

01672



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

**CARACTERIZACION DE LOS PERFILES PROTEÍNICOS DE
Brucella melitensis EN GELES DE POLIACRILAMIDA E
INMUNOELECTROTRANSFERENCIA**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS VETERINARIAS
AREA MICROBIOLOGÍA

PRESENTA

Ana Laura Miranda Romero

Director de Tesis: Dr. Alfredo Sahagún Ruíz
Tutores Dr. Efrén Díaz Aparicio
Dr. Francisco Suárez Güemes



México, D.F.

2005

0346521



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.

DEDICATORIAS

A Dios por acompañarme y sostenerme todos los días de mi vida.

A mis padres Victor Manuel Miranda Herrera y Gloria Romero Romero por su ejemplo de vida, por el gran apoyo que siempre me han brindado, por su entrañable amor y fortaleza.

A mis hijos, Carlos Manuel, Aarón y Juan Alberto, por ser mis tesoros y el motor de mi existencia.

A mis hermanos Patty, Claudia y Victor por acompañarme y apoyarme en esos momentos difíciles.

A Juan Carlos por ser mi compañero, por brindarme su confianza y con paciencia alentarme para alcanzar esta meta.

A mis amigos y compañeros Rocío, Hugo, Rigo, Edgar, Betty, Xochitl, Daniel, Jesús, por los buenos momentos y los ratos de gloria en el laboratorio.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: ALFREDO SAHAGUN ROIZ

FECHA: 02 08 05

SIRMA: P.A. 

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por el lujo de ser una de sus egresadas.

Al Departamento de Inmunología y Microbiología de la FMVZ- UNAM, y a todo su personal, quienes en todo momento me brindaron todas las facilidades para la elaboración de este trabajo.

Al CENID-Microbiología INIFAP por brindarme sus instalaciones y el apoyo de su personal durante la fase experimental de este estudio, así como la invaluable aportación de sus investigadores.

Al Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica,(INDRE) SSA. Por la invaluable aportación del material biológico con el que se realizó esta investigación.

Al Dr. Carlos Díaz A, del Depto. De Estadística del Instituto de Matemáticas Aplicadas (IMAS) de la UNAM, por su amable y desinteresada orientación en la parte estadística de esta investigación.

A mis asesores: Alfredo Sahagún, Efrén Díaz y Francisco Suárez, por su orientación en el desarrollo de la investigación y por creer en mi.

A mis revisores: Irma Hernández, Gilberto Chávez, Francisco Basurto, Alejandro de la Peña y Efrén Díaz, por su valiosas aportaciones.

RESUMEN

Caracterización de los perfiles proteínicos de *Brucella melitensis* en geles de poliacrilamida e inmunoelectrotransferencia. Ana Laura Miranda Romero.

El objetivo de este estudio fue la caracterización por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% de las proteínas de veintitrés cepas de campo procedentes de diferentes zonas geográficas en México y de tres cepas de referencia de *Brucella melitensis* así como su análisis por inmunoelectrotransferencia. Los aislamientos fueron donados por el INDRE de la SSA, el CENID Microbiología INIFAP SAGARPA y el Depto. de Microbiología e Inmunología de la FMVZ UNAM. Estos se inocularon en cuye para su conversión de fase rugosa a lisa y biotipificación. La cinética de crecimiento determinó que las proteínas se obtuvieran a las 36 horas y la extracción de proteínas se realizó con sonicado y Tritón X-100, las proteínas se visualizaron con tinción de plata y cuantificaron con Bradford. Un 64% de los aislamientos de origen humano son biotipo 1 y el 36% biotipo 3. El 66% de los de origen animal son biotipo 3 y el 40% biotipo 1, se observaron 20 bandas, desde los 15 a 84 kDa, siendo las de 17, 34, 45, 58, 66 y 77 kDa las más evidentes. En todos los casos son aparentes las de 59 a 60, 48 a 49, 46-a 47, 40 a 41, 36 a 37, 31 a 32, 29 a 30, 27 a 28 y de 21 a 22 kDa, se observó mayor variación en el biotipo 1. Las principales bandas fueron las de 45 a 46, 38 a 40, 36 a 38, 31 a 34, 29 a 31, 26 a 27 y 19 kDa. Se utilizaron sueros hiperinmunes de cuye y un conjugado de proteína A para la inmunoelectrotransferencia. Se observó una reacción difusa en varios casos de 66 a 97 kDa, hay reactividad de 25 a 27 y de 36 a 38 kDa. Las proteínas de 25, 19 y 17 kDa son muy notorias en todos los casos. Los perfiles electroforéticos se analizaron con el índice de similitud de Dice, concluyendo que el 70.37 % de los aislamientos son muy semejantes, el 29.62 % tiene diferencias y en el 11.11% éstas diferencias son muy notorias.

Palabras clave: *Brucella melitensis*, proteínas de membrana externa, electroforesis, inmunoelectrotransferencia.

ABSTRACT

SDS-PAGE Characterization of outer membrane proteins of twenty three cultures of *Brucella melitensis* that come from different places in Mexico, and three reference cultures, and their Western-blot analysis. Cultures were provided for INDRE, SSA; CENID Microbiología-INIFAP-SAGARPA and Microbiology and Immunology Department of FMVZ-UNAM. Cultures were inoculated in guinea pigs for their conversion from rough to smooth phase and for biotipification. Growth patterns determinate that after 36 incubation hours the proteins were extracted with good quality. Proteins were extracted by sonication and Triton X-100 and quantified by Bradford and observed with silver stain. The 64% of the human cultures were biotype 1 and 36% were biotype 3. The 66% of the animal cultures were biotype 3 and the 40% were biotype 1. Twenty protein bands were located from the 15-84 kDa, but 17, 34, 45, 58, 66 y 77 kDa were more evident. In all cultures the 21-22, 27-28, 29-30, 31-32, 36-37, 40-41, 46-47, 48-49, 59-60 kDa were located. The mayor bands were 19, 26-27, 29-31, 31-34, 36-38, 38-40, 45-46 kDa. By Western blot and using guinea pigs serum there was a diffuse reaction at the 66-97 kDa. And there was reaction at the 25-27 and 36-38 kDa. Electrophoretic proteins profile was study by Dice similarity index, and there was found that 70.37% of the cultures were very similar, but there were differences in 29.62%, and in a 11.11% these differences were really notice.

Key words: *Brucella melitensis*, outer membrane proteins, SDS-PAGE, Western-blot.

CONTENIDO

	Página
Dedicatorias	I
Agradecimientos	II
Resumen	III
Abstract	IV
Contenido	V
Lista de abreviaturas	VIII
Lista de cuadros	X
Lista de figuras	XI
I.- Introducción	1
Justificación	3
Hipótesis	4
Objetivos	4
II.- Revisión de la Literatura	5
Marco Teórico	5
Brucelosis	5
Situación actual de la brucelosis en México	5
Situación de la brucelosis caprina	6
Situación de la brucelosis humana	7
El género <i>Brucella</i>	9
Características estructurales del género <i>Brucella</i>	10
Membrana externa	11
Componentes solubles	13
Proteínas de membrana externa	13
Clasificación de las proteínas de membrana externa	15
Otras proteínas de membrana externa	16
Lipopolisacárido liso y polisacáridos relacionados	17
Lípido A	17
Hapteno nativo	18
Lípidos libres	18

	Página
Propiedades generales con significancia funcional	19
Vía hidrofílica	19
Vía hidrofóbica	19
Interacción con policonaciones	19
Métodos de extracción de proteínas	20
Inmunología de la brucelosis	21
Diagnóstico de la brucelosis	23
Vacunas contra la brucelosis	24
III.- Marco Referencial	27
Introducción a la clasificación de los microorganismos	27
Sistemática microbiana	28
La clasificación e identificación de las bacterias	29
El concepto de especie	29
Taxonomía numérica	30
La quimiotaxonomía	31
Impresión de huellas digitales o Fingerprinting	32
Genética molecular	32
Taxonomía polifásica	33
Visualización de los resultados de un estudio clasificatorio	34
El dendrograma	34
Matrices de similaridad	35
La nomenclatura	35
IV.- Materiales y métodos	37
Obtención de las cepas de <i>Brucella melitensis</i>	37
Inoculación de cuyes con cepas rugosas	38
Aislamiento, identificación y biotipificación	38
Cinética bacteriana	39
Obtención de biomasa	39
Métodos de ruptura celular y extracción de proteínas	40
de membrana externa	
Cuantificación de proteínas	43

	Página
Perfiles electroforéticos en SDS-PAGE	43
Estimación del peso molecular de las proteínas	43
Producción de sueros hiperinmunes de cuye	44
Análisis por inmunoelectrotransferencia	44
Análisis estadístico	45
V.- Resultados	46
Cinética de crecimiento bacteriano	46
Biotipificación de las cepas de <i>B.melitensis</i>	46
Métodos de extracción de proteínas de membrana externa	47
Perfil electroforético de proteínas de membrana externa de	48
..... <i>B. melitensis</i>	
Producción de sueros hiperinmunes de cuye	54
Inmunoelectrotransferencia	54
Análisis estadístico	56
VI.- Discusión	59
Biotipificación de las cepas de <i>B.melitensis</i>	59
Cinética bacteriana	59
Evaluación de los métodos de extracción de PME	60
Perfil electroforético de proteínas	62
Inmunoelectrotransferencia	63
Análisis estadístico	63
VII.- Literatura citada	64
VIII. Apéndice	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AL	Anillo en leche prueba
ARN	Ácido ribonucleico
C	Citosina
CA	Coefficiente de apareamientos
CENID	Centro Nacional de Investigación y Diagnóstico
CIBS	Comité Internacional de Bacteriología Sistemática
CONASA	Comité Nacional de Sanidad Animal
CONETB	Comité Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis y Brucelosis Bovina
CSJ	Coefficiente de Jaccard
DGSA	Dirección General de Salud Animal
FC	Fijación de Complemento prueba
FCA	Fosfatidilcolina
FEDMVZ	Federación de Médicos Veterinarios Zootecnistas
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
G	Guanina
HN	Hapteno nativo
IFN	Interferón
IG	Inmunoglobulinas
IL	Interleucina
INDRE	Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias
kDa	Kilodaltones
KDO	2-ceto-deoxi octulorónico
LPS	Lipopolisacárido
LPS-L	Lipopolisacárido liso
MC	Membrana citoplasmática

MCPHC	Complejo principal de histocompatibilidad (por sus siglas en inglés)
ME	Membrana externa
NK	Células Natural Killer (por sus siglas en inglés)
nm	Nanómetros
OMPs	Proteínas de membrana externa (Outer membrane proteins) por sus siglas en inglés
PC	Pared celular
PG	Péptido-glicano
PME	Proteínas de membrana externa
PMN	Polimorfonucleares
RB	Rosa de Bengala prueba
SAGAR	Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Tc	Células T cooperadoras
TSA	Trypticaseína de soya agar

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación de las cepas de <i>B. melitensis</i> por su procedencia	37
Cuadro 2. Clasificación de las cepas por su origen.	37
Cuadro 3. Biotipificación de aislamientos de <i>B. melitensis</i>	47
Cuadro 4. Clasificación por zona geográfica del número de bandas en los perfiles electroforéticos de las proteínas de membrana de 27 cepas de <i>Brucella melitensis</i> .	52
Cuadro 5. Frecuencia de las bandas de proteínas de membrana externa en las cepas de <i>B. melitensis</i> de diferentes regiones en México.	53
Cuadro 6. Sueros con reactividad a inmunoelectrotransferencia.	56

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Cinética de crecimiento bacteriano de 2 cepas de <i>Brucella melitensis</i> , cepa 16M y una cepa de campo	46
Figura 2. Estructura celular de una bacteria Gram negativa	48
Figura 3. Perfil electroforético de proteínas de membrana externa de <i>B. melitensis</i> C3, N7,N1,S2y C5.	48
Figura 4. Perfil electroforético de proteínas de membrana externa de varias cepas de <i>B.melitensis</i> .	49
Figura 5. Perfil electroforético de las proteínas de membrana externa de <i>B. melitensis</i> N3, N2, C6, Rev Fran y S1	49
Figura 6. Perfil electroforético de los aislamientos de <i>B. melitensis</i> C1, S7 y N9 con marcador de peso molecular.	50
Figura 7. Perfil electroforético de proteínas de membrana externa de <i>B.melitensis</i> en la cepa C2.	50
Figura 8. Perfil electroforético de proteínas de membrana externa de <i>B.melitensis</i> cepas C4 y N8.	51
Figura 9. Perfil electroforético de proteínas de membrana externa en varias cepas de <i>B.melitensis</i> .	51
Figura 10. Perfil electroforético de proteínas de membrana externa de <i>B.melitensis</i> cepas N11 y S5.	51
Figura 11. Análisis de inmunoelectrotransferencia, de las proteínas de membrana externa de las cepas N1, N2, C6 y S3 de <i>B.melitensis</i>	55
Figura 12. Análisis de inmunoelectrotransferencia, de las proteínas de membrana externa de las cepas 16M RevMex y S6 de <i>B.melitensis</i>	55
Figura 13. Matriz sombreada de similitud de proteínas de membrana externa de 27 cepas de <i>B.melitensis</i> procedentes de diferentes zonas geográficas de México.	57
Figura 14. Dendrograma de similitud de proteínas de membrana externa de 27 cepas de <i>B. melitensis</i> procedentes de diferentes regiones de México.	58

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad causada por especies del género *Brucella* que presenta una distribución mundial. En México, la brucelosis es una enfermedad endémica y es la principal zoonosis bacteriana por su distribución en todo el territorio nacional ya que se presenta tanto en la población rural como urbana de ambos sexos y económicamente activa, además de tener gran importancia económica para la industria ganadera. La mayor incidencia de brucelosis se encuentra en el ganado estabulado y se localiza en áreas de alta densidad animal, en algunas regiones la prevalencia estimada fluctúa entre el 0.02% al 28% (Luna 1996). De ahí la importancia de ejercer un control efectivo de la enfermedad con base en el diagnóstico serológico, la eliminación de animales positivos y la vacunación (CONETB-SAGAR, FEDMVZ, 1996).

B. melitensis es la especie que más se notifica como causa de enfermedad en los humanos, casi en un 90% de los casos, esto es muy grave ya que se trata del tipo más virulento y causante de una enfermedad aguda muy importante. Por otra parte, la brucelosis caprina tiene una distribución más amplia ya que se le puede encontrar en todo el territorio nacional; pues en su mayoría este ganado se explota en condiciones de nula tecnificación.

El género *Brucella* se caracteriza por ser una bacteria intracelular que ha sido clasificada con base en las características de la envoltura celular y su predilección por la especie hospedera en 6 especies, estas son: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis* que se subdivide en biovares o biotipos (Moreno *et al.*, 2002). Varios autores han estudiado su estructura y genoma mediante el uso de diferentes técnicas, *B. melitensis* puede tener antígeno M (biotipo 1) o antígeno A (biotipo 2) como antígenos dominantes o ambos A y M (biotipo 3). (López-Merino 2002). Se sabe que la proporción de antígenos A-M en *B. melitensis* es de 1: 20 (Suárez 1995).

El avance en las técnicas de biología molecular ha permitido su aplicación en la microbiología, orientada a la caracterización molecular, lo cual puede generar un gran

número de atributos bioquímicos a partir del estudio de los componentes estructurales de las bacterias; éstos pueden ser analizados con los recursos metodológicos que ofrece la taxonomía numérica, para establecer similitudes entre cepas de microorganismos. Estos datos son de gran valor, no solo para el estudio taxonómico de las especies bacterianas, sino para el estudio epidemiológico de las enfermedades y el desarrollo de productos biológicos que ofrezcan mayor seguridad y eficacia en la prevención de enfermedades de alto costo, como es el caso de la brucelosis en México.

JUSTIFICACIÓN

Debido a las elevadas pérdidas económicas se han implementado esquemas de erradicación que involucran la combinación de programas de vacunación, pruebas diagnósticas y sacrificio. Los programas de vacunación han sido instituidos para prevenir la enfermedad (Mancera *et al.*,1992). En el ganado vacuno se usa la cepa RB51, mientras que las cabras son vacunadas con Rev1 de *B. melitensis* y los animales desarrollan una respuesta inmune a la cepa vacunal. Las pruebas serológicas convencionales como la de Tarjeta ácida, la prueba de anillo en leche, la fijación de complemento y la aglutinación con suero no diferencian entre el suero de animales infectados y vacunados, porque en estas pruebas el LPS-L es el antígeno inmunodominante.

Los métodos alternativos de diagnóstico se han propuesto basados en antígenos que permitan la diferenciación entre animales vacunados e infectados, tales como la ELISA competitiva. En este estudio se propone la extracción de PME y su purificación como estrategia de caracterización para evaluar la similitud de estas proteínas en las diferentes cepas e identificar la relación antigénica entre PME mediante la confrontación con sueros homólogos y heterólogos; pues se ha visto que el uso de un antígeno o la mezcla de ellos sin LPS-L podría tener ventajas para el diagnóstico, ya que pueden prevenirse reacciones cruzadas porque las proteínas internas no tienen antígenos comunes con el LPS-L de las bacterias que cruzan, lo cual ya ha sido demostrado en pacientes enfermos de brucelosis.

Las proteínas estructurales pueden inducir una respuesta inmune útil para el diagnóstico (Verstrete, 1984), sobre todo en casos de brucelosis crónica, pues es necesario implementar pruebas diagnósticas con un bajo límite de detección de anticuerpos. La caracterización de las proteínas de *B. melitensis* y de la relación antigénica entre porinas y grupos de proteínas podría usarse en la distinción de cepas de *B. melitensis*, (Verstrete *et al.*,1982) pues aún no existe la prueba diagnóstica ideal.

HIPÓTESIS

El análisis de los perfiles electroforéticos e inmunoelectrotransferencia de las proteínas de membrana externa de diferentes cepas de *B. melitensis* con sueros positivos permitirá establecer si existen diferencias y similitudes entre proteínas de membrana externa .

OBJETIVOS

Caracterizar las proteínas de membrana externa de *B. melitensis* por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida para definir su perfil de proteínas.

Analizar por inmunoelectrotransferencia los perfiles de proteína para establecer la relación antigénica entre las cepas estudiadas.

Determinar el índice de similitud de los antígenos proteínicos en las cepas de *B. melitensis* para establecer su grado de conservación.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

MARCO TEORICO

Brucelosis

La brucelosis es una enfermedad causada por especies del género *Brucella* que presenta una distribución mundial, aunque ya ha sido erradicada en algunos países como el Reino Unido, Noruega, Suecia, Finlandia, Dinamarca, Checoslovaquia y Canadá (Salman,1995). Afecta a diferentes especies de animales domésticos y silvestres, principalmente bovinos, cabras, cerdos y también ha sido aislada de mamíferos acuáticos (Ross *et al.*,1996 y Jahans *et al.*,1997).

La Brucelosis animal es de gran importancia no solo por tratarse de una zoonosis de amplia distribución, sino también por sus implicaciones e impacto directo en la producción pecuaria y por constituir actualmente una barrera para el comercio e intercambio nacional e internacional de animales y productos de origen animal (FAO, 1997).

En todos los países de Centroamérica han sido identificadas *B. abortus* y *B. suis*, mientras que *B. melienseis* ha sido reportada en Guatemala. La prevalencia de la brucelosis ovina se estima entre el 4 y 8 %, y es aún mayor en los hatos lecheros. Para enfrentar esta problemática, se han establecido programas nacionales de control, basados en la vacunación de terneras y remoción de animales reactivos (Moreno, 2002). En Paraguay, después de aproximadamente 20 años, el porcentaje de grupos positivos(3-4%), se redujo, posiblemente debido a la vacunación y las mejoras en las prácticas de manejo (Baumgarten, 2002).

Situación actual de la brucelosis en México

La brucelosis en México es una enfermedad endémica y es la principal zoonosis bacteriana por su distribución en todo el territorio nacional y de gran importancia económica para la industria ganadera. La mayor incidencia de brucelosis se encuentra en el ganado estabulado y se localiza en áreas de alta densidad animal. El año de 1996, Luna

reportó para algunas regiones una prevalencia estimada entre el 0.02% y 28%. En el ganado vacuno la prevalencia fluctuaba entre 4 y 11% y las pérdidas económicas para la industria láctea fueron de aproximadamente \$2,400,000 pesos mexicanos cada año (Guerrero y Monroy 1997).

Para el año 2000, las acciones implementadas por la Comisión Nacional de Erradicación de la Tuberculosis y Brucelosis Bovina, estas cifras se habían reducido a \$2,000,000 de pesos por año (Luna-Martínez, 2002). De ahí la importancia de ejercer un programa nacional de erradicación y control efectivo de la brucelosis con base en el diagnóstico serológico, la eliminación de animales positivos y la vacunación (CANETB-SAGARPA, 2000).

Situación de la brucelosis caprina

La brucelosis caprina tiene una amplia distribución en el territorio nacional. Las entidades federativas donde se reporta con mayor frecuencia son los estados de Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Tamaulipas, Guanajuato, Michoacán, Estado de México, Querétaro y San Luis Potosí (UNAM, CANIFARMA, SARH 1988).

El Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal (CONASA), en 1996 reportó que el 87% de la población caprina se explota en condiciones de nula tecnificación, en rebaños pequeños de menos de 100 animales los cuales tienen un manejo común; como es el pastoreo, el préstamo de sementales, el empadre y la reposición de animales y solo el 13% restante se explota bajo condiciones tecnificadas. Esta situación para el año 2000, según datos de la Campaña Nacional de Erradicación de la Brucelosis no ha cambiado significativamente para los caprinos, pues sus prácticas de manejo en el centro del país incluyen el recorrido de grandes distancias; de hasta 20 km desde su lugar de origen y la convivencia nocturna y a la intemperie con otros animales domésticos, por lo que solo el 15% de los caprinos se cría en buenas condiciones.

La prevalencia de la brucelosis caprina en 1994, fluctuaba del 0.75% al 5.8% en los estados del Norte del país, y alcanzaba hasta un 20.35% a 40% en los estados de Puebla, Veracruz y Oaxaca. Por otra parte la SAGAR calculaba en ese mismo año, pérdidas anuales

de cuatro millones de pesos por abortos, ya que la prevalencia era del 12.94%. (NOM-022-SSA2-1994) (DGSA) aunque estos datos corresponden a muestreos dirigidos en zonas problema.

La CONETB-SAGAR, FEDMVZ en 1996 reportó vacunaciones en el 11.3% de las hembras del inventario nacional y la intensificación de las acciones para la prevención y control de la enfermedad, principalmente en los estados fronterizos del Norte del país, con la finalidad de reducir su presencia y no obstaculizar el comercio con el país vecino.

Situación de la brucelosis humana

La brucelosis humana es una enfermedad presente en todo el territorio nacional, pero gracias a las acciones de prevención y control de la enfermedad en el ganado, los reportes de casos anuales han disminuido en forma importante, de 5,332 casos en el periodo 1984-93 a 3,202 en el periodo de 1994 a 97. Estas cifras deben sin embargo tomarse con reserva, dada la subnotificación de casos. (Gurría 1998).

En estudios realizados en 1974 y 1975 por Muñoz y colaboradores en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), se dio a conocer que la enfermedad se distribuía en tres zonas de mayor prevalencia: la del Golfo de México, con 3.6 %; la del Noroeste, con 2.6% y la del Norte con 2.4%, con una media para el país del 1.6%. Datos de López-Merino *et al.*, 1992, señalan una incidencia en 1974 del 0.82 % y de 7.62 % en 1988.

De 1987 a 1992 se registraron los promedios de mortalidad por cada 100 mil habitantes, en Guanajuato este era del 0.17% y del 0.11% en Zacatecas, Sonora y Tlaxcala. La morbilidad de la enfermedad es más alta en los estados de Guanajuato, Coahuila, Nuevo León, Querétaro y Sonora (NOM-022-SSA2-1994)

López-Merino y Migrañas en 1992, reportaron una seroprevalencia general de 3.42%, las entidades federativas con prevalencia más alta eran el Estado de México con 13.5% y en orden descendente Guanajuato 10.66%, Sinaloa 9.05%, Jalisco 8.12% y Sonora 7.23 %. Los estados con menor presencia eran Colima 0.59%, Chiapas 0.53% y 0.24% para el Estado de Morelos.

La frecuencia de anticuerpos fue entonces mayor para individuos varones en edad

productiva, siguiendo las mujeres y niños: esto se explica porque son ellas las encargadas de realizar la compra y selección de los alimentos para la familia, además de atender junto con los niños la ordeña de los animales en las explotaciones de traspatio y la elaboración del queso.

Mediante estudios bacteriológicos realizados en México, se conoce la existencia de las biovariedades 1, 4, 5 y 6 de *Brucella* resultando el biovar 1 el más frecuente y el biovar 4 el más virulento para el hombre (López-Merino, 2002).

Por otra parte, *B. melitensis* es la especie que más se notifica como causa de enfermedad en los humanos: casi en un 90% de los casos, situación sumamente grave ya que se trata del tipo más virulento y causante de una enfermedad aguda muy severa. En el territorio nacional el biovar 1 es el más frecuente, aunque en algunos casos se ha aislado el 3 y el 2. Desafortunadamente, desde hace ya varios años la brucelosis se presenta tanto en la población rural como urbana de ambos sexos y económicamente activa, entre 20 y 45 años de edad. El mayor número de casos se presenta en mujeres y los niños de aproximadamente 10 años son actualmente una población en riesgo creciente (López-Merino, 2002). Esta situación se presenta debido a que en México, aproximadamente el 35% de la leche de vaca que se produce se consume sin pasteurizar, ya sea como leche cruda o quesos frescos.

Una cuestión todavía más grave es el consumo del 85% de la producción de leche de cabra en forma de quesos sin pasteurizar y sin supervisión sanitaria. De ahí la relación directa que existe entre casos de brucelosis humana y el consumo de subproductos de la leche no pasteurizados. Datos de la Secretaría de Salud 2001, indican que un 98% de los casos humanos son debidos a la ingestión de productos contaminados y son todavía las mujeres y los varones entre los 25 y 64 años los grupos de mayor riesgo de infección. Esta situación se presenta también en el Noreste del país, ya que se reporta un 70 % de mujeres afectadas y un 30% en pacientes varones. Todos ellos en etapa productiva que va desde los 18 hasta los 39 años; con una moda de 32 años, una mediana de 33 años y una media de 38.5 años (Serrano-Trejo y Rodríguez Verdugo, 2004).

Sin embargo, la Secretaría de Salud (SSA) registró una disminución en el número de casos humanos desde hace 8 años, pues en 1998 se presentaron 3550 pacientes, en 1999 se

detectaron 2719 casos, para el año 2000 se observaron 2089 y en el año 2001 se conocieron 2107 casos (Luna-Martínez- Mejía Terán, 2002).

En casos estudiados, se sabe que el 93% de los humanos se infecta con *B. melitensis* de origen caprino, el 5% con *B. melitensis* de origen bovino, 1.5% con *B. abortus* de origen bovino, y un 0.5% con *B. suis* de origen bovino (Luna-Martínez- Mejía Terán, 2002).

El género *Brucella*

El género *Brucella* está formado por bacterias Gram negativas que miden de 0.5 a 1.5 μm y de 0.5- 0.7 μm de diámetro, de forma cocobacilar, son inmóviles y sin cápsula, no forman esporas, son positivas a la reacción de catalasa y oxidasa. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37° C y crecen mejor a un pH de 6.8. Son microorganismos aerobios, sin embargo, algunas especies necesitan de una atmósfera enriquecida con 5-10 % de CO₂ (Alton *et al.*, 1975a, 1975b). Como microorganismos intracelulares causan bacteremia y la desaparición de títulos en huéspedes con la infección latente (Moriyón 1997).

El género *Brucella* está taxonómicamente ubicado en la α -2 subdivisión de la Clase *Proteobacteria* dentro de la familia *Rhizobiaceae* (Cloeckaert, *et al* 1999). Esta familia incluye a especies patógenas para plantas y animales respectivamente: *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bartonella* y *Brucella*, todas estas capaces de interactuar con células eucariotas en forma intercelular o intracelular (Moreno *et al.*, 1990 y López-Merino 1992).

A pesar de que el género *Brucella* es un grupo muy homogéneo, las características de la envoltura celular y su predilección por la especie hospedera, la clasifican en 6 especies: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis* . (Suárez 1995, Moriyón 1997). Se han realizado algunos hallazgos que ponen en duda esta clasificación, debido al aislamiento *Brucella* en mamíferos marinos. Los primeros reportes al respecto surgieron de las costas de Escocia a partir de aislamientos en tejidos de lobos marinos y delfines. (Ross H M. *et al.*, 1996). Estas cepas se han aislado a partir de una amplia variedad de lobos marinos, leones marinos, delfines y ballenas en las costas de diferentes

continentes, por lo que han sido denominadas *B. cetaceae* y *B. pinnipediae*, en este grupo se distinguen las cepas provenientes de cetáceos de las aisladas de focas (López-Merino, 2002). Aunado a lo mencionado anteriormente se han realizado estudios de hibridación de ADN sugieren que estas especies son parte de un género monoespecífico y se recomienda que sean agrupadas en biovares de una sola especie *B. melitensis*.(Cheville N F, 2000).

En 1968, Hoyer y Mc Cullough analizaron el genoma de varias especies, utilizando la hibridación de ADN-ADN, estableciendo que las 4 especies lisas (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*) tienen un alto porcentaje de homología en su secuencia de polinucleótidos, con un porcentaje de moles G + C de 56 a 58. Existen 2 antígenos en las cepas lisas, el antígeno A y el M, los cuales están formados por poli-hidroxi-amino presente en el lipopolisacárido (LPS) de las especies lisas.

Las cepas de *B. abortus* bv.1 tienen al epítipo A como dominante que consiste en un polímero de cinco perosaminas unidas por ligadura α 1,2 y con una cierta proporción de unidades ligadas por unión α 1,3; mientras que *B. melitensis* bv1 por tener epítipo M dominante, presenta unidades repetidas de un pentasacárido constituido por perosamina unida a la ligadura α 1-3 y cuatro unidades ligadas a α 1-2. Estas ligaduras influyen en la forma del epítipo del LPS, el epítipo A dominante tiene forma de barra, mientras que el de tipo M tiene aspecto rizado o retorcido. La *B. melitensis* puede tener antígeno M (biotipo1) ó antígeno A (biotipo 2) como dominantes, o ambos A-M en el biotipo 3. Se sabe que la proporción de antígenos A-M en *B. melitensis* es de 1: 20 (Suárez, 1995).

Características estructurales del género *Brucella*

La envoltura celular de *Brucella* es una estructura de tres láminas; la interna es la membrana citoplasmática (MC), después hay un espacio periplásmico y por último la membrana externa (ME). (Verger *et al* 1985.)

Membrana externa

La composición de la ME de *Brucella* es semejante a la de *E. coli*. La región apolar hidrofóbica de la membrana tiene un grosor de 4.5 nm y forma una barrera funcional y estructural entre el periplasma y el exterior de la célula. La membrana constituye una barrera física y funcional entre el interior de la célula bacteriana y su medio, además de ser la primera estructura que entra en contacto con las células del sistema inmunológico del huésped. Contiene LPS, proteínas y fosfolípidos, el peptido-glicano (PG) está fuertemente asociado a ella a través de moléculas de lipoproteínas unidas por enlaces covalentes que le proporcionan estabilidad (López-Merino, 2002).

El LPS es el componente de la ME más estudiado, pues es el más externo, abundante y antigénico, se le conoce también como endotoxina, aunque sus propiedades biológicas y bioquímicas son diferentes a las del resto de bacterias Gram negativas, especialmente en cuanto al contenido de ácidos grasos del lípido A, no obstante conserva sus propiedades inmunológicas (López-Merino, 2002).

Las cepas lisas poseen LPS-L, el cual está constituido por el lípido A, formado por diferentes ácidos grasos; una región central constituida por el ácido 2-ceto 3-desoxiooctulosónico, glucosa, manosa y quinovosamina; y una cadena O que se proyecta hacia el exterior de la ME que está constituida por perosamina (Forestier *et al.*, 1999).

La estructura del LPS de cepas rugosas (LPS-R) es similar al LPS-L, excepto por la cadena O, que está ausente o reducida a unos pocos residuos; por lo que la especificidad del LPS-R está determinada por el polisacárido del núcleo (López-Merino, 1992).

La pared celular (PC) está conformada por PG, que posee proteínas solubles e insolubles asociadas; hay también antígenos proteínicos que se encuentran tanto en fracciones solubles como insolubles de extractos de células (Nielsen, 1990). La composición lipídica de la MC mantiene un fuerte efecto hidrofóbico con implicaciones estructurales (Moriyón, 1997).

El PG de las brucelas es más resistente a la desintegración física que el de *E. coli* lo que se explica por diferencias cuantitativas y cualitativas de aspecto y tamaño en la

estructura del mismo. Estudios detallados de microscopia electrónica muestran que el PG presenta una interacción con la ME mucho más firme que la que se observa en *E. coli*. Además se ha demostrado que durante la inactivación por calor de la célula se causa el colapso de la MC en *B. abortus*, pero la ME mantiene su apariencia morfológica a pesar de la importante liberación de LPS y otros materiales de la ME. Esto sugiere que la interacción ME-PG podría resultar en una ME mucho más rígida en *Brucella* que en otros Gram negativos. Esta interacción se explica por la firme asociación de algunas proteínas de ME con el PG (Moriyón, 1997).

Los extractos proteínicos de *B. abortus* solubilizados con Dodecil-sulfato de sodio (SDS) contienen 3 antígenos de superficie (a,b,x). El antígeno x ha sido de utilidad para diferenciar animales infectados de vacunados por medio de hemaglutinación pasiva (Verstrete y Winter, 1984). Las principales proteínas de membrana externa (PME) de *Brucella* son porinas del grupo 2 (35-40 kDa), proteínas de grupo 3 (25-30 kDa) y una lipoproteína de 8 kDa, covalentemente ligada al PG (Nielsen, 1990). Poco se conoce acerca de la acción y las propiedades de las proteínas del grupo 1 (88 - 94 kDa), se ha demostrado que las del grupo 2 (35 - 40 kDa) son proteínas de la matriz con actividad de porinas y las del grupo 3 son semejantes al complemento de las PME de *E. coli*. A pesar de estas similitudes, el LPS originalmente descrito en *E. coli* no es similar al descrito en *Brucella spp* (Gómez 1986, Moriyón 1997).

Existen pequeñas variaciones en los diámetros de los canales de las porinas entre las especies de *Brucella* y por ello la diferencia en sensibilidad a los colorantes. La hidrofobicidad de la fucsina básica y la tionina son diferentes, la tionina tiene un diámetro mínimo de (0.7 μm), mucho más pequeño que el de la fucsina básica, por lo que el paso de la molécula soluble depende del diámetro de las porinas. Las cepas de *B. melitensis* son usualmente resistentes a este colorante y se ha encontrado una cepa que tiene un poro más angosto que las otras especies, por lo que esta característica se usa ampliamente para la clasificación por especie y biotipos de *Brucella*, junto con la sensibilidad a antibióticos (Douglas 1984).

Los agentes antimicrobianos tales como los B-lactámicos, tetraciclinas y aminoglicósidos, penetran la ME a través de la bicapa lipídica. La permeabilidad de ésta bicapa se debe a la estructura de la ME y a las propiedades del LPS. En contraste con las enterobacterias, el LPS de *Brucella* es muy diferente en cuanto a su estructura hidrofóbica y a la porción del lípido A. Se ha reportado que el LPS de *Brucella* contiene proteínas fuertemente unidas, las cuales no pueden ser removidas por los tratamientos que afectan a las proteínas del LPS en enterobacterias. De ahí que las cepas de *Brucella* se caractericen además por su moderada sensibilidad a numerosos antibióticos (Douglas 1984).

Componentes solubles

Se han detectado 2 importantes enzimas de detoxificación en el periplasma de *B. abortus*, una la Cu/Zn superóxido dismutasa y la catalasa. Además de los 1,2- α glucanos presentes en extractos acuosos periplásmicos (Moriyón ,1997).

Proteínas de membrana externa

Durante la última década se han publicado extensos trabajos sobre las proteínas de membrana externa (PME) de las bacterias Gram negativas. En la familia *Enterobacteriaceae* se han detectado una serie de proteínas con pesos moleculares de aproximadamente 40 kDa estrechamente asociadas con el PG. A estas proteínas se les refiere como proteínas de la matriz, y constituyen poros de difusión a través de los cuales las sustancias hidrofílicas de bajo peso molecular penetran la ME. Además son proteínas esenciales para su ensamblaje.

Las PME en *E. coli*, tienen un papel importante en la estabilidad de la ME. Otras proteínas análogas han sido descritas en bacterias Gram negativas (Moriyón ,1983).

Las proteínas mayoritarias de *Brucella spp* fueron identificadas por primera vez en 1980, por extracción con detergentes de las envolturas celulares y fueron clasificadas por su peso molecular en grupos (Winter 1983) Gpo.1 (94 o 88 kDa), Gpo.2 de (36-38 kDa) y

Gpo.3 (31-34 kDa y 25-27 kDa). Se ha visto que las del grupo 2 son porinas y tienen una fuerte interacción con el LPS y con el PG. Los genes de proteínas del grupo 2 y 3 así como de varias PME minoritarias han sido caracterizadas. Además, epítomos de estas PME han mostrado estar expuestos a la superficie celular. También se sugiere que las lipoproteínas de *Brucella* podrían estar expuestas a la superficie y ancladas por un lípido (Moriyón, 1983).

Las PME también conocidas internacionalmente como "OMPs", generan gran interés porque las han relacionado con la protección. Primero se descubrieron las proteínas mayores de 25-27, de 31-34 y de 36-38 kDa; y posteriormente formaron los grupos 3 (25-27) y 2 (38-38). Las proteínas del grupo 2 fueron identificadas como porinas; a las del grupo 3 se les consideró equivalentes a las Omp A de *E.coli*, con base en la similitud en la composición de sus aminoácidos y a su relación antigénica. El grupo 1 lo formaron proteínas con pesos moleculares de 88 a 94 kDa, cuya concentración fue menor a la de los otros grupos. En la actualidad como consecuencia de la clonación y secuenciación de los genes que codifican para estas PME, se les ha asignando otra nomenclatura: Omp 25, Omp 31 y Omp2b (Ficht *et al.*, 1990 y 1996).

Otras PME han sido, posteriormente identificadas por anticuerpos monoclonales y por ser menos abundantes se les ha denominado proteínas menores y tienen masas moleculares de 10, 16.5, 19 y 89 kDa. Gracias a la realización de estudios genéticos y de secuencia de aminoácidos, las de 10, 16.5 y 19 kDa, se han identificado como lipoproteínas de membrana externa, denominadas Omp10, Omp 16 y Omp 19, respectivamente (López-Merino, 1992). La Omp 16, pertenece a la familia de lipoproteínas asociadas al peptidoglicano presente en bacterias Gram negativas. Aparentemente existen proteínas homólogas a las Omp 10 y Omp 19 en *Ochrobactrum anthrropi* y otras bacterias relacionadas genéticamente a *Brucella* (Velazco *et al.*, 1997).

La Omp 1 de 89 kDa se encuentra expuesta en la superficie de la célula; finalmente, se ha puesto de manifiesto la existencia de acuaporinas en la ME, que son proteínas transmembranales con canales para agua que pertenecen a la familia de las proteínas intrínsecas mayores. Las Omp mayores o principales están expuestas en la superficie de la

ME, sin embargo estarían menos evidentes en las cepas lisas a diferencia de las cepas rugosas, debido al impedimento estérico que causan las largas y abundantes cadenas O del LPS en las cepas lisas (López-Merino, 1992).

A través de microscopia electrónica y marcado inmunológico con oro se ha demostrado que la mayoría de las PME tienen epítomos en la superficie de la membrana de la célula lisa y que esta exposición se incrementa en células rugosas. También notaron que PME de 89 kDa y de 31-34 kDa no son accesibles en *B. abortus* lisa mientras que si están expuestas en células rugosas y también en células lisas de *B. melitensis* (Gamazo, 1989). Con estos hallazgos se han demostrado las diferencias entre células lisas y rugosas en bacterias Gram negativas, además de la exposición de PME de células lisas que son sugestivas a diferencias entre especies.

Se han observado 3 grupos de PME que contienen cantidades sustanciales de LPS fuertemente adherido, el cual puede ser reducido pero no eliminado totalmente por extracción de células con ácido tricloroacético (Verstrete, 1982).

Las proteínas del grupo 3 se observan entre los 30 kDa electroforesis en geles de poliacrilamida, a pesar de que bandas adicionales se observaron frecuentemente en esta región. El grupo 2 y 3 fue antigénicamente distinto entre ellos, pero el grupo 3 mayoritario compartió antígenos entre todas las cepas. La mayoría de las proteínas del grupo 1 son componentes minoritarios físicamente asociados con los del 3.

Las proteínas del grupo 2 son aparentemente trímeros en su estado nativo con pesos de 43 a 41 kDa después de su completa desnaturalización con SDS.

El grupo 1 produjo una banda mayoritaria de 94 kDa y presentó modificaciones con calor (Moriyón, 1997).

Clasificación de las proteínas de membrana externa

Existe diversidad entre los genes de PME por especies, biovar y a nivel de cepas que son de interés taxonómico y epidemiológico, y que han aportado una nueva visión dentro de la evolución del género *Brucella*.

En el grupo 2 Ficht *et al.*, 1989 demostró que 2 genes ligados muy cercanos (*Omp2a* y *Omp2b*) codifican para porinas y poseen un alto grado de homología. El locus de *OMP2* está presente en todas las brucelas. Sin embargo, solamente *Omp2b* se manifiesta durante el crecimiento de *B. abortus* en el laboratorio (Ficht, 1989 y Mobasher, 1997).

La comparación de porinas entre las diferentes cepas de *Brucella* muestra pequeñas pero significativas diferencias en el tamaño aparente del poro de diferentes organismos. Al parecer *B. canis*, *B. abortus* 19 y *B. abortus* 1119.3 producen poros relativamente grandes en contraste con *B. melitensis* B115 y *B. abortus* 4520, productoras de los poros más pequeños (Douglas, 1984).

En el grupo 3, dos genes (*omp25* y *omp31*) codifican para las PME del grupo 3 con solo un 34% de identidad para la secuencia de aminoácidos. La PME de 25 kDa tiene poca identidad con *OmpA* de *E. coli* la cual previamente se había sugerido como equivalente a la del grupo 3. El *Omp A* interactúa con el LPS y establece la conformación nativa de la proteína. A pesar de que otras PME de *Brucella* también sostienen una fuerte unión entre LPS y lípidos, la interacción del LPS es más marcada en el *Omp25*. Aunque se ha reportado la actividad de porina en la *OmpA*, esta interactúa con el PG, otras PME y el LPS, su papel en la estructura se manifiesta por la marcada inestabilidad de la ME y defectos en el cultivo de mutantes deficientes en *OmpA*. (Ficht *et al.*, 1989).

Otras proteínas de membrana externa (PME)

Varias lipoproteínas de bajo peso molecular han sido identificadas como PME minoritarias en *B. abortus* (*Omp19*, *Omp16* y *Omp10*). La topología de estas proteínas es aún desconocida, pero de acuerdo a su secuencia de aminoácidos son hidrofílicas, y por ello podrían estar en el espacio periplásmico y tener alguna función en la viabilidad de *Brucella*. Numerosas PME, internas, citoplásmicas y periplásmicas han sido caracterizadas. Algunas son reconocidas por el sistema inmune durante la infección y solo se han reportado en *Brucella*, por lo que sería de gran utilidad en futuras pruebas diagnósticas o para ser consideradas en las nuevas vacunas (López-Merino 1992).

Lipopolisacárido liso y polisacáridos relacionados

Por métodos diversos se ha detectado la presencia de lipopolisacárido liso (LPS-L) en la superficie de brucelas lisas. También se sugiere la presencia de un segundo polisacárido en las envolturas celulares conocido como hapteno nativo (HN) antigénicamente relacionado con el LPS-L. Aunque es conocido que estas moléculas portan determinantes serológicamente dominantes en la superficie celular, su caracterización no está completa aún (Verger 1985)

Lípido A

A pesar de que la composición del esqueleto del carbohidrato parece constante, hay una heterogenicidad del lípido A, la cual posiblemente se relaciona con el grado de fosforilación y sustitución del acil. La etanolamina y arabinosamina, presentes frecuentemente en el lípido A de las enterobacterias no han sido encontradas. En cuanto al esqueleto de oligosacárido, se ha reportado su heterogenicidad en algunas cepas mutantes espontáneas rugosas. La ausencia de fosfato es notable porque el 2 ceto-deoxi-octuloronico (KDO) frecuentemente porta grupos fosfato que contribuyen a la carga negativa de la región del esqueleto del lípido A. La frecuencia relativa de ligaduras α - 1,2 y α - 1,3 explica la estructura del epítipo de la cadena O.

La mayoría de los autores aceptan la modificación de Douglas y Palmer 1988 de la estructura antigénica A+M de Wilson y Miles 1932, de acuerdo a esto, la cadena O del biotipo 1 de *B. abortus* y *B. melitensis* portan exclusivamente epítipos A o M, respectivamente, además de un epítipo C común, responsable de la reactividad cruzada. El biotipo 1 de *B. melitensis* y biotipos serológicamente intermedios también tienen una ligadura en α -1,3 pero en proporciones reducidas. En consecuencia, es común *con B. abortus* con biotipo 1, la cadena O de estos biotipos tiene extensiones de más de 5 azúcares continuamente ligados en α - 1-2 (Díaz EA *et al.*, 2001).

Hapteno nativo (HN)

Los polisacáridos fueron originalmente definidos por inmunoprecipitación de extractos de brucelas lisas, y un componente serológicamente relacionado presente solamente en cepas mutantes rugosas de *B. melitensis*. Originalmente fue llamado polisacárido B. El HN y el polisacárido B han sido tema de controversia, algunos autores han identificado al polisacárido B como glucanos cíclicos periplásmicos en *B. melitensis* 16M y otras brucelas lisas, y el HN como un esqueleto de la cadena O del polisacárido resultado de la hidrólisis hipotética ocurrida durante la extracción del LPS. El HN de *B. melitensis* 16M y *B. abortus* 2308 están cerca de sus respectivas cadenas O, tanto en tamaño como en composición química. La existencia de la cadena O como polisacáridos no ligados a la ME de varias bacterias Gram negativas es comúnmente aceptado, y sucede como resultado de las variaciones en el polímero estándar. Estructuralmente existe evidencia de que el HN libre está entrelazado con el LPS, la cadena O y anclado en la ME por interacciones polisacárido - polisacárido. (Díaz EA *et al* 2001).

Lípidos libres

La composición de los lípidos depende del medio y de la edad del cultivo. Es bien conocido que los fosfolípidos mayoritarios en *B. abortus* y *B. melitensis* es la fosfatidilcolina (FC), la cual ocupa el 37% de los fosfolípidos totales; otros son la fosfatidiletanolamina (33%) cardiolipina (20%) y fosfatidilglicerol (10%). Hay evidencia de que FC es enriquecida en la ME de *Brucella* y tiene propiedades estructurales diferentes de la fosfatidiletanolamina, el fosfolípido mayoritario en muchos Gram negativos. Además, *B. abortus* y *B. melitensis* contienen lípidos neutros de los cuales los lípidos de ornitina son los más notables. La localización de estos en la envoltura celular es desconocida pero son contaminantes frecuentes en extractos de LPS al parecer es posible su localización en la superficie de la ME. Finalmente, las brucelas también contienen algunos materiales parecidos a la cera poco caracterizados. (Díaz EA *et al.*, 2001).

Propiedades generales con significancia funcional

Vía hidrofílica: La penetración de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de las porinas de *Brucella* fue mostrado por Douglas en 1984. En proteoliposomas de fosfatidilcolina, *OmpF* de *E. coli* y porinas de *Brucella* tienen aparentemente un diámetro interno similar (1.2 nm) con pequeñas diferencias entre especies y cepas. Se sabe que las porinas de *B. abortus* 19 eran ligeramente más grandes que aquellas de cepas rugosas de *B. abortus* 45/20 y *B. melitensis* 115.

Desde que se usa la tionina en la biotipificación de brucelas, se sabe que tiene una excepcional baja hidrofobicidad entre los colorantes, se sugirió que las diferencias entre especies estaban relacionadas con la sensibilidad a la tionina para diferenciar propiedades funcionales de sus porinas (Douglas, 1984). Estos resultados actualmente se atribuyen a la *Omp2b* porque la *Omp2a* no se expresó in vitro. Cuando la *Omp2a* fue clonada en *E. coli* se incrementó la permeabilidad a las maltodextrinas, y se ha sugerido que esta porina se manifiesta solamente durante el crecimiento intracelular o bajo otras condiciones del medio ambiente asociadas a la patogenicidad de *Brucella*. (Díaz EA *et al.*, 2001).

Vía hidrofóbica: Actualmente se ha demostrado que sustratos hidrofóbicos pueden penetrar a la brucela directamente a través de la bicapa lipídica, lo cual contrasta con la mayoría de las bacterias Gram negativas. Se demostró que el incremento en la permeabilidad celular es principalmente, debido a las propiedades del LPS. Se conoce que existen variaciones entre especies y biotipos por su sensibilidad variable a la fucsina básica, un colorante muy hidrofóbico usado para la biotipificación de *Brucella*. Finalmente, las PME se observa en *B. abortus* bajo condiciones en las cuales se manifiesta en *E. coli*. (Díaz EA *et al.*, 2001).

Interacción con policationes: Muchos policationes, incluidos varios péptidos de lisosomas y fluidos corporales tienen una potente actividad bactericida. Esta actividad es característica de su misma interacción.

Métodos de extracción de proteínas

Como ya se ha demostrado en la envoltura celular se encuentran proteínas mayoritarias, de las cuales las PME del grupo 2 se caracterizan por estar fuertemente ligadas al PG, de modo que para lograr una extracción eficiente con detergentes se necesita de una digestión del mismo con lisozima (Douglas, 1984). Por otra parte hay una especial dificultad en la extracción de cantidades significativas de proteínas de *Brucella* en el espacio periplásmico. Sin embargo, un método que ofrece ventajas de la sensibilidad de la ME de *Brucella* es el empleo de detergentes como el Zwittergent (Moriyón, 1987).

Se ha visto en comparación con *E. coli* que los detergentes no iónicos son menos eficientes para extraer las PME de *Brucella*, y éstas pueden ser extraídas con SDS, aun sin el uso de lisozima (Towbin *et al.*, 1979).

Dubray y Bezard han aislado 3 proteínas de 37, 25 y 15 kDa por electroforesis en geles de poliacrilamida (Nielsen, 1990). Algo muy trascendente, considerando la posible utilización de los perfiles de las porinas en SDS-PAGE para distinguir *B. abortus* y *B. melitensis* de *B. canis* y *B. ovis*.

Existe un grupo de proteínas de 41 - 43 kDa, antigénicamente similar entre todas las cepas de *B. abortus* y han mostrado parecido en la composición de aminoácidos entre ellas y una similitud general con las PME de *E. coli*. Existen diferencias antigénicas entre algunos grupos de PME, así como en su composición de aminoácidos, sin embargo, también hay antígenos que se comparten entre las *B. abortus* estudiadas (Verstreat, 1982). Se ha observado un antígeno compartido entre las proteínas - porinas y otros 3 fueron compartidos entre el grupo 3 de proteínas (25 y 30 kDa). Estos resultados sugieren que puede ser posible la inclusión de PME de *B. abortus* en una vacuna que inmunice contra varias especies de *Brucella*. Existen reportes del uso de PME de *B. abortus* que confieren protección activa. Sin embargo la inclusión de PME en la vacuna necesita del entendimiento de la diversidad antigénica de estas proteínas entre especies (Verstreat, 1984).

Inmunología de la brucelosis

Las especies de *Brucella* son patógenos intracelulares facultativos y su virulencia está relacionada con la capacidad que tienen, para resistir el efecto bactericida de los componentes del suero normal y adherirse, penetrar y multiplicarse en una gran variedad de células, tanto fagocíticas como no fagocíticas. Su localización intracelular las mantiene protegidas de los antibióticos y de factores bactericidas del plasma como el complemento y los anticuerpos, lo que determina la naturaleza crónica de la infección (López-Merino, 1992).

En los linfocitos humanos, *Brucella* se une a la MC a través de moléculas semejantes a lectinas, y en otras células se sospecha de la existencia de un receptor aún no caracterizado. Cuando las bacterias son fagocitadas por células polimorfonucleares (PMN), o por células fagocíticas mononucleares, éstas se multiplican en el interior de los fagosomas, aquí despliegan mecanismos que bloquean o suprimen la respuesta bactericida de estas células.

Por otro lado, se sabe que *B. abortus* se libra de su destrucción dentro de los PMN, gracias a la producción de guanosina 5, monofosfato (GMP) y adenina que actúan inhibiendo la fusión del fagosoma-lisosoma, la degranulación y la activación del sistema mieloperoxidasa y la producción del factor de necrosis tumoral, además de producir Cu-Zn superóxido dismutasa, que participa probablemente en las fases tempranas de la infección intracelular. (López-Merino, 1992).

Una vez dentro del macrófago, la bacteria se enfrenta a condiciones adversas como el pH, la falta de nutrientes y la presencia de intermediarios reactivos del oxígeno para establecerse en el fagosoma, y su supervivencia se ha asociado a la síntesis de enzimas antioxidantes (KatE y SodC) y proteínas de variados pesos moleculares: 17, 24, 28, 60 y 62 kDa. Esta última corresponde a la proteína GroEl de choque térmico; las de 24 y de 60 kDa se inducen en medio ácido y su producción se relaciona con su supervivencia en condiciones ácidas. Las proteínas de 17 y 28 kDa se han relacionado con la supervivencia intracelular, mientras que la proteína HtrA, inducida por el estrés, participa en la inducción de una respuesta granulomatosa temprana hacia *B. abortus* en el ratón.

Las células del huésped ante una infección por bacterias Gram negativas se enfrentan a dos tipos de antígenos, el LPS y las proteínas, los cuales ejercen diferentes formas de activación del sistema inmune. La proteínas bacterianas antigénicas inducen una respuesta inmune específica, tanto celular como humoral con células de memoria funcionales.

Una vez ingerida la bacteria, los antígenos proteínicos extraños se localizan en compartimentos intracelulares dentro de las células presentadoras de antígeno y se procesan hasta pequeños péptidos de 8 a 12 residuos que están listos para asociarse con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MCPHC) de clase II. Estas moléculas presentadoras se traslocan desde el retículo endoplásmico al aparato de Golgi, antes de alcanzar la vía endocítica a través de la cual son presentados en la superficie de la célula y de esta forma reconocidos por los linfocitos T (López-Merino, 1992).

El LPS es una molécula T independiente, capaz de activar linfocitos B que inducen la producción de anticuerpos sin la aparente participación de las células T. Los antígenos proteínicos presentados a las células T cooperadoras (Tc) con fenotipo CD4+, sin embargo, algunos antígenos de *Brucella* se manifiestan como MCPHC de clase I, que provoca la activación de células T citotóxicas con fenotipo CD8+.

Las subpoblaciones de las células Tc se distinguen por que las Tc1 controlan la respuesta de tipo celular, por medio de ciertas citocinas, en cambio las Tc 2 controlan la respuesta de anticuerpos por el mismo mecanismo. Las células Tc1 participan en forma directa en la protección hacia patógenos intracelulares, ya que producen interferón γ (IFN- γ) inductor de la activación de los macrófagos con mayor capacidad bactericida. Ambas subpoblaciones regulan la producción de los diferentes isotipos de anticuerpos en forma selectiva al producir distintas citocinas.

Las células Tc1, producen citosina IFN- γ , que activa eficientemente a los macrófagos y se desencadena la respuesta celular de tipo 1, que controla la infección y elimina a la bacteria, se cree que esto sucede por un incremento en la producción de reactivos intermediarios del oxígeno en los macrófagos activados por el IFN- γ . *B. abortus* es un fuerte inductor de inmunidad celular de tipo 1 debido a su capacidad de estimular la producción de interleucina (IL)12, en macrófagos. La interacción del LPS con el receptor

CD14 induce la producción de IL-12, que estimula células NK y T CD4 para que secreten IFN- γ , de esta manera influye en el desarrollo de células del tipo Tc1 (López-Merino, 1992).

Las células T CD8 además de que podrían participar en la producción de IFN- γ , lisan los macrófagos infectados con *Brucellas* y así matan a las bacterias intracelulares por medio de la granulocina o bien las exponen a los macrófagos activados con el IFN- γ .

En los pacientes brucelosos se ha visto que los anticuerpos de la clase Ig M aparecen en general después de una semana de controlada la infección. En seguida en forma progresiva se presentan los de la clase Ig G e Ig A. Sin embargo, los anticuerpos no solo se encuentran en el transcurso de la enfermedad y la convalecencia, sino también en el suero de individuos aparentemente sanos que pudieron cursar con la enfermedad inaparente o subclínica. (López-Merino, 1992).

Por otra parte, la semejanza estructural entre los epítomos A y M tiene gran importancia práctica, ya que al inocular una cepa de *B. abortus*, en un animal en experimentación, el antisuero obtenido, reaccionará principalmente con cepas A dominante, con A / M y en menor grado con cepas M dominantes, lo que significa que reaccionará en diferente magnitud, con todas las especies de *Brucella* en fase lisa, a menos que el antisuero sea absorbido con suspensiones de *B. melitensis* para eliminar los epítomos M y obtener un suero A monoespecífico.

Diagnóstico de la brucelosis

Para la adecuada interpretación y comparación de las pruebas inmunológicas debe hacerse usando los criterios de: límite de detección más bajo, exactitud, precisión, sensibilidad, especificidad y valor predictivo. Las pruebas bien estandarizadas son la fijación de complemento (FC), rosa de bengala (RB) y anillo en leche (AL) en las cuales se usan suspensiones de *Brucella* en fase lisa ya que comparten ambos antígenos A y M (Verger, 1985). Pero al realizar el diagnóstico siempre existe la posibilidad de tener falsos positivos y falsos negativos. El primer caso se puede presentar cuando una vaca presenta

reacción cruzada a brucelosis con RB, pero en realidad es portadora de *Yersinia enterocolitica*. Los falsos negativos pueden presentarse en un establo infectado con brucelosis al practicar la prueba de AL ésta da un resultado negativo por interferencia de la aplicación de antibióticos (Guerrero, 1986).

Las pruebas serológicas convencionales como RB, AL y la aglutinación del suero no diferencian entre el suero de animales infectados y vacunados, porque en estas pruebas el LPS-L es el antígeno inmunodominante (Douglas *et al.*, 1984)

Es necesario desarrollar pruebas con mayor sensibilidad y especificidad que apoyen en forma eficiente los programas de control y erradicación y con la capacidad de diferenciar animales vacunados de infectados. Por otra parte, es importante desarrollar nuevos inmunógenos, basados en subunidades celulares mediante la incorporación de los determinantes antigénicos que estimulen a células T y sean capaces de inducir protección a cepas virulentas.

La respuesta humoral a *Brucella* ha sido estudiada por técnicas serológicas, precipitación en agar-gel y ELISA, sin embargo, estas pruebas no pueden diferenciar la respuesta inmune a cada uno de los antígenos que tiene la célula y que pueden participar en diferentes estadios de la enfermedad. La inmunoelectrotransferencia después de la separación del complejo de antígenos por electroforesis puede en cambio analizar respuestas hacia antígenos individuales (Mikolon *et al.*, 1995). Se ha observado que los anticuerpos se elevan primero contra el LPS-L, y después contra el polisacárido B y por último contra proteínas de superficie o internas. Por tanto, la respuesta humoral del huésped a *Brucella* está dirigida contra el LPS-L y otros antígenos de superficie o internos (poli-B y antígeno 2) que han sido usados para el diagnóstico (Mikolon *et al.*, 1995).

Vacunas de *Brucella*

La vacuna Rev 1 es la vacuna oficial en México para caprinos y ovinos y se caracteriza por multiplicarse en el hospedador, causándole una infección activa, pero con una baja persistencia en los tejidos, (Alton, 1966) razón por la cual se considera de baja virulencia y no revierte a patógena, aún en pases continuos (Alton, 1967).

Al administrarse a través del método estandar ($1-2 \times 10^9$ UFC, vía subcutánea) éste es capaz de inducir una prolongada respuesta serológica y causar aborto en los animales gestantes, (Zundel *et al.*, 1992 y Smith, 1994) pero la concentración a 5×10^4 UFC, no causa aborto, ni se excreta en leche. Tampoco interfiere en las pruebas serológicas realizadas posvacunación, (Alton, 1970). Mancera demostró en 1992, que su uso en dosis reducidas produce bajos títulos de anticuerpos de poca duración.

Esta vacuna tiene la capacidad de inducir un alto grado de inmunidad a una dosis de 1.5×10^9 UFC en los 30 meses siguientes a la vacunación sin producir efectos indeseables como la interferencia prolongada con las pruebas serológicas o su excreción (Alton, 1966).

En la actualidad se puede considerar a Rev1 como la mejor vacuna para la prevención de la brucelosis en los pequeños rumiantes (Blasco, 1996). Al aplicarla en borregas gestantes debe considerarse la posibilidad de que cause aborto cuando se inyecta vía subcutánea en dosis normal, (Jiménez, 1989). Sin embargo, al aplicarla en borregas gestantes a dosis de 5×10^8 UFC no tiene efectos adversos y puede detener un brote con abortos en borregas (Blasco *et al.*, 1984).

En su aplicación práctica, se ha comprobado que produce títulos persistentes por periodos indefinidos en adultos, siendo esta una desventaja (Alton 1970, Nicoletti 1994). Esto ocasiona que al realizarse muestreos después de varios años de vacunación y con fines de erradicación para el sacrificio del ganado, estos interfieran en el diagnóstico serológico. La principal desventaja de esta vacuna es su patogenicidad para el humano, (Blasco y Díaz 1993) lo que hace necesaria la búsqueda y diseño de otras vacunas (Festerbank *et al.*, 1982).

Ante esta necesidad y después de años de estudio surge la vacuna RB51, que es una cepa mutante que se originó de la cepa virulenta 2308 de *B. abortus*, la cual al parecer, carece del homopolímero de perosamina de la cadena "O" que se encuentra en su lipopolisacárido, (Schuring *et al.*, 1994) o tiene una menor cantidad de esta molécula que resulta insuficiente para inducir la producción de anticuerpos en animales inmunizados, (Schuring *et al.*, 1994 y Díaz 1991) ya que la mayor proporción de la respuesta inmune humoral está dirigida contra este antígeno, permitiendo usar pruebas convencionales de diagnóstico por estar basadas exclusivamente en la detección de anticuerpos específicos

para el lado de la cadena "O", (Díaz *et al.*,1981, Cheville *et al.*, 1992 y Cheville *et al.*,1993) lo que hace que esta vacuna permita diferenciar animales infectados de vacunados usando pruebas serológicas estandarizadas.

La vacuna RB51 surgió a partir de tres pases de *B. abortus* 2308 en agar soya tripticasa adicionada con diferentes concentraciones de rifampicina y penicilina, produciéndose una cepa con morfología rugosa, después de otros pases en varias concentraciones de rifampicina y penicilina resultó un clon llamado RB 19, el cual no tiene la capacidad de adsorber a Bru38, un anticuerpo monoclonal específico para el homopolímero de perosamina de la cadena "O" de los LPS de *B. abortus*, confirmando la estabilidad de la morfología rugosa (Schuring *et al.*, 1994).

Es posible el desarrollo de una vacuna subcelular efectiva desprovista de LPS que pudiera resolver los obstáculos para la erradicación, como son la detección de animales infectados o latentes. Por otra parte, una prueba diagnóstica que no está basada en la detección de los anticuerpos contra LPS puede considerarse como una buena alternativa para la distinción de animales vacunados de infectados. Actualmente se pueden distinguir títulos de anticuerpos vacunales de títulos por infección, por el decremento en la dosis vacunal y por la observación de que la mayoría del ganado infectado responde al HN de LPS no detectable en animales infectados (Verstreat *et al.*,1982).

A pesar de que las proteínas que están bajo investigación son constituyentes estructurales de la célula y por eso es poco probable su función primaria como factor de virulencia, pueden inducir la respuesta inmune útil en el diagnóstico y conferir la protección. Las PME han sido usadas en otros géneros para la clasificación serológica y como vacunas (Verstreat *et al.*, 1982 , Zygmunt *et al.*,1992).

MARCO REFERENCIAL

Introducción a la clasificación de los microorganismos

Todos los seres procariotas están colocados en el reino *Procaryotae*, .en su rango formal el orden es subsecuente y jerárquico. de modo que los niveles taxonómicos no se empalman, éstos deben de ser usados para indicar los niveles de relación entre las varias clases de bacterias. Dichos niveles son denotados conforme a las reglas de la nomenclatura con nombres latinizados mediante sufijos, para indicar las divisiones (-es), clases (-aceae), órdenes (-ales), familias (-aceae), géneros y especies. La primera publicación válida de los nombres y descripción de cada una de las especies bacterianas validadas fue el International Journal of Systematic Bacteriology (IJSB).

El Comité Internacional de Bacteriología Sistemática (CIBS) es el organismo encargado de asignar la nomenclatura formal a estos microorganismos, se encargan de llevar a cabo revisiones periódicas que son publicadas en las ediciones del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática, las cuales no son consideradas oficiales ya que tienden a modificar el arreglo y filiación de taxa superiores, no obstante es una referencia mundialmente usada. (Collier L, Balows A y Sussman M. 1998)

Este manual reconoce cuatro divisiones del reino *Procaryotae*:

- I Gracilicutes; para las bacterias Gram negativas,
- II Firmicutes ; para las bacterias Gram positivas,
- III Tenericutes; para las bacterias que carecen de pared celular y
- IV Mendosicutes para las Archeobacterias.

El Manual Bergey es considerado un documento taxonómico conservador, ya que utiliza un término provisional y neutral “Sección” para indicar grupos de bacterias similares sin interferir con las relaciones filogenéticas dentro de cada sección,(con excepción de los casos en los que se dispone de evidencia genética) o entre secciones. Más aún, el Manual Bergey no acepta el status de reino de las Eubacterias, arqueobacterias y eucaryotes que fue

sugerido por biólogos moleculares en base a estudios de secuenciación de ARN.

Esta clasificación es de mucha utilidad para los microbiólogos, pero se considera trivial por carecer de mecanismos de definición y regulación que están implícitos para cualquier nomenclatura, razón por la que están expuestos al uso inapropiado y a la fuerte tendencia del uso restringido a ramas específicas de la microbiología, como son la bacteriología aplicada y especializada, ya sea médica, veterinaria o industrial. Por lo que se ocupan de ramas específicas en las que interactúan con diversas bacterias cuyas necesidades de nutrientes, temperatura, pH y potencial de oxido-reducción para su crecimiento o sobrevivencia y su tolerancia a agentes químicos, es muy diferente.

Sistemática microbiana

La sistemática considera el estudio de la diversidad, similaridad e interrelaciones de los microbios con fines de taxonomía. Esta última incluye la clasificación, nomenclatura e identificación de los microorganismos. La clasificación, por su parte, usa el conocimiento de los microorganismos para ordenarlos en grupos similares o relacionados conocidos como taxa. La nomenclatura es el sistema de asignar un nombre a los grupos taxonómicos de acuerdo a los códigos y reglas internacionales. La identificación es el proceso de asignar a un organismo en el grupo taxonómico que pertenece (Joklik Willet.1992).

La clasificación podría estar basada en la evolución o líneas filogenéticas de descendencia, lo cual es muy posible en plantas y animales; pero no en el mundo de las bacterias, donde la morfología es muy similar y la sexualidad es muy limitada, ya que solo pocas bacterias se conjugan y donde no hay registros de fósiles. Obviamente, es necesario trabajar con las bacterias tal y como están hoy en día, incluyendo estudios de ADN, ARN, proteínas y otra información que pudiera contenerse en las macromoléculas de las células, así como sus patrones de regulación y de otras estructuras celulares, sistemas y componentes metabólicos. Y proponer el ofrecimiento hacia el mejor camino para desarrollar las evidencias de la descendencia en la evolución y una verdadera clasificación filogenética. (Joklik Willet.1992).

La clasificación e identificación de las bacterias

Las especies bacterianas son definidas fenotípicamente: Esto significa que cada tipo de bacteria puede ser considerada una especie, tipificada como una colección de cepas que comparten muchas características y difieren considerablemente de otras cepas. Una cepa es la progenie de los subcultivos de una sola colonia, aislada de un cultivo puro. Las especies bacterianas son definidas por estudios estructurales de su forma, tamaño, forma de movimiento, estado de latencia. La reacción a la tinción de Gram y su crecimiento macroscópico, ensayos bioquímicos y nutricionales, productos terminales e información bioquímica de los componentes celulares y metabolitos, ensayos fisiológicos relativos al oxígeno, temperatura, pH, y la respuesta a agentes antibacterianos, ensayos ecológicos y a la composición del ADN, homología y ensayos genéticos(Joklik Willet.1992).

Los biovares o biotipos de especies. En las colecciones de especies bacterianas de cepas interrelacionadas, hay algunos microorganismos que difieren del grupo. La descripción de la especie incluye las principales características dentro de la colección. Hacia el interior de cada colección de especies o grupo se escoge una arbitrariamente, la que mejor represente a esa especie. Esta cepa es conocida como biotipo o biovar de esa especie, y sus características serán utilizadas en adelante para describir a esa especie en particular. Las cepas biotipo son usadas como cepas de referencia y están disponibles en las colecciones de la “American Type Culture Collection” (ATCC) . Muchas de las cepas biotipo pueden exhibir todas las características de las cepas dentro de la colección, por lo tanto se han designado con el nombre de serovar o serotipo, patovar o patotipo, morfotipos o morfovares o fagotipos o fagovares para indicar una particularidad de la variación de la cepa (Joklik Willet. 1992).

El concepto de especie

En la práctica, la identificación y la mayoría del trabajo de clasificación en biología general todavía descansa exclusivamente en la comparación de caracteres fenotípicos. Los bacteriólogos tienen, probablemente, avances en el concepto de especie, y podría llegarse a

esto bajo un consenso razonablemente práctico y aplicado, mas que arbitrario, y sobretodo basado en la hibridización del ADN. (Wiley EO, 1981). Sin embargo, este consenso ha sido confundido con la adopción de una serie de términos que fragmentan el concepto de especie en variantes. Los términos que fueron propuestos son los de genoespecies, que abarcan organismos interfértiles, especies sin nombre. Están también los organismos similares a las cepas tipo y las taxoespecies que comprenden grupos que comparten una alta proporción de propiedades comunes. (Wiley EO, 1981)

Así, el término de especies genómicas rapidamente se confundió con el de genoespecies, abarcando organismos que mostraban una alta secuencia de similitud en el ADN.

El concepto de especie que parece universalmente más aceptado en la práctica es el de taxoespecie: que está formado por un grupo de organismos que muestra una alta similitud en un amplio rango de acercamientos de caracterización y están delimitados por otros organismos por un área de combinaciones de caracteres que son rara vez encontrados en la naturaleza.

Esta definición está implícita en la taxonomía numérica y naturalmente entraña el concepto de la taxonomía polifásica. (Wiley EO, 1981)

Taxonomía numérica

Debido a las diferencias en la construcción de una clasificación basada únicamente en bases filogenéticas y sostenida en características que pueden reflejar las relaciones de evolución, la descripción taxonómica y la clasificación de muchas especies, ha sido revisada desde los años cincuentas en forma de comparaciones numéricas computarizadas de gran número de ensayos fenotípicos. (Sneath PHA, Sokal RR, 1973)

El primer legado fue realizado por Michael Adanson en el siglo XVIII, este sistema da igual peso o valor a todos los ensayos para su comparación. El argumento es que si 50 ó varios cientos de ensayos fenotípicos son examinados la ocurrencia de unas pocas variaciones en los ensayos es minimizada y los resultados de las comparaciones son más

objetivos. La taxonomía numérica entonces revela similitudes y diferencias en los atributos de las bacterias tal y como existen hoy en día, sin referirse al origen genético. (Sneath PHA, Sokal RR, 1973)

La comparación de ensayos entre bacterias de la taxonomía numérica puede ser expresada por el coeficiente de similitud de Jaccard (SJ) o como un simple coeficiente de apareamientos (CA). El SJ incluye solamente características positivas, mientras que el CA, incluye tanto positivos como negativos. Sin embargo otros coeficientes pueden ser útiles para propósitos especiales. Estos coeficientes expresan el porcentaje de ensayos que se tienen en común entre organismos. Las designaciones de grupos conocidos como *phenons* o *taxa* (taxoespecies o taxogenus) son hechos con base a los rangos o grados de similitud. Las taxoespecies son grupos de cepas con una alta similitud fenotípica entre ellas, puede o no incluir genoespecies que son capaces de tener cambios en sus genes. (Sneath PHA, Sokal RR, 1973)

La bacteriología tiende a la caracterización fisiológica y bioquímica, ante la escasez de pruebas de caracterización morfológica y la falta de materiales fósiles necesarios para la filogenia, lo que contrasta con la tendencia prioritaria de la morfología en la microbiología. Y en seguida se hace mención de algunas de estas pruebas de caracterización.

La Quimiotaxonomía

La quimiotaxonomía se desarrolla gracias al interés en las bases químicas de las pruebas inmunológicas y en el mecanismo de acción de los antibióticos B-lactámicos. A partir de estos estudios se entendió con mayor detalle la estructura química de la PC, y los hallazgos de la correlación de otras propiedades con la notable diversidad de estructuras fue crítico para la agrupación de géneros en familias. (Collier L, Balows A y Sussman M, 1998). Sus métodos incluyen la comparación de la estructura macromolecular de las envolturas celulares, particularmente las uniones de polipéptidos de mureína, ácidos teicoicos y teicurónicos, lípidos polares y no polares, así como el mecanismo de transporte de electrones del metabolismo oxidativo y fotosintético, etc. Sin embargo, estos métodos

tienen como desventaja: su costo, lentitud y bajo rendimiento, ya que requieren de personal con amplia experiencia, aunque proveen información química detallada y relevante para la clasificación de las especies, géneros y en niveles supragenéricos (Sneath PHA, Sokal RR, 1973).

Impresión de huellas digitales o Fingerprinting

El Fingerprinting se considera una tecnología de la quimiotaxonomía, sus métodos incluyen el análisis de proteínas en geles de poliacrilamida, espectrometría de masas, y otras menos conocidas. Sus resultados reflejan la composición química de la célula, pero en términos comparativos, mejores que los producidos por elucidación de detalles de la estructura química. Estos métodos utilizan la separación fisicoquímica rápida de las moléculas que producen perfiles que pueden ser comparados para detectar similitudes entre cepas. Los perfiles son a menudo complejos, y la notable diferencia en la naturaleza no puede ser deducida solamente mediante el uso exclusivo de estos métodos. Estas tecnologías se caracterizan por su alto costo de instrumentación, pero los datos producidos se consideran pertinentes para niveles taxonómicos de subespecies y supragéneros. (Collier L, Balows A y Sussman M, 1998).

Genética molecular

Los primeros avances dentro de la base de la clasificación en ADN, se dieron con los ensayos de la proporción de pares de Guanina- citosina y de adenina- timidina. La proporción del contenido de G+C varía ampliamente entre los géneros, pero menos aún dentro de los géneros. Ésta se considera una herramienta útil para detectar homogeneidad dentro del género. A pesar de que diferencias significativas claramente indican disimilaridad, existe cierta parecido en el contenido de G+C, que no necesariamente indica similitud con otras propiedades. Es decir, a pesar de que la proporción de pares de bases puede ser similar, la secuencia de ADN puede diferir ampliamente, y codificar para un patrón metabólico distinto (Collier L, Balows A y Sussman M, 1998).

Posteriormente, las técnicas de hibridización ADN-ADN permitieron la comparación de la compatibilidad de secuencias de bases entre cepas. Esta técnica es reconocida como la prueba definitiva para la similitud a nivel de especies. Las cepas que muestran un porcentaje de unión mayor al 70-75% con una diferencia menor al 5% entre las uniones bajo condiciones astringentes y no astringentes, se considera que pertenecen a una misma especie. La unión a este nivel indica una secuencia de identidad del 96%. Sin embargo, hay antecedentes de anomalías entre resultados de hibridización y clasificación bioquímica en el caso de *Xanthomonas* y *Pseudomonas* que pertenecen a las Enterobacterias. (Collier L, Balows A y Sussman M, 1998).

Otra tecnología de aplicación es la comparación de las secuencias de bases para genes específicos, es la codificación para el 16S rARN de la pequeña subunidad ribosomal.

Taxonomía polifásica

Cada una de estas técnicas es de utilidad dentro de la investigación taxonómica para la clasificación e identificación, aun considerando sus ventajas y desventajas, y juntas con sus resultados pueden robustecer la clasificación general. Las deficiencias de bajo rendimiento, métodos costosos pueden ser compensados probando los miembros típicos de los grupos detectados en alto rendimiento, por técnicas de bajo costo. Las técnicas de alto rendimiento son propias para la búsqueda de largas colecciones de cepas de nuevas especies potenciales. (Sneath PHA, Sokal RR, 1973)

Taxa que son distintas y cohesivas en el vasto rango de técnicas corrientes debieran estar la prueba del tiempo. Colwell, en 1970, sugiere esta aproximación polifásica, pues los reportes basados en una sola técnica aparecen continuamente, pero con frecuencia son desprestigiados posteriormente. Esta creciente inestabilidad de la nomenclatura a nivel del género en algunas áreas de la clasificación pueden bien reflejar las fallas para implementar la taxonomía polifásica. Los taxonomistas deberían reconocer que cada uno de los acercamientos a la caracterización tiene un uso apropiado en forma individual para la construcción de las clasificaciones (Sneath PHA, Sokal RR, 1973).

Visualización de los resultados de un estudio clasificatorio

La presentación de los resultados es uno de los grandes problemas en la taxonomía. Muchos autores escogen esquemas o diagramas como los dendrogramas, o los árboles, con o sin raíz y ocasionalmente los diagramas bi y tridimensionales. Cada uno tiene sus ventajas y desventajas, pero ninguno puede representar totalmente la complejidad de los datos.

Las representaciones tabulares en matrices completa y parcialmente sombreadas muestran la totalidad de los datos, pero son inmanejables y difíciles de interpretar. Muchos microbiólogos prácticos no tienen el conocimiento para interpretar las sutilezas de estos diagramas y varios de los que usan estos programas son taxónomos que generan diagramas de cajas negras, en ignorancia de los principios y deficiencias de los cálculos involucrados. (Sneath PHA, Sokal RR, 1973)

El dendrograma

El dendrograma es una forma de representación que tiene un solo eje que indica similitud entre cepas o entre grupos. La estructura parecida a un árbol representa las fusiones entre cepas o grupos, estrechándose desde los múltiples tipos, cada representación de una sola cepa, de la raíz, una sola línea representa la fusión de todas las cepas en un solo grupo.

Cada punto de la rama en el dendrograma representa la formación de un grupo con un nivel de similitud, intragrupo indicado por la posición de la unión en relación al eje. Donde la unión está entre dos cepas, la similitud se representa sin ninguna distorsión, pero las fusiones entre grupos de cepas llegan a ser sucesivamente menos representativas de similitudes entre cepas de individuos en los grupos.

Sneath and Sokal 1973, desarrollaron un método para construir estas figuras, el grupo principal de propiedades es comparado a estas fusiones de grupo; los grupos formados a bajos niveles de similitud pueden contener tal diversidad de organismos que el grupo principal de propiedades tiene poca relevancia hacia las propiedades de los miembros individuales.

Matrices de similitud, matrices ordenadas y sombreadas de similitud.

Estas matrices representan la similitud entre cepas como números o grado de sombreado en una forma tabular. Las tablas sombreadas son particularmente útiles para destacar los entremezclados al término de los grupos y similitudes entre grupos que no pueden ser aparentes en la topología de un dendrograma. Debiera ser notado, sin embargo, que el orden de las cepas influye marcadamente la claridad de estas matrices.

La Nomenclatura

El CIBS tiene un rol esencial en la guía del desarrollo de la sistemática bacteriana. Es muy importante la comunicación entre los taxonomistas y bacteriólogos para la aceptación de una nomenclatura bacteriana internacional, ya que ésta debe ser convincentemente expuesta a una mayoría que ha decidido preservar la nomenclatura formal que le fue enseñada muchos años atrás.

Estos problemas de comunicación pueden ser atendidos mediante las comunicaciones computarizadas de los cambios y de opiniones en la internet. Un avance mayor es la disponibilidad de una lista de todos los nombres validados (Sneath PHA, Sokal RR, 1973).

Un problema asociado es la creciente brecha entre los métodos de caracterización usados por los taxonomistas y los disponibles para la identificación en la rutina de laboratorio, pues las determinaciones de porcentajes de bases, hibridación de ADN-ADN, la determinación de la secuencia 16Sr ARN y los métodos de quimiotaxonomía no están disponibles para la mayoría de los laboratorios de rutina, ya que además son métodos muy especializados, tortuosos y lentos para su uso común de identificación en la rutina bacteriológica. Sería de gran interés el trabajo conjunto de taxonomistas y microbiólogos aplicados para buscar métodos de caracterización que cumplan con las necesidades de ambas investigaciones y rutinas de trabajo.

Muchos de los cambios en la nomenclatura pueden ser de ayuda al incrementar la capacidad de predecir propiedades importantes para la identificación de rutina. La introducción de la taxonomía numérica, marca una gran ruptura con la influencia botánica,

permitiendo el reconocimiento de la verdadera naturaleza de la variación entre especies bacterianas y disponiendo del bagaje de grupos monotéticos e invariables caracteres de diagnóstico. (Sneath PHA, Sokal RR, 1973)

Actualmente, las pruebas de caracterización permiten la comparación de otros hechos más allá de los fisiológicos y nutricionales con el medio ambiente. Juntos han fortalecido la exploración de la diversidad de las bacterias, las cuales pueden producir descubrimientos inesperados de importancia económica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las cepas de *Brucella melitensis*

El estudio se realizó con veintitrés aislamientos de diferentes regiones del país y tres cepas de referencia. De estos aislamientos trece eran de origen animal y diez de origen humano. Ver Cuadro 1 y 2.

Cuadro 1

CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *B. melitensis* POR SU PROCEDENCIA

Zona Norte	No. de Cepas	Zona Centro	No de Cepas	Zona Sur	No .de Cepas
B.C. Norte	2	D. F.	1	Campeche	1
Coahuila	4	Guanajuato	2	Guerrero	1
Durango	1	Jalisco	1	Michoacán	1
Sonora	2	Querétaro	1	Puebla	3
Zacatecas	2			Tlaxcala	1

Cepas de referencia: Rev 1 (PRONABIVE)

Rev 1 (INRA) Fran.

16M

Cuadro 2

CLASIFICACION DE LAS CEPAS POR SU ORIGEN

Origen	Norte	Centro	Sur	TOTAL
Humano	6	2	5	13
Animal	5	3	2	10
TOTAL	11	5	7	23

Veinte cepas fueron donadas por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE) de la Secretaría de Salud, tres cepas de origen animal fueron donadas por el CENID - Microbiología INIFAP-SAGAR y las cepas de referencia fueron donadas por el Depto. de Microbiología e Inmunología de la FMVZ UNAM.

Las cepas obtenidas de la colección del INDRE estaban conservadas a menos 70° C en leche descremada o polivinilpirrolidona. Estas cepas al ser recuperadas se encontraban en fase rugosa, lo cual se apreció por su morfología colonial y la aglutinación colonial en acriflavina 1:1000.

Inoculación de cuyes con cepas rugosas

Con la finalidad de inducir la conversión de las bacterias de fase rugosa a lisa, se utilizaron cuyes de 12 semanas de edad, los cuales fueron inoculados por vía intratesticular con 1 ml de una suspensión de *B. melitensis* con 1×10^9 ufc/ml. A los cuyes se les practicó la eutanasia entre los 18-20 días posinoculación y sus órganos (hígado, testículo, pulmón, bazo) fueron macerados con solución salina fisiológica para sembrar una muestra de cada órgano por duplicado en medio de Farrel (Alton *et al.*,1975).

Aislamiento, identificación y biotipificación

Una vez obtenido el crecimiento de colonias morfológicamente semejantes a *Brucella* en fase lisa, se procedió a su identificación siguiendo los métodos estándar (Alton *et al.*,1975). Cada una de las cepas lisas se aisló en agar tripticaseína de soya y se identificaron mediante el uso de pruebas bioquímicas, crecimiento en colorantes, resistencia a penicilina y estreptomomicina y la microaglutinación frente a antígenos A y M.²

Cinética bacteriana

Con la finalidad de determinar el momento óptimo para cosechar el cultivo, se realizó la cinética bacteriana de la cepa 16 M y de una cepa de campo de *B. melitensis*. Esto se llevó a cabo en botellas de Roux con medio sólido, usando TSA con 10% de agar-agar. Las botellas se inocularon con 5 ml de una suspensión de *B. melitensis*, a una concentración de 17×10^5 ufc/ml determinada por el método de Miles y Misra correspondiente a una absorbancia de 0.82, a una longitud de onda de 590 nm. Las botellas se incubaron en atmósfera aeróbica a 37° C.

Las fases de crecimiento se determinaron al cosechar el cultivo con 25 ml de solución salina estéril y con lecturas a las 8, 16, 24, 32, 40 y 48 horas (Alton et al.,1975, Gómez y Moriyón 1986 y Sambrook *et al.*,1989).

Obtención de biomasa

Las botellas de Roux se incubaron en atmósfera aeróbica a 37° C durante 36 horas. El cultivo se cosechó con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 y una gota de esta suspensión de bacterias se sembró en placas de TSA para verificar su pureza. Posteriormente se inactivaron en baño María a 70° C durante 60 min. y se verificó este proceso mediante la siembra de una placa de TSA en donde no se obtuvo crecimiento alguno. La suspensión de bacterias se centrifugó a 7000 x g por 15 minutos a 4° C para obtener la biomasa, la cual se observó en forma de pastilla. Esta pastilla fue lavada dos veces con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 a 7000 x g, 30 min. a 4° C, para eliminar residuos del medio de cultivo y se almacenó hasta su extracción a menos 70° C (Gómez y Moriyón 1986, Sambrook *et al* 1989, Towbin *et al.*,1979, Verger y Plommet 1985).

Métodos de ruptura celular y extracción de proteínas de membrana externa (PME).

Se ensayaron varios protocolos de extracción de PME con la finalidad de seleccionar el que diera mayor nitidez y cantidad de proteínas para realizar posteriormente su purificación por electroforesis en geles de poliacrilamida.

Extracción con SDS 4% a 60 C por 60 minutos con lisozima

El paquete celular inactivado fue resuspendido en una solución de lisis (PBS 0.1M, SDS 4%, pH 7.2). La ruptura celular se realizó mediante la congelación en nitrógeno líquido durante 1 minuto y descongelación en baño María a 60° C. La extracción se realizó con la solución de lisis a 60° C durante 60 minutos. Este paso se repitió en cinco ocasiones consecutivas, removiendo en cada paso el sobrenadante centrifugado a 16500 x g 15 minutos. El sobrenadante obtenido en cada paso fue alicuotado e identificado. Al sedimento se le agregó SDS al 40% a 60° C y se hizo una digestión con lisozima (1mg/60 mg de biomasa) a 37° C durante doce horas.

Extracción mediante sonicación y Zwittergent al 10%

El paquete celular inactivado se suspendió en una solución de lisis (50 mM Tris pH 8.0, 5 mM EDTA pH 8.0, 5 mM Iodoacetamida, 1 mM PMSF, 0.1 mM TLCK) y en estas condiciones fue almacenado a -70° C para su posterior extracción. La ruptura celular se realizó por congelación en nitrógeno líquido y descongelación en baño María a 37.5° C durante cinco veces consecutivas. El sedimento fue también sonicado 30 veces durante treinta segundos con periodos de descanso de 1.5 minutos para evitar el calentamiento de la muestra. La extracción se realizó con una solución de TBS (10 mM Tris pH 8, 150 mM

NaCl) ,(Zwittergent^{•BM}, 10%, 1 mM PMSF, 0.1 mM TLCK) incubando en hielo durante 20-30 minutos.

Extracción con sonicación, SDS al 4% y Zwittergent al 0.2%

El paquete celular inactivado fue suspendido en una solución de Tris 50 mM, 0.15 M NaCl y sonicado 30 veces durante 30 segundos con periodos de descanso de 1.5 minutos. Se hizo una primera extracción con SDS 4% durante 60 minutos a 60° C. También se practicó una digestión con lisozima (10 mg/ml) a 37° C durante 24 horas y una segunda extracción con solución de lisis Tris 0.15 M NaCl, Zwittergent 0.2% incubándose en hielo por treinta minutos. El sobrenadante se obtuvo por centrifugación a 111400 x g 30 minutos a 4° C y fue conservado a -70° C hasta su corrimiento electroforético.

Extracción con sonicación y 0.5% de Tritón X-100

La ruptura celular se hizo a base de congelación-descongelación en nitrógeno líquido y baño María a 37° C así como sonicación en 15 ciclos de 30 segundos a 12 micrones. La extracción se hizo con una solución de lisis (300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM PMSF, 0.1 mM TLCK, 0.5% Triton X-100* y se incubó en hielo durante sesenta minutos. Se centrifugó a 3220 x g 15 minutos y se obtuvo el sobrenadante, el cual se centrifugó por segunda ocasión a 29200 x g 30 minutos. La pastilla de proteínas obtenida se almacenó con los inhibidores de proteasas antes mencionados a -20° C.

^{•BM}

* Calbiochem

Sonicación hasta clarificación y 0.5% de Tritón X-100

En este caso se realizaron modificaciones al protocolo anterior: El paquete celular obtenido una vez inactivado a 70° C durante 60 minutos es dividido en 3 o 4 partes, las cuales se procesaron por separado. Cada parte fue suspendida en 35 ml de la solución antes mencionada adicionada de inhibidores de proteasas y sonicado a 30 micrones por periodos de un minuto y descansos de 1.5 minutos hasta la clarificación de la suspensión. La extracción se realizó con Tritón X-100 al 0.5% a 37° C en baño María durante 60 minutos. Posteriormente se centrifugó a 4640 x g 15 minutos y el sobrenadante se ultracentrifugó a 2,060 x g 30 minutos a 4° C. La pastilla de proteínas obtenida se resuspendió en 200-250 µl de la solución de lisis sin Tritón .

Sonicación por 40 minutos y 2% de Tritón X-100

La pastilla fue resuspendida en una solución de lisis (10 mM Na₂PO₄ pH 7.2, 5 mM Iodoacetamida, 0.1 mM TLCK, 1 mM PMSF) y las células se rompieron por sonicación durante 40 minutos a 6° C. La fracción insoluble fue removida por centrifugación (300 x g, por 2 minutos) y el sobrenadante fue centrifugado (300 x g, 30 minutos a 4° C) para obtener las membranas. Las proteínas fueron solubilizadas con detergente Tritón X-100 al 2% (30 minutos a 37° C). Se centrifugaron (300 x g, 30 minutos a 4° C) para obtener la membrana celular externa, las cuales fueron resuspendidas en 2 veces su volumen con solución de fosfatos pH 7.2

Extracción de proteínas de membrana externa

Conforme a la valoración de los protocolos anteriormente descritos se estableció que el método por el cual se obtuvieron mejores resultados fue el de sonicado por 40 minutos Tritón X-100 al 2%. Este método se utilizó para la extracción de proteínas de todos los aislamientos.

Cuantificación de proteínas

La concentración de proteína en los extractos se determinó por el método de Bradford.⁴ Se utilizó una curva estándar de seroalbúmina de bovino con diluciones dobles una solución de trabajo de 1 mg/ml, pH 7.4. Se incluyó una solución blanco de 10 mM Na₂HPO₄ utilizada para el proceso de extracción. Las muestras se colocaron en microplacas de fondo plano y se les adicionó el reactivo de Bradford (100 mg de azul de Coomassie 6250, 50 ml de etanol al 95%, 100 ml de ácido fosfórico al 85%). Se incubaron por cinco minutos a temperatura ambiente y la lectura se realizó a 595 nm de longitud de onda por medio de un lector de ELISA*(Mod. 3550).

Perfiles electroforéticos en SDS-Page

El análisis se realizó en un gel de poliacrilamida al 12% siguiendo el método de Laemmli 1970. Se usó una solución de muestra con 25 mM Tris, pH 6.8, 2.5% de 2-mercaptoetanol; 2% SDS, 15% glicerol y cristales de azul de bromofenol (Gómez y Moriyón 1986, Zygmunt et al.,1990). Las muestras de proteína se ajustaron a 300 µg, y se suspendieron en la solución de muestra, calentándose a 100° C por 5 minutos. Para la preparación de los geles se utilizó un aparato Mini Protean II*(Mod. 11000/1500). Los perfiles electroforéticos de las PME obtenidas de las diferentes cepas de *B. melitensis*, se visualizaron utilizando la tinción de plata (Ochs et al.,1981).

Estimación del peso molecular de las proteínas

El peso molecular aproximado de las bandas de proteína en los geles se determinó comparando su migración con la de los marcadores de peso molecular para proteína de amplio rango (BMW) y de bajo peso molecular (LMW).^{®BioRad}

Producción de sueros hiperinmunes de cuye contra *B. melitensis*

Se inocularon cuyes de doce semanas aproximadamente con 1 ml de la suspensión bacteriana de cada cepa a una concentración de 1×10^9 ufc/ml, vía subcutánea en el abdomen. Tres semanas después fueron sangrados en blanco y a cada suero se le practicó la prueba de Rosa de Bengala y Fijación de Complemento para verificar su seroconversión.

Análisis por inmunoelectrotransferencia

El análisis inmunoelectroforético se hizo conforme al protocolo descrito por Towbin, 1979, utilizando geles de poliacrilamida al 12 y membranas de nitrocelulosa (0.45 μ m)^{©Millipore} y para la transferencia de proteínas, con una solución de transferencia (25 mM de Tris, 192 mM glicina, 20% v/v alcohol metílico). La electrotransferencia se realizó durante 60 minutos a 100 voltios, en un aparato Mini Trans-blot.^{®BioRad}. Las membranas fueron bloqueadas con TBST (10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) con gelatina^{♦Difco} al 3% durante treinta minutos. Después de lavar con TBST, las membranas fueron cortadas en tiras de aproximadamente 0.5 mm de ancho, y se enfrentaron a sueros de cuye durante 12 horas en una dilución 1/1000 adicionados con gelatina al 1% e inhibidores de proteasas (PMSF 10 mM) con 0.01 % de Timerosal.

El conjugado de Proteína A^{*Sigma} se diluyó a 1/1000 con marcador de peroxidasa. Se utilizó una solución de revelado a base de 4cloro-naftol' y peróxido de hidrógeno (20 ml de etanol, 60 mg de 4-cloroNaftol, 100 u1 de H2O2, 100 ml de TBS). Para control de la transferencia, los geles fueron teñidos posteriormente con azul de Coomasie (Gómez y Moriyón 1986, Verstrete *et al* 1982, Zygmunt *et al* 1994).

©Millipore

®BioRad

♦Difco

*Sigma

Análisis estadístico

Se efectuaron pruebas de índices de similitud de Dice para los perfiles electroforéticos de los aislamientos estudiados utilizando el paquete computacional SAS, se obtuvo el porcentaje de frecuencias de las bandas de proteínas encontradas por aislamiento.

El análisis estadístico de los grupos y la obtención de la matriz sombreada y el dendrograma se obtuvieron con el paquete computacional S-PLUS.

RESULTADOS

Cinética de crecimiento bacteriano

Se llevó a cabo la cinética de crecimiento de la cepa 16M y del aislamiento N6 de *B. melitensis* con lecturas a partir de las 8 horas de incubación hasta las 50 horas. Ver Figura 1. De acuerdo con los datos antes mencionados se determinó que la fase Lag se presenta aproximadamente a las 8 hrs, la fase Log a las 16 hrs y el inicio de la fase estacionaria a las 32 hrs.

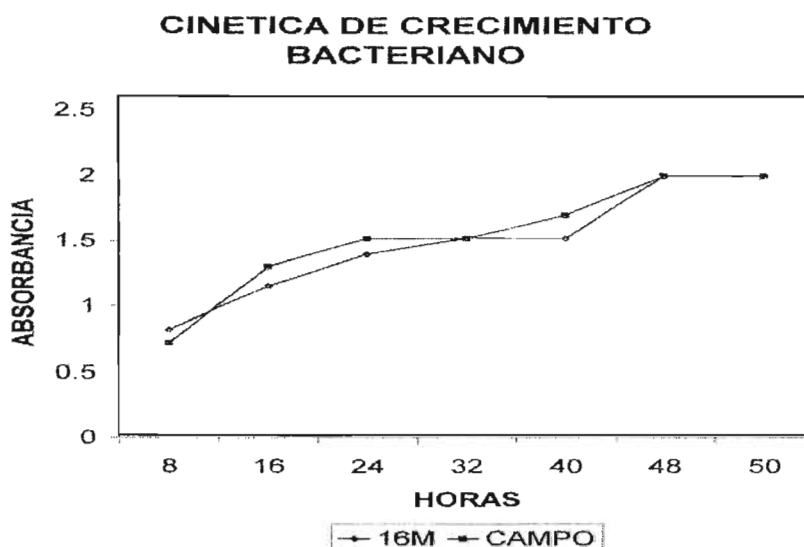


Figura 1. Cinética de crecimiento bacteriano de 2 cepas de *Brucella melitensis*, cepa 16M y una cepa de campo.

En la mayoría de los ensayos se observó mayor nitidez y cantidad del extracto de proteínas, en los geles de electroforesis que correspondían a las cepas cosechadas a las 32 hrs, razón por la cual todos los aislamientos tuvieron este tiempo de incubación.

Biotipificación de las cepas de *B. melitensis*

Se determinó que los aislamientos de *B. melitensis* pertenecen a los biotipos 1 y 3; un 64% de los aislamientos de humanos son del biotipo 1, mientras que el 36%

corresponden al biotipo 3. En cuanto a los aislamientos de origen animal, un 60% pertenece al biotipo 3 y el 40% al biotipo 1 (Cuadro 3).

Cuadro 3
BIOTIPIFICACION DE AISLAMIENTOS DE de *B. melitensis*

Zona Norte		Zona Centro		Zona Sur	
Identificación	Biotipo	Identificación.	Biotipo	Identificación.	Biotipo
N1	1	C1	1	S1	3
N2	1	C2	3	S2	NB
N3	3	C3	1	S3	1
N4	NB	C4	1	S4	3
N5	NB	C5	NB	S5	1
N6	1	C6	1	S6	1
N7	1			S7	3
N8	NB				
N9	NB				
N10	NB				
N11	3				

NB No pertenecen a estos biotipos.

Métodos de extracción de proteínas de membrana externa

De los seis diferentes métodos de extracción, los tres primeros no se consideraron porque aportaban pequeñas cantidades de proteínas y de pobre calidad. En el cuarto método a base de sonicación y 0.5% de Tritón X-100 se observó una mejoría en la calidad, sin embargo, la cantidad de proteína obtenida fue escasa. En el quinto protocolo donde se sonico hasta clarificar y con 0.5% de Tritón X-100, las proteínas obtenidas fueron escasas y se degradaban rápidamente, observando solamente en el primer corrimiento electroforético la calidad necesaria para su purificación. En el sexto método se manejó Tritón X-100 al 2%, este último aportó buena calidad y mayor cantidad de proteínas, por lo que se siguió utilizando para la extracción de proteínas de membrana externa de la totalidad de los aislamientos estudiados (Figura 2).

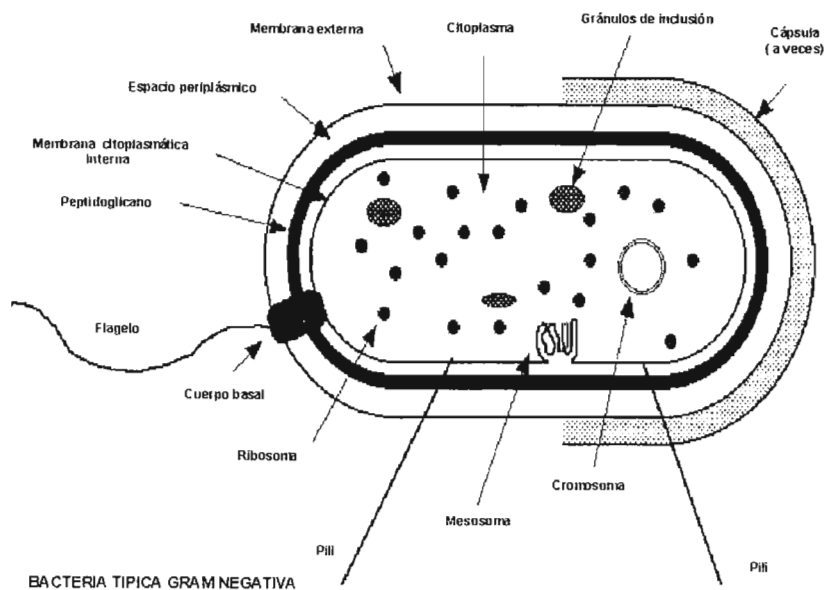


Figura 2. Estructura celular de una bacteria Gram negativa.

Perfil electroforético de proteínas de membrana externa de *B. melitensis*

El perfil electroforético observado incluye 20 bandas que varían desde 15 a 84 kDa, de las cuales las bandas de 17, 34, 45, 58, 66 y 77 kDa son las más prominentes (Figuras 3-10).

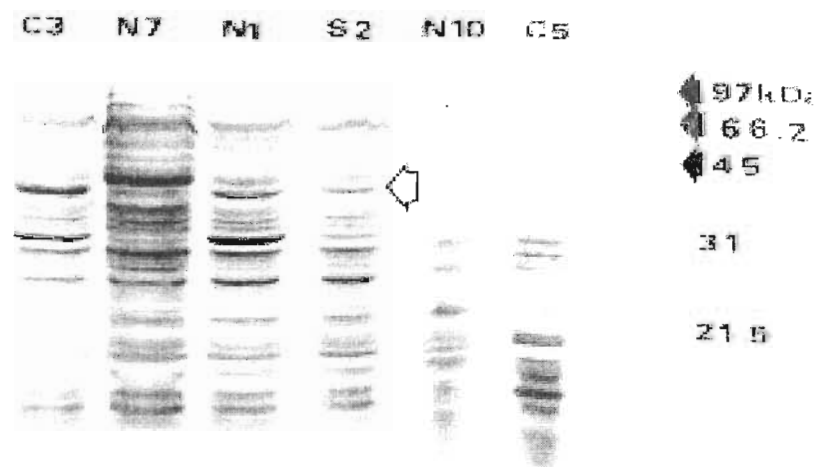


Figura 3. Perfil electroforético de proteínas de membrana externa de *B. melitensis* C3, N7, N1, S2 y C5. La flecha blanca indica una variación en el patrón de bandas que corresponden a 40 kDa y 36 kDa de las 4 cepas.

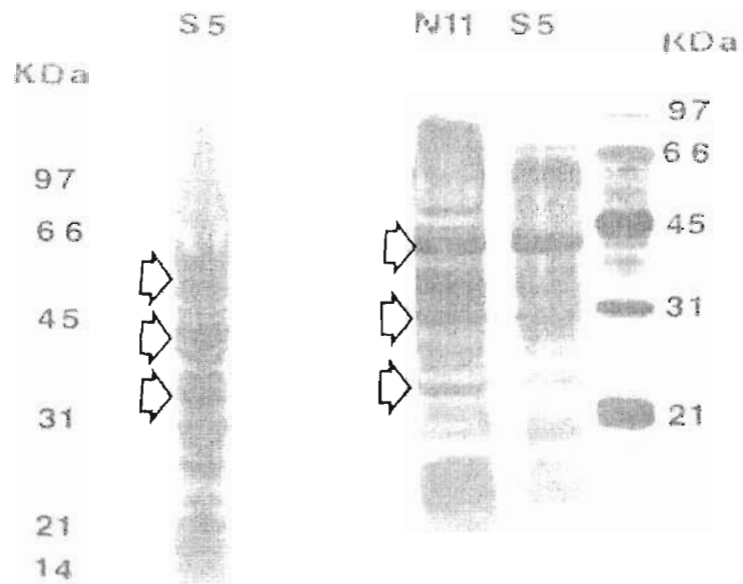


Figura 4.- Perfil electroforético de proteínas de membrana externa de varias cepas de *B.melitensis*.

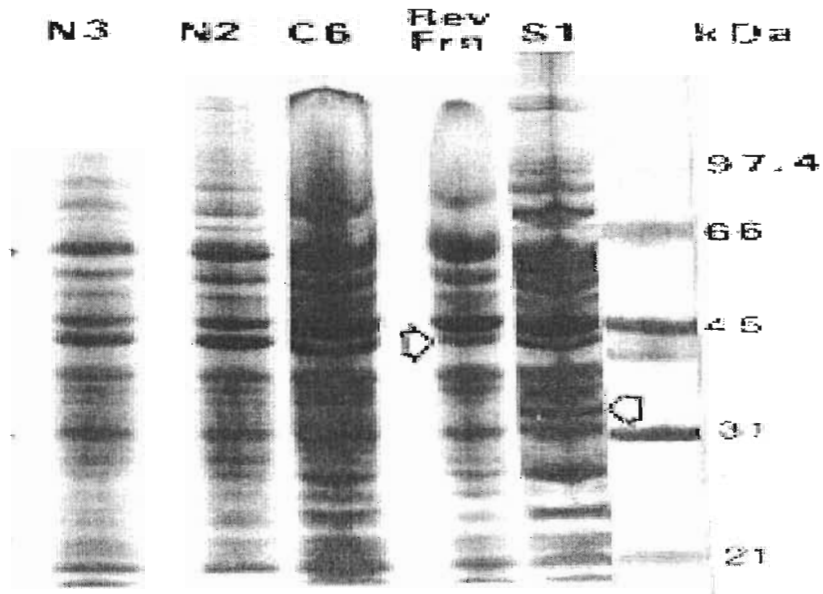


Figura 5. Perfil electroforético de las proteínas de membrana externa de *B. melitensis* N3, N2, C6, Rev Fran y S1. La flecha blanca indica una modificación en la banda de 36 kDa.

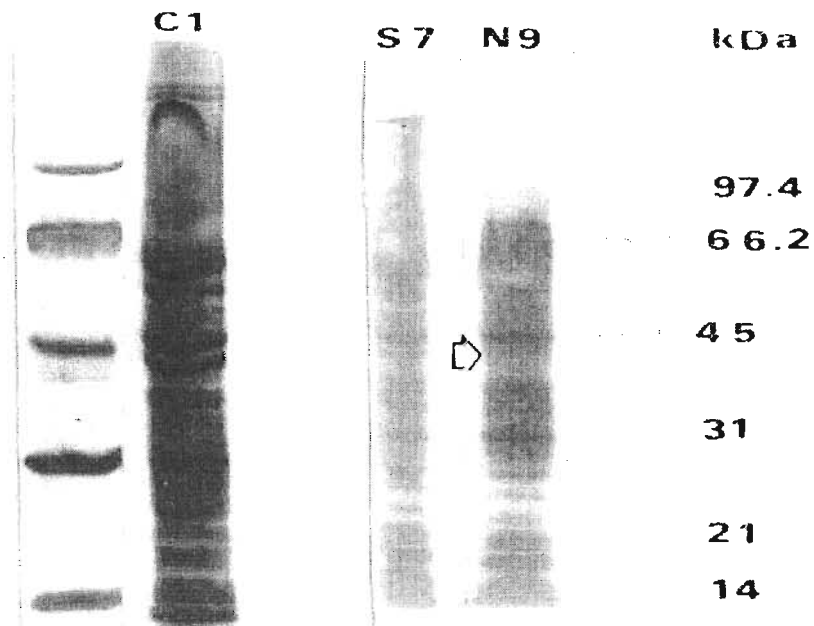


Figura 6. Perfil electroforético de los aislamientos de *B. melitensis* C1, S7 y N9 con marcador de peso molecular. La flecha indica una modificación en la banda de 36 kDa.

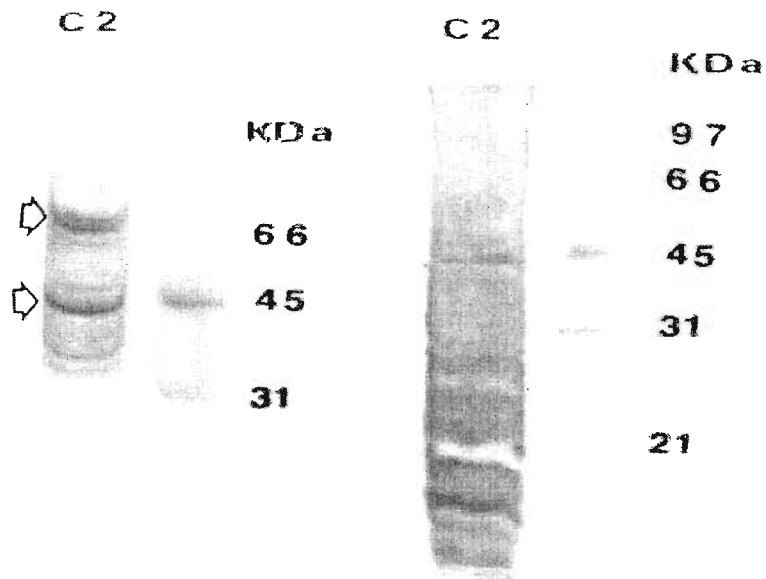


Figura 7. Perfil electroforético de proteínas de membrana externa de *B. melitensis* en la cepa C2.

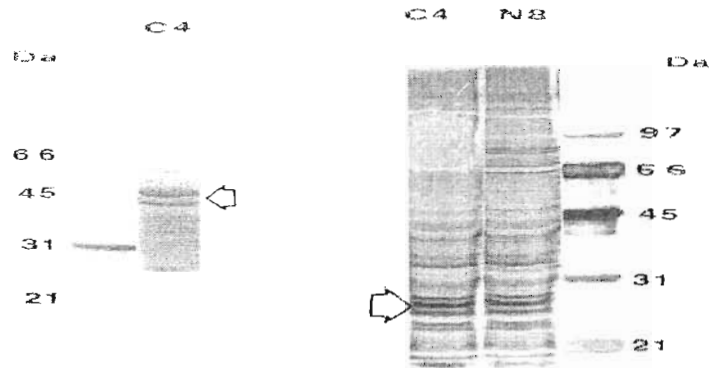


Figura 8.- Perfil electroforético de proteínas de membrana externa de *B.melitensis* cepas C4 y N8.

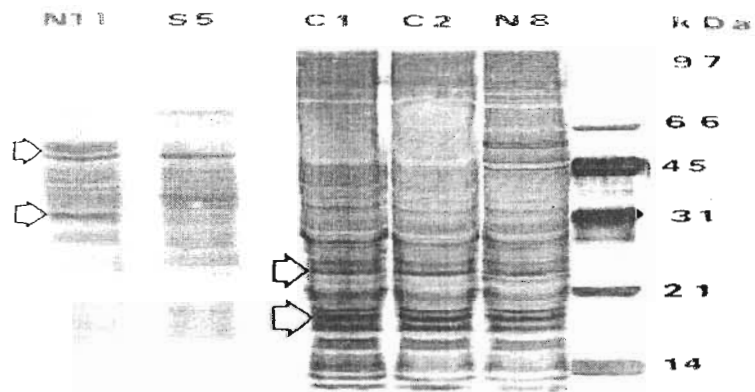


Figura 9.- Perfil electroforético de proteínas de membrana externa en varias cepas de *B.melitensis*.

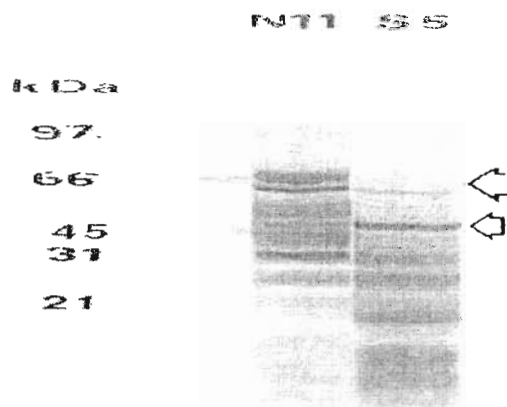


Figura 10.- Perfil electroforético de proteínas de membrana externa de *B.melitensis* cepas N11 y S5.

Se observaron diferencias en la presencia y ausencia de bandas en los diferentes aislamientos, así como en la concentración de algunas bandas, esta comparación se hizo tomando como referencia el aislamiento N3 y considerando las bandas entre los rangos de 45-66 kDa, de 31-45 kDa y de 21-31 kDa.

Cuadro 4
 CLASIFICACIÓN POR ZONA GEOGRAFICA DEL NÚMERO DE BANDAS EN
 LOS PERFILES ELECTROFORÉTICOS DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA
 DE 27 CEPAS DE *Brucella melitensis*.

Bandas kDa	Norte	Centro	Sur	Rev.Mex	Rev.Fr	16M
66	1	1	1	1	0	1
60-62	5	0	2	0	1	0
55-57	1	1	1	0	0	0
50-53	0	1	1	0	0	0
45-46	4	1	3	0	1	0
38-40	9	4	1	1	0	1
36-38	2	3	0	0	0	1
31-34	1	3	02	0	0	0
29-31	4	1	0	0	0	0
26-27	2	0	1	0	0	0
25	0	1	0	0	0	0
20	0	1	0	0	0	0
19	1	1	0	0	0	0
17	1	1	0	0	0	0

1. - En el primer rango (45-66 kDa), el 100% de los aislamientos se observaron bandas de 59-60 kDa, 48-49 kDa y de 46-47 kDa.
2. - En el segundo rango (31-45 kDa), en el 100% de las cepas, se observaron bandas de 40-41 kDa, 36-37 kDa y de 31-32 kDa. En este rango, un 43.5% de las bandas presentaron variaciones.

3. - En el tercer rango (21-31 kDa), el 100% de los aislamientos presentaron bandas de 29-30 kDa, 27-28 kDa y de 21-22 kDa.

Cuadro 5

FRECUENCIA DE LAS BANDAS DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA
EN LAS CEPAS DE *B.melitensis* DE DIFERENTES REGIONES EN MÉXICO

Norte	%	Centro	%	Sur	%	C.Ref	%
N1	94.4	C1	100	S1	100	Rev Mex	94.44
N2	100	C2	77.77	S2	94.44	Rev Fr	88.88
N3	100	C3	94.44	S3	94.44	16 M	100
N4	100	C4	83.33	S4	100		
N5	94.44	C5	55.55	S5	83.33		
N6	100	C6	94.44	S6	72.22		
N7	100			S7	100		
N8	100						
N9	100						

Los aislamientos del biotipo 1 presentaron una mayor variación en comparación con los otros biotipos de las cepas, pero si se considera el origen de los aislamientos, los provenientes de humano presentaron la mayor variación.

Las principales bandas observadas en los aislamientos estudiados son: 45 - 46 kDa, 38-40 kDa, 36 - 38 kDa, 31-34 kDa, 29-31 kDa, 26-27 kDa y 19 kDa. Ver Cuadro 4, 5 y Figuras 3-10.

Las bandas menores que se observaron son: 84-85 kDa, 73-77 kDa, 66 kDa, 60-62 kDa, 55-57 kDa, 50-53 kDa, 34-36 kDa, 25 kDa, 23 kDa, 20 kDa, 17 kDa y 15-14 kDa. Ver Cuadro 4 y Figura 7-10.

Producción de sueros hiperinmunes de cuye

Los aislamientos bacterianos inoculados a los cuyes, produjeron títulos positivos a la prueba de Rosa de Bengala a los 18-20 días pos-inoculación, pero solo 9 sueros de 27 que se produjeron fueron positivos a la prueba de Fijación de Complemento con títulos de 1:4 (1), 1:16 (3), 1:32 (2), 1:64 (3).

Inmunoelectrotransferencia

Los corrimientos electroforéticos de los extractos de PME de las cepas Rev1 Mx, 16M, N1, N2, C6, S3 y S6 fueron transferidos a membrana e incubados con sueros homólogos y heterólogos de cuye, observándose la expresión de las siguientes bandas. (Cuadro 5).

Los 10 sueros hiperinmunes evaluados (Rev 1 Mex, Rev 1 Fr, 16M, N1, N3, N6, N7, C6, S3 y S6), reaccionaron a la banda de 25 kDa. (Cuadro 5 y Figura 13).

Las extracciones de proteínas de la cepa Rev 1 Mx y el aislamiento S6 no tuvieron reacción a las bandas de 17 y 19 kDa, lo cual fue evidente para las otras extracciones. (Cuadro 6 y Figura 11 y 12).

Las bandas con menor reactividad fueron las de 50 y 36 a 38 kDa, pues solo un suero hiperinmune reaccionó para cada una de ellas, correspondiendo a N1 y C6 respectivamente. (Cuadro 6 y Figura 11 y 12).

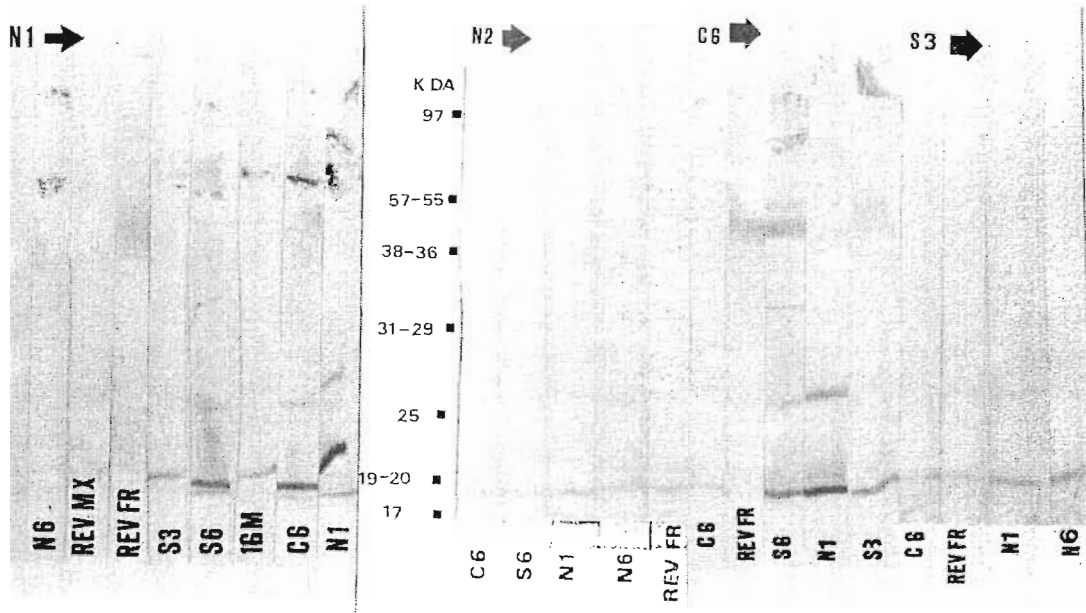


Figura 11.-Análisis de inmunoelectrotransferencia, se observa reactividad en la banda correspondiente a 19-20 kDa, 25 kDa, 29-31 kDa de las proteínas de membrana externa de las cepas N1, N2, C6 y S3 de *B.melitensis*

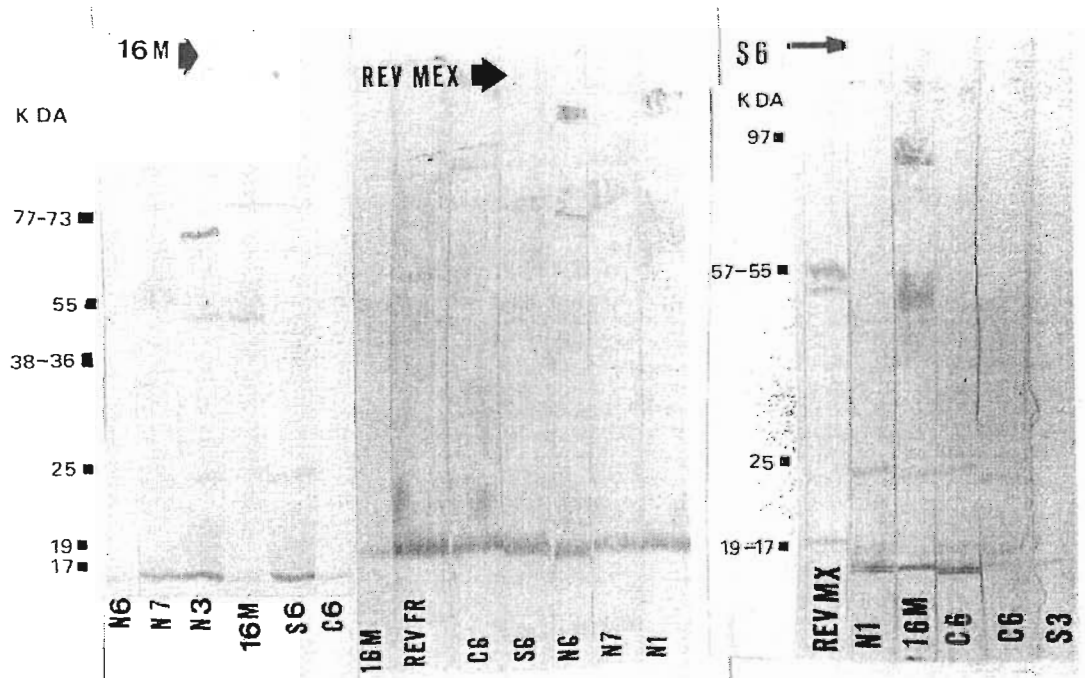


Figura 12.-Análisis de inmunoelectrotransferencia, se observa reactividad en la banda correspondiente a 19-20 kDa, 25 kDa y 55 kDa de las proteínas de membrana externa de las cepas 16M RevMex y S6 de *B.melitensis*

Cuadro 6

SUEROS CON REACTIVIDAD A INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

Bandas kDa	Cepas de <i>Brucella melitensis</i>						
	Rev.Mex	16M	N1	N2	C6	S3	S6
66-97	4		6		5		
73-77		4	2				
66		1	1				
55-57		1	1		2		2
50			1				
36-38					1		
34-36	9	1				3	
31-34		1			1		
26-27			2	3			
25	11	3	4	4	3	2	3
19		7	9	6	5	6	
17		8	9	6	5	6	

Las bandas de 66 a 99 kDa mostraron reactividad difusa y solamente en 3 de 7 (42.85%) extracciones de proteínas. (Cuadro 6 y Figura 11 y 12)

Las bandas de 26 a 27 kDa, de 31 a 34, de 34 a 36, de 55 a 57, de 66 y de 73 a 77 kDa tuvieron reacciones inconstantes para los extractos proteicos probados. (Cuadro 6 y Figura 11 y 12).

Análisis estadístico

Los perfiles electroforéticos de proteínas se analizaron con base en la presencia y concordancia de las bandas entre cada uno de los aislamientos, siendo 18 de 20 bandas las que coinciden en todos los casos. Esta concordancia se calcula mediante el índice de similitud de Dice. (Figura 13).

El 70.37 % de los aislamientos son muy similares, el 29.62 % tiene diferencias y en el 11.11 % estas son muy marcadas.

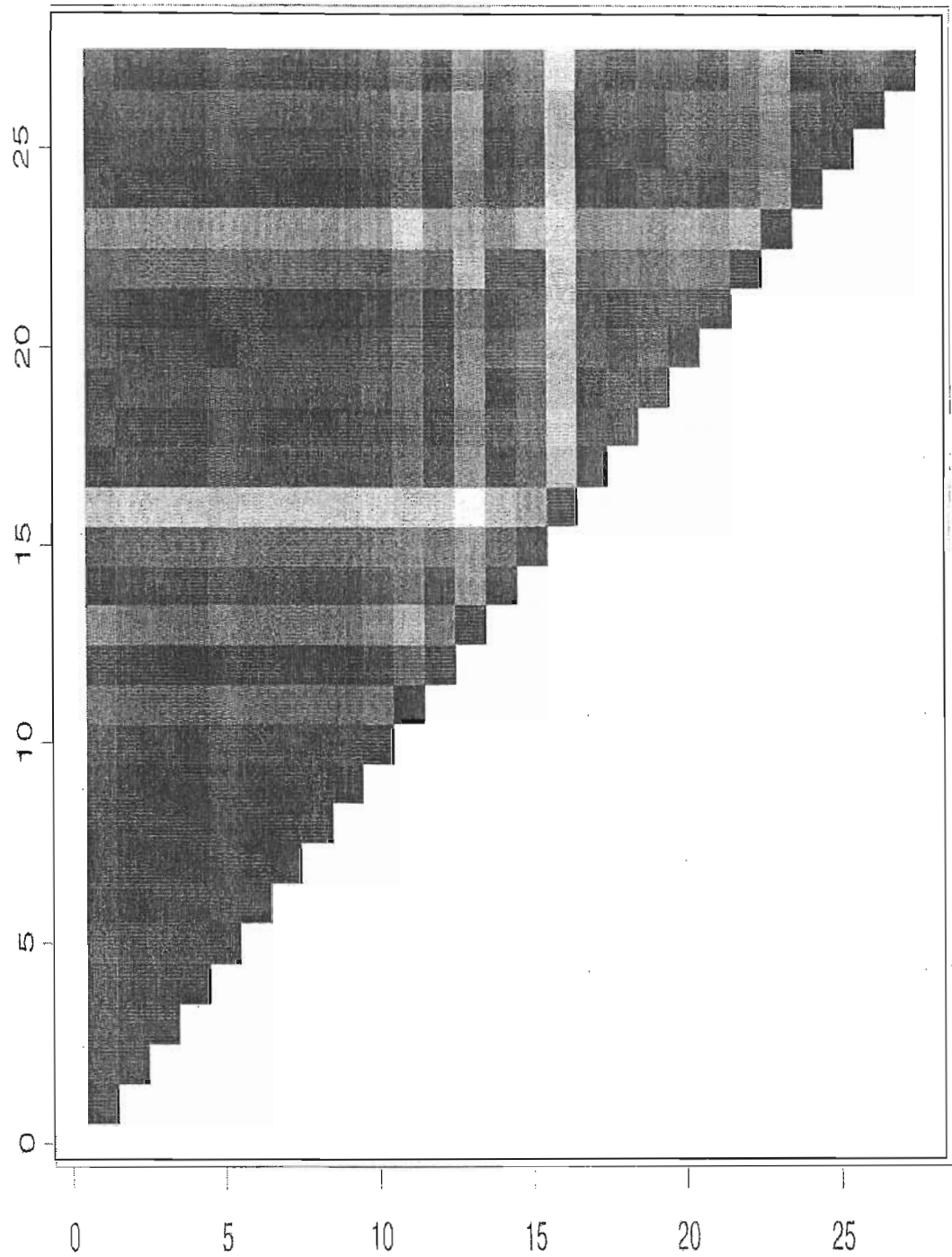


Figura 13.- Matriz sombreada de similitud de proteínas de membrana externa de 27 cepas de *B. melitensis* procedentes de diferentes zonas geográficas de México.

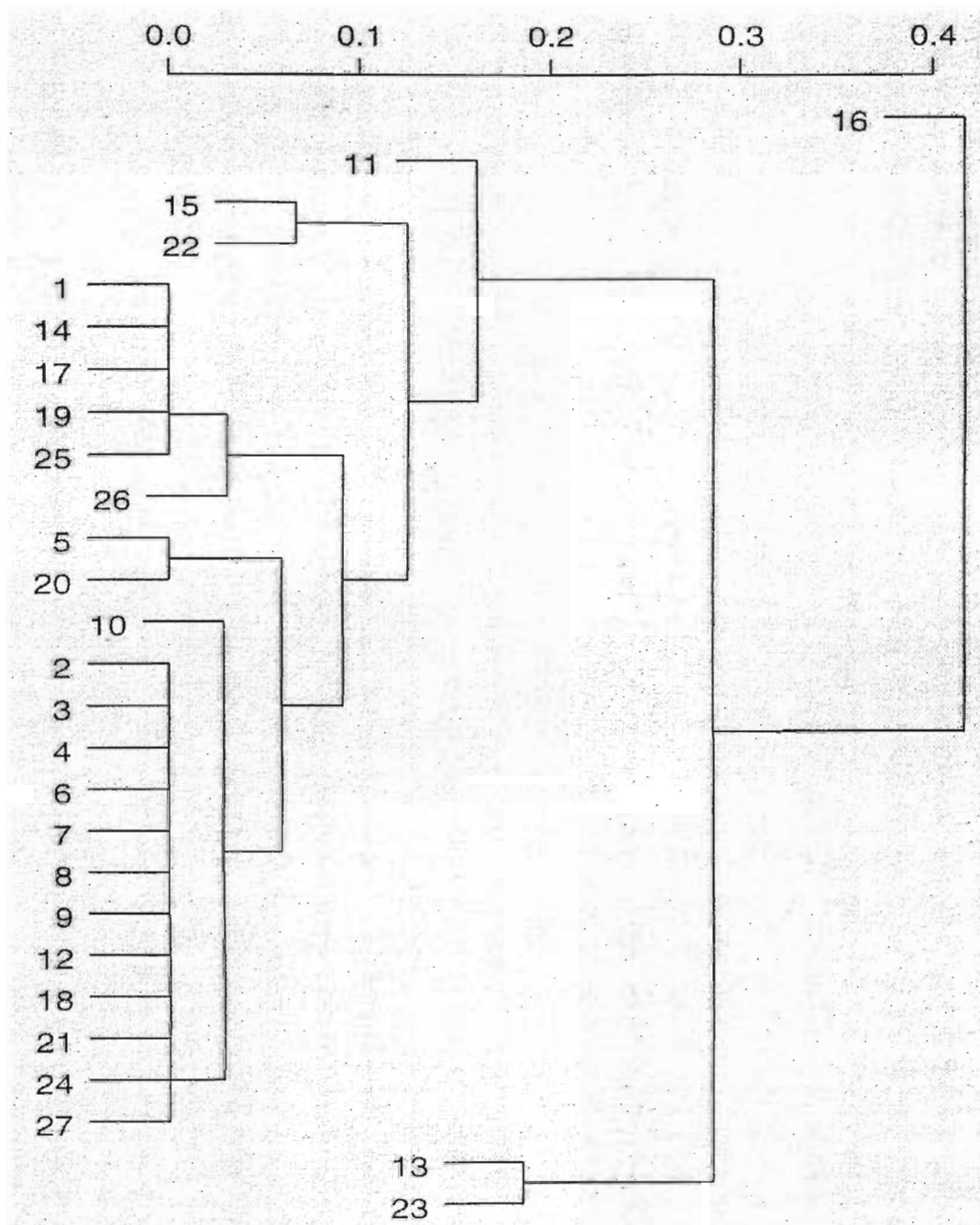


Figura 14.- Dendrograma de similitud de proteínas de membrana externa de 27 cepas de *B.melitensis* procedentes de diferentes regiones de México.

DISCUSIÓN

La caracterización de las proteínas de membrana externa de *B. melitensis* obtenidas de diferente origen y procedencia geográfica, reveló un perfil electroforético con un 70.37% de similitud entre ellas; para lograr la caracterización de las cepas se realizaron algunos procedimientos que se describen a continuación.

Biotipificación de las cepas de *B. melitensis*

En este estudio, los aislamientos de *B. melitensis* de origen humano fueron en su mayoría del biotipo 1. Mientras que en los aislamientos de origen animal predominó el biotipo 3. Sin embargo, el Centro Panamericano de Zoonosis reporta al biotipo 1 de *B. melitensis* como el más frecuente en México y en el Continente Americano.

Cinética bacteriana

La cinética bacteriana y la obtención del paquete celular se llevó a cabo en botellas de Roux con Agar tripticosa soya. La cuantificación de proteína del paquete celular determinó que se obtuvo dos veces más proteína bacteriana en botellas de Roux con Agar Tripticosa soya en comparación con lo obtenido en Caldo Tripticosa soya con agitación. Esto contrasta con lo observado por Verstreat *et al.*, 1982; así como lo señalado por Moriyón y Berman en 1983; quienes utilizaron caldos Albimi y Tripticosa soya con agitación respectivamente para estudiar el paquete celular de *Brucella*.

De acuerdo con los resultados aportados por la curva de crecimiento bacteriano de la cepa de referencia y de una cepa de campo en este estudio se determinó que a las 32 horas después de la inoculación se presenta el inicio de la fase exponencial tardía, en la cual se obtuvieron extractos de proteína con mayor nitidez y cantidad.

Santos *et al.*, 1984 determinaron las fases de crecimiento para *B. abortus* 4520 a partir de caldo y estimaron la fase media log a las 16 horas, la fase exponencial-tardía a las 24 horas y la fase estacionaria a las 48 horas. La fase exponencial-tardía para este estudio se presentó ocho horas después, esto pudiera atribuirse a la permanencia de las cepas en congelación a -20° C durante mucho tiempo. Como lo demuestran Mills CK y

Gherna RL,1988 al observar una pérdida de la viabilidad posterior a la criopreservación de 6.5 log por congelación y almacenamiento a -65°C durante 2 años. Cabe resaltar que esta pérdida de la viabilidad se presentó independientemente del crioprotector que usaron (glicerol y caldo Brucella Albimi).

Para incrementar la viabilidad y recuperar la fase lisa de las cepas de *Brucella*, donadas para el estudio, fue necesaria su posterior reconversión a la fase lisa por inoculación en cuyes, sucesos que afectaron las fases de crecimiento de las cepas.

Gamazo *et al.*, 1993, menciona que para *B. melitensis* y *B. ovis* en la fase de crecimiento exponencial se liberan espontáneamente vesículas de ME ricas en PME del grupo 3. Douglas *et al.*,1984 realizó la extracción de proteínas a partir de *B. abortus* cepa 19 en caldo Albimi en agitación durante la fase exponencial tardía. Sin embargo, Schurig *et al.*,1981 llevó a cabo la extracción de antígenos a las 72 horas de crecimiento de *B. abortus* a partir de caldo tripticasa soya adicionado de un 2% de agar. Por otra parte Garin *et al.*,1990; y Bowden *et al.*,1995 usan extractos celulares de 48 horas, crecidos en agar base sangre con 5% de sangre normal de equino y agar tripticasa soya con extracto de levadura y 5% de suero de equino normal.

Evaluación de los métodos de extracción de proteínas de membrana externa

Extracción con SDS 4% a 60 C por 60 minutos con lisozima.

La ruptura celular por congelación y descongelación seguida de la extracción con SDS al 4% y lisozima, no dio resultados satisfactorios pues se obtenía poco sobrenadante y una pastilla de proteínas muy pequeña.(Res 1^a) Mediante esta técnica el autor reporta PME de los grupos 1, 2 y 3 así como una banda adicional de 48 kDa. En el grupo 2 se observa una banda difusa que es más obvia en las cepas lisas.

Extracción mediante sonicación y Zwittergent al 10%

La congelación y descongelación de la cepa en una solución de lisis con EDTA, TRIS e inhibidores de proteasas aunados a la sonicación y la extracción con Zwittergent

produjo una ligera mejoría en el tamaño de la pastilla obtenida, sin embargo, se observaron reacciones indefinidas o difusas a lo largo del corrimiento electroforético, sin la apreciación de alguna banda nítida. Nielsen 1990 menciona que, la ME de *Brucella* no es afectada por EDTA por lo tanto se excluye la posibilidad de producir esferoplastos con lisozima para separar la MI de la ME.

Extracción con sonicación, SDS al 4% y Zwittergent al 0.2%

En el caso de la sonicación y extracción con SDS 4% y Zwittergent 0.2% no se observaron resultados favorables, pues se encontraron reacciones indefinidas a lo largo del corrimiento electroforético. Nielsen 1990 señala que el uso de detergentes no iónicos en la extracción de PME de *Brucella* es menos eficiente en comparación con *E. coli*. Además, los detergentes aniónicos como el SDS tienen poca acción en sus envolturas celulares. Se sabe que las PME del grupo 2 detienen más ácidos grasos que el *OmpC* o la PME equivalente de *E. coli* cuando se usan los mismos métodos de purificación.

Extracción con sonicación y 0.5% de Tritón X-100

A través de la congelación y descongelación, aunado a la sonicación y extracción con TritónX-100 al 0.5%, se obtuvieron pastillas de proteínas de mayor volumen y se observaron bandas en SDS-PAGE que no tenían calidad aceptable. No obstante que el Tritón es un detergente no iónico, tiene un menor efecto desnaturalizador que solubiliza las proteínas de membrana y mantiene las interacciones de proteína a proteína. En este estudio persiste la aparición de reacciones indefinidas o manchones atribuidos posiblemente a la presencia de LPS y degradación de proteínas.

Sonicación hasta clarificación y 0.5% de Tritón X-100

El protocolo anterior se modificó aplicando ultracentrifugación, en este caso se observó una notable mejoría en la calidad de las proteínas obtenidas, sin embargo, el volumen de proteína obtenida fue muy escaso, por lo que no se aplicó en los diferentes aislamientos. Riezu-Boj *et al.*,1990 extrajeron PME de *B. ovis* mediante ultracentrifugación (100,000 X g X 5 horas) y Sarcosyl con Zwittergent , de esta forma obtuvieron proteínas de 67, 22.4, 21.5, 19.5 y 18 kDa. Sin embargo, reporta la presencia

de LPS en extractos de detergentes, los cuales pueden interferir en la detección de anticuerpos contra el grupo 3 de PME.

Sonicación por 40 minutos y 2% de Tritón X-100

La ruptura celular por sonicación hasta clarificar y el uso de TritónX-100 al 2% aportaron corrimientos electroforéticos de buena calidad y con un volumen apropiado de proteínas para realizar varios ensayos a diferentes concentraciones. En 1990, Cloeckaert *et al.* extrajeron PME de *B. melitensis*, mediante ultracentrifugación (53,000 x g x 1.5 horas) con TritónX-100 al 1% y obtuvieron múltiples bandas en dobletes o tripletes por SDS-PAGE usando anticuerpos monoclonales versus 25-27, 31-34 y 36-38 kDa. También se revelaron bandas menos teñidas y más difusas de peso molecular inferior a 31 kDa. Este método resultó ser el más adecuado, por lo que se utilizó con una concentración de proteínas de 300 µg/ml para la electroforesis en gel de poliacrilamida.

Perfil electroforético de proteínas

Mediante la metodología previamente descrita se observó un perfil electroforético de 15 a 84 kDa, las bandas de 17, 34, 45, 58, 66 y 77 kDa son las más prominentes. Cloeckaert *et al.*, 1992, reporta un perfil que va de 10 a 89 kDa para *B. abortus* y el mismo autor en 1994 menciona a las proteínas de 25-27 kDa, 31-34 kDa y 36-38 kDa como mayoritarias para *B. melitensis*. En el presente estudio tales bandas son mayoritarias, así como también lo son las de 45-46 kDa, 38-40 kDa y 19 kDa. (Figura 3-12). En cuanto a esta última banda, el mismo autor con otros colaboradores la reporta como minoritaria para *B. melitensis* en 1994, lo cual no coincide en este estudio. De igual forma, la banda de 45-46 kDa que Zygmunt *et al.*, 1992 reporta como minoritaria para *B. melitensis*, en este estudio fue una banda mayoritaria.

Inmunoelectrotransferencia

CloECKaert et al.,1992 reporta la reactividad positiva para las bandas mayoritarias de 25 a 27 kDa, 36 a 38 kDa, las consideradas minoritarias de 10, 16.5, 19 y 89 kDa y el reconocimiento de las de 40 y 80 kDa por suero de bovinos infectados. En este estudio, la banda de 25 kDa presenta una fuerte reacción, contraria a la reacción débil, reportada en bovinos con *B. abortus* (Figura 13). Esta banda fue aparente tanto para sueros heterólogos como homólogos. Mientras que la de 34 a 36 kDa presenta reacción positiva entre las cepas de referencia y los aislamientos de campo. Se observa a su vez reacción para las bandas de 17 y 19 kDa lo cual coincide con lo reportado por el autor antes mencionado. En la zona de 66 a 97 kDa en varios casos se observó una reacción difusa.(Figura 13).

Análisis estadístico

El índice de similitud de Dice es ampliamente utilizado por la taxonomía numérica en la clasificación de los microorganismos, pues es posible detectar con éste los parecidos y diferencias entre cepas para la definición de las fronteras de las taxa y la asignación de la nomenclatura oficial por género y especie a las cepas en estudio. En este caso, al confrontarse los perfiles electroforéticos de las 27 cepas bacterianas estudiadas, se encontró un 70.37% de similitud entre ellas con base en la concordancia de las bandas de proteína de membrana externa.

LITERATURA CITADA

1. Alton GG, Jones LM, Pietz DE. Laboratory techniques in Brucellosis. 2nd ed., Geneva: World Health Organization, 1975.
2. Alton GG, Lois M.J, Angus RD, Verger JM. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Paris, Francia. Institut National de la Recherche Agronomique, 1975.
3. Alton GG. Duration of the immunity produced in goats by the Rev1 *Brucella melitensis* vaccine. J. Comp Path 1966: 76; 241-253.
4. Alton GG, Elberg SS. Rev1 *Brucella melitensis* vaccine. Vet Bull. 1996: 37; 793-800.
5. Alton GG, Elberg SS, Crouch D. Rev1 *Brucella melitensis* vaccine, the stability of the degree of attenuation. J Comp Path 1967: 77; 293.
6. Alton GG. Vaccination of goat with reduced doses of Rev1 *Brucella melitensis* vaccine. Res Vet Sci 1970: 54; 54 -59.
7. Baumgarten D. Brucellosis: a short review of the disease situation in Paraguay. Veterinary Epidemiology 2002: 90; 63-69.
8. Blasco JM, Estrada A, Mercadal M. note on adult sheep vaccination with reduced dose of *Brucella melitensis* Rev 1. Ann Rech Vet 1984: 15; 553-556.
9. Blasco JM. A review of the use of *B. melitensis* Rev1 vaccine in adult sheep and goats. Prev Vet Med 1996: 31; 275-283.
10. Blasco JM, Díaz R. *Brucella melitensis* Rev1 vaccine as a case of human brucellosis. The Lancet 1993: 347: 805.
11. Bowden RA, Cloeckaeer A, Zygmunt MS, Bernard S, Dubray G. Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. Infect Immun 1995: 63; 3945-3952.
12. Bradford MM. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical bioch. 1976: 72; 248-254.
13. Bricker JB, Halling MS. Differentiation of *Brucella abortus* bv.1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv.1 by PCR. J Clin Microbiol 1994: 32; 2660-2666.
14. Cheville N F. Ann. N.Y. Acad.Sci. 2000: 916;147-153.
15. Cloeckaeert A, Kerkhofs P, Limet J N. Antibody response to *Brucella* outer membrane proteins in bovine brucellosis: Immunoblot analysis and competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1992: 30; 3168-3174.

16. Cloeckaert A, P de Wergifosse, Dubray G. Identification of seven surface- exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: Immunogold labeling for electron microscopy and enzyme linked immunosorbent assay. *Infect Immun* 1990; 58; 3980-3987.
17. Collier L, Balows A, Sussman M. Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infections. 9th ed. Vol.2 Systematic Bacteriology. London. Sydney. Auckland 1998. 45- 59.
18. Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal . Memoria de la 5ta Reunión Anual. Comité Brucelosis. 1996. México, D.F. 268-274.
19. CONETB-SAGAR, FEDMVZ. Manual de actualización técnica para la aprobación del médico veterinario en tuberculosis bovina y brucelosis. Comisión Nacional para la erradicación de la tuberculosis bovina y brucelosis. Secretaria de agricultura, ganadería y desarrollo rural, Federación de Colegios y asociaciones de médicos veterinarios zootecnistas de México A.C. 1996.
20. Díaz AE. Pruebas diagnósticas en brucelosis caprina. Memorias del Congreso Internacional de Producción . Zacatecas, México. 1995:51-59.
21. Díaz R, Jones LM, Leons D and Wilson JB. Surface antigens of smooth *Brucella*. *J. Bacteriol* 1981; 96: 893-901.
22. Dirección de Tuberculosis Bovina y Brucelosis. CANETB Informe Anual 2000. Resultados Preliminares. CANETB, DGSA, CONASA, SAGARPA.
23. Douglas JT, Rosenberg EY, Nikaido H, Verstreat DR., Winter AJ. Porins of *Brucella* species. *Infect Immun* 1984; 44: 16-21.
24. Cheville NF, Jensen AE, Hallin SM, Tatum FM, Morfitt DC, Hennager G, Frerichs WM, Schuring GG. Bacterial survival, lymph node changes and immunologic responses of cattle vaccinated. With a standard and mutant strains of *Brucella abortus*. *Am J Vet Res* 1992; 53; 1881-1888.
25. Cheville NF, Stevens MG, Jensen AE, Tatum FM, Halling SM. Immune response against and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. *Am. J Vet Res* 1993; 54; 1591-1597.
26. FAO 1997. *El estado mundial de la agricultura y alimentación*. En colección FAO: Agricultura No 30 Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
27. Festerbank R, Pardon P, Marly J. Comparison between subcutaneous and conjuntival route of vaccination with Rev1 strain against *Brucella melitensis* infection in ewes. *Ann Rech Vet* 1982; 13; 295-301.

28. Ficht TA, Bearden SW, Sowa BA, Adams LG. DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 1989; 57; 3281-329.
29. Ficht TA, Hussein HS, Derr J, Bearden SW. Species-specific sequences at the omp2 locus of *Brucella* type strains. *Int J Syst. Bacteriol* 1996; 46; 329-331.
30. Forestier C, Moreno E, Merese S, Phalipon A, Olive D, Sansonetti P, Gorvel JP. Interaction of *Brucella abortus* lipopolysaccharide with major histocompatibility complex class II molecules in B-lymphocytes. 1999; 67; 4048 – 4054.
31. Gamazo C, Moriyon I. Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infect Immun* 1987; 55; 609-615.
32. Gamazo C, Vitas AI, Moriyón I, López-Goñi I, Díaz R. *Brucella* group 3 outer membrane proteins contain a heat-modifiable protein. *FEMS Microbiology Letters* 1993; 112; 141-146.
33. Gamazo C, Winter AJ, Moriyón I, Riezu-Boj JI, Blasco J.M, Díaz I. Comparative analyses of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 1989; 1419-1426.
34. Garin BB, Bowden RA, Dubray G, Limet JN. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting analysis of smooth lipopolysaccharide heterogeneity among *Brucella* biovars related to A and M specificities. *J Clin Microbiol* 1990; 28; 2169-2174.
35. Gómez MJM, Moriyón I. Demonstration of a peptidoglycan-linked lipoprotein and characterization of its trypsin fragment in the outer membrane of *Brucella spp.*. *Infect Immun* 1986; 53; 678-684.
36. Guerrero LML, Monroy LJF. Valor predictivo de dos técnicas diagnósticas de Brucelosis Bovina en Tizayuca. *Memorias del XXI Congreso Nacional de Buiatría*. 1986.
37. Gurría FJ. Importancia de la erradicación de la brucelosis en México. *Memoria Brucelosis III Foro Nacional*; 1998 Julio 20-21; Acapulco Guerrero, México. México, D.F. : SAGAR-UNAM-OPS. 5-11.
38. Jahans KL, Foster G, Brought ES. The characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Veterinary Microbiology* 1997; 57; 373-382.
39. Jiménez de Bagues MP, Marin CM, Barberan M, Blasco JM. Responses of ewes to *B. melitensis* Rev1 vaccine administered by subcutaneous or conjunctival routes at different stages of pregnancy. *Ann Rech Vet* 1989; 20; 205-213.

40. Joklik W, Amos, Winfert 20th. Zimsser Microbiology 1992. Appleton and Lange, Norwalk Connecticut Editors.
41. Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970: 227; 680-685.
- 42 López Merino A. A brucellosis review in Latin America. Young E.J. Corbel MH, Editors. Brucellosis. CRC Press Inc. 1989: 151-171.
- 43 López-Merino, Migrañas-Ortiz. Seroepidemiología de la brucellosis en México. Salud Pública de México 1992: 34; 210-230.
44. López-Merino A. *Brucella*. Instituto Politécnico Nacional. Imagen biblioweb.dgsca.UNAM.mx/libros/microbios/imagenes/esquema3.jpg 10/06/2002.
45. Luna JE. Comité de Brucellosis: Normatividad y Control de Calidad. Memoria de la 5^o Reunión Anual del Consejo Técnico Consultivo Nacional de Salud Animal. 1996 .
46. Luna-Martínez JE, Mejía-Terán C. Brucellosis in México: current status and trends. Veterinary Microbiology 2002: 90; 19- 30.
47. Mancera MA, Díaz AE, Vázquez NJ, Velásquez QK, Suárez GF, Flores CR. Vacunación de cabras con la cepa Rev1 de *Brucella melitensis* en diferentes dosis: evaluación serológica y desafío. Vet Mex 1992: 2; 117-123.
48. Mikolon BA, Hernández de AJ, Gardner IA. Aspectos epidemiológicos del brote de Brucellosis caprina en el Valle de Mexicali, Baja California, México (1993-1994). Memorias del Congreso Internacional de Producción Caprina; 1995. 49-50. Zacatecas, México.
49. Mobasher H, Ficht TA, Marquis H, Lea EJA, Lakey JH. *Brucella* Omp 2a and Omp2b porins: single channel measurements and topology prediction. FEMS Microbiology Letters 1997: 155; 23-30
50. Moreno E, Cloeckert A, Moriyón I. *Brucella* evolution and taxonomy. Veterinary Microbiology 2002: 90; 209- 227.
51. Moreno, E. (2002). *Brucellosis in Central America*. Veterinary Microbiology 90: 31-38
52. Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Mayer H. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a ph with members of the alfa-2 subdivision of the class Proteobacteria. J Bacteriol 1990: 7; 3569- 3576.
53. Moriyón I, Berman DT. Isolation, purification and partial characterization of *Brucella abortus* matrix protein. Infect Immun 1983;39;394-402.
54. Moriyón I. Structure of the cell envelope. 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference 1997. Noviembre 8-9; Chicago (Illinois) USA. 1997: 3-18.
55. Muñoz O, Coll R, Cerda MS, Gutierrez G. Seroepidemiología de la brucellosis en la República Mexicana. Gac Med Mex 1976: 3; 103-108.

56. Nicoletti, PL. The control of brucellosis (*Brucella melitensis*) in small ruminants. Memoria del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Acapulco, México. 1994. 524
57. Nielsen K, Duncan JR. Animal Brucellosis. CR Press. E.U.A. 1990: 20-75
58. Norma Oficial Mexicana. NOM-022-SSA2-1994. Para la prevención y control de la brucelosis humana, en el primer nivel de atención. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 30 de noviembre de 1995.
59. Ochs DC, McConkey EH, Sammons DW. Silver stains for proteins in polyacrilamide gels: A comparison of six methods. Electrophoresis 1981; 2: 304-307.
- 60 Palmer DA, Douglas JT. Analysis of *Brucella* lipopolysaccharide with specific and cross – reacting monoclonal antibodies. J Clin Microbiology 1989; 27; 2331-2337.
- 61 Riezu-Boj JI, Moriyon I, Blasco JM, Gamazo C. Antibody response to *B.ovis* outer membrane proteins in ovine brucellosis. Infect Immun 1990: 489-494.
62. Roop II, RM, Jeffers G, Bagchi T, Walker J, Enright FM, Schuring GG. Experimental infection of goat fetuses in utero with a stable rough mutant of *Brucella abortus*. Rech Vet Sci. 1991; 51; 123-127.
- 63 Ross HM, Jahans KL, Mac Millan AP, Reid RJ, Thompson PM, Foster G. *Brucella* species infection in North Sea seal and cetacean populations. Veterinary Records 1996: 138; 647-648.
- 64 Salman MD. Epidemiology of Brucellosis. Memorias del Congreso Internacional de Producción Caprina 1995. Zacatecas, México. 1995; 44-48.
65. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor 1989.
66. Santos JM, Verstrete DR, Perera VY, Winter AJ. Outer membrane proteins from rough strains of four *Brucella* species. Infect Immun 1984; 46;188-194.
67. Schurig GG, Pringle AT, Breese SS Jr. Localization of *Brucella* antigens that elicit a humoral immune response in *Brucella abortus*-infected cattle. Infect Immun 1981; 34; 1000-1007.
68. Schurig GG, Sriranganathan N, Toth T, Hopec J, Enright F, Boule S. *Brucella abortus* strain RB51 a promising vaccine candidate for *Brucella* eradication programs. Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias Acapulco, México.1994.
69. Serrano-Trejo MA y Rodríguez-Verdugo M. Congruencia diagnóstico terapeutica en el manejo de la brucelosis aguda del adulto en la Unidad de Medicina Familiar No.1 del Instituto Mexicano del Seguro Social de Ciudad Obregón, Sonora. 2004. Memorias de la X Reunión de Investigación en Salud.
70. Smith CM and Sherman MD. Goat Medicine. Lea Fbiger. United States of America. 1994.

71. Sneath PHA, Sokal RR. 1973. Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classification : Association coefficients. WH. Freeman and Company, San Francisco 129- 136.
72. Suarez GF. Brucelosis: Un viejo problema de actualidad. Memorias del Congreso Internacional de Producción Caprina. Zacatecas, México. 1995: 49-50.
73. Towbin HT, Staehlin, Gordon J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocelulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci. 1979: 76; 4350-4354.
74. Velazco J, Díaz R, Grilló M J, Barberán M, Marín C, Blasco J M, Moriyón I. Antibody and delayed – type hypersensitivity responses to *Ochrobactrum anthropi* cytosolic and outer membrane antigens in infection by smooth and rough *Brucella* spp. Clin Diagn Lab Immunol 1997: 4; 279-284
75. Verger JM, Plommet M. *Brucella melitensis*. Martinus Nijhoff Publishers for The Commision of the European Communities. Francia. 1985. 1-20, 123-137.
76. Verstrete DR, Creasy MT, Caveney NT, Baldwin CL, Blab MW, Winter AJ. Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: Isolation and characterization. Infect Immun 1982: 35; 979-989.
77. Verstrete DR, Winter AJ. Comparison of sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis profiles and antigenic relatedness among outer membrane proteins of 49 *Brucella abortus* strains. Infect Immun 1984: 46;182-187.
78. Wiley EO. 1981. Phylogenetics: The theory and practice of phylogenetic systematics. Wiley, New York.
79. Winter AJ, Verstrete DR, Hall CE, Jacobson RH, Castleman WL, Meredith MP, McLaughlin CA. Immune response to porin in cattle immunized with whole cell, outer membrane, and outer membrane protein antigens of *Brucella abortus* combined with trealosa dimycolate and muramyl dipeptide adjuvants. Infect Immun 1983: 42; 1159-1167.
80. Zundel E, Elberg JM, Crayon M, Michael R. Conjuntival vaccination of Pregnant ewes and goats with *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine safety and serological responses. Ann Rech Vet 1992: 23; 177-188.
81. Zygmunt MS, Alj Debbarh HS, Cloeckert A, Dubray G. Antibody response to *Brucella melitensis* outer membrane antigens in naturally infected and Rev 1 vaccinated sheep. Vet Microbiol 1994: 39; 33-46.
82. Zygmunt MS, Charles J.M, Dubray G. Analysis of immune response: comparison of immunoblots after isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate- polyacrilamide gel

electrophoresis using cytoplasmic protein extract from *Brucella*. FEMS Microbiology Letters 1990: 70; 263-268.

83. Zygmunt MS, Gilbert FB, Dubray G. Purification, characterization, and seroactivity of a 20-Kilodalton *Brucella* protein antigen. J Clin Microbiol 1992: 30; 2662-2667.

APENDICE

INDICE DE SIMILITUD DE DICE

INDICE DE SIMILITUD DE DICE

Cepas de Brucella	CENTRO																		SUR							REV		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
1	1	0.9714	0.9714	0.9714	0.9411	0.9714	0.9714	0.9714	0.9411	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714
2	0	1	1	1	0.9714	1	1	1	1	0.9714	0.99	1	0.875	0.9714	0.99	0.7142	0.9714	1	0.9714	0.9714	1	0.99	0.8387	1	0.9714	0.9411	1	1
3	0	0	1	1	0.9714	1	1	1	1	0.9714	0.96	1	0.875	0.9714	0.99	0.7142	0.9714	1	0.9714	0.9714	1	0.99	0.8387	1	0.9714	0.9411	1	1
4	0	0	0	1	0.9714	1	1	1	1	0.9714	0.99	1	0.875	0.9714	0.99	0.7142	0.9714	1	0.9714	0.9714	1	0.99	0.8387	1	0.9714	0.9411	1	1
5	0	0	0	0	1	0.9714	0.9714	0.9714	0.9411	0.875	0.9714	0.8387	0.9411	0.875	0.7407	0.9411	0.9714	0.9411	1	1	0.9714	0.875	0.8	0.9714	0.9411	0.99	0.9714	1
6	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0.9714	0.99	1	0.875	0.9714	0.99	0.7142	0.9714	1	0.9714	0.9714	1	0.99	0.8387	1	0.9714	0.9411	1	1
7	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0.9714	0.99	1	0.875	0.9714	0.99	0.7142	0.9714	1	0.9714	0.9714	1	0.99	0.8387	1	0.9714	0.9411	1	1
8	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0.9714	0.99	1	0.875	0.9714	0.99	0.7142	0.9714	1	0.9714	0.9714	1	0.99	0.8387	1	0.9714	0.9411	1	1
9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.9714	0.99	1	0.875	0.9714	0.99	0.7142	0.9714	1	0.9714	0.9714	1	0.99	0.8387	1	0.9714	0.9411	1	1
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.875	0.9714	0.8387	0.9411	0.875	0.6666	0.9411	0.9714	0.9411	0.9411	0.9714	0.5535	0.8	0.9714	0.9411	0.99	0.9714	1
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.969	0.7586	0.875	0.6666	0.72	0.875	0.569	0.875	0.875	0.875	0.99	0.8565	0.7142	0.99	0.875	0.8387	0.99	1
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.875	0.9714	0.99	0.7142	0.9714	1	0.9714	0.9714	1	1	0.99	0.8387	1	0.9714	0.9411	1	1
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.8387	0.3275	0.5933	0.8387	0.875	0.8387	0.8387	0.9714	0.9375	0.8666	0.9714	1	0.9666	0.9714	1
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.9375	0.7407	1	0.9714	1	0.9411	0.9714	0.9375	0.8666	0.9714	1	0.9666	0.9714	1
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.8	0.9375	0.99	0.9375	0.875	0.99	0.9333	0.857	0.99	0.9375	0.9332	0.99	1
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7407	0.7142	0.7407	0.7407	0.7142	0.72	0.6666	0.7142	0.7407	0.762	0.7142	1
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.9714	1	0.9411	0.9714	0.9714	0.9714	0.8666	0.9714	1	0.8996	0.9714
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.9714	0.9714	1	0.9714	0.9411	1	0.9666	0.9714	1	1
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.9411	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	1
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	0.9714	1
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.99	0.8387	1	0.9714	0.9411	1	1
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.7857	0.99	0.9375	0.9332	0.99	1
23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.8387	0.8666	0.9375	0.8387	1
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.9714	0.9411	1	1
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.9666	0.9714	1
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.9411	1
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1