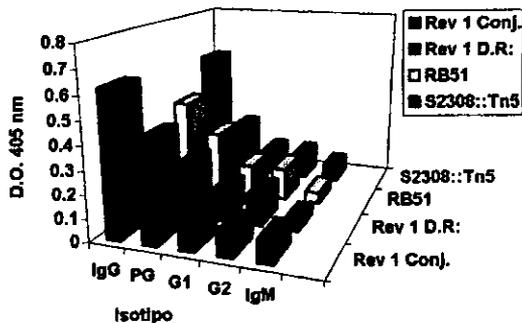


Figura 34.- Respuesta Inmune humoral en cabras vacunadas al día 30

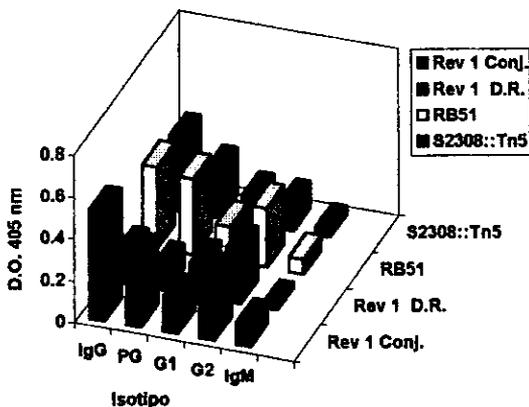


Figura 35.- Respuesta Inmune humoral en cabras vacunadas al día 60

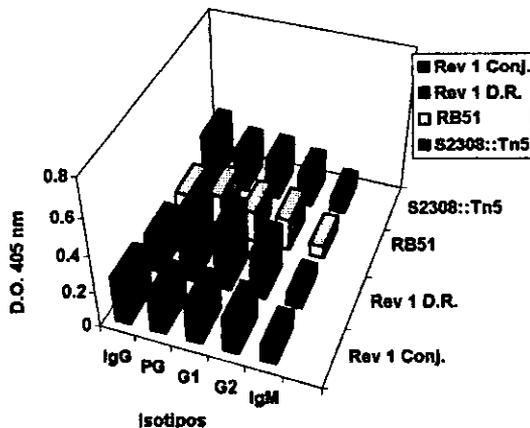


Figura 36.- Respuesta Inmune humoral en cabras vacunadas al día 90

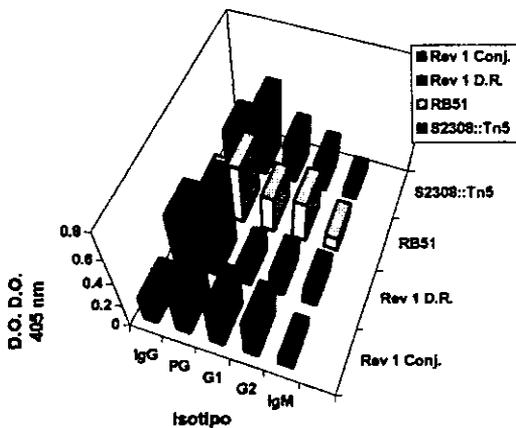


Figura 37.- Respuesta Inmune humoral en cabras vacunadas al día 120

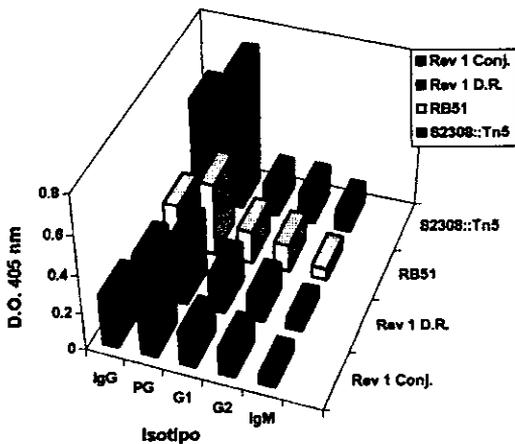


Figura 38.- Respuesta Inmune humoral en cabras vacunadas al día 150

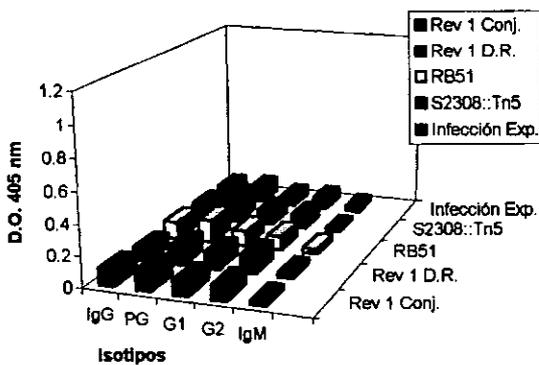


Figura 39.- Respuesta serológica en cabras vacunadas o infectadas al día 0

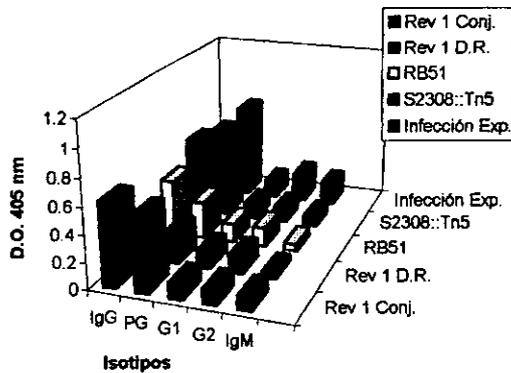


Figura 40.- Respuesta serológica en cabras vacunadas o infectadas al día 30

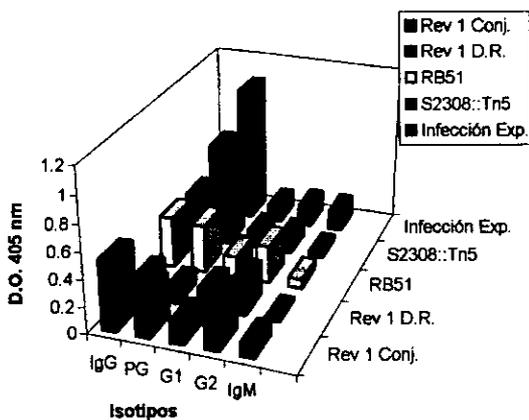


Figura 41.- Respuesta serológica en cabras vacunadas o infectadas al día 60

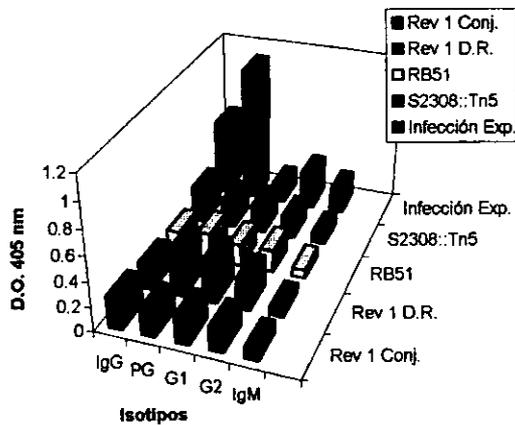


Figura 42.- Respuesta serológica en cabras vacunadas o infectadas al día 90

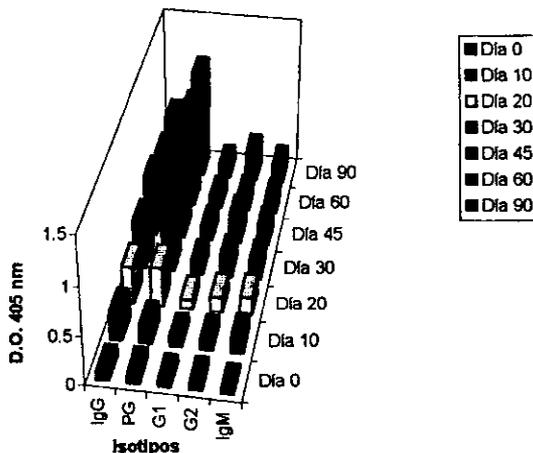


Figura 43.- Respuesta inmune humoral en cabras infectadas