



11661  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MEXICO 4

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA

OBTENCION DE UNA PROTEINA DE MEMBRANA  
EXTERNA DE *Brucella ovis* PARA LA  
ESTANDARIZACION DE UNA PRUEBA DE ELISA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A :**

**Q.F.B. PEDRO MEJIA SANCHEZ**

DIRECTOR: DR. VICTOR RUBEN TENORIO GUTIERREZ

ASESORES: DR. EFREN DIAZ APARICIO

M. en C. ENRIQUE SALAS TELLEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

2003

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **DEDICATORIA**

### **A Cony:**

Por su entrañable amor, por su comprensión durante todo este tiempo y por su grandiosa calidad humana. Te amo.

### **A mis hijos:**

Asuani Areli y Pedro Eduardo, que representan la esperanza, la ilusión y el porque de seguir luchando en la vida. Los amo y quiero.

### **A mis padres:**

Con cariño, de cuya vida he tenido constante y vigoroso ejemplo de propiedad y carácter.

### **A mis hermanos:**

Como motivación en la vida y simbolo de unidad fraternal.

### **A mis amigos:**

Arcelia, Octavio, Germán, Efrén, Victor, Ma. de Lourdes, Laura, Cynthia, Francisco, Carolina, Arturo, Jesús y en especial a Alfonso por estar conmigo en los buenos y malos momentos y por todo el apoyo que me brindaron.

### **A todos aquellos:**

Que de alguna forma recibí su apoyo en la conclusión de este trabajo, mi agradecimiento más sincero. En especial a mis suegros Inés y Rubén.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A mis asesores:**

Víctor R. Tenorio Gutiérrez, Efrén Díaz Aparicio y Enrique Salas Tellez, por la orientación y apoyo para la realización de éste trabajo.

### **A todo el personal:**

Del departamento de bacteriología del CENID-Microbiología. INIFAP-SAGARPA.

### **A mis maestros:**

Por sus enseñanzas mil gracias.

### **Al Jurado:**

Presidente:	Dr. Francisco Suárez Güemes
Vocal:	Dr. Jorge Tortora Pérez
Secretario:	Dr. Andrés Romero Rojas
Primer suplente:	M.C. Guillermo Valdivia Anda
Segundo suplente:	Dr. Víctor R. Tenorio Gutiérrez

### **A Dios:**

Por su existencia, por su gran amor y su libertad.

Por habernos dado la vida, aunque poco a poco acabamos con ella.

Por el gran reto que implica ser un verdadero ser humano y solo se logra a tú lado.

Por ser tan necio conmigo, porque a pesar de mi falta de acciones sigo contando contigo.

Porque al observar cada parte de la naturaleza, no podemos negar que tú mano ahí fue puesta.

Porque sin ti, esperar el nuevo amanecer no tendría sentido.

A aquellos que van junto a mí en esa gran carrera que es la vida.

A aquellos que a pesar de en ocasiones haberme quedado atrás, se han regresado por mí. POR TODO GRACIAS.

## LISTA DE CUADROS

	pág.
1. Cuadro 1. Sueros recolectados para ser utilizados en el ELISA.....	27
2. Cuadro 2. Concentración de proteínas .....	32

## LISTA DE FIGURAS

1. Figura 1. PAGE-SDS de fracciones celulares.....	34
2. Figura 2. Inmunotransferencia de fracciones celulares y extractos totales.....	35
3. Figura 3. Inmunotransferencia de fracciones celulares y extractos totales.....	36
4. Figura 4. Inmunotrasferencia de extractos totales con suero contra <i>B. ovis</i> ....	37
5. Figura 5. Inmunotransferencia de extractos totales con suero contra <i>B. melitensis</i> .....	39
6. Figura 6. Inmunotransferencia de proteínas concentradas.....	41
7. Figura 7. Inmunotransferencia de proteínas concentradas, extracto de <i>B. ovis</i> y células completas de <i>B. melitensis</i> .....	41
8. Figura 8. Distribución de los valores de absorbancia evaluados en el ELISA..	43

# ÍNDICE

	Pág.
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. ANTECEDENTES.....	5
4.1 Características generales.....	6
4.2 Propiedades antigénicas.....	7
4.3 Epizootiología y Epidemiología.....	9
4.4 Patogenia y cuadro clínico.....	11
4.5 Diagnóstico.....	12
4.6 Control y profilaxis.....	15
5. JUSTIFICACIÓN.....	17
6. HIPÓTESIS.....	18
7. OBJETIVO.....	18
7.1 Objetivo general.....	18
7.2 Objetivos específicos.....	18
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
8.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	19
8.2 Obtención de fracciones celulares.....	19
8.3 Separación cuantitativa de las proteínas unidas a compuestos orgánicos.....	20
8.4 Cuantificación de proteínas.....	21
8.5 Preparación del suero hiperinmune de conejo contra <i>Brucella ovis</i> .....	21

E

8.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida sulfato de sodio (PAGE-SDS).....	22
8.7 Inmunotrasferencia.....	23
8.8 Obtención de proteína purificada.....	25
8.9 Colección de sueros positivos y negativos de <i>B. ovis</i> .....	25
8.10 Prueba de inmunodifusión doble en agar (IDG).....	26
8.11 Selección por aislamiento de sueros positivos y negativos de <i>B. ovis</i> .....	26
8.12 Estandarización de reactivos de la técnica de ELISA.....	28
8.13 Desarrollo de la técnica de ELISA indirecta.....	29
9. RESULTADOS.....	32
9.1 Fracciones celulares.....	32
9.2 Características de las fracciones celulares y extractos totales.....	33
9.3 Inmunotransferencia con suero hiperinmune de conejo contra <i>B. ovis</i> .....	33
9.4 Inmunotransferencia con sueros contra <i>B. melitensis</i> .....	38
9.5 Concentración de proteína por el método de filtración-ultrafiltración.....	40
9.6 Estandarización del ELISA indirecto.....	42
10. DISCUSIÓN.....	44
11. CONCLUSIONES.....	52
12. BIBLIOGRAFÍA.....	53
13. ANEXO.....	63

## 1. RESUMEN

El inmunoensayo enzimático (ELISA) es frecuentemente utilizado para el diagnóstico de *Brucella ovis*, el mejor antígeno para realizarlo es el extracto salino caliente, con la desventaja de presentar reacción cruzada a los anticuerpos contra *Brucella melitensis*. El objetivo del presente trabajo fue obtener un antígeno proteico específico de *B. ovis*, que en ELISA presente una elevada sensibilidad y especificidad. De las distintas fracciones celulares (membrana externa, interna y citosol), mediante la técnica de PAGE-SDS, se identificaron proteínas de *B. ovis*, *B. melitensis*, *Mannheimia haemolytica*, *Actinobacillus seminis* y *Haemophilus somnus*. Se realizaron inmunotransferencias con sueros hiperinmunes, observándose gran similitud en el PAGE-SDS y la inmunotransferencia entre las bandas proteicas de *B. melitensis* y de *B. ovis*, sin embargo, se identificaron tres bandas de reconocimiento de 35, 38 y 81 kDa en *B. ovis*, que no aparecieron en *B. melitensis*, estas proteínas se purificaron por un método de filtración-centrifugación y no presentaron reacción con los antisueros de *B. melitensis*, *B. abortus*, *M. haemolytica*, *A. seminis* y *H. somnus*. Para estandarizar el ELISA con estas proteínas purificadas como antígeno, se utilizaron 179 sueros de ovinos con aislamiento de *B. ovis*, 74 sueros de ovinos sin aislamiento de *B. ovis* de hatos libres de brucelosis y un variado número de sueros positivos contra las otras especies bacterianas. Se obtuvo una sensibilidad del 98% y una especificidad del 100%, con valor de concordancia Kappa de 0.97. Descartándose en el ELISA, una reacción cruzada con sueros de *B. melitensis*, *M. haemolytica*, *A. seminis* y *H. somnus*. Concluyendo que se logró estandarizar un ELISA con elevados valores de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de *B. ovis*.

**Palabras claves:** *Brucella ovis*, *B. melitensis*, Ovinos, Proteínas, ELISA.

## 2. ABSTRACT

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is widely used for *Brucella ovis* diagnostic, the major antigens to perform this ELISA is a row *B. ovis* hot saline extract, however this extract produce antibody cross reactions to *Brucella melitensis* and other related bacteria. The aim of this work was produce a specific protein antigen of *B. ovis* with high sensitivity and specificity for ELISA test. Specific proteins profiles from different bacteria cell fractions (inner membrane, outer membrane and cytosol) was performed for *B. ovis*, *B. melitensis*, *Mannheimia haemolytica*, *Actinobacillus seminis* and *Haemophilus somnus* by trials of SDS polyacryamide gel electrophoresis (SDS-PAGE); *B. ovis* and *B. melitensis* revealed a overall similarity; although three main proteins (35, 38 and 81 kDa), only was detected in *B. ovis* extracts in comparison with *B. melitensis* extracts. Specific antibodies for *B. ovis* and *B. melitensis* developed in rabbits was tested by immunoblotting for each bacteria protein profiles, 35, 38 and 81 kDa *B. ovis* proteins was recognized by specific serum and not by *B. melitensis* sera; no reaction was found with *Mannheimia haemolytica*, *Actinobacillus seminis* and *Haemophilus somnus*. The 35 and 38 kDa proteins were purified by Centriprep® and used for ELISA tests. ELISA test was standardized and statistically tested using a 2 X 2 contingency tables with 179 *B. ovis* isolation positive sheep sera, 74 negative brucellosis free sheep sera and positive reference sera to *B. melitensis*, *Mannheimia haemolytica*, *Actinobacillus seminis* and *Haemophilus somnus*. In this system ELISA shown a sensitivity of 98% and specificity of 100%, with an agreement measured by *Kappa* of 0.97. No cross reaction was found with the reference positive sera to other bacterial strains.

**Key words:** *Brucella ovis*, *B. melitensis*, Ovino, Proteins, ELISA.

### 3. INTRODUCCION

La brucelosis es una zoonosis que afecta ganado, bovino, ovino, caprino, suinos, caninos y mamíferos acuáticos. Produce pérdidas económicas cuantiosas, siendo estos efectos particularmente apreciables en los países en vías de desarrollo, debido a que afecta la reproducción y la productividad de los animales. Además, es un problema de Salud Pública ya que el humano es susceptible de adquirir la enfermedad por contagio directo, durante el manejo de los animales o por ingestión de productos lácteos frescos contaminados (Cloeckaert, 1997).

Existen seis especies del género *Brucella*: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae* y *B. canis*. Son reconocidas tres biovariedades para *B. melitensis*, siete para *B. abortus* y cinco para *B. suis*. (Corbel, *et al.*, 1984; Verger, *et al.*, 1985). Con base en estudios moleculares y a que las seis especies de *Brucella* descritas están fuertemente relacionadas, se ha propuesto una sola especie de *Brucella*, siendo ésta *B. melitensis* y convirtiendo las ahora conocidas especies en biovariedades, por ejemplo *B. melitensis* biovar *abortus* (Díaz, *et al.*, 1998). Cuatro especies son de interés económico: *B. melitensis*, que afecta sobre todo al ganado caprino y ovino; *B. abortus*, al ganado bovino; *B. suis*, a los cerdos y *B. ovis* que afecta a los machos produciendo la epididimitis contagiosa del carnero y pudiendo infectar a la hembra. *B. canis* desde los años 60'S es importante para los criadores de caninos. Por último, *B. neotomae* afecta a la rata del desierto (*Neotoma lepida*). Las infecciones cruzadas son de importancia en la epidemiología de la *Brucella*, sobre todo en *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis*. Las cepas de *Brucella*, aisladas hace cinco años de mamíferos marinos, parecen no adecuarse por completo a ninguna de las especies anteriormente descritas, por lo que se ha propuesto la creación de una nueva especie, denominada *B. maris* (Jahans, 1997). Por el momento, esta nueva especie todavía no ha sido aceptada en forma definitiva.

*B. melitensis* y *B. ovis* están presentes en nuestro país, *B. melitensis* es el agente primordial de la brucelosis afectando principalmente al ganado caprino y bovino, mientras que *B. ovis* afecta a la especie ovina, en particular al carnero

produciendo la epididimitis contagiosa. *B. melitensis* puede transmitirse al hombre y no se ha reportado que *B. ovis* infecte al humano (Alton, *et al.*, 1988).

*Brucella ovis* es el agente etiológico de la epididimitis contagiosa del carnero, una enfermedad infectocontagiosa que afecta de forma natural a la especie ovina. Esta enfermedad se caracteriza por una inflamación del epidídimo en los carneros, con la consiguiente disminución de la fertilidad de los mismos. Además, aunque no muy frecuentemente, puede producir abortos tardíos en las hembras y un aumento de la mortalidad perinatal (Cleon and Schweitzer, 1989).

La epididimitis ovina ha sido primordialmente asociada a *Brucella ovis*, *Actinobacillus seminis* y a una gran variedad de microorganismos que incluyen *Histophilus ovis*, *Actinobacillus actinomycentencomitans*, *Actinomyces pyogenes*, *Bacteroides spp.*, *Brucella abortus*, *Chlamydia psittaci*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Erysipelotrix rhusopathiae*, *Escherichia coli*, *Hemophilus somnus*, *Moraxella spp.*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella abortus ovis*, *Staphylococcus spp* y *Streptococcus spp.* (De Long *et al.*, 1979; Walker *et al.* 1986; Genetzky, 1995). Se han descrito dos cuadros de epididimitis; uno afectando a animales adultos donde el agente más frecuente es *B. ovis* y otro en animales vírgenes provocada por bacilos pleomórficos gram negativos (que incluye *A. seminis*, *H. ovis*, otros *Actinobacillus* y *Haemophilus*). Por lo tanto, se describen dos diferentes entidades patológicas, dependiendo de la actividad sexual del individuo (Bulgin and Anderson, 1983). De aislamientos realizados en carneros adultos y vírgenes se encontró que el 96.3% de los adultos con lesiones de epididimitis fueron positivos a *B. ovis*, mientras que *A. seminis* se aisló en animales vírgenes en un 75% e *H. ovis* en todos los aislamientos de los carneros vírgenes (Walker *et al.*, 1986). Encontrándose una presencia relevante de *A. seminis* en semen con alteraciones de éste y una baja fertilidad (Low *et al.*, 1995), cuando *B. ovis* se logra prevenir por vacunación con *B. melitensis* Rev 1 (Van Tonder, I y II 1979).

El diagnóstico de la brucelosis ovina, puede ser clínico, bacteriológico, serológico o mediante técnicas de biología molecular. Para el estudio bacteriológico pueden utilizarse una serie de pruebas de laboratorio. La utilización de muestras

correctamente tomadas y la existencia de medios de cultivo selectivos, permiten realizar con éxito el diagnóstico bacteriológico en la inmensa mayoría de los casos. En el diagnóstico serológico se han utilizado diferentes pruebas, pero las de mayor sensibilidad y especificidad han sido: Fijación de complemento (FC), Inmunodifusión doble en gel (IDG) y Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).

#### 4. ANTECEDENTES

En 1952 en Nueva Zelanda, se aisló a partir de carneros afectados de epididimitis, un microorganismo gram negativo cocobacilar que, inoculado por vía intravenosa o prepucial, producía lesiones genitales en el carnero (Mc Farlane *et al.*, 1952). En 1953, un microorganismo semejante fue descrito en Australia (Simmons y Hall, 1953) y Nueva Zelanda (Buddle y Boyes, 1953). Posteriormente, la infección fue descrita en numerosos países (Blasco, 1983), entre ellos México (Pérez *et al.*, 1979).

El microorganismo aislado en 1953 por Simmons y Hall, fue considerado como una cepa mutante de *B. melitensis* (Buddle y Boyes, 1953). Sin embargo, posteriormente Buddle lo denominó *B. ovis* porque contenía antígenos comunes con cepas rugosas de *B. abortus* y *B. melitensis*, aunque no poseía los antígenos A y M de las cepas lisas (Buddle, 1955). Este mismo autor propuso la denominación alternativa de "*B. brucei* var. *ovis australasiae*". Otros autores lo incluyeron dentro del género *Neisseria* por semejanzas en su metabolismo (Meyer y Cameron, 1956) o dentro de *Haemophilus*, debido a la existencia de ciertas propiedades en común (Kennedy *et al.*, 1956).

En 1962 y 1966, el Subcomité Internacional de Taxonomía rehusó admitir este microorganismo como *Brucella* (Jones, 1967). Sin embargo, sobre la base de las relaciones antigénicas entre *B. melitensis* y *B. ovis* (Díaz *et al.*, 1967) y el análisis de los ácidos nucleicos (Hoyer y Mc Cullough, 1968), varios autores recomendaron su inclusión dentro del género *Brucella*, lo que finalmente fue aceptado por el Subcomité Internacional de Taxonomía en 1970 (Alton *et al.*, 1988).

Se ha descrito la presencia de *Brucella ovis* en Alemania, Francia, Hungría, Australia, Nueva Zelanda, España, Rusia, República Checa y Eslovaca, Rumania, Estados Unidos de América, Canadá, México, Argentina, Perú, Uruguay, Chile y Brasil (Blasco, 1990).

En México está presente, pero se desconoce su distribución. El primer trabajo en México se realizó en 1974 en donde se encontró que de 380 sueros de borregos del Estado de Tabasco, el 2.6% fue positivo a la prueba de fijación de complemento (Suárez *et al.*, 1974). No fue sino hasta 1979 en que lograron aislar a la bacteria de sementales Suffolk en el Estado de Guanajuato, los cuales habían sido importados tiempo atrás de los Estados Unidos de América (Pérez *et al.*, 1979). En un trabajo realizado en el Estado de México, donde se aisló la bacteria, se presentó una seropositividad del 35% con la prueba de IDG en este hato, la fertilidad en hembras era del 40% y había un 8% de abortos (Boix, 1987). En estudios serológicos realizados en el 1987 y 1989 en los Estados de México y Tlaxcala, el porcentaje de hatos positivos fue del 47% y del 23.5% respectivamente. Además, se han tenido informes de la enfermedad en el Estado de Hidalgo y el Distrito Federal, mencionándose en un trabajo de 1997, que el 2.4% de los animales son reactores positivos a la prueba de IDG y el 20.5% son rebaños con animales positivos, esto se realizó en ocho de los principales estados productores de ovinos (Jalisco, México, Tlaxcala, Hidalgo, Guanajuato, Nuevo León, Puebla y Veracruz) (Núñez *et al.* 1997).

#### **4.1 CARACTERÍSTICAS BACTERIOLÓGICAS**

El género *Brucella* se constituye por bacilos cortos o cocobacilos gram negativos, inmóviles, no esporulados y que no presentan cápsula evidente. Además, es un parásito intracelular facultativo que se localiza preferentemente en células fagocíticas y que se observa en racimos dentro del citoplasma de las células infectadas. Debido a estas características, se ha dificultado el tratamiento y hace que la enfermedad evolucione hacia formas crónicas (Corbel y Brinley-Morgan, 1984). Algunas de sus especies, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. neotomae*,

presentan características de superficie propias del fenotipo liso (S: "smooth"). Pero también existen especies que carecen de un lipopolisacárido liso (*B. ovis* y *B. canis*) por la ausencia de la cadena O, que les hace parecerse a las mutantes rugosas de las especies lisas, denominadas especies rugosas (R: "rough").

Para su aislamiento primario, *B. ovis* crece en el medio de Thayer-Martin (Thayer y Martín, 1964), modificado con la adición de nitrofurantoina, vancomicina, colistina y nistatina (Alton *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 1973), en agar sangre o en agar soya tripticasa enriquecida con un 5-10 % de suero animal (De Long *et al.*, 1979). La incubación debe realizarse a 37°C en un 10-20 % de CO<sub>2</sub>. Las colonias aparecen entre cuatro y siete días, son grisáceas y circulares, con bordes enteros y regulares, convexas y de superficie brillante; el centro es opaco y la periferia translúcida y por su morfología es prácticamente imposible distinguir las colonias de las especies lisas del género *Brucella* (Alton *et al.* 1988). El germen es catalasa positivo y oxidasa negativo. No produce H<sub>2</sub>S, ni hidroliza la urea y no reduce los nitratos a nitritos. Requiere CO<sub>2</sub> para crecer. Oxida los aminoácidos L y D-alanina, L-asparagina, L-ácido glutámico, D y L-serina. No oxida la L-arabinosa, D-galactosa, D-glucosa, D-ribosa, mesoeritritol, D-xilosa, L-arginina, D y L-citrulina, D y L-ornitina y L-lisina. Su crecimiento es inhibido por violeta de metilo, pero se multiplica en presencia de fucsina y tionina. Los cultivos no son lisados por los fagos Tb, WB, M51-S708, Fz, Bk, MC-75, D y R. Sin embargo, los fagos R/O y R/C son líticos para *B. ovis*. Es sensible a la penicilina, estreptomomicina, tetraciclina y reacciona con acriflavina (Alton *et al.*, 1988; Corbel y Brinley-Morgan, 1975).

#### **4.2 PROPIEDADES ANTIGÉNICAS**

El género *Brucella* se caracteriza por tener una envoltura celular compuesta por una membrana interna y una externa, pared celular y por un espacio periplásmico intermedio. Este último contiene enzimas, entre ellas muchas que destoxifican agentes nocivos procedentes del medio, proteínas relacionadas con el transporte de nutrientes, varias enzimas sobre las que actúan los antibióticos β-lactámicos y

como componente estructural importante, un glucopéptido (mureína o peptidoglicano) responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria (Dubray, 1976). La membrana externa contiene, distribuidos asimétricamente, fosfolípidos, proteínas y lipopolisacárido (LPS). Es relativamente permeable a agentes hidrófobos como los colorantes, detergentes y sales biliares, con diferencias entre especies y biotipos que se reflejan en las técnicas bacteriológicas de tipificación. Es resistente a los péptidos catiónicos bactericidas presentes en lisosomas y fluidos corporales (lisozima, lactoferrina, defensinas) y algunos otros policationes bactericidas como la polimixina B (Freer, *et al.*, 1999). Estas características se relacionan con ciertas propiedades de los componentes de la membrana externa ya que la envoltura de *Brucella* contiene, entre otros fosfolípidos: foasfatidil-colina, que es una sustancia poco común en patógenos gram negativos, así como lípidos de ornitina. Los fosfolípidos y el LPS de *Brucella* poseen ácidos grasos de cadena más larga que lo habitual en los gram negativos típicos (Cloeckaert *et al.*, 1996). Es posible que estas características se relacionen con la tinción positiva de las brucelas por el método de Stamp.

En aquellas bacterias gram negativas, que carecen de cápsula, el antígeno inmunodominante de la superficie celular es el LPS, que consta de una parte glucolipídica (lípidos A) y otra polisacarídica dirigida hacia el exterior (Lugtemberg y Van Alphen, 1983). Esta última se divide en dos secciones: el núcleo, más interno y la cadena O. Las especies rugosas, *B. ovis* y *B. canis*, en forma natural carecen de la cadena O, que poseen las especies lisas *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. neotomae*, aunque pueden perderla por mutación denominándose mutantes rugosas o R. La presencia de LPS rugosos (LPS-R), sean naturales o mutantes, hace que existan dos tipos diferentes de superficies celulares. Esta diferencia es importante, ya que las brucelas habitualmente patógenas para el hombre (*B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*) poseen LPS en fase lisa (LPS-S) y éste es marcadamente inmunodominante en la respuesta serológica (Corbel y Brinley-Morgan, 1984).

El análisis químico del LPS de las mutantes R de las especies lisas de *Brucella* y su comparación con las cepas S, sugiere una estructura del núcleo con 2-ceto, 3-

deoxioctulosanato, glucosa, galactosa y quinovosamina y con carencia de heptosa (Moreno *et al.*, 1984). La cadena O es un homopolímero de N-formil-perosamina, sin ramificaciones, que llevan los antígenos A y M clásicos de Wilson y Miles (Bundle *et al.*, 1987; Moreno *et al.*, 1987).

Mediante análisis por electroforesis y tinción de proteínas con plata, o bien mediante técnicas autorradiográficas o inmunoenzimáticas se pueden detectar dentro de *Brucella ovis* los siguientes antígenos: **1. Lipopolisacáridos, LPS-R** (especies rugosas). **2. Proteínas de membrana externa (Omp):** Grupo 1 (88 a 94 kDa), Grupo 2 (35 a 39 kDa), Grupo 3 (25 a 31 kDa), presentes en la superficie (Riezu-Boj *et al.*, 1990; Cloeckeaert, *et al.*, 1996). Lipoproteína (8 a 9 kDa). Una proteína de 67 kDa, contra la cual el 85% de los animales infectados con *Brucella ovis* presentan anticuerpos. Igualmente importantes son los llamados grupos B, C y D (21 a 22, 18 a 19 y 13 a 15 kDa, respectivamente) (Gamazo *et al.*, 1989). **3. Proteínas Periplásmicas:** BCSP31, Superóxido dismutasa Cu-Zn, BP26 (Omp). **4. Proteínas Citoplásmicas:** proteínas de Estrés (GroEL, GroES, DnaK, HtrA), proteína ribosomal L7/L12, proteínas Ssb y UvrA, bacterioferritina, proteínas de función desconocida (p15, p17 y p39) (Cloeckeaert, 1997; Mbai, *et al.*, 1996). Los componentes citoplasmáticos solubles no ofrecen, ninguna particularidad antigénica con respecto de los otros gram negativos. El análisis por inmunoelectroforesis con sueros policlonales no revela diferencias cualitativas entre las distintas especies de *Brucella* examinadas y por el contrario, demuestra que no existen antígenos solubles comunes con otras bacterias gram negativas, incluidas aquellas con las que hay reacciones cruzadas entre los LPS-S.

#### 4.3 EPIZOOTIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA

La epididimitis ovina, suele aparecer en un rebaño tras el ingreso de animales infectados, la probabilidad de que los animales del rebaño se infecten depende fundamentalmente de la vía de infección, de la dosis infectante y de algunas características intrínsecas de los animales, tales como la edad, sexo y la raza (Genetzky, 1995).

El padecimiento es más común en los grandes rebaños, ya que generalmente poseen un alto número de sementales de diversas edades mantenidos continuamente en contacto, siendo menos frecuente en los pequeños rebaños, en donde es remplazada con mayor frecuencia toda la población de carneros y el número de sementales es reducido (Bagley *et al.*, 1985).

La transmisión directa de carnero a carnero también se da con frecuencia en los periodos de confinamiento prolongado, transmitiéndose *B. ovis* a través de la mucosa rectal. Sin embargo, es a través de la vía oral como se producen la mayor parte de los contagios durante la estabulación. En condiciones experimentales la infección puede transmitirse a través de las vías oral, conjuntival, prepucial, intravenosa, intratesticular, nasal y subcutánea, teniendo mejores resultados cuando se efectúa por la vía conjuntival y la prepucial simultáneamente. Usando estas vías y con dosis de  $5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (ufc) de *B. ovis*, se reproduce la infección en alrededor del 90 % de los carneros desafiados. (Cleon and Schweitzer, 1989).

La transmisión directa de carnero a carnero se da con frecuencia en los periodos de estabulación prolongada de los animales en recintos poco espaciosos a través de la mucosa rectal. Sin embargo es a través de la vía oral como se producen la mayor parte de los contagios, debido a que se lamen el prepucio unos a otros, y puesto que los carneros infectados excretan millones de bacterias por el semen y por las secreciones genitales, el riesgo de contagio es muy elevado. Los carneros infectados eliminan *B. ovis* en el semen incluso durante más de cuatro años después de la infección. En condiciones naturales una misma oveja suele ser repetidamente cubierta por varios carneros, lo que facilita la diseminación de la infección. Esta vía podría, sin embargo, tener mayor importancia en las condiciones de manejo en México, con empadres no controlados y condiciones de hacinamiento en los corrales de encierro nocturno, donde puede producirse la monta de una oveja por más de un macho en un corto periodo de tiempo (Blasco y Barberan, 1998).

La edad constituye un factor importante en la epidemiología de la enfermedad. Varios autores concuerdan en que los animales de mayor edad son más

afectados, especialmente los carneros maduros y sexualmente activos (Beeman *et al.*, 1982). Sin embargo, esta afección también puede ocurrir en los carneros jóvenes de entre seis y doce meses de edad que no han sido utilizados para apareamiento; en tal situación se ha aislado con mayor frecuencia *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Bulgin y Anderson, 1983). Las hembras se ven afectadas más frecuentemente entre uno y los cuatro años (Jensen, 1974). En relación al sexo, varios autores han demostrado el papel predominante que juega el macho en la transmisión y distribución de la enfermedad (Burgess *et al.*, 1982). En Chile se ha estimado la prevalencia en machos del 15 % y de hembras de 1.02% (Pinochet, 1985).

#### **4.4 PATOGENIA Y CUADRO CLÍNICO**

*B. ovis* no es tan invasiva como otras especies del género, pero resiste a la fagocitosis de las células del sistema retículo endotelial y aunque las manifestaciones de la infección sean únicamente genitales, puede ser aislada del bazo y otros tejidos, en ocasiones sin lesión aparente (Jubb y Kennedy, 1974). *Brucella ovis* penetra en los tejidos a través de las mucosas oral, conjuntival, nasal, peneana o rectal y después por vía linfática, alcanza los nódulos linfáticos más próximos al lugar de entrada. Si las bacterias no son destruidas, se difunden por todo el organismo a través de la vía hematógena. El período de incubación no se conoce en la infección natural, se menciona que es de uno a dos meses (Webb *et al.*, 1980). En la fase inicial de la enfermedad puede observarse un aumento de la temperatura (hasta 41.7°C), mal estado general, anorexia y la libido puede estar disminuida, aunque en condiciones de campo estos signos suelen pasar desapercibidos.

*B. ovis* entra al organismo y produce una bacteremia alojándose en los nódulos linfoides, el epidídimo es el órgano blanco de la bacteria, debido probablemente, a la presencia de azúcares como el eritritol o a que en la lesión traumática del epidídimo hay liberación de histamina y pequeños cantidades de fluidos ricos en proteínas. Favoreciendo con esto colonización de los microorganismos y

agravando el cuadro inflamatorio (Montaña, *et al.*, 1998). También estos traumatismos pueden causar la ruptura de los conductos epididimales, iniciando la formación de un granuloma espermático mediado por factores autoinmunes sin la presencia de bacterias (Bulgin *et al.*, 1990; Saravanamuthu, *et al.*, 1991). Una vez establecida, presenta inflamación y la bacteria puede diseminarse a vesículas seminales o permanecer en epidídimo y salir en la eyaculación (Cleon and Schweitzer, 1989; Cloeckcaert, 1997).

La epididimitis infecciosa es el aumento de tamaño del epidídimo, generalmente unilateral y ocasionalmente bilateral. Los testículos pueden crecer hasta cuatro veces su tamaño normal, tiene consistencia firme principalmente en la región de la cola aunque también hay alteraciones en la cabeza del epidídimo. Las alteraciones en el cuerpo del epidídimo, aunque existan, son raramente percibidas por palpación (Alton *et al.*, 1988).

Los carneros infectados pueden presentar una disminución del número de espermatozoides y de su motilidad, llegando incluso a la azoospermia. Además, aumenta el número de espermatozoides anormales y de células inflamatorias en el semen (Blasco, 1990; Folch *et al.*, 1981). Hay baja calidad del semen, presencia de granulomas espermáticos y fibrosis progresiva del epidídimo.

En las ovejas *B. ovís* produce alteraciones en la circulación placentaria, que al interferir con la nutrición fetal provoca el nacimiento de corderos de poco peso y viabilidad. Puede producir abortos tardíos en las hembras, un aumento de la mortalidad perinatal, aumento en el intervalo entre partos y por lo tanto, reducción en el número de nacimientos (Blasco, 1990).

#### **4.5 DIAGNÓSTICO**

Los métodos para diagnosticar la enfermedad se pueden clasificar en clínicos, serológicos y bacteriológicos.

El diagnóstico clínico puede realizarse mediante la palpación del contenido escrotal, sin embargo, no tiene valor definitivo para el diagnóstico de la infección por *B. ovís*, debido a que existen animales infectados que no presentan

manifestaciones clínicas o una epididimitis puede aparecer como resultado de un traumatismo o por la infección de otro microorganismo (De Long *et al.*, 1979; Walker *et al.* 1986; Genetzky, 1995). Por lo tanto, es necesario recurrir a pruebas serológicas y bacteriológicas para establecer un diagnóstico preciso.

El aislamiento del agente etiológico constituye el diagnóstico directo confirmatorio, en animales vivos. La muestra más recomendable es el espermatozoides recogido tras la electroeyaculación con las máximas precauciones de asepsia, bien en bolsas de plástico o mediante hisopos tomados directamente de la cavidad prepucial (Blasco y Marín, 1990). Aunque raramente, *B. ovis* puede producir brotes de abortos en ovejas, en este caso, puede aislarse también a partir de hisopos vaginales y de leche (Grilló *et al.*, 1999).

A la necropsia de animales sacrificados, los órganos más adecuados para el diagnóstico bacteriológico son: hígado, pulmón, ganglios linfáticos, bazo, epididimo, vesícula seminal, testículo, glándulas bulbouretrales y las glándulas sexuales accesorias (Blasco y Marín, 1990; Ficapal, 1993; Acosta, 2001). Otras muestras son las membranas fetales, los abortos y el contenido estomacal de los fetos y/o los corderos recién nacidos de hembras con infección natural (Libal y Kirkbride, 1983).

El diagnóstico serológico con basa en la demostración de anticuerpos contra antígenos de *B. ovis*, ya sean células completas o sus extractos. La hidrofobicidad del LPS-R, influye en que no sea un antígeno adecuado en la mayoría de las técnicas serológicas. El antígeno de elección para estos fines es el extracto salino caliente (HS) obtenido de *B. ovis* (Cloeckeaert, 1997). La razón es que este extracto está enriquecido en aquellos componentes de superficie de mayor relevancia antigénica (LPS-R y proteínas del grupo 3), agrupados en micelas mixtas (Riezu-Boj, *et al.*, 1990). Estos agregados tienden a sedimentar lentamente en solución acuosa, pero son mucho más estables que sus constituyentes antigénicos por separado, precisamente porque su agregación en micelas enmascara las secciones más hidrofóbicas de los mismos.

Se han empleado una gran variedad de pruebas serológicas como son: FC, IDG, Aglutinación y Hemaglutinación indirecta, ELISA y la prueba de

Inmunofluorescencia (IF). Las pruebas más empleadas son FC, IDG y ELISA debido a sus altos valores de sensibilidad y especificidad (Ficapal, 1993).

La FC tiene adecuada sensibilidad y especificidad, sin embargo, presenta inconvenientes tales como la existencia de reacciones falsas negativas (Mbai *et al.*, 1996) y falsas positivas (Afzal, 1984). Tiene, además, inconvenientes prácticos como son la necesidad de inactivar los sueros, la dificultad para realizarla con sueros hemolizados o con poder anticomplementario y la existencia de fenómenos de zona (Ris *et al.*, 1984).

Para la detección de anticuerpos precipitantes frente a *B. ovis* se han utilizado varias técnicas de precipitación en gel. La más utilizada es IDG, con antígenos solubles. Esta prueba es muy simple y barata y utilizando HS como antígeno se obtiene una sensibilidad similar o superior a la de la FC, siempre que se realice en las condiciones óptimas (Ficapal, 1993; Marín *et al.*, 1989). La desventaja es que es una prueba cualitativa, que puede variar según la apreciación del técnico y que debe estandarizarse para su uso masivo.

La técnica más utilizada para el diagnóstico es ELISA de tipo indirecto realizada en microplacas de poliestireno (Marín *et al.*, 1998). Las principales diferencias entre las distintas técnicas residen en el tipo de antígeno y substrato utilizado. Al igual que en otras pruebas serológicas, la sensibilidad y especificidad del ELISA dependen del tipo de antígeno que se utilice. El antígeno soluble HS de *B. ovis*, es muy usado en la técnica de ELISA. Lo que ha mejorado su sensibilidad, pero no su especificidad comparado con las pruebas de IDG y FC con el mismo antígeno (Alonso-Urmeneta *et al.*, 1998; Marín *et al.*, 1999; Mbai *et al.*, 1996; Chin and Carring, 1991). Sin embargo, existen sueros de animales infectados que son negativos en ELISA y positivos en IDG y viceversa. Por el contrario, el uso paralelo de la FC no mejora la sensibilidad de la IDG ni del ELISA (Alonso-Urmeneta *et al.*, 1998; Chin and Carring, 1991; Marín *et al.*, 1999).

#### 4.6 CONTROL Y PROFILAXIS

Se han utilizado diversos métodos de control de la epididimitis en borregos jóvenes, basándose en la eliminación de todos aquellos que presentan lesiones epididimales; con la identificación de los agentes causales de las lesiones; producción de bacterinas trivalentes contra los principales agentes aislados (*B. ovis*, *A. seminis* y *H. somnus*), utilización de vacunas como de *B. melitensis* Rev 1 y la de *B. abortus* Cepa 19 y administración de antibióticos en el alimento (Bulgin, 1990).

La eliminación de los carneros con epididimitis detectadas por palpación no puede erradicar la enfermedad por existir carneros infectados que no presentan alteraciones testiculares macroscópicas (Webb *et al.*, 1980) El empleo conjunto de las técnicas serológicas, bacteriológicas y la palpación antes y después de la época de apareamiento, detecta el mayor número posible de carneros infectados y permite reducir la infección desde el 30 % a menos del 1 % en aproximadamente un año (Blasco y Marín, 1987).

Las inmunizaciones más utilizadas contra la infección por *B. ovis* son las bacterinas, inoculadas solas o asociadas a las vacunas cepa 19 de *B. abortus* y Rev 1 de *B. melitensis*. Las bacterinas utilizadas, se han aplicado en programas de control y revacunación con la inclusión de fármacos en los alimentos de 100 mg de sulfametazina y 150 mg de oxitetraciclina por día, durante cuatro meses. En estos casos se logró la reducción de la epididimitis en todos los tratamientos: bacterina sola, bacterina-antibióticos y antibióticos solos (Bulgin, *et al.*, 1990). Sin embargo, las bacterinas de *B. ovis*, en general, tienen una eficacia limitada, porque no son completamente efectivas en prevenir y controlar la infección, y además, presentan inconvenientes importantes, como el costo de la revacunación anual e interfieren con las pruebas de diagnóstico y el incremento de la actividad inmunitaria exacerba las lesiones epididimales en los animales infectados (Genetzky, 1995). Algunos autores recomiendan el uso de bacterinas contra *B. ovis*, cuando la prevalencia de la enfermedad en el hato supera el 15% (Ley, 1993). La inoculación simultánea de *B. abortus* S19 y las bacterinas de *B. ovis*

incrementan la protección conferida por las bacterinas solas (Mc Gowan, 1979). Sin embargo, la cepa 19 puede colonizar los órganos reproductivos del macho causando epididimitis (Van Hereden y Van Rensburg, 1962), puede ser excretada en el semen (Buddle, 1962) y puede ser también responsable de cojeras (West *et al.*, 1978).

La cepa Rev 1 de *B. melitensis*, ha sido la vacuna más eficaz, esta es una revertiente en fase lisa de una mutante estreptomycin-dependiente. Por ser atenuada para la oveja (no para el hombre), ha sido empleada para la vacunación contra *B. melitensis* y *B. ovis* en ovinos.

La vacuna Rev 1 estimula la síntesis de anticuerpos contra los antígenos utilizados en el diagnóstico de la infección por brucelas en fase S y, en mucho menor grado, con las pruebas de *B. ovis* empleadas habitualmente (FC y IDG con HS). Si se vacuna a los tres o cuatro meses de edad, en la mayoría de los animales la reacción no persiste más de seis meses (García-Carrillo, 1981). Sin embargo, en algunos carneros pueden persistir títulos en FC durante más de un año (Fensterbank *et al.*, 1982). Esta interferencia de la respuesta postvacunal se minimiza si se emplea la vía conjuntival (Marín *et al.*, 1990), ya que la mayoría de los animales vacunados se hacen seronegativos a los 4-6 meses tras la vacunación

La revacunación no mejora el nivel de protección, presenta inconvenientes prácticos e induce una respuesta serológica duradera frente a antígenos lisos, por lo que no es recomendable (Blasco y Marín, 1987). Aunque se ha citado que la vacunación de carneros adultos no da buenos resultados, otros investigadores han demostrado que la vacunación de carneros adultos con *B. melitensis* Rev 1 confiere un significativo nivel de protección (Marín *et al.*, 1990).

## **5. JUSTIFICACIÓN**

En muchos países la especie ovina es económicamente importante por su lana y como fuente de proteína (carne y leche). Especialmente en lugares donde, por factores ambientales, socioculturales u otros, el medio no es apto para otro tipo de explotación pecuaria. Las enfermedades infecciosas disminuyen la eficiencia de los rebaños. Entre éstas, la brucelosis cobra especial relevancia por que causa baja reproductividad del rebaño, siendo especialmente importante *Brucella ovis*, agente causal de la enfermedad conocida como epididimitis del carnero.

El diagnóstico definitivo de la enfermedad sólo puede lograrse a través del estudio bacteriológico, lo que es difícil y fuera de la capacidad de muchos laboratorios en México. Sin embargo, un diagnóstico adecuado puede lograrse cuando las técnicas serológicas son usadas en combinación con observaciones clínicas e historia epidemiológica.

En México el diagnóstico se realiza con la técnica de IDG, que tiene el inconveniente de ser cualitativa o se utiliza FC que presenta dificultades de ejecución y estandarización (Blasco, 1990). Por lo que, es recomendable usar técnicas de diagnóstico que tengan mayor sensibilidad y especificidad y que sean reproducibles y rápidas, como la de ELISA.

El HS, compuesto por LPS-R y proteínas del grupo 3, es el antígeno utilizado recientemente en pruebas como IDG y ELISA. Presenta la ventaja de tener alta sensibilidad y especificidad, las que pueden variar según la prueba serológica que se utilice, su principal desventaja, sobre todo en países como México, donde la brucelosis causada por brúcelas lisas, es un problema endémico, es que da reacción cruzada con anticuerpos contra brúcelas lisas, lo que interfiere en el diagnóstico (Cloeckkaert, 1997). Por ello, para mejorar la sensibilidad y sobre todo la especificidad en el diagnóstico de *B. ovis*, es necesario contar con una fracción proteica con alta especificidad, que pueda utilizarse como antígeno y producirse fácilmente.

## **6. HIPOTESIS**

Algunas proteínas celulares de *B. ovis* son adecuadas como antígenos para realizar un ELISA de elevada sensibilidad y especificidad.

## **7. OBJETIVOS.**

### **7.1 OBJETIVO GENERAL**

Obtener un antígeno proteico específico de *Brucella ovis*, que al ser utilizado en ELISA, presente una elevada sensibilidad y especificidad.

### **7.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- a) Obtener diferentes fracciones subcelulares de *B. ovis*.
- b) Identificar proteínas específicas de *B. ovis* utilizando electroforesis.
- c) Evaluar el patrón de antigenicidad de las proteínas por Inmunotransferencia, determinando su especificidad ante microorganismos filogenéticamente y etiológicamente relacionados.
- d) Obtener sueros de animales con cultivo positivo de *B. ovis* y sueros de animales libres de la enfermedad. Así como sueros con anticuerpos contra microorganismos filogenéticamente relacionados como las brucelas lisas, *Mannheimia haemolytica*, *Actinobacillus seminis* y *Haemophilus somnus*.
- e) Estandarizar una ELISA para el diagnóstico serológico de *B. ovis* en ovinos, determinando los valores de sensibilidad y especificidad.

## **8. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **8.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento**

Se utilizaron las cepas de *B. ovis* Reo 198 independiente de CO<sub>2</sub> y una cepa de campo; de *B. melitensis* 16 M, la Rev 1 y una cepa de campo; *M. haemolytica* denioinada cepa OV20, *Actinobacillus seminis* ATCC 15768 y *Haemophilus somnus* ATCC 2336. Todas procedentes del cepario del laboratorio de bacteriología del CENID-Microbiología. Las cepas se mantuvieron congeladas en leche descremada estéril a -70°C y para su uso rutinario, en placas de agar brucela o de agar sangre (Difco, USA).

Para la propagación bacteriana de *B. ovis* y *B. melitensis* se inocularon placas de agar brucela, las cuales se sembraron en forma masiva. Se incubaron, durante siete días aproximadamente a 37°C. Posteriormente, se corroboró la identidad del crecimiento bacteriano con tinción de gram y pruebas bioquímicas (Teixeira *et al.*, 1997; Zygmunt *et al.*, 1990).

Las cepas de *M. haemolytica*, *H. somnus* y *A. seminis*, fueron inoculadas en placas de agar sangre 10%. Estas se incubaron de 48 a 72 horas a 37°C.

### **8.2 Obtención de fracciones celulares**

Las bacterias de *B. ovis* y *B. melitensis* fueron cosechadas en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (PBS) y ajustadas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 610 nm y una concentración de 10<sup>8</sup> ufc/ml. Una cantidad de 1.5 ml de la suspensión bacteriana fue centrifugada a 6 000 Xg durante 15 minutos. Se desechó el sobrenadante y el paquete bacteriano fue resuspendido en 30 µl de amortiguador de Laemmli, para posteriormente ser utilizadas en la inmunolectroforesis.

Las cepas de *B. ovis* Reo 198 y de *B. melitensis* 16M, se cosecharon con HEPES (ácido H-2-hidroxiethylpiperazina-N-2-etanosulfónico) 10mM pH 7.5, diluyéndose

hasta obtener una absorbancia de 0.4 a 600 nm, se centrifugaron a 29 000 Xg durante 15 minutos a 4 °C. El paquete celular se lavó por dos ocasiones con HEPES y se centrifugó nuevamente. Al término de ésta, se resuspendió con 40 ml de HEPES y 10 ml de inhibidores de proteasas (PMSF 0.1 M y EDTA 1 mM).

El paquete celular se sonicó (ULTRASONIC PROCESOR Continued), utilizando 10 pulsaciones de 10 segundos cada uno y se centrifugó a 1 770 Xg por 15 minutos para la remoción de restos celulares. Se recuperó el sobrenadante y se ultracentrifugó a 150 000 Xg por una hora a 4 °C (Beckman L8-M). Correspondiendo el sedimento a las fracciones de membranas (membrana externa y membrana interna) y el sobrenadante al citosol. El paquete se resuspendió con 10 ml de una solución de Sarcosyl al 1% en HEPES 10 mM y se mantuvo en agitación suave durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 150 000 Xg por una hora a 4°C. El paquete obtenido contiene las proteínas de la membrana externa y el sobrenadante las proteínas de la membrana interna. La pastilla se resuspendió en HEPES 10 mM por medio de un homogenizador manual. De los sobrenadantes (membrana interna y citosol) se hicieron alícuotas de 20 ml, guardándose a -70°C hasta el momento de su uso (Riezu-Boj *et al.*, 1990).

### **8.3 Separación cuantitativa de las proteínas unidas a compuestos orgánicos**

A 100 µl de cada fracción celular (membranas externas, internas y citosol) de *Brucella ovis* y *Brucella melitensis* se le agregaron 400 µl de metanol, se homogenizaron y se centrifugaron por 10 segundos a 14 000 Xg. Después se le agregaron 100 µl de cloroformo y nuevamente se homogenizó y se centrifugó.

Para la separación de la fase orgánica se adicionaron 300 µl de agua destilada, se agitó y centrifugó por un minuto a 14 000 Xg. La fase superior se removió cuidadosamente y se desechó. A la fase restante le fueron adicionados 300 µl de metanol, se agitaron y centrifugaron por dos minutos a 14 000 Xg. El sobrenadante fue removido y el paquete de proteínas, se secó bajo flujo de aire y se guardó a -70°C hasta su uso (Riezu-Boj *et al.*, 1990).

#### **8.4 Cuantificación de proteínas**

El contenido de proteínas totales fue determinado por colorimetría, utilizando el método de microtitulación de Bradford (Bradford, 1976). Cada vial de proteína se solubilizó con 100  $\mu$ l de amortiguador. Se construyó una curva de referencia con albúmina sérica bovina de 1 a 10  $\mu$ g/ml en PBS. 10  $\mu$ l de muestra de proteína fueron mezclados con 190  $\mu$ l de reactivo de Bradford. Esto se realizó para cada fracción celular de *Brucella ovis* y *Brucella melitensis* y para los extractos totales de *Actinobacillus seminis*, *Haemophilus somnus* y *Mannheimia haemolytica*. La lectura se realizó en un lector de microplacas de ELISA (Immunoskan plus) a 405 nm.

Para conocer la concentración de proteína de cada una de las muestras, se correlacionó la absorbancia obtenida con la proteína en la curva estándar de albúmina sérica bovina. El cálculo matemático que se utilizó para obtener la cantidad de proteína en los 10  $\mu$ l de muestra fue la regresión lineal.

#### **8.5 Preparación del suero hiperinmune de conejo contra *Brucella ovis***

Se utilizó suero hiperinmune en conejos contra las células completas de *Brucella ovis*, para ser utilizado como antisuero en la técnica de inmunotransferencia (Riezu-Boj *et al.*, 1990).

Seis conejos Nueva Zelanda de 3 Kg de peso fueron utilizados, cada animal fue inoculado vía intravenosa con  $9 \times 10^8$  ufc/ml, el inóculo fue estandarizado en un nefelómetro de Mc Farland y se utilizaron las siguientes dosis: 0.5, 0.5, 1.0 y 1.0 ml, respectivamente, a intervalos de cuatro días entre cada dosis aplicada. Se sangraron a los animales vía intracardiaca, cuatro días después de la última inoculación, y por centrifugación a 6 000 Xg durante 15 minutos se obtuvo el suero, el cual se conservó en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de un mililitro en tubos de plástico debidamente identificados. El suero fue titulado por IDG, haciendo diluciones dobles de éste y utilizando como antígeno HS (extracto salino)

de *B. ovis*. Para su utilización en la inmunotransferencia, el suero fue diluido en PBS-Tween 20-Albúmina sérica bovina.

### **8.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida Dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS)**

La separación de las proteínas, se llevó a cabo en geles discontinuos de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) en condiciones no reductoras, por el método de Laemmli, 1970, de forma que las posiciones de las diferentes proteínas en el gel fueran en función de sus tamaños moleculares. Para ello se empleó una cámara de electroforesis vertical con placas de 8 x 10 cm (Gibco MiniV8).

#### **Preparación de la muestra.**

Basándose en la concentración de la proteína, se calculó la concentración necesaria de la proteína que se colocó por pozo en el gel de poliacrilamida. Equivalente cada uno de estos volúmenes a una concentración de proteína de 10 µg/ml. Esto se hizo para las proteínas de membrana externa, membrana interna y citosol de *Brucella ovis* y *Brucella melitensis* y los extractos totales de *Mannheimia haemolytica*, *Actinobacillus seminis* y *Haemophilus somnus*. Para cada cantidad de muestra se agregó un volumen igual de amortiguador de muestra y se colocó en Baño María a ebullición, durante un minuto, para lograr la desnaturalización de la proteína en presencia de SDS. (ver anexo)

#### **Preparación de los geles (PAGE-SDS) y corrimiento electroforético.**

Se prepararon geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio al 10, 12.5 y 15 %, (Laemmli, 1970). Entre las placas de vidrio, se colocó el gel de corrimiento o de resolución (ver anexo). Para obtener una óptima resolución de proteínas, se preparó el gel concentrador, el cual se colocó en la parte superior del gel de corrimiento. Después de polimerizar, el gel fue colocado en la cámara de electroforesis que contenía amortiguador de corrimiento. Se retiró cuidadosamente

el peine y se colocaron los marcadores de peso molecular con rango de 10 a 220 kDa y las muestras en cada pozo de *B. ovis*: Reo 198 (membrana externa, interna y citosol), una cepa de campo y el HS, de *B. melitensis*; la 16 M (membrana externa, interna y citosol), Rev 1 y una cepa de campo, de *M. haemolytica* OV20, *A. seminis* ATCC 15768 y *H. somnus* ATCC 2336. Así como una cepa de campo de estos microorganismos.

Se estableció el patrón electroforético, repitiendo varias veces la prueba. De cada corrimiento que se realizó, se hicieron dos geles, uno para ser teñido con azul de Coomassie y el otro para ser transferido a membranas de nitrocelulosa para realizar la inmunotransferencia. El corrimiento fue a 80 Volts en el gel concentrador y posteriormente a 120 Volts y 400 mA, hasta verificar que la muestra completara el recorrido en el gel de corrimiento, lo cual se realizó en dos horas.

Tinción de los geles de poliacrilamida

Después de finalizar la electroforesis, uno de los geles fue colocado en un recipiente que contenía solución azul de Coomassie en un volumen suficiente para cubrir el gel completamente, la tinción se llevó a cabo por 24 horas en agitación. Posteriormente, el exceso de colorante del gel se eliminó con solución destañadora, hasta lograr apreciar con claridad las bandas proteicas y fue conservado en ácido acético al 10 %.

El peso molecular de las proteínas fue estimado por su posición en el gel, comparado con un estándar de proteínas conocido (marcador de peso molecular), corrido en el mismo gel, utilizando el coeficiente de movilidad relativo o Rf.

### **8.7 Inmunotransferencia**

Después de separar las proteínas por electroforesis en PAGE-SDS, Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, utilizando como metodología el sistema de emparedado, que consistió en colocar en una rejilla, en el siguiente orden: una esponja o fibra sintética, papel filtro, gel de poliacrilamida, membrana

de nitrocelulosa, papel filtro y esponja o fibra (ver anexo). La rejilla preparada fue colocada en la cámara de electrotransferencia, la cuál contenía un amortiguador de transferencia, vigilando que el papel de nitrocelulosa estuviera del lado del ánodo. La transferencia se llevó acabo durante una hora a 400 miliamperes (mA) (Towbin y Gordon, 1984).

Terminado el tiempo de corrimiento, la membrana de nitrocelulosa se colocó en un recipiente para ser tratada con leche descremada al 5% por 24 horas, con la finalidad de bloquear y que no se presentaran uniones no específicas de las proteínas del suero. Se retiró la leche descremada, se lavó la membrana en tres ocasiones con PBS-Tween 20 por 15 minutos cada una y se incubó toda la noche en agitación a 4 °C con suero hiperinmune contra *B. ovis* diluido 1:25 en PBS-Tween 20.

A continuación se quitó el suero y la membrana fue lavada por tres ocasiones con PBS-Tween 20 por 15 minutos en agitación entre cada lavada. La membrana se sumergió completamente en Proteína A conjugada con peroxidasa, diluida 1:2000 en leche descremada al 2 % y con agitación fueron incubadas por dos horas a 37°C o toda la noche a 4 °C. Nuevamente se hicieron los tres lavados con PBS-Tween 20, y dos lavados más con PBS pH 7.2 por 15 minutos.

Para el revelado se utilizó 3,3-Diaminobenzidina (DAB) al 0.05% (20 mg de DAB) en 40 ml de ácido fosfórico 50 mM a pH 7.4, el cual se agitó por 40 minutos y se filtró. A esta solución se le agregó lentamente 1.2 ml de solución NiCo (20 mg de  $\text{NiCl}_3$  y 20 mg de  $\text{CoCl}_2$  en 2 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ ). La solución DAB se agregó en el recipiente que contenía la membrana de inmunotransferencia, ésta se puso en agitación suave, se agregaron para el revelado, 400  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de hidrógeno), hasta que fueron visibles las bandas de identidad y se paró la reacción con agua destilada fría.

También, se realizaron inmunotransferencias con los extractos totales y las fracciones celulares antes mencionadas, tratando las membranas de nitrocelulosa con sueros positivos contra *B. melitensis*, contra *A. seminis*, contra *H. somnus* o contra *M. haemolytica*.

### **8.8 Obtención de proteína purificada.**

Por un mecanismo de filtración-centrifugación denominado Centriprep (amicon, millipore), se realizó la concentración y purificación de proteínas. Inicialmente la muestra de cada vial de las fracciones celulares de *B. ovis* fue resuspendida con 300 µl de PBS hasta obtener un volumen final de 15 ml. Este fue colocado en el tubo Centriprep de 50 kDa, se centrifugó a 2 600 Xg por 10 minutos y el filtrado se colectó para posteriormente ser puesto en el tubo Centriprep de 30 kDa, éste fue centrifugado y colectado. Por último, el filtrado se le determinó el contenido total de proteínas por el método de microtitulación de Bradford.

Con este procedimiento, se concentraron las proteínas de 35 y 38 kDa que por inmunotransferencia se habían identificado anteriormente. Para corroborar la presencia y concentración de estas proteínas, se realizó de igual manera la electroforesis e inmunotransferencia de las proteínas purificadas, utilizando como primer anticuerpo, de manera separada suero contra *B. ovis*, *B. melitensis*, *A. seminis* y *M. haemolytica*. Como conjugado, Proteína A conjugada con peroxidasa (metodología anteriormente descrita en las dos secciones anteriores).

### **8.9 Colección de sueros positivos y negativos de *B. ovis*.**

Se trabajó con 179 sueros de ovinos con aislamiento de *B. ovis* procedentes del banco de sueros del Proyecto de Brucelosis del CENID-Microbiología, INIFAP, que estaban almacenados a -70 °C. Además, se hizo la recolección de sueros negativos de hatos libres de epididimitis, sin vacunar. Así como, sueros negativos y positivos de *B. abortus*, *B. melitensis*, *A. seminis*, *H. somnus* y *M. haemolytica*. Por último, se consiguieron sueros conocidos positivos y negativos de *B. ovis* y *B. melitensis*.

La obtención de muestras se realizó con tubos con vacío para extracción de sangre, a partir de la vena yugular de los carneros, siendo la cantidad extraída de

6 a 8 mililitros. Una vez coagulada, se procedió a centrifugarlas para la separación del suero, que fue almacenado en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **8.10 Prueba de inmunodifusión doble en agar (IDG)**

Se realizaron las pruebas de IDG para el diagnóstico de *B. ovis* con antígeno HS de *B. ovis*, utilizando cajas de Petri con gel como soporte. El gel se preparó con agarosa al 1%, en 5 ml de amortiguador de boratos pH 8.3, 95 ml de agua destilada y NaCl al 11 %. La roseta utilizada estaba formada por seis pocillos periféricos de 6 mm de diámetro y uno central de 4 mm con una separación entre ellos de 3 mm. En el pozo central se depositaron 12  $\mu\text{l}$  del antígeno HS y en los pozos circundantes se colocaron 16  $\mu\text{l}$  de sueros problema y controles positivo y negativo. Como sueros control negativo se usaron sueros de animales libres de *B. ovis* y *B. melitensis*. Como sueros control positivo, se emplearon los de animales que resultaron con cultivos positivos. Las lecturas se realizaron a las 72 hrs.

#### **8.11 Selección de sueros positivos y negativos de *B. ovis*, por aislamiento del microorganismo.**

En el cuadro 1, se muestran como se agruparon los sueros para ser utilizados en la estandarización del ELISA para el diagnóstico de *B. ovis*. Se emplearon 328 sueros: 179 positivos y 149 negativos a *B. ovis*. Los aislamientos fueron confirmados con el examen bacteriológico, tinción de Gram y Ziehl-Neelsen modificada y pruebas bioquímicas características. Además, de las muestras de sangre se obtuvo el suero para realizar la prueba de IDG con antígeno para *B. ovis*, resultando, 126 sueros positivos, 53 de estos como débiles positivos y 74 negativos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**CUADRO 1.** Sueros que se recolectaron para ser utilizados posteriormente en la estandarización del ELISA para el diagnóstico de *B. ovis*. Estos incluyen sueros negativos y positivos de *B. ovis* y *B. melitensis*. Así, como sueros positivos de *B. abortus*, *M. haemolytica*, *A. seminis* y *H. somnus*.

<b>SUEROS (328)</b>	<b>POSITIVOS (179)</b>	<b>179</b> Sueros de ovinos con aislamiento Bacteriológico de <i>B. ovis</i>
	<b>NEGATIVOS (149)</b>	<b>74</b> Sueros de ovinos de hatos libres de <i>B. ovis</i> , sin aislamiento y sin vacunación contra brucelosis  <b>35 (+)</b> Sueros de <i>B. melitensis</i> con aislamiento bacteriológico <b>10 (+)</b> Sueros de <i>B. abortus</i> de bovinos <b>10 (+)</b> Sueros de <i>M. haemolytica</i> <b>10 (+)</b> Sueros de <i>A. seminis</i> <b>10 (+)</b> Sueros de <i>H. somnus</i>

### **8.12 Estandarización de reactivos de la técnica de ELISA.**

Para la realización y estandarización de la técnica de ELISA, se tomaron en cuenta los siguientes factores: adsorción y concentración del antígeno, controles positivo, negativo y del conjugado, concentración óptima del conjugado, tipo de sustrato, tiempos de incubación, pH de los reactivos, tiempo de lectura e interpretación de resultados.

Como fase sólida o inmunoadsorbente, se utilizaron microplacas de poliestireno de 96 pozos, de fondo plano y de una capacidad de 350 microlitros (Nunc Inc. Dinamarca).

Para la adsorción del antígeno en las microplacas, se probaron diferentes soluciones amortiguadoras, como: Solución salina fisiológica (SSF) pH 7.2, Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2 y amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6 (ver anexo). En volúmenes que variaron de 100 a 200  $\mu$ l, incubándose durante toda la noche a 4°C o durante dos horas a 37°C.

Se determinó la cantidad de antígeno mínimo necesaria para la realización del ensayo, en las placas de poliestireno mediante una titulación en bloque, utilizando diferentes diluciones del antígeno frente a diferentes diluciones de los sueros positivos y negativos de referencia. Esto se llevó a cabo mediante una reacción de ELISA Indirecto, realizando entre cada paso tres lavados con PBS-Tween 20. Se utilizaron concentraciones de proteína de 1, 2.5, 5 y 10  $\mu$ g/ml en amortiguador de carbonatos, se distribuyó la solución a razón de 100 $\mu$ l por pozo e incubó toda la noche a 4°C, enseguida se agregaron 100  $\mu$ l de leche descremada al 2% y se incubó toda la noche a 4 °C, posteriormente se agregaron diferentes volúmenes de los sueros positivos y negativos, desde 50, 100, 150 y 200  $\mu$ l. El conjugado (Anti-IgG de ovino marcada con peroxidasa) se utilizó a una dilución de 1:2000, distribuyendo 100  $\mu$ l por pozo e incubando a 37°C por una hora. Por último, se agregaron 100  $\mu$ l de sustrato ABTS- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina sulfónico-peróxido de hidrógeno) y se incubó de 15 a 60 minutos. Una vez realizado, se escogió la dilución máxima de antígeno que permitiera tener la mayor diferencia entre los sueros controles positivo y negativo.

Para determinar la concentración óptima del conjugado (Anti-IgG de ovino marcada con peroxidasa), se probaron diferentes diluciones del conjugado (desde 1:50 hasta 1:8000), frente a sucesivas diluciones de los sueros positivos y negativos (desde 1:50 hasta 1:1000) en placas tapizadas con el antígeno a su concentración óptima. Aquella dilución del conjugado que produjo menor reacción inespecífica (color de fondo) con muestras negativas e implicó una clara distinción de las muestras positivas, fue la elegida.

Del sustrato ABTS se probaron diferentes tiempos de incubación, realizándose lecturas seriadas hasta encontrar el adecuado, que fue aquel donde se encontraron mayores diferencias de color entre sueros positivos y negativos de referencia. La lectura se realizó en un lector automático de ELISA a 405 nm.

### **8.13 Desarrollo de la técnica de ELISA indirecta**

Se diluyó el antígeno (proteína purificada) a una concentración de 10 µg/ml en amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6. Distribuyendo la solución anterior a razón de 200 µl por pozo e incubando la placa a 4 °C toda la noche en agitación suave.

La solución con el antígeno no adsorbido fue eliminada, se realizaron cuatro lavados con 100 µl por pozo de PBS-Tween 20, cada lavado se dejó en agitación por 15 minutos cada uno.

Después de los lavados, se agregaron 100 µl por pozo de leche descremada al 2 % en PBS pH 7.2 y se incubaron las placas por 1 hr a 37 °C.

Transcurrido el tiempo, se retiró la leche descremada y nuevamente se realizaron 4 lavados con PBS-Tween 20.

Se agregaron 200 µl de los sueros problema, controles positivo y negativo, así como control del conjugado y blanco y se incubaron por 1 hr a 37 °C en agitación suave. Cada suero problema que se utilizó, se trabajó por duplicado. Los sueros problema que se utilizaron fueron de: *B. ovis*, *B. melitensis*, *B. abortus*, *A. seminis* y *M. haemolytica*.

Posteriormente se lavó la placa y se agregaron 100  $\mu$ l de conjugado anti-IgG de ovino marcado con peroxidasa en una dilución 1:3000, incubándose durante 1 hr a 37 °C en agitación suave.

Se lavó la placa en tres ocasiones y se colocaron 100  $\mu$ l de sustrato, la placa fue incubada a 37°C por 30 minutos con agitación suave. El sustrato se preparó con 5.5 mg de ABTS en 50 ml de solución amortiguadora de citratos 0.05 M pH 4 y 19  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 %. La lectura se realizó en un lector de ELISA con un filtro de 405 nm.

Con el conjunto de valores de absorbancia obtenidos tras la lectura de las placas, se calculó el punto de corte, a partir de la distribución de las muestras positivas y negativas en función de las frecuencias y los valores de absorbancia.

Además, se calculó la sensibilidad y la especificidad de la prueba de ELISA comparada con los aislamientos a partir de una tabla de 2 x 2 o tabla de contingencia, usando el programa Win-Episcope, Ver 1.0 (Frankena *et al.*, Wageningen, The Netherlands & Zaragoza Spain; Greiner y Gardner, 2000):

		Aislamiento		
		+	-	
ELISA	+	A	B	A + B
	-	C	D	C + D
		A + C	B + D	N

**A.** No. de positivos verdaderos  
**B.** No. de falsos positivos  
**C.** No. de falsos negativos  
**D.** No. de negativos verdaderos  
**N.** No. de muestras

$$\text{Sensibilidad (\%)} = A / (A + C) \times 100$$

$$\text{Especificidad (\%)} = D / (B + D) \times 100$$

Los valores de concordancia del ELISA, se calcularon mediante el análisis *Kappa* a partir de la tabla de contingencia:

$$Kappa = \frac{OP - EP}{1 - EP}$$

**OP.** Proporción observada  
**EP.** Proporción esperada

$$OP = \frac{A + D}{N}$$

$$EP = \frac{(A + C)(A + B) + (B + D)(C + D)}{N^2}$$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Fracciones celulares

Se realizó la obtención de los distintos microorganismos, de los cuales se determinó la concentración de proteínas (cuadro 2).

Cuadro 2. Concentración de proteína que se obtuvo de las fracciones celulares de *B. ovis* REO 198 y de *B. melitensis* 16M. Además, de los extractos totales de *M. haemolytica*, *A. seminis*, *H. somnus*, *B. ovis* cepa de campo, *B. melitensis* Rev 1, *B. melitensis* cepa de campo y antígeno HS de *B. ovis*.

Microorganismo	Concentración mg/ml
<b>Fracciones celulares</b>	
* <i>Brucella ovis</i> REO 198	
membrana externa	2.5
membrana interna	2.3
citosol	1.7
* <i>Brucella melitensis</i> 16 M	
membrana externa	2.4
membrana interna	1.9
citosol	1.2
<b>Extractos totales</b>	
* <i>Brucella ovis</i> cepa de campo	2.3
* <i>Brucella ovis</i> antígeno HS	1.5
* <i>Brucella melitensis</i> Rev 1	1.6
* <i>Brucella melitensis</i> cepa de campo	1.7
* <i>Mannheimia haemolytica</i>	2.0
* <i>Actinobacillus seminis</i>	0.80
* <i>Haemophilus somnus</i>	0.75

## **9.2 Características de las fracciones celulares y extractos totales**

El gel del corrimiento electroforético (PAGE-SDS) de los extractos de membrana externa, interna y citosol de *B. ovis* y *B. melitensis* y de los extractos totales de *M. haemolytica*, *A. seminis*, se presenta en la Fig. 1. En *B. ovis*, se observa la presencia de los tres grupos de proteínas de la membrana externa que han sido reportadas (Riezu-Boj *et al.*, 1990). De los grupos 1, 2 y 3 (grupos B, C y D) que reportaron Gamazo *et al.*, en 1989, solo se logran identificar los grupos 1 y 2 (B y C), y de membrana interna y citosol predominan proteínas de 40 a 90 kDa. Del extracto de membrana externa de *B. melitensis*, resaltan las proteínas con peso molecular de 38 y de 68 a 90 kDa y de las proteínas de membrana interna destacan las de 68 a 90 kDa. En *M. haemolytica*, se observan proteínas de 15 a 30, de 40 a 60 y de 70 a 90 kDa. Por último, en *A. seminis* resaltan seis bandas proteicas, de 12, 15, 38, 50, 70 y 76 kDa.

## **9.3 Inmunotransferencia con suero hiperinmune de conejo contra *B. ovis***

Los resultados de las inmunotransferencias se presentan en las Figs. 2, 3 y 4. El suero obtenido contra *B. ovis* fue utilizado a una dilución de 1: 25. Como se observa en las tres figuras, se indica con una flecha, el reconocimiento de dos bandas, tanto en membrana externa, interna y citosol de *B. ovis*, con un peso molecular de 35 y 38 kDa. Las cuales no aparecen en las fracciones celulares de *B. melitensis*. En la Fig. 2, a partir de un gel preparado al 12.5% destaca además la presencia de la banda de 35 kDa en el extracto total de *B. ovis*. En la Fig. 3 se presenta un gel al 15 % señalándose con flechas del lado izquierdo, la presencia de una banda de reconocimiento de 81 kDa. Por último, en la Fig. 4, se presenta una inmunotransferencia con extractos proteicos de varias cepas bacterianas contra el antisuero de *B. ovis* en donde aparecen las bandas de identidad de 35 y 38 kDa en las fracciones celulares y los extractos completos de *B. ovis* y no en los extractos de *M. haemolytica*, *H somnus*, *A. seminis* y el antígeno HS de *B. ovis*.

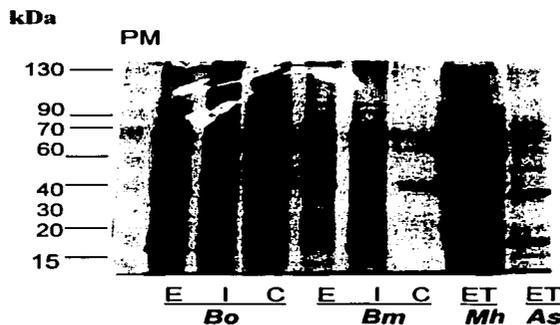


Fig.1. PAGE-SDS al 12.5 %, teñido con azul de Coomassie. De las fracciones celulares: membrana externa (E), membrana interna (I) y Citosol (C) de *B. ovis* (*Bo*) y *B. melitensis* (*Bm*). Así, como los extractos totales (ET) de *M. haemolytica* (*Ph*) y *A. seminis* (*As*). Electroforesis del marcador de peso molecular (PM).

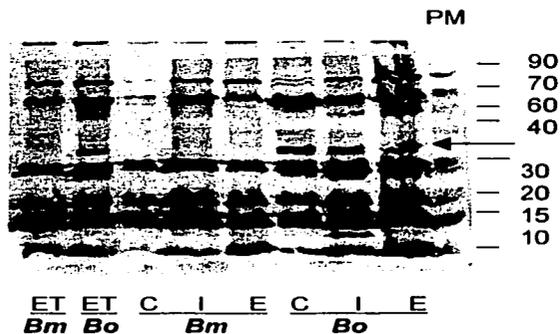


FIG. 2. Inmunotransferencia de un gel al 12.5 % de las fracciones celulares: membrana externa (E), membrana interna (I) y Citosol (C) de *B. ovis* (*Bo*) y *B. melitensis* (*Bm*). Así, como los extractos totales (ET) de ambos. Utilizando suero anti-*B. ovis* obtenido en conejo. Marcador de peso molecular (PM). Indicándose con una flecha una banda de identidad de 35 kDa que aparece en las fracciones y extractos totales de *B. ovis* y no en *B. melitensis*.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

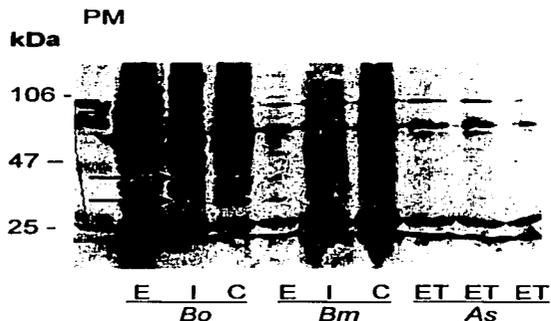


FIG. 3. Inmunotransferencia de un gel al 15 % de las fracciones celulares: membrana externa (E), membrana interna (I) y Citosol (C) de *B. ovis* (*Bo*) y *B. melitensis* (*Bm*). Así, como los extractos totales (ET) de *A. seminis* (*As*). Utilizando suero anti-*B. ovis* obtenido en conejo. Marcador de peso molecular (PM). Indicando con flechas dos bandas de identidad de 35 y 38 kDa en las fracciones de *B. ovis* que no aparecen en *B. melitensis* ni en los extractos totales de *A. seminis*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

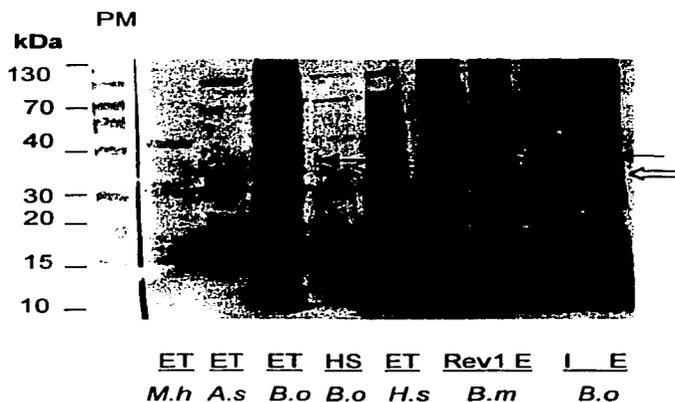


FIG. 4. Inmunotransferencia de las fracciones celulares: membrana externa (E), membrana interna (I) y Extracto salino (HS) de *B. ovis* (*Bo*); membrana externa (E) y Rev 1 de *B. melitensis* (*Bm*). Así, como los extractos totales (ET) de *A. seminis* (*As*), *M. haemolytica* (*Mh*) y *H. somnus* (*Hs*). Utilizando suero anti-*B. ovis* obtenido en conejo. Marcador de peso molecular (PM). Indicando con flechas dos bandas de identidad de 35 (Flecha clara) y 38 (flecha oscura) kDa de las fracciones y extractos totales de *B. ovis* que no aparecen en *B. melitensis* ni en los extractos totales de los microorganismos antes mencionados.

#### **9.4 Inmunotransferencia con sueros contra *B. melitensis*.**

En las inmunotransferencias de las proteínas de las fracciones celulares y los extractos totales de todas las cepas ya mencionadas se utilizó un antisuero, ya sea contra *B. melitensis*, *M. haemolytica*, *A. seminis* o contra *H. somnus*. En estas inmunotransferencias hubo reacción de los sueros con las diferentes fracciones de *B. ovis* y *B. melitensis*. Así como con los extractos totales de *M. haemolytica*, *A. seminis* y *H. somnus*. Se observó la presencia de bandas de identidad en todos los casos. Sin embargo, no hubo reacción con las proteínas de 35 y 38 kDa que se identificaron en las inmunotransferencias con antisuero contra *B. ovis* (Fig. 5). Entre los que destaca además, la reacción con proteína del grupo 3 del extracto salino (HS) y la ausencia de reacción con las proteínas de 35 y 38 kDa. Esto mismo resultados se presentaron cuando se utilizaron los sueros contra *M. haemolytica*, *A. seminis* y *H. somnus*.

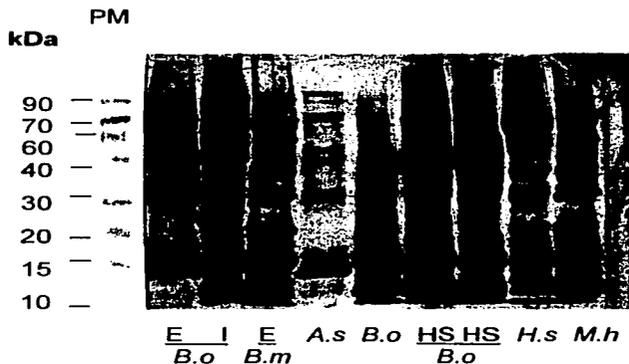


FIG. 5. Inmunotransferencia de un gel al 12.5 % de las fracciones celulares: membrana externa (E) y membrana interna (I). Así como el Extracto salino (HS) de *B. ovis* (*Bo*); membrana externa (E) de *B. melitensis* (*Bm*) y los extractos totales (ET) de *A. seminis* (*As*), *M. haemolytica* (*Mh*) y *H. somnus* (*Hs*). Utilizando un suero de ovino contra *B. melitensis*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 9.5 Concentración de proteína por el método de filtración-ultracentrifugación

El sistema Centriprep, permitió concentrar las proteínas de membrana externa, estas fueron cuantificadas por el método de microtitulación de Bradford, obteniéndose una concentración de 1000 µg/ml. Posteriormente, de éste paquete de proteínas, se realizó la electroforesis y la inmunotransferencia con suero hiperinmune de conejo contra *B. ovis* y con suero de ovino positivo a *B. melitensis*, como se observa en la Fig. 6, se identificaron las proteínas de 35 y 38 kDa y cuatro bandas de identidad, perteneciente a proteínas del grupo 2, aunque estas se presentan en menor concentración, utilizando antisuero contra *B. ovis*. No hubo reacción, dada por la presencia de bandas de identidad, cuando se utilizó el antisuero contra *B. melitensis*. Se realizaron las inmunotransferencias con suero contra *H. somnus*, *M. haemolytica*, *A. seminis*, *B. melitensis* y *B. ovis*. (Fig. 7), observándose que no hubo reacción de ningún antisuero con las proteínas que se concentraron de *B. ovis* como se muestra en los carriles 1.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

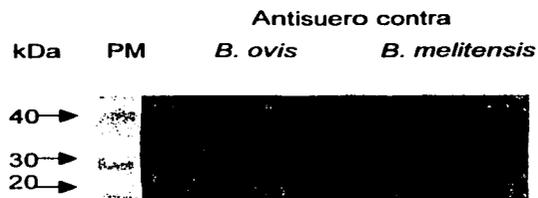


FIG. 6. Inmunotransferencia de las proteínas concentradas por el método Centriprep. Empleando suero contra *B. ovis* y *B. melitensis*.

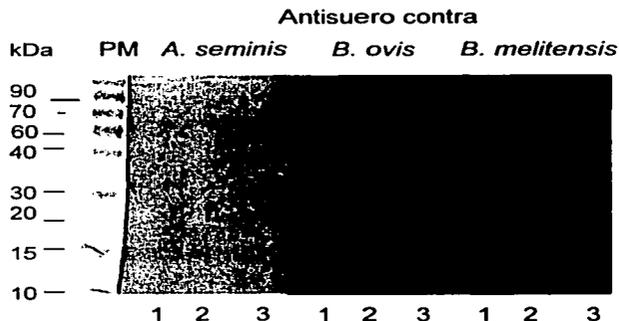


Fig. 7. Inmunotransferencia de las proteínas concentradas por el método Centriprep de *B. ovis* (1), extractos totales de *B. ovis* (2) y células completas *B. melitensis* (3). Utilizando suero contra *A. seminis*, *B. ovis* y *B. melitensis*. Las flechas señalan las proteínas de 35 y 38 kDa de *B. ovis* obtenidas por filtración-ultrafiltración.

## 9.6 Estandarización del ELISA indirecto

En la titulación se determinó la cantidad de proteína mínima necesaria para la realización del ensayo que fue de 10 µg/ml. El conjugado que se utilizó fue anti-IgG de ovino conjugado con peroxidasa y la concentración óptima del conjugado fue de 1:3000.

El sustrato utilizado fue ABTS y el tiempo de incubación idóneo de 30 minutos, teniendo una lectura rápida y simultánea de todos los pozos de la placa. Se realizó la interpretación de resultados con los valores de absorbancia, controles positivo y negativo conocidos y se calculó el punto de corte para tener la distribución de las poblaciones conocidas como positivas y negativas de *B. ovis* (Fig. 8). Teniendo como muestras negativas las que presentan absorbancia menor de 9 y como positivas las que presentan absorbancia mayor de 12, estos resultados se presentan en base de  $1 \times 10^{-2}$ . Se estudiaron posibles reacciones cruzadas con sueros de *B. melitensis*, *M. haemolytica*, *A. seminis* y *H. somnus*, las cuales no se presentaron debido a que la absorbancia fue menor de 9. Se buscó la repetibilidad con el máximo de muestras posibles, realizando tres repeticiones por duplicado, con resultados semejantes en todos los casos, teniendo una variación mínima en los resultados. Si bien la prueba agrupa claramente a los animales positivos, el grado de dispersión con los sueros positivos fue mayor que en los negativos. Se calculó la sensibilidad y especificidad de la prueba utilizando una tabla de 2 x 2. Teniendo como criterio de absorbancia las muestras negativas con una densidad óptica menor de 9, eliminando cinco falsos positivos y como muestras positivas una absorbancia mayor de 12, presentándose tres animales infectados que no fueron diagnosticados correctamente. Tomando como criterio de positividad la absorbancia de 9 eliminando cinco sueros falsos positivos, la Sensibilidad fue del 98.1% y la Especificidad del 97.5% y tomando como positividad una absorbancia de 12, eliminando los tres falsos negativos la sensibilidad fue del 98.2 % y la especificidad del 100 %. Por último, se determinó la concordancia entre los aislamientos y ELISA con el valor de *Kappa* el cual fue de 0.97 (Frankena et al., Wageningen, The Netherlands & Zaragoza Spain).

## FRECUENCIA

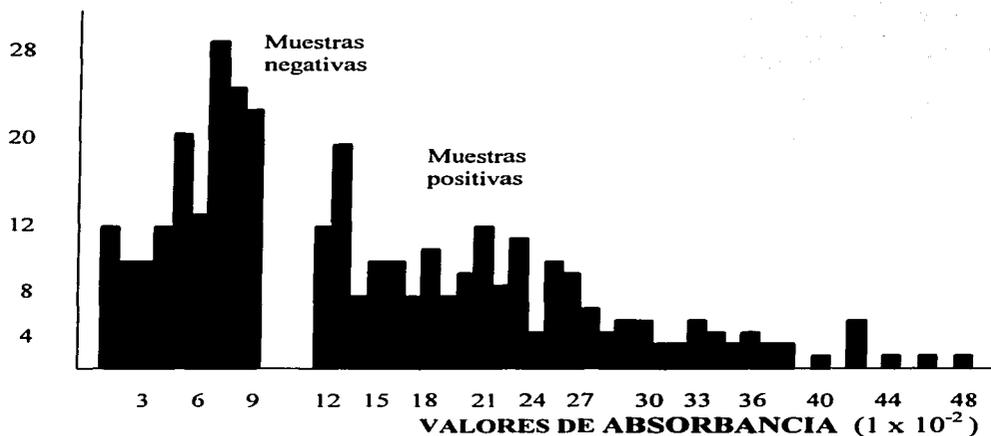


FIG. 8. Distribución de los valores absorbancia (base  $1 \times 10^{-2}$ ) leídos a 405 nm de 328 sueros positivos y negativos en función de la frecuencia, evaluados en ELISA indirecto, usando como antígeno las proteínas de 35 y 38 kDa de *B. ovis*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 10. DISCUSIÓN

La composición y la expresión de las proteínas de membrana externa de las bacterias gram negativas están reguladas entre otros factores por las condiciones de cultivo (Osborn, 1980). Por tal motivo, para evitar variaciones en los cultivos, se emplearon las mismas condiciones de mantenimiento y desarrollo para las cepas bacterianas utilizadas, corroborando las características fenotípicas con resultados satisfactorios.

Se logró hacer la separación de las membranas externa e interna y citosol de *B. ovis* Reo 198 y *B. melitensis* 16 M. De estas fracciones, en las inmunotransferencias se identificaron proteínas específicas de *B. ovis* que no aparecieran en las fracciones de *B. melitensis* y para comprobar una posible reacción cruzada entre ambas. La mayoría de los trabajos previos reportan solo grupos de proteínas de la membrana externa y no de las otras fracciones (Cloeckert, *et al.* 1996; Riezu-Boj, *et al.* 1990; Chin y Bernadette, 1990). Donde se reconocieron tres grupos de proteínas de la membrana externa con un rango de peso molecular para el grupo 1, de 88 a 94 kDa, grupo 2 de 35 a 39 kDa y grupo 3 de 25 a 31 kDa. Además, se reporta una banda de 48 kDa característica de *B. melitensis*. Basándose en esto, lo hecho en este trabajo coincide con los reportes previos ya que en la electroforesis de geles de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie (Fig. 1), se observa la posición de las bandas proteicas de membrana externa pertenecientes a los grupos 1, 2 y 3.

El método de microtitulación de Bradford, utilizado para la cuantificación de proteínas, es un método rápido y sensible que detecta concentraciones menores de 1 µg de proteína (Bradford, 1976), a diferencia del método de Lowry que es más compleja y en donde se necesita mayor cantidad de albúmina sérica bovina como estándar (Lowry *et al.*, 1951). Basándose en el método de Bradford y a una cantidad aceptable de paquete celular para realizar la extracción, se logró obtener una buena concentración de las fracciones celulares y de los extractos totales de los diferentes microorganismos. Por otro lado, las proteínas identificadas de

*M. haemolytica*, *A. seminis* y *H. somnus*, coinciden con las reportadas por otros autores (Stephens, *et al.*, 1983; Kerstens y De Ley, 1975). Siendo la principal diferencia en que para *A. seminis* se reportan proteínas de peso molecular de 26 a 94 kDa (Healey *et al.*, 1988), utilizando en la extracción un detergente, el n-octyl-D-glucopiranosil para su obtención y en éste trabajo se identificaron solo seis proteínas predominantes.

Las pruebas serológicas más eficientes para el diagnóstico de *B. ovis* en muchos países son FC, IDG y ELISA. Sin embargo, la inmunotransferencia actualmente se puede utilizar como una herramienta de confirmación. Utilizando complejos mixtos de *B. ovis* como antígenos, derivados por la extracción de proteínas de las bacterias con SDS y 2-mercaptoetanol (Kittelberger, *et al.*, 1997) o proteínas específicas de membrana externa.

De estos extractos proteicos, se han identificado antígenos inmunodominantes o bandas de identidad característicos de *B. ovis*: una de 63 kDa de *B. ovis* HS, tres proteínas de membrana externa de 17, 19 y 29 kDa y el LPS-R, utilizando sueros de hatos libres y sueros positivos con aislamiento de *B. ovis* (Kittelberger, *et al.*, 1997), las cuales también se identificaron en las inmunotransferencias realizadas, con excepción del LPS-R (Figs. 2 y 4). Además, estos investigadores utilizaron dos tipos de detergentes (Sarcocyl y Triton X-114-base) para la extracción de las proteínas de membrana. Expusieron los resultados en función de la sensibilidad y la especificidad para la prueba de inmunotransferencia. Obteniéndose una especificidad del 100 % con ambos detergentes. Sin embargo, la sensibilidad fue del 97 % en promedio cuando se utilizó Sarcocyl y con Triton X-114-base disminuyeron los valores de sensibilidad entre 28 % y 35 % en algunas bandas de identidad. Es por ello, que se utilizó la metodología con Sarcocyl, teniendo resultados satisfactorios.

Las inmunotransferencias, indican que las proteínas contenidas en las fracciones de *B. ovis* (membrana externa, interna y citosol), presentan reacción con el suero hiperinmune de conejo contra *B. ovis* y con el suero de *B. melitensis*, así mismo, proteínas de *B. melitensis* presentan reacción con ambos sueros. Teniéndose por lo tanto, una reacción cruzada entre ambas cepas. Afzal *et al.*, en 1987 utilizando

sueros contra *B. ovis* y contra *B. melitensis*, observaron una reacción cruzada entre ambas cepas, principalmente de proteínas de la membrana externa del grupo 2. Sin embargo, en las Figs. 2, 3, y 4 de éste trabajo, se observa también una reacción con proteínas del grupo 1 y 3 de ambas cepas. En estas figuras, también se observa reacción del suero hiperinmune contra *B. ovis* con algunas proteínas de *A. seminis*, *M. haemolytica*, *H. somnus* y el antígeno HS de *B. ovis*. Esta reacción cruzada que se identifica, es la que no permite dar un diagnóstico preciso diferencial entre *B. ovis*, *B. melitensis* y las demás bacterias por ELISA. En el caso del extracto salino caliente (HS), que es el antígeno utilizado para el diagnóstico de *B. ovis* en diferentes pruebas serológicas, incluyendo el ELISA (Marin *et al.*, 1998) este presentó reacción con el suero contra *B. ovis*, principalmente de proteínas del grupo 3 y el suero contra *B. melitensis* con proteínas del grupo 2 de membrana externa (Gamazo, *et al.*, 1989).

La presencia de las bandas de identidad de 35, 38 y 81 kDa de *B. ovis*, que se observaron en las inmunotransferencias con suero hiperinmune de conejo contra *B. ovis* y que no aparecieron con los demás microorganismos, en especial con *B. melitensis*, es la evidencia de que utilizando ésta metodología, se encuentran proteínas específicas para el diagnóstico de *B. ovis*. Permitiendo posteriormente separarlas y utilizarlas en ELISA para el diagnóstico preciso de *B. ovis*. Las proteínas de 35 y 38 kDa también, fueron identificadas en inmunotransferencias (Ebani, *et al.*, 2000 y Cerri, *et al.*, 2000), para el diagnóstico de *B. ovis*, usando como antígeno el HS de *B. ovis* y un suero de carnero infectado experimentalmente contra *B. ovis*. Sin embargo, en estos trabajos las proteínas obtenidas no fueron utilizadas con el fin de implementar un diagnóstico serológico de *B. ovis*, ni tampoco se realizó una diferenciación con proteínas de *B. melitensis*, por lo que se desconoce su especificidad y su valor diagnóstico.

Por otro lado, se sabe que *M. haemolytica*, *H. somnus* y *A. seminis*, son microorganismos que se presentan frecuentemente en los ovinos y pueden producir la epididimitis ovina. Es por ello, que para corroborar si las proteínas de 35, 38 y 81 kDa de *B. ovis* eran específicas, se realizaron inmunotransferencias con antisueros contra cada uno de estos microorganismos antes mencionados,

incluyendo *B. melitensis* (Fig. 5). Sin embargo, los resultados no indican una reacción de los antisueros de cada bacteria contra las tres proteínas de *B. ovis*. Por lo tanto, aparentemente no hay interferencia que afecte el diagnóstico de la enfermedad causada por *B. ovis*.

El método de filtración-ultracentrifugación (Centriprep), es un mecanismo usado para la purificación, concentración y desalación de muestras biológicas en rangos de volumen de 2 a 15 ml. Es utilizado como tubo de centrifuga de 50 mililitros y está compuesto por un filtro colector que contiene una membrana de celulosa de baja adsorción, con límites de peso molecular que son de 3, 10, 30 y 50 kDa. En función de éste se concentraron las proteínas de 35 y 38 kDa, esto se observa en la inmunotransferencia realizada con antisuero contra *B. ovis* (Fig. 6). En ella, también se observa que al utilizar antisuero contra *B. melitensis*, no hubo reacción con las proteínas concentradas, incluyendo las cuatro bandas de identidad de menor concentración que aparecieron. De igual forma, para corroborar si las proteínas de 35 y 38 kDa de *B. ovis* eran específicas, se realizaron inmunotransferencias con sueros contra *A. seminis*, *M. haemolytica* y *B. melitensis* y tampoco hubo reacción contra dichas proteínas (Fig. 7). Por lo tanto, las proteínas obtenidas por el método de ultrafiltración, fueron utilizadas como antígeno en la técnica de ELISA por su gran especificidad, ya que no hubo reacción con sueros contra *B. melitensis*, *A. seminis*, *M. haemolytica* y *H somnus*, en cambio dieron una respuesta clara contra los anticuerpos de *B. ovis*.

Una proteína de membrana externa de 29 kDa fue identificada como el componente inmunodominante en infecciones de *B. ovis* (Kittelberger *et al.*, 1995a y 1998). Esta proteína, aunque no se separó, se puede observar en las inmunotransferencias con antisuero contra *B. ovis* que está presente, observándose en los grupos de proteínas de 27 a 31 kDa, que también se identificaron en los grupos predominantes de 25 a 31 kDa (Riezu-Boj *et al.*, 1990) y de 27 a 29 kDa (Chin *et al.*, 1991).

Para la estandarización del ELISA, se trabajó con 328 sueros. Aparte de los sueros negativos de hatos libres y positivos con aislamiento de *B. ovis* y *B. melitensis*, además se incluyeron sueros positivos de *A. seminis*, *M. haemolytica*,

*H. somnus* y *B. abortus*, esto con la finalidad de descartar una reacción cruzada con las proteínas de 35 y 38 kDa de *B. ovis* que se concentraron, la cual no ocurrió, ya que al realizarse la prueba presentaron una absorbancia menor de  $9 \times 10^{-2}$  que fue el valor utilizado como punto de corte. Valor analizado en la gráfica de ELISA (Fig.8), a diferencia de otros trabajos, para estandarizar un ELISA y realizar la comparación con otras técnicas, que solo utilizaron sueros positivos y negativos de *B. ovis* y no probaron sueros de otros microorganismos (Alonso, 1995; Vigliocco, 1997; Ebani, *et al.*, 2000 y Cerri, *et al.*, 2000, Nuñez *et al.*, 1998).

Cuando se determinó el punto de corte, se obtuvo una distribución de las poblaciones conocidas en cuanto a la absorbancia de las muestras positivas y negativas de *B. ovis*. Tomando como sueros negativos a *B. ovis*, los sueros con absorbancias inferiores de  $9 \times 10^{-2}$  y como positivos los sueros superiores de  $12 \times 10^{-2}$ . La técnica de ELISA detectó cinco falsos positivos y tres falsos negativos. Con estos resultados se presentó una sensibilidad del 98.1% y una especificidad del 97.5%. Sin embargo, cuando se determinó el punto de corte y se tomó en cuenta una positividad de absorbancia de 12, se eliminaron los falsos positivos y negativos, y la sensibilidad fue del 98.2% y la especificidad del 100 %. Los sueros positivos por aislamiento a *B. melitenisis* a partir del cálculo del punto de corte presentaron una absorbancia menor de 9. Por lo tanto, resultaron negativos a la Técnica de ELISA utilizando las proteínas de 35 y 38 kDa.

La prueba de IDG con antígeno HS de *B. ovis*, se utiliza como prueba oficial de *B. ovis* en México con resultados satisfactorios, la cual tiene una sensibilidad del 91% y una especificidad del 100% (Nuñez, *et al.*, 1998). En este trabajo la prueba se realizó en conjunto con las pruebas bacteriológicas y bioquímicas de *B. ovis*, obteniéndose, 126 sueros positivos, 53 como débiles positivos y los 74 negativos, que fueron los que se utilizaron para la estandarización del ELISA.

La estandarización de la técnica de ELISA fue fundamental para los resultados que se obtuvieron. El control de cada una de las variables que se tomaron en cuenta, fueron claves en la realización de la técnica, por ejemplo, la mayoría de

los antígenos utilizados hoy en día en ELISA indirecto para la detección de anticuerpos, no son solo proteínas antigénicas las que se obtienen y utilizan. Por lo que la determinación de la concentración proteica por el método de Lowry (1951), generalmente no da buenos resultados. Es por esto, que se utilizó un mejor sistema titulación en bloque, utilizando diferentes diluciones del antígeno frente a diferentes diluciones de los sueros positivos y negativos (Joint FAO, 1993). Los antígenos utilizados, mostraron en condiciones normales una capacidad de adherencia al poliestireno adecuada, a diferencia de los antígenos utilizados por Marin *et al.*, en 1989, en donde no se adhirieron al poliestireno en condiciones normales, por lo que tuvieron que recurrir a la evaporación del disolvente para fijarlas a la fase sólida. Para la adsorción del antígeno, se probaron incubaciones durante toda la noche a 4°C y dos horas a 37°C. Los resultados finales, fueron más repetitivos cuando se incubaron toda la noche. Por otro lado, la reacción enzimática por el tiempo de incubación y la temperatura de 37°C en la última parte del ELISA, fue favorecida en un tiempo de incubación de 30 minutos. A diferencia de un tiempo de incubación de 40 minutos a 37°C (Marin, *et al.*, 1989) o una temperatura de 20°C por una hora de incubación (Alonso *et al.*, 1995). Debido a esto y a que se emplearon los mismos controles, se logró la repetibilidad y estandarización de la técnica de ELISA.

La sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas para el diagnóstico de *B. ovis*, depende mucho del antígeno utilizado. Se a observado que complejos de antígenos de superficie solubles en agua, tienen mayor valor diagnóstico que suspensiones de bacterias completas (Marin, *et al.*, 1989). El HS, es el antígeno que ha proporcionado mejores resultados diagnósticos en todas las pruebas. Su solubilidad en el agua y su alto contenido de epitopes de superficie celular explican el éxito de las pruebas serológicas estudiadas. En adición a los determinantes del LPS, éste extracto contiene proteínas de membrana externa que comparten brucelas lisas y rugosas (Gamazo *et al.*, 1989). Es por ello, que tales componentes presentan una reacción cruzada entre el extracto salino de *B. ovis* y los sueros infectados con *B. melitensis* o sueros de ovinos vacunados con *B. melitensis* Rev 1 (Rieuz-Boj, *et al.*, 1986; Blasco, *et al.*, 1987). Este

problema es más relevante, si existen infecciones de *B. ovis* y *B. melitensis* en los ovinos o si la vacunación con Rev 1 es utilizada. Además, se debe mencionar que el uso del HS en la prueba de IDG no está exento de problemas, el más importante es la estabilidad del antígeno, que aunque se conserva perfectamente liofilizado, una vez rehidratado pierde paulatinamente título si se mantiene en refrigeración o a  $-20^{\circ}\text{C}$  o si se sometemos a congelación y descongelación. Esta falta de estabilidad puede repercutir de forma importante en el diagnóstico y en la repetibilidad, principalmente cuando se conserva la suspensión del antígeno durante un tiempo prolongado y si son pocos los sueros examinados. Además, la prueba no ha sido estandarizada y los resultados pueden solamente interpretarse cualitativamente (Marín, *et al.*, 1989).

La prueba de fijación de complemento es la que más se ha usado como prueba serológica para el diagnóstico de infecciones de *B. ovis*. Sin embargo, presenta inconvenientes prácticos y su sensibilidad y especificidad siempre han sido inferiores a IDG y ELISA (Marín, *et al.*, 1998)

En forma general se ha aceptado que el diagnóstico de infecciones por *B. ovis* puede ser clínico, bacteriológico, serológico y últimamente se puede hablar de un diagnóstico por técnicas de Biología molecular (Kittelberger *et al.*, 1997; Cerri, *et al.*, 2000; Ebani, *et al.*, 2000). Como ya se mencionó, la examinación clínica de ovinos, a determinado la presencia de alteraciones testiculares macroscópicas con valores limitados para el diagnóstico por la existencia de infecciones sin signos clínicos (Blasco y Barberán, 1990) o simplemente a que otros patógenos son responsables de las alteraciones (De long, *et al.*, 1979), limitando con esto el diagnóstico de la brucelosis ovina. En contraste, los resultados bacteriológico y serológicos están más estrechamente relacionados con el control de la enfermedad (Ficapal, *et al.*, 1997), datos que fueron corroborados en el presente trabajo. El número de animales seropositivos fue significativamente alto cuando los carneros fueron diagnosticados bacteriológicamente positivos.

Lo resultados obtenidos en este trabajo fueron similares o superiores a los reportados por otros autores, presentando una sensibilidad del 98.2 % y una especificidad del 100 %, esto si comparamos estudios de ELISA en donde la

sensibilidad fue menor cuando se utilizó HS como antígeno (Marín, *et al.*, 1989; Alonso, *et al.*, 1995; Ficapal, *et al.*, 1995), cuando se utilizaron células completas (Chin, *et al.*, 1990; Vigliocco, *et al.*, 1997) y cuando se utilizaron proteínas citoplasmáticas (Reichel, *et al.*, 1999). Resultados semejantes con HS se han obtenido, pero con conjugados monoclonales y policlonales (Marín, *et al.*, 1998). La sensibilidad y especificidad fueron superiores a los obtenidos por Nuñez *et al.*, en 1997, en donde reportaron una sensibilidad del 97 % y una especificidad del 84 %.

Es necesario reconocer que el ELISA indirecto tiene mayor costo y trabajo operacional que la IDG, como quedó demostrado en este trabajo. Pero los estudios comparativos realizados con IDG, FC y ELISA, han demostrado que esta última presenta mayor sensibilidad, repetibilidad y con resultados cuantitativos y no cualitativos (Ficapal, *et al.*, 1995; Reichel *et al.*, 1999). Pueden obtenerse mejores resultados individuales con ELISA que con IDG y FC (Riezu, *et al.*, 1986) y se han presentado casos en que IDG es capaz de detectar positividad en sueros que resultan negativos a ELISA (falsos negativos). Por estos motivos, se ha sugerido que el uso combinado de IDG y ELISA permitiría mejorar la detección de anticuerpos a *B. ovis* (Blasco, *et al.*, 1990) y se tendría un 100 % de Sensibilidad. La utilización de estas proteínas podría prescindir de IDG y se obtendrían los mismos resultados.

La utilización de estas proteínas como antígeno aumentan la especificidad de la prueba, evitando la probabilidad de encontrar reacciones cruzadas con *B. abortus*, *M. haemolytica*, *H. somnus*, *A. seminis* y con *B. melitensis* principalmente. Además, la concordancia entre el aislamiento y ELISA fue buena al presentar un valor de *Kappa* de 0.97.

En un futuro estas proteínas pudieran potencialmente ser usados como antígenos inmunodominantes para diagnóstico serológico específico de *B. ovis* o profilaxias vacunal. Esto es debido a que la investigación en Brucellosis se enfoca actualmente en la identificación de antígenos no lipopolisacáridos (Kittelberger, *et al.*, 1995; Lindler, *et al.*, 1996; Letesson, *et al.*, 1997; Vemulapalli, *et al.*, 2000)

## **11. CONCLUSIONES**

- 1. Los métodos utilizados para la extracción de las fracciones celulares de *B. ovis* y *B. melitensis* fueron adecuados, teniendo una buena concentración de proteínas. Corroborando así, lo que se ha hecho en otros trabajos.**
- 2. Se evaluó por inmunotransferencia, la antigenicidad de las proteínas extraídas. Observándose, la reacción cruzada que existe entre el suero de conejo inmunizado con *B. melitensis* y las proteínas de *B. ovis*.**
- 3. Esta valoración permitió identificar tres probables proteínas que están presentes en *B. ovis* y no en *B. melitensis*, de 35, 38 y 81 kDa, de las cuales las dos primeras fueron utilizadas en el diagnóstico preciso de la brucelosis ovina causada por *B. ovis* por el método de ELISA. Descartándose una reacción cruzada con *B. melitensis*, *M. haemolytica*, *H. somnus* y *A. seminis*.**
- 4. El ELISA con proteínas de 35 y 38 kDa se puede utilizar para el diagnóstico de la epididimitis infecciosa por *B. ovis*. Debidamente estandarizada, pudiera presentar una sensibilidad y especificidad superiores a IDG y a FC con proteínas citosólicas o HS como antígeno.**

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta, D.J.P. 2001. Patogenia de la epididimitis por *Actinobacillus seminis* en ovinos. Tesis de Maestría. FES-Cuautitlán. UNAM. México, D.F.
2. Afzal, M., Tengerdy, R.P., Squire, P.G. and Ellis, R.P. 1984. Characterization of *Brucella ovis* lipopolysaccharide and its use for diagnosis of ram epididymitis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **20**:1159-1164.
3. Afzal, M.; Scott, J.B. Tengerdy, R.P. Squire, P.G. 1987. Isolation and antigenic reactivity of *Brucella ovis* outer membrane proteins. *J. of Clin Microbiology.* **25**. 11:2132-2135.
4. Alonso, O; Rojas, M.V.; Guzmán, T. M. 1995. Uso de una técnica de ELISA indirecto para el diagnóstico de brucelosis ovina. *Arch. Med. Vet.* XXVII, No. Extraordinario.
5. Alonso-Urmeneta, B., Marín, C. Aragón, V., Blasco, J.M., Díaz, R. And Moriyón, I. 1998. Evaluation of lipopolysaccharides and polysaccharides of different epitopic structures in the indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of brucellosis in small ruminants and cattle. *Clin And Diagns Lab Immn.* **6** (5): 749-754.
6. Alton, G.G., Jones, L.M. y Pietz, D.E. 1988. Las técnicas de laboratorio en la brucelosis. FAO/OMS. Serie monografías 55. Edición 1976. Ginebra Suiza.
7. Bagley, C.V. Paskett, M.E. Matthews, N.J. Stenquist, N.J. 1985. Prevalence and causes of ram epididymitis in Utah. *J. Am. Vet. Med. Ass.* **18**: 798-801.
8. Beeman, K.B.; S. Hummels y R. Rahaley. 1982. Epididymitis in rams. *VM/SAC.* **77**: 1647-1658.
9. Blasco, J.M. y Barberan, M. 1998. Epidemiología, Patología y Cuadro Clínico. *Ovis* Editorial. Madrid, España. 25-32.
10. Blasco, J.M., Marín, C.M. 1990. Brucelosis ovina: Etiología, diagnóstico bacteriológico. *Ovis* **8**, 15-22.

11. Blasco, M. J. M. 1990. Epidemiología, Patogenia y Cuadro Clínico. Brucelosis ovina. Ovis. Tratado de Patología y Producción ovina. *Luzáns ediciones*. España. **8**:25-32.9
12. Blasco, M. J..M. and Marin, C. M. 1987. Immunization with *Brucella melitensis* Rev 1 against *Brucella ovis* infection of rams. **Vet Microbiology**. **14**:381-392.
13. Boix, S.A. 1987. Determinación de la incidencia de *Brucella ovis* en hembras de un rebaño ovino con antecedentes de epididimitis en un semental. Tesis de licenciatura. *Fac. Est. Sup. Cuautitlán*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
14. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Anal. Biochemistry**. **72**: 248-254.
15. Brown, G. M., Pietz, D. E. Y Price, D. A. 1973. Studies on the transmission of *Brucella ovis* infection of rams. **Cornell Vet**. **63**: 29-40.
16. Buddle, M.B. 1955. Observations on the transmission of *Brucella* infections in sheep. **New. Zel. Vet. J.** **3**: 10-19.
17. Buddle, M.B. y Boyes, B. W. 1953. A *brucella* mutant causing genital disease of sheep in New Zealand and Australia. **Aust. Vet. J.** **29**: 245-253.
18. Buddle, M.B. 1962. Production of immunity in rams against *Brucella ovis* infection. **New Zel. Vet. J.** **10**:111-115.
19. Bulgin, M.S. y Anderson, B.C. 1983. Association of sexual experience with isolation of various bacteria in cases of ovine epididymitis. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, **182**: 372-374.
20. Bulgin, M.S., Bruss, M.L., Anderson, B.C. 1990. Methods for control of lamb epididymitis in large purebred folcks. **J. Am. Vet. Med. Ass.** **196**:1110-1115.
21. Bundle, D. R., Cherwonogrodzky, J. W., Caroff, M. y Perry, M.B. 1987. The lipopolysaccharides of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Ann. Inst. Pasteur. Microbiol.* **138**: 92-98.
22. Burgess, G.W.; J.W. McDonald y J.J. Norris. 1982. Epidemiological studies on ovine brucellosis in selected ram flocks. **Aust. Vet. J.** **59**: 45-47.

23. Cerri D, Ebani VV, Pedrini A, Bassi S, Bey RF, Andreani E, Farina R. 2000. Evaluation of test employed in serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella ovis*. **New Microbiol.** **23**(3):282-288.
24. Chin, J. and Turner, B. 1990. Extraction of membrane antigens from *Brucella ovis* and an assessment of their serological activity by immunoblotting. **J. of Gen. Microbiology.** **136**:1615-1622.
25. Chin, J.C., Pang, B. and Carring, M. 1991. Comparison of seroreactivity of rams with brucellosis in a complement fixation test, whole cell ELISA and by immunoblotting. **Vet. Microbiology.** **26**: 291-299.
26. Cleon, V.K. and Schweitzer, D. 1989: *Brucella ovis*, Infection and Its Management in ovine reproduction. **Agri-Practice.** **4**: 36-39.
27. Cloeckkaert, A. 1997. "Antigens of *Brucella*", in 50<sup>th</sup> Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. November 8-9.
28. Cloeckkaert, A., J. M. Verger, M. Grayon and N. Vizcaino. 1996. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. **FEMS Microbiology Letters** **145**: 1-8.
29. Cloeckkaert, A., J. M. Verger, Grayon, M, Zygmunt, M, Grepinet, O. 1996. Nucleotide sequence and expression of the gene encoding the major 25.kilodalton outer membrane protein of *Brucella ovis*: Evidence for antigenic shift, compared with other *Brucella* species, due to a deletion in the gene. **Infect and Immun.** **64**, 6: 2047-2055.
30. Corbel, M. J. y Brinley-Morgan, W.J. 1975. Proposal for minimal standards for descriptions of new species and biotypes of the genus *Brucella*. **Int. J. Sist. Bact.** **25**: 83-89.
31. Corbel, M.J. and Brinley-Morgan, W.J. 1984. Genus *Brucella*. En N.R. Kneg and I.G. Holt (eds). Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
32. De long, W.J., Waldhalm, D.G. y Hall, R.F. 1979. Bacterial isolates associated with epididymitis in rams from Idaho and eastern Oregon flocks. **Am. J. Vet. J.** **40**:101-102.

33. Díaz, A.E., Hernández, A.L., Valero, E.G., Velázquez, Q.F. 1998. Diagnóstico de Brucelosis animal. INIFAP-SAGAR. Pág. 8, Francisco Suarez Güemes. México, D.F.
34. Dubray, G. 1976. Localisation cellulaire des poyosides des bactéries des geres *Brucella* et *Escherichia* en phase lisse (S) or rugueuse (R) , **Ann. Microbiol.** (Inst. Pasteur) **127B**:133-149.5
35. Ebani VV, Cerri D, Bey RF, Andreani E, Farina R. 2000. An immunoblotting for the serodiagnosis of brucellosis by *Brucella ovis*. **New Microbiol.** **23**(1): 55-62.
36. Fensterbank, R., Pardon, P. Y Mmarly, J. 1982. Efficacy of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine against *Brucella ovis* infections in rams. **Ann. Rech. Vet.** **13**: 185-190.
37. Ficapal, A. 1993. Comparación de técnicas diagnósticas para *Brucella ovis* en moruecos. Tesis Doctoral. Universidad de Cataluña.
38. Ficapal, A.; Alonso-Urmeneta, B. Velasco, J.; Morrión, I. Blasco, J.M. 1995. Diagnosis of *Brucella ovis* infection of rams with an ELISA using protein G as conjugate. **Vet. Rec.** **137**: 145-147.
39. Ficapal, A., Jordana, J., Blasco, J.M., Moriyón, I. 1998. Diagnosis and epidemiology of *Brucella ovis* infection in rams. **Small Ruminant Res.** **29**: 13-19.
40. Folch, J., Blasco, J.M. y Uriarte, J. 1981. Carcterísticas reproductivas de morecuos Romanov afectados de epididimitis infecciosa II. Alteraciones seminales. **An. INIA/Ser. Gan.** **15**: 77-85.
41. Freer, E., Pizarro-Cerdá, J., Weintraub, A., Bengoechea, J. A., Moriyón, I., Hultenby, K., Gorvel, J.P. y Moreno. E. 1999. The outer membrane of *Brucella ovis* Shows increased permeability to hydrophobic probes and is more susceptible to cationic peptides than are the outer membranes of mutant roguh *Brucella abortus* strains. **Infect. and Immun.** **67**, 11: 6181-6186.
42. Gamazo, C., Winter, A.J., Moriyon, I., Riezu-Boj, J.I. Blasco, J.M. y Díaz, R. 1989. Comparative analysis of proteins extracted by hot saline or released

- spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. **Infect. Immun.** **57**:1419-1426.
43. García-Carrillo, C. 1981. Protection of rams against *Brucella ovis* infection by *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine. **Zblt. Vet. Med. B.** **28**: 425-431.
  44. Genetzky, R.M. 1995. Epididymitis in Rams. **The compendium Food Animal**, **17**:447-454.
  45. Greiner, M. and Garner, I.A. 2000. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic test. **Preventive Veterinary Medicine.** **45** (1-2): 3-22.
  46. Grilló, M.J., Marin, C.M., Barberán, M. y Blasco, J.M. 1999. Experimental *Brucella ovis* infection in pregnant ewes. **Vet. Rec.** **44**:555-558.
  47. Hoyer, B.H. y Mc Culloch, N. B. 1968. Homologies of desoxyribonucleic acids from *Brucella ovis*, Canine Abortio organism and other *Brucella* species. **J. Bacteriol.** **96**: 1783-1790.
  48. Jensen, R. 1974. Disease of sheep. Lea and Febiger, Philadelphia.
  49. JOINT FAO/IAEA PROGRAMME. 1993. Brucellosis indirect ELISA Kit. Animal Production and Health. July.
  50. Jones, L. M. 1967. Report to the International Comité on Nomenclature of bacteria by the Subcommittee on Taxonomy on *Brucellae*. **Int. J. System. Bact.** **17**: 371-375.
  51. Jubb, K.V. y Kennedy, P.C. 1974. Patología de los animales domésticos. Tomo I. Ed. Labor. Barcelona.
  52. Kennedy, P.C. Frazier, L. M. y McGowan, B. 1956. Epididymitis in rams. Pathology and bacteriology. **Cornell Vet.** **46**: 303-319.
  53. Kerstens, K., and DeLey, J. 1975. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. **J. Gen. Microbiol.** **87**: 333-342.
  54. Kittelberger, R.,; Diack, D.S.; Ross, D.S. and Reichel, M.P. 1997. An improved immunoblotting technique for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infections. **New Z. Vet. J.** **45**: 75-77.
  55. Kittelberger, R.,; Diack, D.S.; Viscaino, N.; Zygmunt, M.S and Cloeckert, A. 1998. Characterization of an immuno-dominant antigen in *Brucella ovis* and

- evaluation of its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. **Vet. Microbiology. 59**: 213-227.
56. Kittelberger, R.; Hansen, M.F.; Hilbink, F.; de Lislle, G.W and Cloeckaert, A. 1995b. Selective extraction of bacterial macromolecules by temperature-induced phase separation in Triton X-114 solution. **J. Microbiol. Meth. 24**:81-92.
57. Kittelberger, R.; Hilbink, F.; Hanse, M.F.; Ross, G.P.; de Lislle, G.W and Cloeckaert, A. 1995. Identification and characterization of immunodominant antigens during the course of infection with *Brucella ovis*. **J. Vet. Diagn Invest. 7**: 210-218.
58. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of bacteriophage T4. **Nature (London) 227**: 680-685.
59. Letesson, J.J.; Tibor, A. Eyned, G.V.; Wansard, V.; Weynants, V.; Denoel, P. and Saman, E. 1997. Humoral immune responses of Brucella-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant Brucella proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. **Clin and Diagns Lab Immun. 4** (5): 556-564.
60. Ley, W.B. 1993. Epidydimitis. Agri-Practice-Ovine Reproduction. **14**: 34-37.
61. Libal, M.C. y Kirkbride, C.A. 1983. *Brucella ovis* induce abortion in ewes. **J. Ame. Vet Res. 183**: 5-7.
62. Lindler, L.E.; Hadfield, T.L.; Tall, B.D.; Snellings, N.J. Rubin, F.A.; Van de Verg, L.L.; Hoover, D. and Warren, R.L. 1996. Cloning of a *Brucella melitensis* group 3 antigen gene encoding Omp28, a protein recognized by the humoral immune response during human brucellosis. **Infect and Immun. 64** (7): 2490-2499.
63. Low, J.C., Somerville, D, Mylne, J.A. and Mckelvey, W. A. C. 1995. Prevalence of *Actinobacillus seminis* in the semen of rams in the United Kingdom. **Vet. Rec. 136**(11): 268-269.
64. Lowry, O. M., Rosebrough, M. J., Farr, A.L. & Randal, R. J. 1951. **J. of Biol Chem. 193**: 265

65. Lugtenberg, B. y Van Alphen, L. 1983. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram negative bacteria. **Biochim. Biophys. Acta** **737**: 51-115.
66. Marín, C.M., Alonso-Urmeneta, B., Moriyón, I., Pérez-Gómez, S. And Blasco, J.M. 1998. Comparison of polyclonal, monoclonal and protein G peroxidase conjugates in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* in sheep. **Vet. Record**. **143**:390-394.
67. Marin, C.M., Barberan, M., Jiménez de Bagues, M.P. y Blasco, J.M. 1990. Comparison of subcutaneous and conjuntival routes of Rev 1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. **Res. Vet. Sci.** **48**: 209-215.
68. Marín, C.M., Jimenez de Bagues, M.P., Blasco, J.M., Gamaso, C., Moriyón, I. And Díaz, R. 1989. Comparison of three serological test for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. **Vet. Record**. **125**:504-508.
69. Marín, C.M., Moreno, E., Moriyón, I., Díaz, R. And Blasco, J.M. 1999. Performance of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assay, gel immunoprecipitation with native hapten polysaccharide, and standart serological test in diagnosis of sheep Brucellosis. **Clinical and Diagns Lab. Immun.** **6** (2): 269-272.
70. Mbai, K, Munyua, S.J.M., Gathumbi, P.K. and Mbiuki, S.M. 1996. *Actinobacillus seminis* as a cause of ram infertility in Kenya. **S. Rum. Res.** **21**: 227-231.
71. Mc Farlane, D., Jebson, J.L., Hatley, W.J., Salisbury, R.M., Mc Clute, T.J. y Osborne, H.G. 1952. Ram epididymitis, ewe abortion and lamb neonatal mortality. **Aust. Vet. J.** **28**: 221-226.
72. Mc Gowan, B. 1979. Epididymitis in rams: effect of vaccination and culling on the clinical incidence of the disease. **Cornell Vet.** **69**: 67-72.
73. Montaña, N.I.; Rueda, O.E.; Calderon, C.P.; Ortega, A. Puentes, A.R.; Gallego, M.I. and Mariño, O.C. 1998. Medición de respuesta inmune

- humoral y celular frente a antígenos de *Brucella abortus* RB51 en bovinos. **Arch. Med. Vet. 2**: 109-123.
74. Moreno, E. Borowiak, D y Mayer, H. 1987. *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides. Ann. Inst. Pasteur. **Microbiol. 138**: 102-105.
75. Moreno, E., Jones, L.M. y Berman, D.T. 1984. Immunochemical characterization of rough *Brucella* lipopolysaccharides. **Infect. Immun. 43**: 779-782.
76. Nuñez, T.E., Díaz, A. E, Tenorio, R.V. Hernández, L., Marin, C. y Suárez-Güemez, F. 1998. Stability of antigen and agarose used in a double immunodiffusion serologic test for *Brucella ovis*. **J. Vet. Diagn. Invest. 10**: 113-115.
77. Nuñez, T.E., Díaz, A.E., Velázquez, Q.F., Trigo, T.F. y Suárez, G.F. 1997. Presencia de anticuerpos contra diferentes especies de *Brucella* en sementales ovinos jóvenes. **Vet. Méx. 28** (3): 241-245.
78. Osborn, M.J. and H.C..P. Wu. 1980. Proteins of the outer membrane of Gram-negative bacteria. **Annu. Rev. Microbiol. 34**: 369-422.
79. Pérez, E., Flores, C.R., De la Huerta, J.A. y Trigo, T. F. J. 1979. Diagnóstico y descripción de un brote de epididimitis ovina en México originado por *Brucella ovis*. **Vet. Méx. 10**: 221-226.
80. Pinochet, L. 1985. Sinopsis histórica de la brucelosis en Chile. Memorias del II Seminario de Brucelosis, Valdivia, Chile.
81. Reichel, M.P., Ross, G. Drake, J. and Jowett, J.H. 1999. Performance of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. **New Z. Vet. J. 47**: 71-74.
82. Riezu-Boj, J.I., Moriyon, I., Blasco; Marin, C.M. y Díaz, R. 1986. Comparison of lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection. **J. of Clin. Microbiology. 23**:938-942.
83. Riezu-Boj, J.I., Moriyon, I., Blasco, J.M. Gamazo, C. and Díaz, R. 1990. Antibody Response to *Brucella ovis* Outer Membrane Proteins in Ovine Brucellosis. **Infect. Immun. 58**: 489-494.

84. Riezu-Boj, J.I., Moriyon, I., Blasco, J.M. Gamazo, C., Díaz, R. Y Winter, A. J. 1990. Analysis by immunoblot of the antibody response of sheep infected by smooth and rough brucellae to outer membrane proteins extracted with hot saline. *Infect. Immun.* **58**:489-494.
85. Ris, D.F., Haeml, K.L. and Long, D.L. 1984. Comparison of an enzyme-linked immunospecific assay with the cold complemen fixation test for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infection. *N.Z. Vet. J.* **32**:18-20. 29
86. Saravanamuthu, V.; Foster, R.A.; Ladds, P.W. and Gorrell, M.D. 1991. T and B lymphocyte subsets in spermatic granulomas in five rams. *Vet. Pathol.* **28**: 482-491.
87. Simmons, G.C. y Hall, W. T. 1953. Epididymitis of rams. *Aust. Vet. J.* **29**: 33-40.
88. Stephens, L. R, Humphrey, D. J., Little, B. P, and Barnum, A. D. 1983. Morphological, Biochemical, Antigenic, and Cytochemical relationsips among *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni*, *Haemophilus haemoglobinophilus*, *Histophilus ovis*, and *Acinobacillus seminis*. *J. of Clin. Microbiology.* **17**-5: 728-737.
89. Suárez, G.F., Martínez, Y.E. y Flores, C.R. 1974. Presencia de anticuerpos contra *B. ovis* en borregos tabasco o pelibuey. Resumen de la XI Reunión Anual del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. Pág. 20. México D.F.
90. Texeira, G.; Cloeckeaert, A.; Bezard, G.; Bowden, R.A.; Dubray, G.; and Zygmunt, M.S. 1997. Identification and characterization of *Brucella ovis* immunogenic proteins using two dimensional electrophoresis and immunoblotting. *Electroforesis* **18**: 1491-1497.
91. Thayer, J. D. y Martín, J. E. 1964. A selective medium for cultivating *N. Gonorrhoeae* and *N. Meningitidis*. Publ. Health Dpto. U.S. 79:49
92. Towbin H., y Gordon J. (1984). Immunobloting and Dot immunobloting. Current status and outlook. *J. Immunol. Methods.* **72**:313.
93. Van Heerden, K.M. y Van Rensburg, S.W. 1962. The immunización of rams against ovine brucellosis. *J. S. Afr. Vet. Ass.* **33**: 143-148.

94. Van tonder, E.M. 1979. *Actinobacillus seminis* infection in sheep in the Republic of South Africa. I. Identification of the problem. Onderstepoot. **J. Vet. Res.** **46**: 129-133.
95. Van tonder, E.M. 1979. *Actinobacillus seminis* infection in sheep in the Republic of South Africa. II. Incidence and geographical distribution. Onderstepoot **J. Vet. Res.** **46**: 135-140.
96. Vemulapalli, R.; Cravero, S.; Calvert, C.L.; Toth, T.E.; Sriranganathan, N.; Boyle, S.M.; Rossetti, O.L.; and Schurig, G.G. 2000. Characterization of specific Immune Responses of mice inoculated with recombinant vaccinia virus expressing an 18-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. **Clin and Diagn. Lab. Immun.** **7**, 1: 114-118.
97. Verger, J. MM., D. Grimont, P. A. D. Grimont, and M. Grayon. 1985. *Brucella*. A nonspecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. **Inst. J. Syst. Bacteriol.** **35**:292-295.
98. Vigliocco, M. A.; Silva, P.P.; Mestre, J.; Briones, C.G.; Draghi, G.; Tossi, M.; Nielsen, K. 1997. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for direction of ovine antibody to *Brucella ovis*. **Vet. Microbiology.** **54**: 357-368.
99. Walker, R.L., Leamaster, B.R., Stefflug J.N. and Biberstein, E.L. 1986. Association of age of ram with distribution of epididymal lesions and etiologic agent. **JAVMA.** **188**(4): 393-396.
100. Webb, R.F., Quinn, C.A., Cockram, F. A. and Husband A.J. 1980. Evaluation of procedures for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. **Aust. Vet. J.** **56**:172-175.
101. West, D.M., Johtnstone, A.C., Bruere, A.N. y Chapman, H.N. 1978. Epiphysitis in rams following vaccination against *Brucella ovis* infection. **N. Z. Vet. J.** **26**: 133-134.
102. Zygmunt, S. M. Martin, C. J. and Dubray, G. 1990. Analysis of immune response: comparison of immunoblots after isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-poliacrylamide gel electrophoresis using cytoplasmic protein extrac from *Brucella*. **FEMS Microbiology Letters.** **70**: 263-268.

### 13. ANEXO

#### 1. Agar brucella

- a) Agar brucella.....43g
- b) Agua destilada.....1000ml

#### 2. Agar sangre

- Base agar sangre.....40 g
- Sangre desfibrinada.....100 ml
- Agua destilada c.b.p.....1000 ml

#### 3. Tinción de Gram

- a) En un portaobjetos colocar unas gotas de suspensión bacteriana y si el cultivo es sólido, colocar primero una gota de agua destilada
- b) Extender la gota sobre la laminilla
- c) Dejar secar las laminillas a temperatura ambiente
- d) Pasar la laminilla tres veces por la llama del mechero
- c) Agregar cristal violeta por 1 minuto
- d) Lavar al chorro de agua
- e) Agregar lugol por 1 minuto
- f) Agregar alcohol-acetona por 10 segundos
- g) Agregar safranina por 1 minuto
- h) Lavar al chorro de agua
- i) Observar en el microscopio con el objetivo de inmersión (100X)

#### 3. Soluciones para la preparación de los geles de poli(acrilamida)-SDS

##### a) Acrilamida-Bisacrilamida 40%

- Acrilamida (Biorad).....37.5 g
- N,N-bismetilen acrilamida (Biorad).....1.0 g
- Aforar a 500 ml de agua destilada

##### b) Amortiguador Resolving (gel concentrador) pH 8.8

- Tris-HCl 1.5 M.....trizma base 6.0 g
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletildiamina)..... 0.4 % v/v
- SDS (dodecil sulfato de sodio)..... 0.4 % w/v
- Ajustar a pH con HCl 2 N y aforar a 500 ml de agua destilada

c) Amortiguador Stacking pH 6.8

Tris-HCl 0.14 M.....trizma base 6.0 g  
 TEMED.....0.11% v/v  
 SDS.....0.11% w/v  
 Ajustar a pH con HCl 2 N y aforar a 500 ml de agua destilada

4. Preparación de los geles de poliacrilamida

Componentes, Volumen (ml)	Gel Resolving			Gel Stacking
	10 %	12.5 %	15 %	
Acrilamida:Bis 40%	10.3	12.8	15.4	1.0
Amortiguador Resolving	10.0	10.0	10.0	--
Amortiguador Stacking	--	--	--	9.0
Agua destilada	19.3	16.8	14.2	--
Persulfato de amonio 10 %	0.4	0.4	0.4	0.05
<hr/>				
Volumen total (ml)	40	40	40	10

5. Preparación de membranas de nitrocelulosa

Preparar un sistema de emparedado para la transferencia de las proteínas en el siguiente orden:

- una hoja de esponja
- una hoja de papel filtro (papel whatmann)
- una hoja de nitrocelulosa
- gel de poliacrilamida
- una hoja de papel filtro
- una hoja de esponja

Reunir el emparedado entre las dos hojas de plástico y cerrar herméticamente. Colocar todo en el aparato de transferencia, vigilando que la nitrocelulosa esté del lado del ánodo.

6. Proteína A conjugada con peroxidasa

proteína A conjugada con peroxidasa.....4 µl  
 PBS pH 7.2.....10 ml

## 7. Pruebas bioquímicas

### a) Ácido sulfhídrico

En medio TSI (Triple Azúcar Hierro), se siembra por picadura y estria. Se Incuba de 24 a 48 hrs. a 37 °C. La prueba positiva se manifiesta por la aparición de un precipitado negro a lo largo de la picadura.

### b) Catalasa

Colocar una gota de agua oxigenada al 3% en una laminilla, tomar con el asa una de las colonias y colocarla en la gota de agua oxigenada.

Inmediatamente se produce un burbujeo como resultado del desprendimiento de O<sub>2</sub>.

### c) Indol

Inocular en el medio SIM por picadura 2/3 parte del tubo e incubar 24 a 48 hrs. a 37 °C. agregar el reactivo de Kovac's. Prueba positiva: se forma un anillo rojo en la superficie. Prueba negativa: se forma un anillo de cualquier otro color.

### d) Oxidasa

En un trozo de papel filtro (7 cm) se impregna con 2 a 3 gotas de solución acuosa al 1% de diclorohidrato de tetrametil-p-fenil-diamina, se agrega una gota de cultivo. La aparición de un color purpura intenso en 10 segundos indica prueba positiva.

### e) Reducción de nitratos

En un medio de caldo nitrato con peptonas y 0.1% de nitrato de potasio se Siembra por agitación. Incubar de 18 a 24 hrs. a 37 °C. Añadir 5 gotas de solución A y 5 gotas de solución B. Resultado positivo: rosado rojo intenso.

Negativo: sin color.

Solución A

250 ml agua destilada

100 ml de ácido acético glacial

28 ml de ácido sulfanilico (0.8%)

Solución B

250 ml agua destilada

100 ml de ácido acético glacial

2.1 ml de dimetil-alfa-naftilamina (0.6%)

### f) Urea

En caldo con sales minerales, 2% de urea y rojo de fenol. Se agrega cultivo con una asa y se agita. Se incuba de 18 a 24 hrs a 37 °C. Prueba positiva: coloración roja. Prueba negativa: coloración amarilla.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

8. PBS 0.15M pH 7.2

Cloruro de sodio (NaCl).....	8.0 g
Cloruro de potasio (KCl).....	0.2 g
Fosfato dibásico de sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	1.44 g
Fosfato monobásico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ).....	0.24 g
Agua destilada c.b.p.....	1000 ml

9. Amortiguador Tris-HCl 0.5M pH 6.8

Tris base.....	6.0 g
Ajustar el pH con HCl 2N y aforar con agua destilada a 100 ml	

10. Amortiguador muestra 2X pH 6.8

Tris.....	1.51 g
Dodecil sulfato de sodio (SDS).....	2.0 g
Azul de bromotimol.....	0.002 g
Glicerol.....	25 g
Agua bidestilada c.b.p.....	100 ml

11. HEPES 10 mM pH 7.5

HEPES (Sigma).....	11.9 g
Agua destilada.....	1000 ml

12. PMSF 0.1 M

Phenylmethyl sulfony fluoride (PMSF).....	1.3 g
Disolver en metanol.....	100 ml

13. EDTA 1 mM

EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético).....	37.22 mg
Agua bidestilada c.b.p.....	100 ml

14. Sarcocyl 1%

Sarcocyl.....	1.0 g
Agua bidestilada c.b.p.....	100 ml

### 15. Amortiguador de lisis

#### Inhibidores de proteasas (100 mM)

a) DIFP (Disisopropilfluorofosfato).....	175 µl
Propilenglicol.....	10 ml
b) PMSF (Fenil-metil sulfonilfluoruro).....	17.62 mg
Metanol.....	1.0 ml
c) Leupeptina.....	47.56 mg
Agua bidestilada.....	1.0 ml
d) NEM (N-etilmabimida).....	12.11 mg
Tris pH 8.6.....	1.0 ml
e) PHMB (p-hidroxi-mercuribenzoato).....	36.07 mg
Agua bidestilada pH 8-10.....	1.0 ml

Preparar una solución con:

DIFP.....	50 µl
PMSF.....	20 µl
Leupeptina.....	10 µl
NEM.....	50 µl
PHMB.....	100 µl

De la solución anterior de inhibidores tomar 62.5 µl + 125 µl de amortiguador de corrida y aforar a 1.0 ml con Tris pH 8.6.

### 16. Amortiguador de corrida

Tris 0.025 M.....	3.0 g
Glicina 0.192 M.....	14.4 g
SDS.....	1.0 g
Agua bidestilada.....	1000 ml

### 17. Solución colorante de proteínas

Metanol al 50%.....	454 ml
Acido acético.....	46 ml
Azul de Coomassie.....	1.2 g

Se agita por una hora y se filtra.

### 18. Solución desteñidora

Metanol.....	400 ml
Ácido acético.....	100 ml
Agua destilada.....	500 ml

19. Ácido acético al 10%

Ácido acético.....	100 ml
Agua destilada.....	900 ml

20. Reactivo de Bradford

Azul de Coomassie.....	100 mg
Etanol absoluto.....	50 ml
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85 %).....	100 ml
Agua destilada c.b.p.....	1000 ml

21. Buffer de transferencia

Trizma base.....	18.15 g
Glicina.....	86.40 g
Metanol.....	1200 ml
Agua destilada.....	4800 ml

22. Solución de bloqueo al 2 y 5 %

Leche descremada (Svelty).....	2 ó 5 g
PBS pH 7.2 (ver incisos anteriores).....	100 ml

23. Solución de lavado PBS-Tween 20

Cloruro de sodio (NaCl).....	8.0 g
Cloruro de potasio (KCl).....	0.2 g
Fosfato dibásico de sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	1.44 g
Fosfato monobásico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ).....	0.24 g
Tween 20 (Sigma).....	500 µl
Agua destilada c.b.p.....	1000 ml

24. Solución DAB pH 7.4

Diaminobenzidina (DAB) 0.05%.....	20 mg
Ácido fosfórico 50 mM.....	40 ml

25. Solución NiCo

Cloruro níquelico.....	30 mg
Cloruro cobáltico.....	30 mg
Agua destilada.....	3 ml

26. Amortiguador de boratos pH 8.3

Ácido bórico ( $H_3BO_3$ ).....0.19 g  
Cloruro de potasio (KCl).....0.72 g  
Disolver y ajustar a pH 8.3 con NaOH 0.2 N y llevar a 100 ml con agua  
Bidestilada.

27. Solución salina fisiológica (pH 7.2)

Cloruro de sodio (NaCl).....0.85 g  
Agua destilada.....100 ml

28. Buffer de carbonatos

Carbonato de sodio ( $Na_2CO_3$ ).....3.5 g  
Bicarbonato de sodio ( $NaHCO_3$ ).....5.6 g  
Agua destilada.....1000 ml

29.  $H_2O_2$  (peróxido de hidrógeno) al 30 %

$H_2O_2$ .....5  $\mu$ l  
Agua bidestilada.....120  $\mu$ l

30. Amortiguador de Citratos

Solución A.  
Ácido cítrico monohidratado 0.1 M.....10.5 g  
Agua bidestilada.....500 ml

Solución B.  
Citrato de sodio dihidratado 0.2 M.....25.8 g  
Agua bidestilada.....500 ml

24.3 ml de solución A + 25.7 ml de solución B + 50 ml de  $H_2O$  bidestilada

31. Solución ABTS- $H_2O_2$

ABTS (ácido-2-2-azinobis-3-etilbenzotiazolina sulfónico).....5.5 mg  
Amortiguador de Citratos.....50 ml  
 $H_2O_2$  al 30 %.....19  $\mu$ l

32. Conjugado

Anti-IgG de ovino marcado con peroxidasa.....10  $\mu$ l  
Solución Buffer de Carbonatos .....30 ml

