



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

**ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN EN LAS
PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA Y
DEL PERFIL DE CORTE CON
ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN DE LA
CEPA RB51 DE *Brucella abortus* ANTES Y
DESPUÉS DE SU INOCULACIÓN EN CUYES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTAN:
JAVIER HIROHITO GÓMEZ TRUJILLO
IMELDA MARTÍNEZ RAZO

ASESOR: DR. JOSÉ FRANCISCO MORALES
ÁLVAREZ

COASESOR: DRA. BEATRIZ ARELLANO
REYNOSO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

Javier

- * Le dedico la culminación de este proyecto a mi PADRE principalmente, gracias por tu apoyo incondicional.
- * También le dedico esta tesis a mi MADRE, HERMANOS y a los nuevos SOBRINOS para todos ellos gracias por todo el apoyo brindado para terminar esta etapa de vida.
- * A mi ESPOSA que siempre me a impulsado a subir un escalón mas para alcanzar las metas.

Imelda

- * A ti Javier por estar a mi lado, ayudarme en esto y lograrlo juntos, es un peldaño mas de nuestra vida juntos, es un triunfo más que logramos juntos. TE AMO y no deajo de agradecer tu amor.
- * A mis padres por darme las armas para abrirme paso en la vida, hacerme entender que las cosas cuestan y da gusto terminarlas sobre todo cuando te han costado mucho, y ustedes saben que este paso nos ha costado mucho, gracias por darme una carrera profesional y una educación.
- * A Gris, porque nuestra relación ha sido difícil pero al final te agradezco que estés ahí cuando te necesito, gracias por darme un sobrino tan hermoso.
- * A Daniel porque jamás creí que los pilones fueran tan buenos.

- * A mis tíos Pilar y Armando, porque siempre he tenido su apoyo y me han ayudado a empezar a ejercer mi carrera, sobre todo por su confianza para tocar a sus mascotas.
- * A mis amigos: Nelly, Inés, Diana, Rubén, Mario, Luis, Alberto, Chiquis, Alejandro, Memo. Gracias por su amistad y su apoyo en el momento que me hizo falta.
- * A mis abuelitos† y hermana† que ya no los tengo físicamente pero se que están a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

Javier

- * Le agradezco a la UNIVERSIDAD por haberme dado la oportunidad de forjarme como profesional dentro de sus instalaciones.
- * A mis profesores por compartirme todos sus conocimientos.
- * Y a mis asesores que me enseñaron el camino de la investigación.

Imelda

- * Al Dr. Francisco Morales por ayudarnos a terminar este trabajo, por tenernos paciencia y darnos nuestro primer trabajo, fue un placer trabajar con Usted.
- * A la Dra. Beatriz Arellano por sus consejos para tener un trabajo digno de presentar.
- * Al Dr. Efrén Díaz por su apoyo cuando no encontrábamos la salida y enseñarnos a ver las cosas simples.
- * Al INIFAP por abrirnos sus puertas para trabajar en nuestra tesis y como profesionales.
- * A Maricela, Sara, Idalia, Dr. Jesús Vázquez, Dr. Víctor Tenorio, Dr. Arturo Mancera por darnos consejos, ayudarnos en momentos complicados, por darnos la mano, gracias.
- * A los cuyes que dieron su vida involuntariamente para lograr este trabajo.

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Generalidades 1

Salud Pública 2

Características del agente 3

Transmisión 6

Patogenia 7

Vacunas 7

Diagnóstico 12

Supervivencia 13

JUSTIFICACIÓN 15

HIPÓTESIS 15

OBJETIVOS

Objetivo General 16

Objetivos Particulares 16

MATERIAL Y MÉTODOS 17

RESULTADOS 29

DISCUSIÓN 45

CONCLUSIONES 56

APÉNDICE 57

REFERENCIAS 67

RESUMEN

En México, para la prevención de la brucelosis se aplicaba la vacuna de *Brucella abortus* cepa 19. El uso de la vacuna de *Brucella abortus* RB51, fue autorizada a partir de 1997. Existe la posibilidad de que la cepa RB51 por ser una cepa rugosa mutante de *B. abortus* no sea tan estable dentro de un organismo. El objetivo de este trabajo fue demostrar cambios en el perfil de corte con endonucleasas de restricción del ADN y de proteínas de membrana externa (PME) de las cepas vacunales C-19 y RB51 de *Brucella abortus* al recuperarlas a partir de cuyes inoculados. Para este fin se utilizaron 3 grupos de cuyes raza Harley de 200 gr de peso, a los cuales se les inoculó 0.5 ml vía intraperitoneal de vacuna C-19 y RB51, el tercer grupo se mantuvo como control inoculando SSF. Se recuperaron las cepas a los 7, 14, 21, 28 y 35 días post inoculación, a partir de macerados de bazo e hígado. La obtención de proteínas de membrana externa a partir de las cepas aisladas se realizó por ultracentrifugación utilizando N-Lauril-Sarcosina y HEPES. Se procedió a hacer el corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida al 10%. Se hizo extracción de ADN por la técnica de fenol-cloroformo y se cortaron con 5 endonucleasas: *EcoRI*, *EcoRV*, *PstI*, *HindIII* y *BamHI*. Se hicieron corrimientos electroforéticos en geles de poliacrilamida al 5%. Los geles se tiñeron con Nitrato de Plata para analizar los perfiles de PME y corte. El análisis de los geles se hizo por observación

directa arrojando los siguientes resultados: el ADN cortado con *EcoRI* presentó variaciones en el perfil de corte en una cepa de RB51 aislada del hígado de un cuye a los 7 días post-inoculación entre los 2000 y 2200 pb. La enzima *PstI* cortó el ADN de C-19, pero no lo hizo en ninguna cepa de RB51 ni recuperada ni la cepa vacunal. Con las demás endonucleasas se observó un patrón de corte similar. Por otro lado, las PME mostraron cambios importantes en los perfiles. El cambio en los perfiles de proteínas y de corte con endonucleasas de restricción en una cepa de RB51 puede ser indicativo de modificaciones en el genoma de la bacteria, por lo que faltaría determinar si estos cambios están asociados a variaciones en la patogenicidad de la cepa vacunal.

Proyecto financiado por:

Fondos Mixtos CONACyT-Gobierno del Estado de Zacatecas.

ZAC/4190

Proyecto SAGARPA-CONACyT: 2004-23.

INTRODUCCIÓN

Generalidades

La brucelosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias del género *Brucella*, que afecta al hombre y a las diferentes especies animales, especialmente al bovino y pequeños rumiantes constituyendo una zoonosis de importancia económica y para la salud pública mundial. *Brucella abortus*, causante de la enfermedad en bovinos, es la que mayores pérdidas económicas ha producido a la ganadería a nivel mundial debido a que hay menor producción de carne y leche, además del retraso considerable en el desarrollo de los hatos, ruptura de líneas genéticas, pérdida de becerros, mantenimiento de animales improductivos, etc.,²² y se caracteriza por producir abortos en el último tercio de la gestación, infertilidad, nacimiento de crías débiles, en los machos orquitis y epididimitis con eliminación de la bacteria a través del semen.³⁹ Esta enfermedad causa hasta el 65% de los abortos en vacas, cerdos, ovejas y cabras.⁴⁶

Las bacterias que pertenecen al género *Brucella*, se agrupan en ocho especies, que se diferencian entre sí por su virulencia. Se sabe que las cepas lisas son: *Brucella abortus* (siete biotipos) infecta preferentemente al ganado bovino, mientras que *Brucella melitensis* (tres biotipos) infecta al ganado caprino y ovino, *Brucella suis* (cinco biotipos) al porcino; las cepas rugosas son: *Brucella neotomae* infecta

a la rata del desierto y *Brucella ovis* al ovino, *Brucella canis* a perros⁷. Recientemente se ha descrito a *Brucella pinnipedialis* y *Brucella ceti*^{22, 25, 26} como causantes de la brucelosis en mamíferos marinos. Las más virulentas para el hombre son *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus*; aparentemente *Brucella ovis* y *Brucella neotomae* no son patógenos para el humano⁵⁷ y se han tenido reportes recientes de infección con las brucelas marinas.³³

Salud Pública

A la brucelosis en el humano se le conoce como: "Fiebre del Mediterráneo", "Fiebre de Malta", "Septicemia de Bruce" y "Fiebre Ondulante"; y en los animales se le conoce como "Fiebre de Bang", "Aborto Contagioso" y "Aborto Infeccioso".⁴²

En humanos, el período de incubación puede ser de 1 a 3 semanas y constituye una enfermedad debilitadora caracterizada por fiebre, escalofríos, cefalea y dolor muscular o articular. Como promedio, la recuperación ocurre de 1 a 3 meses, aunque la debilidad permanece por un período más prolongado. En cursos crónicos, la fiebre puede mostrar un patrón ondulante y de ahí el apelativo de "fiebre ondulante". Cuando la enfermedad es aguda se presenta toxemia extrema, trombopenia y endocarditis que pueden llevar a la muerte del individuo.^{35, 38, 46, 48, 63}

Características del agente

Con base en los estudios bacteriológicos realizados en México, se conoce la existencia en bovinos de las siguientes biovariedades de *Brucella abortus*: 1, 4, 5 y 6, siendo la biovariedad 1 la más frecuente y la biovariedad 4 la más virulenta para el hombre.¹⁸

Todas las especies de *Brucella* son intracelulares facultativas y cada especie tiene su huésped natural, que a la vez sirve como reservorio de la infección.³¹

La bacteria es un cocobacilo Gram negativo. Es lisa, inmóvil y no capsulada. Mide de 0.5 x 0.6 a 1.5 μm . Para su aislamiento se utilizan medios que contienen peptonas o triptonas adicionados con extractos de levaduras, suero o sangre; existen medios comerciales que reúnen éstas características (agar triptosa, medio Farrell, Agar *Brucella*, Medio bifásico). En el aislamiento primario las colonias son usualmente lisas, de apariencia opaca y de un diámetro de 2-3 mm. La bacteria es de crecimiento lento y normalmente las colonias características se ven después de 3-5 días de incubación en microaerofilia ó 10% de CO₂. No fermenta los hidratos de carbono. El pH para que la bacteria crezca favorablemente es de 6.6 a 7.4.^{2, 19, 36, 42, 47, 57}

Brucella resiste la congelación (hasta -70°C con crioprotectores) y descongelación varios años pero son destruidas por las temperaturas de pasteurización y calentamiento a 60°C durante 10 minutos, por desinfectantes como fenol, formol y cloro. *In vitro* puede variar su sensibilidad a los antibióticos, pero generalmente la afectan la estreptomycin, eritromicina y las tetraciclinas.⁴³

A diferencia de otras bacterias Gram negativas, *Brucella spp.* no produce exotoxinas, no tiene cápsula que la proteja de la fagocitosis, ni muestra una aparente variación antigénica.^{28, 29, 54}

La morfología de *Brucella* descrita por Dubray y Plommet,²³ no se aparta sustancialmente de la estructura clásica de las Gram negativas, distinguiéndose el citoplasma y la envoltura celular integrada por la membrana citoplásmica, el espacio periplásmico y la membrana externa.¹⁷

Algunos autores opinan que la membrana externa de *Brucella* es responsable, al menos en parte, de la capacidad de multiplicarse en el interior de los fagocitos, el peptidoglicano es similar a las enterobacterias pero se encuentra frecuentemente asociado a la membrana externa,^{27, 54} como en el caso de *E. coli*.⁵⁵

A diferencia de las enterobacterias, la membrana externa de *Brucella* contiene fosfatidilcolina y no fosfatidiletanolamina,²⁸ esto explicaría en parte la resistencia que presenta a la polimixina B, además de que el antibiótico no se une al lipopolisacárido (LPS).¹⁷

Brucella abortus contiene tres grupos de proteínas principales de la membrana externa:

- Grupo 1: de peso molecular de 88-94 kDa, posiblemente relacionadas con ciertas funciones de la biosíntesis de la propia envoltura.
- Grupo 2: de peso molecular de 36-38 kDa, equivalentes a las porinas de otros microorganismos Gram negativos formando un estado nativo de agrupaciones triméricas por las que penetran ciertos solutos. Existen dos genes, *omp2a* y *omp2b* que codifican para estas porinas, pero sólo el segundo parece expresarse *in vitro*.
- Grupo 3: de peso molecular de 25-31 kDa y codificados en los genes *omp25*, el único expresado en *Brucella*, y *omp31*.⁵⁶

Han sido caracterizadas numerosas proteínas de membrana externa, interna, citoplásmicas y periplásmicas de este microorganismo. Algunas son reconocidas por el sistema inmune durante la infección y sólo se han reportado en *Brucella*, por lo que se han hecho varios

trabajos en los que se usan como antígenos específicos para diagnóstico e inclusive se han estudiado como posibles inmunógenos.^{12, 22, 34, 70}

La molécula de LPS es el principal componente de la membrana externa de *Brucella* y posee propiedades bioquímicas y biológicas que lo diferencian del LPS del resto de las bacterias Gram negativas, especialmente en cuanto a su contenido en ácidos grasos.²²

Transmisión

La transmisión de la enfermedad ocurre por contacto directo o indirecto con animales que se encuentran eliminando la bacteria en sus secreciones y la ruta de transmisión más usual es la oral, aunque puede resultar por vía conjuntival, genital, por inhalación o transmitirse al feto *in utero*.¹⁹

La transmisión al humano sucede a través de productos lácteos elaborados con leche no pasteurizada, como quesos; estos últimos se consideran la mayor fuente de infección. La transmisión por aerosoles es posible tanto en el campo, el laboratorio y en los rastros; a causa de esto, la brucelosis es considerada como una enfermedad ocupacional entre los vaqueros, veterinarios, matanceros y técnicos de laboratorio.

Patogenia

Poco después de haber penetrado en el organismo por las vías antes descritas, los microorganismos son englobados por las células fagocitarias en cuyo interior sobreviven, se multiplican y son transportados a los linfonodos regionales. Ahí, los microorganismos siguen multiplicándose tras su diseminación hematológica. La bacteria se situará en el interior de los macrófagos que se encuentran en los testículos, epidídimo y vesículas seminales en el caso de machos; y si es una hembra gestante, en el feto, fluidos fetales y placenta.⁶ En ésta última, ocurre una reacción piogranulomatosa y el aborto se presenta en la segunda mitad de la gestación. Las vacas abortan usualmente una sola vez y aunque se desarrolla un cierto grado de inmunidad los animales permanecen infectados y las brucelas pueden ser excretadas en leche, orina y en subsecuentes pariciones en grandes cantidades. Además que permanecen viables en agua, suelos húmedos, orina y leche por más de 4 meses.¹⁹

Vacunas

En cuanto a la prevención de la brucelosis se desarrollaron vacunas, de las cuales, la cepa 19 (C-19) de *Brucella abortus* que es una cepa de baja virulencia, fue desarrollada en 1923 y aprobada en 1941, ha sido ampliamente usada en el ganado bovino desde esa fecha y se ha elaborado en México desde 1951. Una característica es su habilidad para inducir anticuerpos específicos en suero y leche, contra la

cadena O del LPS, los cuales interfieren en la interpretación de los resultados de las pruebas diagnósticas de rutina; la eficiencia de la inmunidad celular otorgada es relativa y oscila según distintos autores alrededor del 70%.⁶⁸ Con la finalidad de solucionar el problema del diagnóstico se desarrolló la cepa RB51, la cual esencialmente no tiene cadena O o contiene cantidades insuficientes de ésta molécula para inducir la producción de anticuerpos específicos en animales inmunizados, y por lo tanto no genera anticuerpos que alteren la interpretación de las pruebas diagnósticas convencionales.^{67, 69} La vacuna RB51 fue desarrollada en 1981. La cepa RB51 fue seleccionada a partir del crecimiento de la cepa de *Brucella abortus* 2308 en presencia de penicilina y rifampicina, porque se observó previamente en otros estudios que la adición de este antibiótico al medio tiende a provocar que *Brucella abortus* vire a cultivos rugosos.⁶⁹ Se empleó para denominarla la "R" por ser una cepa rugosa, la "B" por *Brucella* y "51" corresponde a una nomenclatura interna del laboratorio que la desarrolló. La cepa RB51 es una cepa atenuada, con una mutación en el gen *wboA* que está involucrado en la virulencia,⁶⁹ como lo indican los ensayos efectuados en ratón, cobayo, caprino y vacuno, de los cuales se elimina en un espacio de tiempo relativamente corto con capacidad abortiva baja o nula, cuando se emplea en protocolos de vacunación de una sola dosis, su capacidad protectora en el vacuno es similar aparentemente a la C-19.^{10, 11, 22, 59, 60, 66, 68, 71}

Según describen sus creadores la cepa RB51 tiene características rugosas estables; es estable *in vitro* e *in vivo*, retiene su habilidad de crecer en presencia de eritritol, muestra reducida virulencia en el modelo murino, coloniza el bazo por poco tiempo, provoca anticuerpos específicos para antígenos de *Brucella abortus*, pero no para cadena O. Además, la infección con RB51 le da al ratón una protección eficiente ante subsecuentes desafíos con la cepa 2308 virulenta. También determinaron que se trataba de una cepa rugosa porque realizaron pruebas de ELISA usando cristal violeta para teñir a las bacterias, observaron que las colonias que poseían la perosamida cadena O como componente de su LPS se teñían de color púrpura y las colonias rugosas no lo hacían.⁶⁹

La virtual ausencia de la cadena O en la cepa RB51 hizo a ésta útil como fuente de preparaciones de componentes celulares para ensayos de respuesta inmune de animales infectados con otros agentes de *Brucella abortus* que son asociados con la cadena O. La cepa RB51 posee los grupos 1, 2 y 3 de proteínas de membrana externa descritas para este género.⁶⁹

En el ganado, su efecto protector es similar al producido por la C-19, es rápidamente eliminada del animal y su efecto abortivo es muy reducido o nulo. Puede ser fácilmente diferenciada de otras cepas de *B. abortus* por electroforesis en campos pulsados o por reacción en

cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, los animales vacunados con RB51 no reaccionan ante los serodiagnósticos convencionales para brucelosis.⁶¹ A partir de su uso en Estados Unidos se han denunciado casos de exposición accidental en humanos a la cepa RB51. Algunos de estos casos desarrollaron signos de inflamación en el sitio de la inoculación seguido por fiebre intermitente, cefaleas, mialgias y niveles elevados de transaminasas y lactato deshidrogenasa en suero.¹⁴

La cepa RB51 ha sido aprobada en Estados Unidos para su uso en programas de erradicación de la brucelosis. Sin embargo, por la ausencia de una prueba serológica disponible para RB51, los animales que han sido vacunados ilegalmente con ésta cepa pueden eludir la detección en ciudades donde la vacunación no es permitida.

La C-19 produce buena inmunidad, pero interfiere en las pruebas serológicas al no poder diferenciar entre anticuerpos vacunales y no vacunales; además de no aplicarse en animales gestantes por causar abortos. La RB51 también tiene buena inmunidad y no interfiere con pruebas serológicas.⁴²

Si bien la Norma Oficial Mexicana (NOM-053-ZOO-1995) para el control de brucelosis en los animales domésticos no menciona el uso de la vacuna de *Brucella abortus* RB51, la Secretaría de Agricultura,

Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) autorizó su producción, comercialización, distribución y aplicación por médicos veterinarios zootecnistas, a partir de 1997 y deja abierta la posibilidad del uso de la C-19 de *B. abortus* para la vacunación de becerras de 3 a 6 meses de edad con dosis clásica y de vacas adultas con la dosis reducida.^{3, 20, 21}

Todas las vacunas contra la brucelosis ocasionan cierto grado de placentitis; por lo tanto, no se recomienda vacunar a hembras gestantes en áreas de baja prevalencia. El riesgo de abortos ocasionados por la vacuna se incrementa notoriamente después del primer tercio de gestación.⁶²

Debido a que ninguna vacuna es curativa, sólo se recomienda vacunar a los animales seronegativos. No se debe vacunar a los machos. La RB51 es segura a toda edad, y se puede aplicar en terneras desde los cuatro meses. Admite una revacunación en adultos, obteniéndose así una inmunidad más sólida y duradera a diferencia de la C-19.⁶² Cada dosis de vacuna reconstituida contiene $10^{-34} \times 10^9$ UFC de *Brucella abortus* RB51 en fase rugosa.¹ Actualmente la vacuna RB51 de *Brucella abortus* ha desplazado a la vacuna C-19 en muchos países.⁶⁸

Cuando se usa una sola vacunación, su efecto protector es similar al que se inducía al emplear la vacuna C-19. En México, la vacunación con la RB51, se lleva a cabo "una vez en la vida" entre los 3-6 meses con la dosis becerro (1×10^{10} UFC) o después de los 8 meses aplicando la dosis reducida (3×10^9 UFC), de manera práctica en zonas endémicas de brucelosis en nuestro país, sólo se recomienda aplicar una vez la revacunación con RB51.^{5, 17, 22}

Diagnóstico

En México, el diagnóstico oficial de la brucelosis se realiza mediante las pruebas serológicas de tarjeta, rivanol y fijación del complemento;²⁰ sin embargo, durante el desarrollo de estas pruebas indirectas se pueden presentar reacciones cruzadas con otras bacterias como *Yersinia enterocolitica* serotipo O:9, *Salmonella* grupo N (O:30), *Vibrio cholerae*, *Escherichia hermanni* y *E. coli* O:157, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Francisella tularensis*⁴⁷ obteniéndose en consecuencia resultados falsos positivos.^{52, 58} Lo anterior se explica por la presencia de moléculas de perosamina en el LPS de algunas bacterias Gram negativas, el cual es responsable de la actividad antigénica cruzada que se observa con los microorganismos antes mencionados. Además, *Yersinia enterocolitica* O:9, contiene una cadena O casi idéntica a la de *B. abortus* así como un determinante M. Este hecho debe tomarse muy en cuenta al realizar el diagnóstico por métodos serológicos, ya que con frecuencia se

cometen errores y no se llega a establecer un buen diagnóstico diferencial, se trate de animales o de humanos.⁴⁷

Supervivencia

La supervivencia del microorganismo depende de la integridad de su membrana externa; gracias a ella resiste la acción tóxica de los ácidos grasos y glicéridos, así como de enzimas proteolíticas y glicosidasas. *Brucella* se adapta a medios tan hostiles como el interior de los fagocitos, el pH, falta de nutrientes y presencia de intermediarios reactivos del oxígeno (peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo), formados en los fagocitos para la destrucción de las bacterias ingeridas. Esta resistencia es mayor en cepas en fase lisa que en fase rugosa.^{9, 54}

Brucella abortus puede permanecer intacta en el fagosoma y bloquea la fusión posterior con el lisosoma. Ello le protege de la acción de los péptidos catiónicos y enzimas líticas presentes en los gránulos lisosómicos. Se cree que la cadena O y quizás lípidos de ornitina interactúan directamente con la membrana del fagosoma impidiendo la fusión.²⁸

Paralelamente la superóxido dismutasa y la catalasa, que son enzimas presentes en *Brucella*, se integran al mecanismo de defensa que desarrollan algunos microorganismos frente a la toxicidad

oxidativa. Por otro lado, se sabe que *Brucella abortus* escapa de los polimorfonucleares al producir guanosina 5' monofosfato y adenina, que inhiben la fusión del fagosoma con el lisosoma, la degranulación y la activación del sistema mieloperóxidasa-haluro y la producción del factor de necrosis tumoral.^{22, 32, 50, 56}

JUSTIFICACIÓN

La justificación de este trabajo radica en que existe la posibilidad de que la cepa vacunal RB51 de *B. abortus* tenga cambios dentro del organismo una vez inoculada, como ha sucedido con la cepa vacunal 45/20, que es una cepa rugosa que ha demostrado que puede revertir a su forma virulenta *in vivo*.^{16, 37} Actualmente se ha observado que algunos animales revacunados con la cepa RB51, son negativos durante 3 ó 4 meses a la prueba de Tarjeta y posteriormente se vuelven positivos, no existiendo referencias de que esta situación se presente con el empleo de dicha vacuna o por la exposición natural hacia la cepa de campo realizando las pruebas de diagnóstico oficial.⁴²

En un trabajo realizado por Díaz y colaboradores⁴⁴ recuperaron la cepa RB51 de secreciones vaginales y leche de vacas vacunadas con esta cepa, lo cual indica que esta cepa vacunal fue capaz de colonizar el tejido, o bien abre la posibilidad de que esta cepa revierta hacia la forma virulenta.

HIPÓTESIS

La cepa vacunal RB51 tiene variaciones en la expresión de proteínas de membrana externa y en el perfil de corte con endonucleasas de restricción, evidenciando su inestabilidad al ser inoculada y después recuperada de un organismo.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar las posibles variaciones en las proteínas de membrana externa y el perfil de corte con endonucleasas de restricción de la cepa RB51 antes y después de ser inoculada en cuyes.

Objetivos Particulares

1.- Inocular a cuyes con las cepas RB51 y C-19 de *Brucella abortus* y recuperar las mismas después de 7, 14, 21, 28 y 35 días.

2.- Extraer las proteínas de membrana externa de las vacunas comerciales RB51 y C-19, además de las mismas cepas recuperadas de cuyes.

3.- Extraer el ADN de las cepas vacunales y recuperadas de RB51 y C-19; y llevar a cabo su digestión con endonucleasas de restricción.

4.- Analizar las posibles variaciones de las proteínas de membrana externa y el perfil de corte con endonucleasas de restricción mediante el corrimiento de las mismas en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata haciendo un estudio comparativo entre cepas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Vacunas

Se utilizaron las siguientes cepas vacunales:

- RB51 de *Brucella abortus* (Nova Litton[®] S.A. de C.V. lote VBV-04-158).
- C-19 de *Brucella abortus* (Nova Litton[®] S.A. de C.V. lote VCV-04-103).

La cepa 19 ha mostrado ser una cepa estable desde su desarrollo, por este motivo se utilizó en el presente trabajo como control.

Manejo de cepas

Se reconstituyeron las vacunas como lo indica el laboratorio productor y se sembraron en cajas petri con agar biotriptasa y se incubaron 72 hrs a 37°C con 5% de CO₂.

Se cosecharon en 3.5 ml de solución salina fisiológica (SSF) estéril, se procedió a calcular el número de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml) por el método de Miles y Misra.

Método de Miles y Misra²

Solución peptonada:

Peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Agua destilada	1.0 L

Se prepararon 10 tubos con 9 ml de solución peptonada numerados del 1 al 10. Se esterilizó en tubos con tapón de baquelita.

Del concentrado se tomó 1 ml y se diluyó en el tubo 1, se realizaron diluciones décuples hasta la dilución 10^{-10} . En cada paso se homogenizó.

Se tomaron tres gotas de 20 μ l para colocarlas en un cuadrante de una caja petri con agar biotriptasa, las cajas se incubaron a 37°C por 72 hrs en una atmósfera de 5% de CO₂.

En la dilución donde se pudieron contar de entre 30 y 100 colonias se tomó la lectura sacando un promedio de las tres gotas para calcular la cantidad de UFC/ml.

Inoculación de cuyes.

Se usaron 15 cuyes raza Harley de 200 g de peso, se formaron al azar 3 grupos de 5 animales cada uno. El grupo 1 fue inoculado con 0.5 ml de la cepa vacunal RB51 a una concentración de $1.28 \text{ ml} \times 10^{11}$ UFC/ml vía intraperitoneal. El grupo 2 fue inoculado con la C-19 a una concentración de 4.86×10^9 UFC/ml por la misma vía y el grupo 3 fue inoculado con solución salina fisiológica, permaneciendo como grupo control.

Sacrificio de los cuyes.

Se sacrificó un animal de cada grupo a los 7, 14, 21, 28 y 35 días postinoculación. El sacrificio fue por sangrado en blanco y se obtuvo hígado, bazo, sangre completa y suero. Se procedió al macerado de tejidos con agua destilada estéril.

Los tejidos macerados se sembraron en agar biotriptasa y agar selectivo para *Brucella* (Farrell), el cual contiene un suplemento selectivo modificado para *Brucella* (OXOID®) se incubaron a 37°C por 72 hrs en una atmósfera de 5% de CO₂. La sangre completa se puso en medio bifásico (agar y caldo TSA) y se incubó a 37°C por 72 hrs en una atmósfera de 5% de CO₂. El suero se mantuvo en congelación.

Durante el tiempo de incubación, cada colonia sugerente a *Brucella*, se resembró en agar biotriptasa para realizar frotis y tinción de Gram, así como para realizar pruebas bioquímicas (catalasa, citrato, TSI, nitratos, nitritos, ureasa y MR/VP).

Manejo de cepas recuperadas.

Se trabajó con las cepas recuperadas que mostraron correspondencia con el género *Brucella* después de realizar las pruebas bioquímicas.

A cada una se le realizó la extracción de proteínas de membrana externa y la extracción de ADN.

Cada cepa se sembró en 30 cajas de agar biotriptasa y se incubó a 37°C durante 72 h con 5% de CO₂.

Se cosecharon de la siguiente forma:

- 10 cajas en 10 ml de SSF para la extracción de proteínas de membrana externa.
- 4 series de 5 cajas en 10 ml de SSF para extracción de ADN.

Las bacterias se inactivaron por calor en baño María a 80-85°C por 1 h. Las cepas se mantuvieron en congelación hasta su uso.

Extracción de proteínas de membrana externa.

1. Paquete celular. Las cepas vacunales y recuperadas de C-19 y RB51 de *Brucella abortus*, que se cosecharon en 10 ml de SSF, se les agregaron 10 ml de una mezcla comercial de inhibidores de proteasas que contiene inhibidores de serina, cisteína y metaloproteasas (Complete, Roche®).

2. Extracción de proteínas. El paquete celular se sonicó (Ultrasonic Processor® GEX 750), utilizando 10 pulsaciones de 1 min con 1 min de descanso, repitiendo este ciclo 5 veces, entre cada ciclo se congelaron en nitrógeno líquido por 5 min para favorecer la ruptura de bacterias. Se centrifugó a 1,000 xg por 15 min para la remoción de restos celulares. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 150,000 xg por una hora a 4°C, esto se hizo en una ultracentrífuga (Beckman® L8-M). Correspondiendo el sedimento a las fracciones de membranas (membrana externa y membrana interna) y el sobrenadante al citosol. Por último, el paquete se resuspendió con 10 ml de una solución de Sarcosil al 1% en HEPES (ácido H-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico) 10 mM y se mantuvo en agitación suave durante 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 150,000 xg por una hora a 4°C. El paquete obtenido contiene las proteínas de la membrana externa y el sobrenadante las proteínas de la membrana interna. La pastilla se resuspendió en 300

μl de HEPES 10 mM con ayuda de un agitador electro-magnético tipo vórtex.

3. Separación cuantitativa de las proteínas unidas a compuestos orgánicos. A 100 μl de la fracción de membrana externa se le agregaron 400 μl de metanol, se agitó y centrifugó por 10 segundos a 9,500 xg. Después se agregaron 100 μl de cloroformo y nuevamente se agitó y centrifugó por 10 segundos a 9,500 xg. Para la separación de la fase orgánica se adicionaron 300 μl de agua destilada, se agitó y centrifugó por un minuto a 9,500 xg. La fase superior se removió cuidadosamente y se desechó. Por último, a la fase restante se le adicionaron 300 μl de metanol, se agitaron y centrifugaron por 2 minutos a 9,500 xg. El sobrenadante fue desechado y el paquete de proteínas, se secó bajo flujo de aire y se almacenó a -70°C hasta su uso.^{64, 65}

4. Cuantificación de proteínas. El contenido de proteínas totales fue determinado por colorimetría, utilizando el método de microtitulación Bradford.⁸ Cada vial de proteína se solubilizó con 100 μl de HEPES 10 mM. Se construyó una curva de calibración con albúmina sérica bovina de 1 a 10 μg/ml; 10 μl de muestra de proteína fueron mezclados con 190 μl de reactivo de Bradford. La lectura se realizó en un lector de microplacas de ELISA a 600 nm.

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

Electroforesis en gel de poliacrilamida sulfato de sodio (PAGE-SDS).

La separación de las proteínas, se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS), por el método de Laemmli,⁴¹ de forma que las posiciones de las diferentes proteínas en el gel sean en función de su peso molecular. Para ello se empleó una cámara de electroforesis vertical con placas de 10 x 10 cm (P8DS-2, Owl Separation Systems®).

1. Preparación de la muestra. Se calculó el volumen necesario de proteína de acuerdo al título obtenido por el método de Bradford, para colocar 10 μ g/ml por pozo en el gel de poliacrilamida. Para cada cantidad de muestra se agregó un volumen igual de amortiguador de muestra, enseguida se puso la muestra en Baño María a ebullición, durante 5 min, para lograr la desnaturalización de la proteína en presencia de SDS.

2. Preparación de los geles (PAGE-SDS) y corrimiento electroforético. Los geles se prepararon según marca el método Laemmli⁴¹ las muestras se corrieron en este gel durante 10 min a 80 volts y posteriormente a 100 volts hasta verificar que las muestras completaran el recorrido en el gel concentrador.

Tinción de los geles de poliacrilamida 10%

Después de finalizar la electroforesis, una serie de geles fue teñida con una solución de Azul de Coomassie para verificar la calidad de las proteínas y la otra serie fue teñida con un kit comercial de nitrato de plata (Invitrogen, SilverXpress[®]) por ser más sensible.

1. Tinción con Azul de Coomassie. El gel fue colocado en un recipiente que contenía solución de Azul de Coomassie en un volumen suficiente para cubrir el gel completamente, la tinción se llevó a cabo por 24 h en agitación. Posteriormente, el exceso de colorante del gel se eliminó con solución desteñidora (Metanol, Ácido Acético, Agua 4:5:1), hasta lograr apreciar con claridad las bandas proteicas y por último, fue conservado en ácido acético al 5%.

El peso molecular de las proteínas fue estimado por su posición en el gel, comparado con el marcador de peso molecular medio (Gibco[®]), corrido en el mismo gel.

2. Tinción de Nitrato de Plata. Se realizó de acuerdo al protocolo del fabricante: se colocó el gel en un recipiente de vidrio y se agregaron 200 ml de la solución fijadora (agua calidad milli-Q, 90 ml, metanol 100 ml y ácido acético 20 ml), se dejó en agitación por 10 min; se retiró la solución y se agregaron 100 ml de la solución sensibilizadora (agua calidad milli-Q, 52.5 ml, metanol 50 ml y sensibilizador 2.5 ml), se dejó en agitación por 10 min; se retiró la solución y se repitió este paso. Se hicieron 2 lavados de 5 min con 200 ml de agua ultrapura cada uno. Se agregaron 100 ml de la solución teñidora (teñidor A, 5 ml; teñidor B, 5 ml y agua calidad milli-Q, 90 ml), se dejó en agitación por 15 min; se hicieron 2 lavados de 5 min con 200 ml de agua calidad milli-Q cada uno. Se agregaron 100 ml de la solución reveladora (revelador, 5 ml y agua calidad milli-Q, 95 ml), se dejó en agitación 3 a 15 min hasta que las bandas se hicieron evidentes; se agregaron 5 ml de solución de parado para detener la reacción y para terminar se realizaron 3 lavados de 10 min con 200 ml de agua calidad milli-Q cada uno (SilverXpress[®] Silver Staining Protocols).

Extracción de ADN cromosómico.

Se tomó una alícuota de 1 ml de cada cepa recuperada y vacunal (C-19 y RB51), se centrifugaron a 1,400 xg por 5 min, se decantó el sobrenadante y a la pastilla se le agregaron 200 µl de TE 10:1, 3.3 µl

de SDS 10%, 1.33 μ l de Proteinasa K (10 mg/ml) y 2.66 μ l de RNAsa (10 mg/ml). Se incubó 1 hr a 37°C, y se centrifugó a 3,500 xg por 8 min, se tomó el sobrenadante y se agregó fenol saturado (1:1), se agitó manualmente y se centrifugó a 1,400 xg por 2 min. Se tomó el sobrenadante y se pasó a un tubo nuevo estéril, se agregó fenol-cloroformo (1:1) y se agitó manualmente, después se centrifugó a 1,400 xg por 1 min. Se tomó la fase acuosa y se pasó a tubo nuevo estéril, se agregó etanol absoluto (1:2). Se guardó 2 h en ultracongelación (-70°C), pasado este tiempo se centrifugó a 8,000 xg por 10 min y se lavó con 1 ml de etanol absoluto. Se decantó el sobrenadante, se dejó secar por 12-24 h a temperatura ambiente, una vez seco el ADN se resuspendió en 100 μ l de agua calidad milli-Q, se conservó hasta su uso a -20°C.

El ADN obtenido se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 1% en TBE 0.5X (Tris-Base 40 mM, ácido bórico 20 mM, EDTA 0.1 mM pH 8.0) adicionados con 3 μ l de bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) para determinar la presencia, pureza y calidad del mismo. El corrimiento electroforético se llevó a cabo a 60 V por 60 minutos y se visualizaron con luz ultravioleta de onda corta en un transiluminador (White/Ultraviolet Transiluminator UVP®).

Cuantificación de ADN

Una vez realizados los geles de agarosa al 1%, se procedió a la cuantificación del ADN en un espectrofotómetro de ADN (Gene Quant II Pharmacia Biotech®) con una longitud de onda de 260 nm. Utilizando 2 µl de ADN de cada muestra diluida en 550 µl de agua calidad milli-Q. El cálculo de la concentración se realizó tomando en cuenta la absorbancia (260 nm) que se multiplicó por la constante de ADN (50) y por el factor de dilución empleado (275), el resultado es expresado en ng/µl.

Digestión con endonucleasas de restricción

Con el ADN ya cuantificado se procedió a hacer el corte con endonucleasas de restricción. Las endonucleasas utilizadas fueron *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *PstI* y *BamHI* (Chimerx®). A 4 µg/µl de ADN, de cada una de las muestras, contenido en microtubos estériles se le agregó agua destilada estéril cuanto baste para 20 µl, además de 4 µl de amortiguador de restricción 10X y 4 µl de la endonucleasa (*PstI* y *EcoRV* contienen 14 U/µl; *EcoRI* y *HindIII* contienen 25 U/µl; *BamHI* contiene 20 U/µl), se incubó la mezcla toda la noche a 37°C, inactivando después a 60°C por 20 min.

Para observar los fragmentos de ADN digeridos por las enzimas se realizó el corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 5% y se corrieron a 25 V durante 8 h. Se utilizó como marcador fragmentos de ADN del fago λ cortados con la enzima de restricción *HindIII* (Invitrogen®).

Para la tinción de los geles de poliacrilamida se utilizó nitrato de plata de acuerdo al siguiente protocolo: Se colocó el gel en 5 ml de solución E 10x diluidos en 50 ml de agua destilada estéril durante 30 min, se retiró la solución anterior y se adicionaron 0.5 ml de solución F 100x diluidos en 50 ml de agua destilada estéril durante 30 min, al retirar la solución anterior, se hizo un lavado con agua destilada estéril, un lavado con NaOH 3% y dos lavados con agua destilada estéril. Se adicionaron 0.4 ml de solución G diluidos en 50 ml de NaOH 3% y se agitó levemente hasta la observación de los segmentos o bandas de las muestras, se retiró la solución y se agregaron 0.5 ml de ácido acético glacial en 50 ml de agua destilada estéril.

Los geles de proteínas y de ADN fueron desecados en papel celofán dulce para el posterior estudio comparativo entre las cepas.

RESULTADOS

La concentración bacteriana para la inoculación de cuyes fue de 1.28×10^{11} UFC/ml en el caso de la vacuna RB51 de *Brucella abortus* y de 4.86×10^9 UFC/ml para la vacuna de C-19 de *Brucella abortus*.

Después de la inoculación se lograron aislamientos sugerentes a *Brucella* en los siguientes casos: de los cuyes inoculados con la vacuna C-19 se obtuvo un aislamiento a partir de bazo a los 7 días post-inoculación y en el caso de los cuyes inoculados con la vacuna RB51 se obtuvieron aislamientos a partir de bazo e hígado a los 7, 14, 21 y 28 días post- inoculación. En ambos casos no se lograron aislamientos a partir de sangre y a los 35 días post-inoculación no hubo aislamientos (Cuadro 1).

A la observación microscópica, todos los microorganismos aislados de las muestras antes mencionadas presentaron una morfología de cocobacilos Gram negativos. La confirmación del género *Brucella* se obtuvo con pruebas bioquímicas como catalasa, ureasa, nitratos, nitritos, TSI, citrato y MR/VP.

Proteínas de membrana externa

Los resultados obtenidos en la cuantificación de proteínas por medio de la microtécnica de Bradford se muestran en el Cuadro 2. Las concentraciones de proteína que se obtuvieron en 10 μ l de las suspensiones se encontró en un rango de 0.0060-9.5 μ g/ μ l.

Análisis de los patrones de corrimiento electroforético de las proteínas de membrana externa de las cepas C-19 y RB51 antes y después de la inoculación en cuyes.

En el corrimiento electroforético de las proteínas de membrana externa de *B. abortus* C-19 y RB51 se observaron diferencias en la expresión de las mismas:

En la Figura 1 se muestra básicamente las diferencias entre las cepas C-19 y RB51 recuperadas: Se observó una banda de 25 kDa en dos cepas vacunales de RB51 recuperadas de bazo y en la de hígado, así como en C-19. Además de dos bandas de aproximadamente 39 kDa presentes en todas las cepas recuperadas de RB51 pero en C-19 solo se observó una y en ésta cepa se encuentra otra banda de menor peso de 35 kDa que en RB51 no. También se encontró una banda de 66 kDa en todos los aislamientos que no se presentó en C-19, por el contrario, en ésta se observó una banda de 53 kDa. Por último se

mostró la presencia de una banda de 80 kDa en casi todos los aislamientos de la cepa vacunal RB51 y en la C-19.

CUADRO 1: AISLAMIENTOS OBTENIDOS DE LOS CUYES SACRIFICADOS

GRUPO		SEMANA 1			SEMANA 2			SEMANA 3			SEMANA 4			SEMANA 5		
		TSA	FARRELL	BIFASICO												
C19	BAZO	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	HIGADO	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	SANGRE	N/A*	N/A	0	N/A	N/A	0									
RB51	BAZO	0	1	0	2	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0
	HIGADO	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	SANGRE	N/A	N/A	0												

*N/A: NO APLICA POR QUE EL INOCULO NO SE SEMBRO EN ESTE MEDIO.

TSA: AGAR SOYA TRIPTICASEINA.

FARRELL (OXOID®): AGAR SOYA TRIPTICASEINA ADICIONADO CON SUPLEMENTO DE ANTIBIOTICOS.

BIFASICO: AGAR Y CALDO SOYA TRIPTICASEINA.

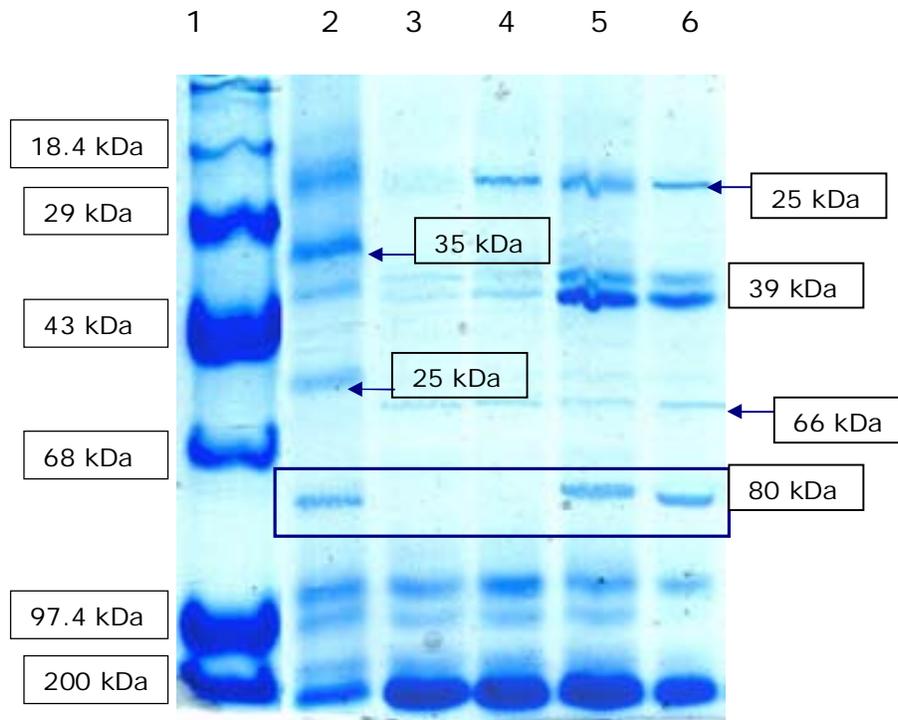


Figura 1: **Corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida de proteínas de membrana externa de *Brucella abortus*. Cepas recuperadas de cuyes a diferentes semanas post-inoculación.** Carriles: 1) Marcador de peso molecular. 2) Vacuna C-19. 3), 4) y 5) RB51 recuperada de Bazo. 6) RB51 recuperada de Hígado. Se observan diferencias en el corrimiento electroforético de ambas cepas: A la altura de los 25 kDa se observa una banda en los carriles 1, 4, 5 y 6, una banda de 35 kDa en el carril 1, un grupo de dos bandas a la altura de los 39 kDa en los carriles 3, 4, 5 y 6, mientras que en el carril 1 solo se observó una banda; en RB51 se encontró una banda en los 66 kDa que en C-19 se encuentra en los 53 kDa y una banda de 80 kDa en los carriles 1, 5 y 6.

Cabe destacar que se encontraron diferencias en la expresión de proteínas de membrana externa de la cepa vacunal RB51 con respecto a las recuperadas de bazo e hígado (Figura 2): Al comparar la cepa vacunal de RB51 (carril 5) con respecto a las recuperadas se encontró que hay dos bandas en un peso aproximado de 35 kDa en la cepa vacunal que no se observan en las recuperadas, así como dos grupos más de bandas, el primero en un peso aproximado de 40 kDa donde se observan tres bandas en la cepa vacunal mientras que en las recuperadas solo se observa una, y el segundo grupo con cuatro bandas de 50 kDa en la cepa vacunal en tanto que las recuperadas se observaron solo dos bandas marcando así diferencias entre la cepa vacunal inoculada y las que se recuperaron a partir de los órganos de los cuyes.

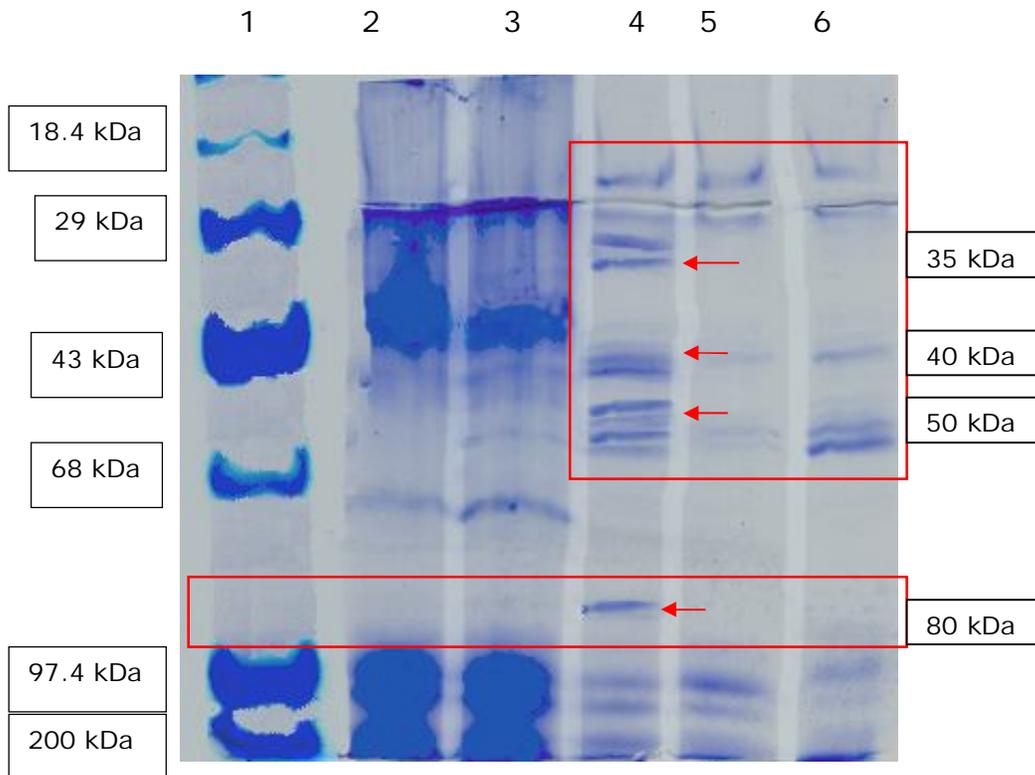


Figura 2: **Corrimiento electroforético en gel de poliacrilamida de proteínas de membrana externa de *Brucella abortus*. Cepas recuperadas de cuyes a diferentes semanas post-inoculación.** Carriles: 1) Marcador de peso molecular. 2) C-19 recuperada de Bazo. 3) C-19 recuperada de Hígado. 4) Vacuna RB51. 5) RB51 recuperada de Hígado. 6) RB51 recuperada de Bazo. Los cambios que se observan en esta imagen son: carril 4 muestra varios cambios con respecto a los carriles 5 y 6 donde se observan dos bandas con un peso aprox. de 35 kDa, dos grupos más de bandas de aprox. 40 y 50 kDa y una banda de 80 kDa que se encuentran en la cepa RB51 de origen vacunal, que no se presentan en las demás cepas recuperadas.

CUADRO 2. MICROTITULACIÓN DE BRADFORD

IDENTIFICACIÓN	LECTURA (600 nm)	Concentración de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
C-19-BAZO	0.665	9.37
C-19-HIGADO I	0.648	9.1
C-19-HIGADO II	0.567	7.95
RB51-BAZO (1)	0.081	0.894
RB51-BAZO I (2)	0.056	0.53
RB51-BAZO II (2)	0.093	1.06
RB51-BAZO III (2)	0.058	0.56
RB51-BAZO I (3)	0.078	0.85
RB51-BAZO II (3)	0.027	0.0109
RB51-BAZO (4)	0.019	0.0062
RB51-HIGADO (1)	0.052	0.473
RB51-HIGADO (2)	0.022	0.037
VACUNA C-19	0.522	7.3
VACUNA RB51	0.137	1.70

*La cantidad de muestra fue demasiado elevada y se ajustó a la capacidad del pozo del gel (20 μl).

(1), (2), (3) y (4) corresponde a la semana de aislamiento de cada cepa

Cuantificación de ADN.

La extracción del ADN se realizó mediante la técnica de Fenol-Cloroformo. En la Figura 3 se presenta un gel de agarosa al 1% donde se observa la calidad del ADN obtenido. La concentración de ADN se encontró en un rango de 0.480-0.760 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y fue de buena calidad (Cuadro 3).

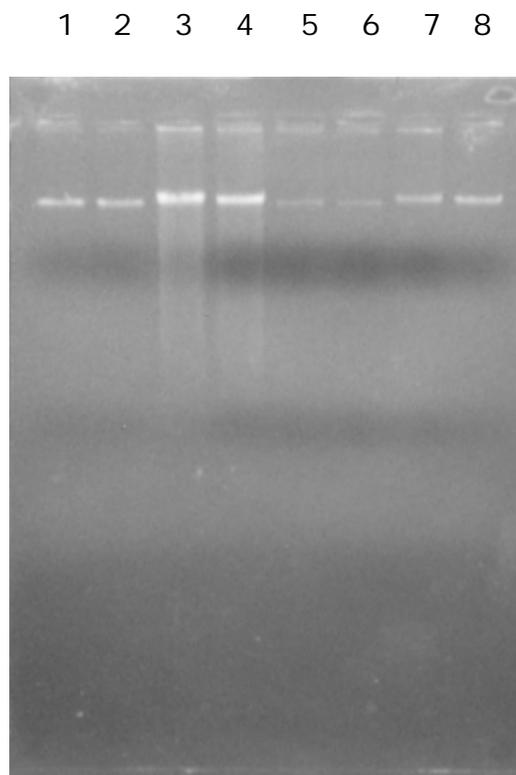


Figura 3: **Gel de agarosa al 1% para ADN.** Carriles 1), 2), 3) y 4) Cepa RB51 recuperada de bazo e hígado a diferentes semanas. Carriles 5) y 6) Cepa 19 recuperada de hígado. Carriles 7) y 8) Vacuna Cepa 19. Se observa que el ADN se encuentra en condiciones óptimas para proceder al corte con endonucleasas de restricción.

CUADRO 3: Cuantificación de ADN.

IDENTIFICACIÓN	LECTURA (A₂₆₀)	Concentración de ADN (µg/µl)
C-19-BAZO	0.040	0.55
C-19-HIGADO I	0.037	0.508
C-19-HIGADO II	0.042	0.577
RB51-BAZO (1)	0.038	0.522
RB51-BAZO I (2)	0.040	0.55
RB51-BAZO II (2)	0.035	0.481
RB51-BAZO III (2)	0.040	0.55
RB51-BAZO I (3)	0.035	0.481
RB51-BAZO II (3)	0.044	0.605
RB51-BAZO (4)	0.040	0.55
RB51-HIGADO (1)	0.055	0.756
RB51-HIGADO (2)	0.038	0.522
VACUNA C-19	0.038	0.522
VACUNA RB51	0.039	0.536

Análisis del patrón de restricción de ADN con las endonucleasas de restricción.

♦ BamHI.

La C-19 no mostró variación en el perfil de corte con esta enzima, debido a que se observó un patrón similar en el ADN de las cepas antes y después de ser inoculadas en los cuyes.

En la cepa RB51, el polimorfismo que se presenta en las diferentes cepas en general es similar; sin embargo en uno de los aislamientos de hígado (carril 3) se detectaron tres bandas de aproximadamente 2,000, 970 y 960 pb, bandas que no se encuentran en el resto de las cepas recuperadas ni en la cepa vacunal (Figura 4).

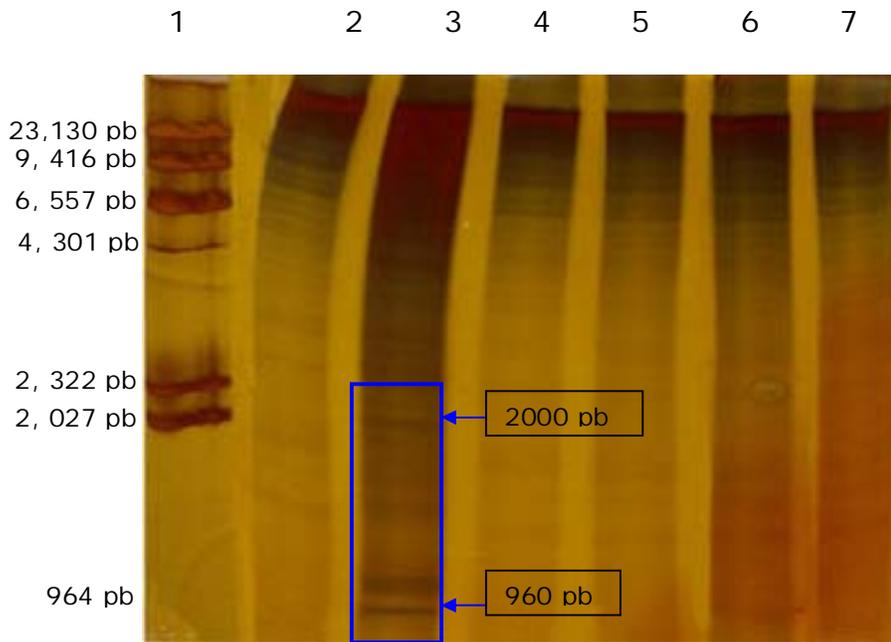


Figura 4: Gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata en el que se realizó corrimiento electroforético de muestras de ADN de cepas vacunales y recuperadas de *Brucella abortus* (RB51), cortadas con la enzima de restricción *Bam*HI. Carriles: 1) Marcador de peso molecular (λ ADN/*Hind*III fragmentos). 2) RB51 recuperada de Bazo. 3) RB51 recuperada de Hígado. 4) RB51 recuperada de Bazo. 5) Vacuna RB51. 6) y 7) RB51 recuperada de Bazo a diferentes semanas. Nótese en el carril 3 la presencia de tres bandas (2,000, 970 y 960 pb) que no se observan en el resto de las cepas recuperadas así como en la cepa de origen vacunal.

♦ *Eco*RI.

Con esta enzima, tampoco se observaron variaciones en el perfil de corte para la C-19. Sin embargo, el polimorfismo de las cepas recuperadas de RB51 que se muestran en la Figura 5 presenta algunas variaciones; en la cepa RB51 recuperada de hígado en la semana 1 (carril 3) se denota la ausencia de un grupo de bandas de

aproximadamente 1 500 pb que sí están presentes en el resto de las cepas. Por otro lado, esta cepa exhibe una banda de 1 000 pb que no se observa en las demás cepas.

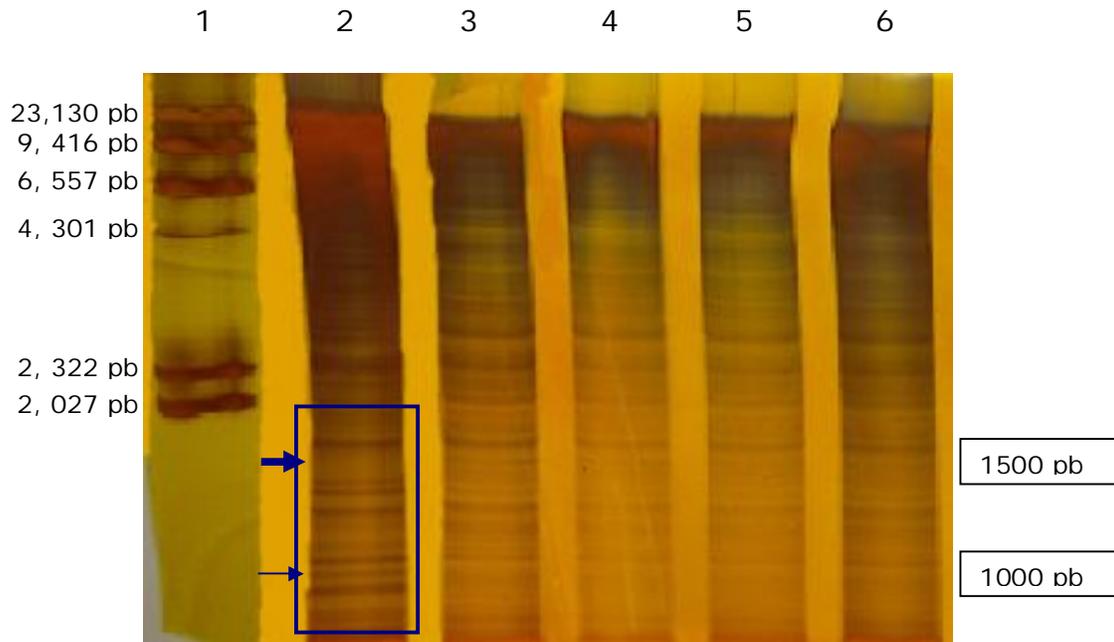


Figura 5: **Muestras de ADN de cepas vacunales y recuperadas de *Brucella abortus* RB51, cortadas con la enzima de restricción *EcoRI*. Gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata.** Carriles: 1) Marcador de peso molecular (λ ADN/*Hind*III fragmentos). 2) RB51 recuperada de Hígado. 3) RB51 recuperada de Bazo. 4) RB51 recuperada de Hígado. 5) Vacuna RB51. 6) RB51 recuperada de Bazo. Mientras que en el carril 3 se muestra una banda de 1 000 pb que no está presente en las demás cepas; en éstas se observa un grupo de bandas de aprox. 1 500 pb que no están presentes en esta cepa recuperada de hígado.

◆ EcoRV.

Al igual que con las enzimas anteriores, en C-19 no se observaron variaciones en el patrón de corte. En el caso de la cepa RB51, tanto vacunal como recuperadas de cuyes, el corrimiento electroforético de ADN muestra un polimorfismo similar.

◆ HindIII.

El patrón de corte con esta enzima fue similar en ambas cepas, y no hubo evidencia de variación antes y después de ser inoculadas en cuyes.

◆ PstI.

Al analizar las cepas recuperadas de cuyes y la de origen vacunal de RB51 no se observó evidencia de restricción con esta enzima, ya que en el gel de poliacrilamida al 5%, se presenta una única banda superior en cada carril que corresponde al ADN no cortado (Figura 6). Sin embargo, en el caso de C-19 si hubo corte con esta enzima y al igual que en las enzimas anteriores, no se observan cambios en el polimorfismo de esta cepa antes y después de ser recuperadas (Figura 7). Al no obtener digestión de la cepa RB51, se hicieron varias pruebas que consistieron en cambiar la concentración de la *Pst I*; es

decir, se duplicó la cantidad de enzima con respecto al ADN, cantidad de ADN, tiempo de incubación. Sin embargo, no se observó corte de ADN con esta enzima de restricción.

Este resultado nos permite observar que existen diferencias entre la C-19 y RB51 basado en la susceptibilidad al corte con esta enzima.

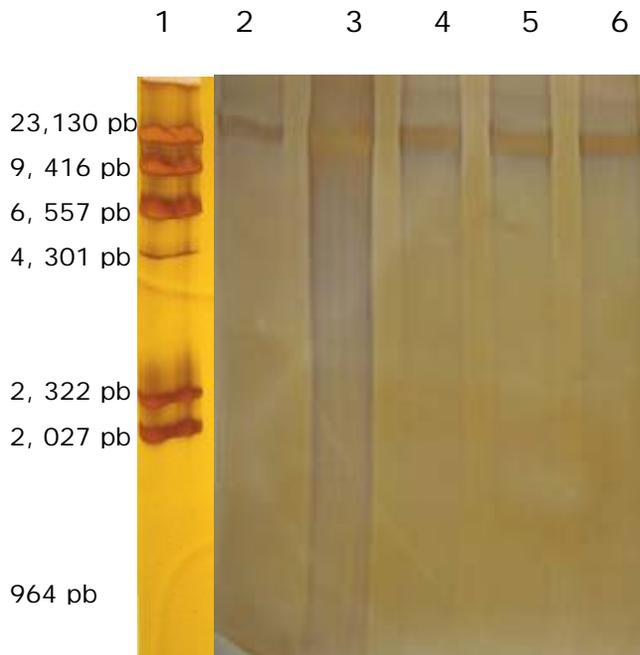


Figura 6: **Gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata en el que se realizó corrimiento electroforético de muestras de ADN de cepas vacunales y recuperadas de *Brucella abortus* (RB51), cortadas con la enzima de restricción *PstI*.** Carriles: 1) Marcador de peso molecular (λ ADN/*HindIII* fragmentos). 2) RB51 recuperada de Bazo. 3) RB51 recuperada de Hígado. 4) RB51 recuperada de Bazo. 5) RB51 recuperada de Hígado. 6) Vacuna RB51. La banda superior que se observa en cada carril demuestra que esta enzima de restricción no cortó el ADN de las cepas recuperadas y de origen vacunal de RB51.



Figura 7: **Gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata en el que se realizó corrimiento electroforético de muestras de ADN de cepas vacunales y recuperadas de *Brucella abortus* (C-19), cortadas con la enzima de restricción *PstI*.** Carriles: 1) Vacuna C-19. 2) C-19 recuperada de Hígado. 3) Vacuna C-19. 4) C-19 recuperada de Hígado. El polimorfismo de las cepas es similar, se puede observar que en este caso la enzima *PstI* si cortó el ADN de la C-19.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizaron ensayos para comprobar la variabilidad de la cepa 19 y RB51, con relación a la expresión de proteínas de membrana externa y el perfil de corte con endonucleasas de restricción después de ser recuperada del bazo e hígado de cuyes inoculados. Los resultados más relevantes mostraron cambios en ambas características. En diferentes especies de *Brucella* los cambios en la morfología colonial (por ejemplo: de lisa a rugosa) son asociados con cambios en su capacidad de infectividad, replicación y antigenicidad.³⁷ Por ejemplo, existen reportes de que la cepa rugosa 45/20 ha revertido a fenotipo liso y con ello ser virulenta,^{16, 37} además esta observación puede también reflejar la selección de variantes lisas presentes en los cultivos.⁴ La cepa RB51 de *B. abortus* que fue creada por selección a partir de la cepa 2308 en medios adicionados con rifampicina, tiene características rugosas estables *in vitro*, carece de cadena O, o contiene cantidades insuficientes de esta molécula como para inducir la producción de anticuerpos específicos en animales inmunizados y no revierte a lisa. Esto fue observado en el estudio de su creación durante su derivación en 15 pases en ratones y después de la infección experimental en cabras gestantes lo cual indica que es estable *in vivo* además de 93 pases *in vitro*. Además se menciona su nivel elevado de resistencia a rifampicina que es útil para la identificación de esta cepa.⁶⁹ Sin

embargo, en diferentes estudios realizados en México, se ha observado que la cepa RB51 tiene la capacidad de ser eliminada en leche y exudado vaginal.⁴⁵ Esta situación podría deberse a que presenta cambios en su patogenicidad tal vez por cambios en el genoma o diferencias en el perfil de expresión de proteínas de membrana externa, tal como se demostró en el desarrollo de este trabajo.

En el desarrollo de este trabajo no se encontraron cambios en el fenotipo de las cepas de RB51, antes y después de ser inoculadas en cuyes. Otra de las características relacionadas con la virulencia es la persistencia del microorganismo en el hospedero, en este sentido, la cepa RB51 fue aislada de bazo e hígado hasta la cuarta semana pero conforme pasaron las semanas se observó una disminución en las colonias recuperadas, a la quinta semana ya no se obtuvo aislamiento. Algunos autores han encontrado que en ratones el microorganismo persiste hasta 4 semanas post-inoculación en el caso de la cepa RB51; además de que una inoculación intraperitoneal resulta en una colonización esplénica que es evidente dentro del período de las 4 semanas.^{37, 69}

En cuanto a las diferencias en la expresión de proteínas de las cepas vacunales antes y después de ser inoculadas en cuyes, se encontraron cambios en el perfil de proteínas de membrana externa

de la cepa RB51; mientras que la expresión de proteínas de la C-19 bajo diferentes condiciones no se vio modificada. En el caso de la vacuna RB51 muestra un perfil de proteínas antes de ser inoculada diferente al observado en las cepas recuperadas de cuyes, a diferentes semanas y de los diferentes órganos; este fenómeno puede explicarse en el sentido que la expresión de proteínas se puede modificar asociado a diferentes condiciones del hospedero, así como a las múltiples interacciones entre la bacteria y la célula huésped.¹⁵ Por ejemplo, desde que *B. abortus* se establece de forma crónica en el macrófago, está sujeta a condiciones adversas. Bajo éstas condiciones, la expresión de sus proteínas es vital para su supervivencia,¹⁵ por lo cual se puede comprender la variación en la expresión de sus proteínas ligado al medio en el que se encuentre.

Durante el estudio de una bacteria, el encontrar o no expresadas algunas proteínas también se debe a que la expresión de éstas es observada en algunas especies bacterianas al haber delección o pérdida de expresión de genes, favoreciendo la expresión de otras. La expresión de un factor de virulencia puede incrementar la persistencia o características virulentas de un patógeno atenuado,⁷⁴ la cepa RB51 no está exenta de llevar a cabo un proceso de expresión de proteínas diferentes y realzar sus factores de virulencia.

Las proteínas encontradas en el presente estudio que marcan diferencias entre la cepa de origen vacunal RB51 y las recuperadas de cuyes se encuentra por debajo de los 43 kDa, éstas podrían corresponder al grupo de proteínas menores o al grupo 2 de las omp en el rango de 36-38 kDa, que han sido estudiadas por diferentes investigadores, como el caso de Connolly y colaboradores¹⁵ que hicieron un análisis proteómico de varias especies de *Brucella* e identificaron las proteínas principales y su papel en la respuesta inmune con la visión de desarrollar una estrategia para obtener una vacuna eficiente. Las proteínas inmunogénicas de la envoltura celular de *B. abortus* son candidatas ideales para las vacunas debido a que son las primeras proteínas que interactúan con el hospedero. *B. abortus* es un organismo que está obligado a adaptarse a diferentes ambientes durante su ciclo vital, debido a que el medio ambiente extracelular contiene sustancias bactericidas como son antibióticos, anticuerpos y proteínas del complemento. Una vez que invade y reside en el macrófago, ésta se adapta para sobrevivir a las duras condiciones de privación de nutrientes y estrés oxidativo. Esta supervivencia de *Brucella*, se ha asociado con la síntesis de enzimas antioxidantes (KatE y SodC) y proteínas de pesos moleculares variados: 17, 24, 28, 60 y 62 kDa.⁴⁷ Los genes que codifican las proteínas de membrana externa más importantes de *Brucella* han sido identificadas desde finales de los 80's. Los productos de éstos genes son nombrados ahora Omp2a y Omp2b de 36-38 kDa o

proteínas del grupo 2 (porinas); Omp25 de 25-27 kDa y Omp31 de 31-34 kDa, ambas consideradas como proteínas del grupo 3.¹³ También existen las denominadas proteínas menores por estar presentes en bajas concentraciones, sus pesos son 10, 16.5, 19 y 89 kDa, son lipoproteínas de membrana externa y son conocidas como Omp10, Omp16, Omp19 y Omp1 respectivamente.⁴⁷

Vemulapalli⁷³ estudió una lipoproteína de aproximadamente 18-19 kDa que tiene propiedades antigénicas, ya que en infección natural se observan anticuerpos contra esta proteína, y menciona que es un candidato potencial para el desarrollo de una vacuna, esta proteína puede corresponder a la encontrada en este trabajo.

Además de realizar el corrimiento electroforético de proteínas de membrana externa, en el presente trabajo se llevó a cabo el análisis del ADN a través del perfil de corte con endonucleasas de restricción con el fin de complementar los resultados ya obtenidos; ya que el uso de un análisis simple con éstas enzimas como una herramienta epidemiológica en las investigaciones de brucelosis es difícil debido a la homogeneidad genética del género *Brucella*. Por lo que, los procedimientos que evidencian diferencias en las proteínas de membrana externa complementan la caracterización intraespecífica de la bacteria.⁵¹

En este estudio se observó una digestión total del ADN con la enzima de restricción *EcoRV*, mientras que con la enzima *PstI* no hubo corte en el caso de RB51. En contraste con estos resultados, en el trabajo realizado por Martínez⁴⁹ donde trabajó las cepas 19, RB51 y una cepa RB51 recuperada de leche de vaca, realizó la digestión del ADN con la enzima *PstI* y en su caso si observó digestión. Existen varias situaciones a considerar para explicar la falta de corte con la enzima *PstI*, entre las que están la marca del laboratorio productor de la enzima, la cantidad utilizada en los diferentes estudios, la proporción de enzima en relación a la cantidad de ADN, constantes físicas como temperatura y tiempo de incubación. Sin embargo, cabe resaltar que las condiciones utilizadas para la cepa RB51 fueron las mismas que las utilizadas para la C-19, en la que si hubo digestión, lo cual también puede indicar diferencias en la secuencia de ADN entre ambas cepas de *B. abortus*.

En el trabajo de Kovach y colaboradores⁴⁰ obtuvieron fragmentos de ADN con la enzima *PstI* a partir de la cepa 2308 de *Brucella abortus*. Siendo RB51 mutante rugosa obtenida de la cepa 2308; esta enzima debería cortar la cepa RB51 de *B. abortus* debido a que la variación en el genoma de una y otra es mínima (en el gen *wboA*).

Para el caso de la endonucleasa de restricción *EcoRI*, en este trabajo, se encontraron varias diferencias en la cepa RB51 recuperada de hígado a la segunda semana con respecto a la cepa de origen

vacunal. En el trabajo desarrollado por Martínez,⁴⁹ también trabajo con esta enzima no encontrando resultados relevantes en el sentido de que haya reportado alguna variación en el perfil de corte. Tal vez se estaría presenciando una variación genética en la cepa RB51, sin llegar a ser definitiva porque faltarían estudios como una secuenciación o un PCR.

Cuando aparecieron las cepas vacunales mutantes como C-19, Rev-1 y RB51 no fueron identificadas genéticamente, esto ahora es posible con la llegada de la secuenciación genómica. Sin embargo, es posible que estas cepas contengan cambios genéticos múltiples e identificar las diferencias relevantes puede ser sumamente difícil.²⁴ Las mutagénesis controladas y directas de *Brucella* permanecen con un valor experimental aprovechado para identificar el papel de los genes en supervivencia y virulencia. Las cepas rugosas mutantes fueron las primeras variantes identificadas porque sus fenotipos son fácilmente distinguibles.

También se trabajó con las enzimas de restricción *EcoRV*, *BamHI* y *HindIII*, donde no se encontraron variaciones en el perfil de corte. En el trabajo de Morales⁵³ se utilizaron estas endonucleasas para el caso de *Mannheimia haemolytica*, las cuales fueron eficientes al realizar el corte y sirvió para encontrar diferencias entre cepas de estas bacterias. De esta manera se utilizan estas endonucleasas en

diferentes géneros bacterianos para determinar diferencias con fines epidemiológicos.

Los resultados de esta tesis demuestran ciertas variaciones de la cepa RB51 en el modelo trabajado. Sin embargo no es posible determinar el efecto biológico de éstas variaciones, por ejemplo, existen diversas circunstancias que podrían asociarse a éstos cambios, se ha mencionado la existencia de una respuesta atípica post-vacunal mencionada por Leal.⁴⁵ En investigaciones realizadas en México, usando la prueba de Tarjeta convencional a una concentración normal, animales vacunados con esta cepa han mostrado ser seropositivos. Esto puede deberse a una respuesta secundaria causada por la exposición a una cepa de campo de *Brucella* presente en el ganado. Pero también, se ha hecho común en México la revacunación repetida con cepa RB51 al ganado, lo que también puede contribuir a la colonización de la cepa, su persistencia y por lo tanto este tipo de respuestas atípicas. Entonces, la presencia de anticuerpos demuestra que los animales están en contacto con el agente pero su sistema inmune controla la infección. Esta situación no se presenta en países con baja prevalencia de brucelosis, como en EU. Sin embargo, bajo la situación de México, donde la enfermedad tiene un estado endémico y de alta prevalencia; el reto para cualquier biológico, incluidas las cepas 19 y RB51, es muy alto por los altos índices de exposición con cepas patógenas de campo.⁴⁵

Además de este tipo de respuesta post-vacunal, en un trabajo realizado por Arellano-Reynoso y colaboradores⁴ aislaron RB51 de leche y exudados vaginales de vacas paridas, que fueron revacunadas con dosis reducida de la bacteria. Aquí, se examinó por microscopia confocal el tráfico intracelular de la cepa virulenta *B. abortus* 2308, la cepa RB51 usada para la vacunación y cepa la RB51 aislada de leche de vaca. *Brucella* fue aislada de leche de vaca y exudados vaginales a los 60 días post-revacunación. Todos los aislamientos fueron biotipificados como *Brucella abortus* RB51 cepa rugosa biovar 1 con morfología rugosa del LPS y resistente a rifampicina. Los autores argumentan que desde que RB51 es una mutante espontánea, existe la posibilidad de un cambio en la atenuación del patrón de la vacuna. Estos autores realizaron ensayos de infección *in vitro* para determinar si la bacteria mutaba y desplegaba un fenotipo virulento permitiendo la replicación intracelular. Sus estudios ponen en evidencia que los aislamientos de *B. abortus* cepa RB51 a partir de leche tienen características iguales o similares a la cepa vacunal. Proponen que estos estudios *in vitro* no representan del todo, lo que pudiese estar sucediendo *in vivo*, y que la presencia de cepas vacunales en leche no se debió a cambios en los mecanismos de virulencia de *Brucella* dentro de la célula huésped.

La cepa RB51 de *Brucella abortus* ha sido aislada de leche después de 60 días post-vacunación. En otro estudio, donde se revacunó por 2 y

3 veces a vacas, al hacer pruebas serológicas no hubo seroconversión, después de éste tiempo en pocas vacas lograron aislar a la cepa RB51 poco después del parto y mencionan que puede no considerarse un problema de salud pública debido a que es menos virulenta que C-19,⁷² sin embargo cabe destacar que aunque le den poca importancia, sí lograron aislar esta cepa.

A pesar de haber encontrado diferencias en la expresión de proteínas de membrana externa, y en el corte con enzimas de restricción en el caso específico de la cepa RB51 en este trabajo, se necesita complementar con otros estudios (como secuenciación genómica o PCR) para afirmar que existen cambios en la virulencia de este microorganismo. Sin embargo, es posible que esta cepa no sea tan estable y pueda constituir un riesgo si no se usa de manera adecuada, pudiera implicarse en casos de aborto, no ser tan inocua para el ser humano, donde ya se han reportado casos de exposición accidental;¹⁴ al igual que no serlo para animales y entonces se deberían de tomar las medidas de bioseguridad en el manejo de esta vacuna. Se ha reportado que la cepa RB51 tiene una virulencia residual en cabras gestantes,³⁰ además de mostrar que es capaz de colonizar tejidos y ser eliminada por leche. Se observó, desde su utilización en México, un aumento de forma exponencial en los resultados positivos en pruebas de Tarjeta y Fijación de Complemento, este fenómeno se observó incluso en hatos

certificados como libres de brucelosis por SAGARPA. En conclusión, faltarían más estudios sobre esta vacuna para determinar si es tan eficiente como la C-19, así como para determinar su inocuidad.

CONCLUSIONES

- ◆ La cepa RB51 de *Brucella abortus* mostró diferencias en su expresión de proteínas de membrana externa antes y después de ser inoculada en cuyes.
- ◆ En el corte con endonucleasas de restricción las cepas RB51 y C19 de *Brucella abortus* conservan una homología muy parecida encontrando pocas diferencias entre ambas.
- ◆ Se observaron cambios en el ADN cortado con *EcoRI* para la cepa RB51 de *Brucella abortus*.
- ◆ La enzima de restricción *PstI* no digiere el ADN de la cepa RB51.
- ◆ La cepa 19 de *Brucella abortus* se mostró constante en su perfil de proteínas de membrana externa y al corte con endonucleasas de restricción.

APÉNDICE

1. Frotis

En condiciones de esterilidad: en un portaobjetos se coloca una gota de fenol diluido, con un asa de siembra se toma una colonia de bacterias y se disuelve con el fenol expandiendo la gota sobre el portaobjetos. Se seca con calor para permitir que se fije.

2. Tinción de Gram

- 1.- Cristal violeta 1min.
- 2.- Enjuagar con agua destilada
- 3.- Lugol 1 min.
- 4.- Enjuagar con agua destilada
- 5.- Alcohol-Acetona lavar hasta que se caiga el colorante
- 6.- Enjuagar con agua destilada
- 7.- Safranina 1 min.
- 8.- Lavar con agua destilada

RESULTADO: Bacterias Gram (-) son color rojas y bacterias Gram (+) son color azul.

3. Solución Salina Fisiológica

8.5 g NaCl cbp 1 L de agua destilada

4. Soluciones para extracción de proteínas

4.1 Sarcosil 1% (N-Lauril-Sarcosina)

1 g Sarcosil cbp 99 ml de HEPES 10 mM.

4.2 SDS 10%

10 g de sodio dodecil sulfato cbp 90 ml de agua destilada.

5. Soluciones para geles de poliacrilamida al 10%

5.1 Buffer De Muestra

Tris 0.5M pH 6.5	3 ml
EDTA 0.2M	0.3 ml
SDS 10%	3 ml
2-Mercapto-etanol	0.3 ml
Glicerol	2.4 ml
Agua destilada	3 ml

5.2 Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8)

18.15 g Tris base.

Disolver en 80 ml de agua destilada, ajustar a pH 8.8 con HCl, aforar a 100 ml y refrigerar a 4°C.

5.3 Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)

6 g Tris Base.

Disolver en 80 ml de agua destilada, ajustar a pH 6.8 con HCl, aforar a 100 ml y refrigerar a 4°C.

5.4 Buffer Separador

Tris 1.5 M pH 8.8	20 ml
SDS 10%	0.8 ml
Agua destilada	24.8 ml

5.5 Buffer Concentrador

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	8 ml
SDS 10%	0.3 ml
Agua destilada	12 ml

5.6 Ácido Acético al 10 %

Ácido acético	100 ml
Agua destilada	900 ml

5.7 Acrilamida 30%

29.2 g	Acrilamida.
0.8 g	N'N'-bis-metilen-acrilamida.

Disolver en 70 ml de agua destilada y aforar a 100 ml, filtrar y refrigerar a 4°C.

5.8 Persulfato de Amonio 0.9%

450 mg	Persulfato de amonio.
50 ml	Agua destilada.

Colocar en alícuotas y congelar a -20°C.

5.9 Buffer de Corrida

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

6. Elaboración de Geles para Proteínas.

➤ Gel Separador

✓ Buffer separador	5.7 ml
✓ Acrilamida 30%	3.3 ml
✓ Persulfato de amonio 0.9%	1.0 ml
✓ TEMED	10 μ l

➤ Gel Concentrador

✓ Buffer Concentrador	2.03 ml
✓ Acrilamida 30%	0.6 ml
✓ Persulfato de amonio 0.9%	0.3 ml
✓ TEMED	4 μ l

Todos los implementos de la cámara de electroforesis se enjuagan con agua destilada, las placas de vidrio se limpian con metanol, posteriormente se colocan los separadores entre las placas de vidrio y

se montan en su base con una goma en el fondo para lograr el ajuste hermético al apretar los tornillos. Enseguida se preparan los geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio al 10%. Entre las placas de vidrio, primeramente se prepara y coloca el gel separador, posteriormente se prepara un gel concentrador, el cual se coloca en la parte superior del gel separador. Se coloca el peine formador de los pozos para las muestras y se espera a su polimerización. Después de polimerizar, el gel se coloca en la cámara de electroforesis que contiene amortiguador de corrida. Se retira el peine con cuidado y se colocan los marcadores de peso molecular y las muestras en cada pozo. El tiempo de corrimiento es de 80 volts por 10 minutos y posteriormente a 100 volts hasta verificar que las muestras completan el recorrido en el gel concentrador.

6.1 Azul de Coomassie

250 ml	Metanol
50 ml	Ácido acético
0.1 g	Azul de Coomassie G-250

Disolver en 1 L de agua destilada, agitar por 1 h y filtrar.

7. Soluciones para extracción de ADN

7.1 Tris-HCl 1 M pH 8.0

12.11 g Tris Base.

Disolver en 80 ml de agua destilada, ajustar a pH 8.0 con HCl, aforar a 100 ml y refrigerar a 4 °C.

7.2 EDTA 0.5 M pH 8.0

37.22 g EDTA

Disolver en una cantidad de agua menor (150 ml), ajustar el pH a 8.0 con NaOH. Aforar a 200 ml y esterilizar en autoclave.

7.3 Solución TE 10:1

Tris-HCl 1 M pH 8.0	2 ml
EDTA 0.5 M pH 8.0	0.4 ml
Agua destilada estéril	197.6 ml

7.4 Preparación de RNAsa 10 mg/ml

Disolver 10 mg de RNAsa (Ribonucleasa) en 1 ml de acetato de sodio 0.01 M. Se hierve 15 min, se deja enfriar y se distribuye en alícuotas de 50 μ l. Se mantiene en congelación hasta su uso.

7.5 TBE 5x (Tris-Boratos)

Tris base	54 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA 0.5 M pH 8.0	20 ml

cbp 1 L y esterilizar.

8. Preparación de gel de agarosa 1%

Disolver 0.3 g de agarosa en 30 ml de buffer TBE 5x, se disuelve por calor hasta que no haya grumos y se adiciona 3.5 μ l de Bromuro de etidio y se coloca en la cámara horizontal de electroforesis.

9. Soluciones para geles de poliacrilamida al 5%

9.1 Buffer Gel Separador

1.5 M Tris-HCl pH 8.8	500 ml
TEMED	2 ml
SDS	2 g

9.2 Gel de poliacrilamida al 5%

Acrilamida 40%	5.1 ml
Buffer Gel Separador	10.0 ml
Agua destilada	24.5 ml
Persulfato de amonio 10%	400 µl

Preparar en agitación constante hasta colocarlos en los vidrios de la cámara de electroforesis.

10. Tinción de Nitrato de Plata para ADN.

♦ Solución E 10x

- 3 ml de ácido acético en 287 ml de etanol.

◆ **Solución F 100x**

- 0.916 g de nitrato de plata en 5 ml de agua destilada estéril.

◆ **Solución G**

- Preparar NaOH al 3% en agua destilada estéril.
- 0.4 ml de formaldehído en 50 ml de NaOH al 3% (Formaldehído al 38%)

◆ **Solución H**

- 0.5 ml de ácido acético en 50 ml de agua destilada estéril.

Se retira el gel de los vidrios y se hace un corte pequeño en la parte inferior del primer carril para identificar el marcador de peso molecular. Se coloca el gel en 5 ml de solución E 10x diluidos en 50 ml de agua destilada estéril durante 30 min, se retira la solución anterior y se adicionaron 0.5 ml de solución F 100x diluidos en 50 ml de agua destilada estéril durante 30 min, al retirar la solución anterior, se hace un lavado con agua destilada estéril, un lavado con NaOH 3% y dos lavados con agua destilada estéril. Se adicionan 0.4 ml de solución G diluidos en 50 ml de NaOH 3% y se agita levemente hasta la observación de los segmentos o bandas de las muestras, se retira la solución y se agregan 0.5 ml de ácido acético glacial en 50 ml de agua destilada estéril.

REFERENCIAS

1. Adone, R., Ciuchini, F. 2001. *Brucella abortus* RB51 and hot saline extract from *Brucella ovis* as antigens in a complement fixation test used to detect sheep vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8(1), 119-122.
2. Alton, G. G., Jones, L. M., Agnus, R. D., and J. M. Verger. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Reserche Agronomique. France.
3. Aparicio, A., Díaz, E., Hernández, L., Pérez, R., Alfonseca, E. y F. Suárez. 2003. Evaluación serológica y bacteriológica de un hato bovino con brucelosis y revacunado con dosis reducida de *Brucella abortus* cepa 19. *Téc. Pecu. Méx.* 41(2), 129-140.
4. Arellano-Reynosos, B., Díaz-Aparicio, E., Leal-Hernández, M., Hernández, L. and J. P. Gorvel. 2004. Intracellular trafficking study of a RB51 *B. abortus* vaccinal strain isolated from cow milk. *Vet. Microbiol.* 98(3-4): 307-312.
5. Biberstein, E. L. 1994. Tratado de Microbiología Veterinaria. Ed. Acribia. España. Pp. 83-291.
6. Blasco, J. M., y C. Gamazo. 1994. Brucelosis Animal: Investigación y Ciencia. 218, 56-62.
7. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the

principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.

8. Bricker, J. B. and S. M. Halling. 1995. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strain S19 and RB51. *J. Clin. Microbiol.* 1640-1642.
9. Canning, P. C. 1990. Phagocyte inflammation in resistance to brucellosis "Advances in brucellosis research" Texas. A&M. University Press College Station. USA. Pp. 151-163.
10. Cheville, N. F., Olsen, S. C., Jensen, A. E., Stevens, M. G., and M. V. Pal. 1996. Effects of age at vaccination on efficacy *Brucella abortus* strain RB51 to protect cattle against brucellosis. *Am. J. Vet. Res.* 57, 1153-1156.
11. Cheville, N. F., Stevens, M. G., Jensen, A. E., Tatum, F. M., and S. M. Halling. 1993. Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 54, 1591-1597.
12. Cloeckaert, A., Verger, J. M., Grayon, M., and N. Vizcaino. 1996. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiol.* 145, 1-8.
13. Cloeckaert, A., Vizcaíno, N., Paquet, J. Y., Bowden, R. A. and P. H. Elzer. 2002. Major outer membrane proteins of *Brucell* spp.: past, present and future. *Veterinary Microbiology.* 90: 229-247.
14. Comerci D. J. 2002. Factores de virulencia en *Brucella abortus*: caracterización del sistema VirB y su rol en la colonización de la

- célula huésped. Desarrollo de un sistema de expresión de proteínas recombinantes en *Brucella abortus* S-19. Tesis Doctorado. Universidad General San Martín. Argentina. 33.
15. Connolly, J. P., Comerci, D., Alefantis, T. G., Walz, A., Quan, M., Chafin, R., Grewal, P., Mujer, C. V., Ugalde, R. A. and V. G. DelVecchio. 2006. Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. *Proteomics*. 6: 3767-3780.
 16. Corbeil, L., Blau, K., Inzana, T., Nielsen, K., Jacobson, R., Corbeil, R. and A. Winter. 1988. Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. *Infect. Immun.* 56: 3251-3261.
 17. Crespo, L. F. 1994. Brucelosis ovina y caprina. Office International des Epizooties. España.
 18. Cuevas, P. A. 2005. Respuesta serológica contra las proteínas de membrana externa de la cepa RB51 de *Brucella abortus* en borregos vacunados. Tesis de Licenciatura. FES Cuautitlán-UNAM.
 19. D'Anatro, N. 2003. Aislamiento y tipificación de *Brucella abortus*. Jornada de Actualización sobre Brucelosis Bovina, Rocha, Argentina.
 20. Diario de la Federación. 20 de agosto de 1996. Norma Oficial Mexicana NOM-041- ZOO-1995 Campaña nacional contra la brucelosis en los animales.
 21. Diario de la Federación. 28 de octubre de 1997. Norma Oficial Mexicana NOM-053- ZOO-1995 Requisitos mínimos para las

vacunas, antígenos y reactivos empleados en la prevención y control de la brucelosis en los animales. SAGAR.

22. Díaz, E., Hernández, L., Valero, G. y B. Arellano. 2001. Diagnóstico de Brucelosis Animal. INIFAP-SAGARPA. México. Pp. 34-171.
23. Dubray, G. and M. Plommet. 1997. Structure et constituants des *Brucella*: propriété biologiques et caractérisation des fractions. *Dev. Biol. Standard.* 31, 68-91.
24. Ficht, T. A. 2002. Discovery of *Brucella* virulence mechanisms using mutational analysis. *Veterinary Microbiology.* 90: 311-513.
25. Foster, G., MacMillan, A. P., Godfroid, J., Howie, F., Ross, H. M., Cloeckaert, A., Reid, R. J., Brew, S. and I. A. Patterson. 2002. A review of *Brucella sp.* infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. *Vet. Microbiol.* 90(1-4):563-580.
26. Foster, G., Osterman, B. S., Godfroid, J., Jacques, I. and A. Cloeckaert. 2007. *Brucella ceti sp. nov.* and *Brucella pinnipedialis sp. nov.* for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2688-2693.
27. Freer, E. 1996. Immunochemical characterization of *Brucella* LPS and its relation to virulence. ISBN 91 628-2302-7. Ph.D. Thesis, Karolinska Institutet, Stockholm.
28. Freer, E., y A. R. Castro. 2001. *Brucella*: una bacteria virulenta carente de los factores de virulencia clásicos. *Rev. Costarric. Cienc. Méd.* 22, 1-2.

29. Freer, E., Moreno, E., Moriyón, I., Pizarro, C. J., Weintraub, A., and J. P., Gorvel. 1996. *Brucella-Salmonella* lipopolysaccharide cimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than their native *Brucella spp* counterparts. *J. Bacteriol.* 178, 5867-5876.
30. Fuentes-Delgado, M. A., Vitela-Mendoza, I. V., Arellano-Reynoso, B., Hernández-Castro, R., Morales-Alvarez, J. F., Cruz-Vázquez, C., Suárez-Güemes, F. and E. Díaz-Aparicio. 2007. Presence of *Brucella abortus* vaccinal strain RB51 in vaginal exudates of aborted cows. *Research Journal of Dairy Sciences.* 1(1-4): 13-17.
31. Golding, B., Scott, D. E., Scharf, O., Huang, L. Y., Zaitseva, M., Lapham, C., Eller, N., Golding, H. 2001. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes and Infection.* 3, 43-48.
32. Gorvel, J. P. and E. Moreno. 2002. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology.* 90: 281-297.
33. Groussaud, P., Shankster, S. J., Koylass, M. S. and A. M. Whatmore. 2007. Molecular typing divides marine mammal stains of *Brucella* into at least three groups with distinct host preferences. *J. Med. Microbiol.* 56: 1512-1518.
34. Hamdy, M. E., and A. S. Amin. 2002. Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. *Veterinary J.* 163, 299-305.

35. Hatipoglu C.A., Yetkin A., Ertem G.T., and N. Tulek. 2004. Unusual clinical presentations of brucellosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 36(9): 694-697.
36. Idrissi, A. H., Benkirane, A., Maadoudi, M., Bouslikhane, M., Berrada, J., y A. Zerouali. 2001. Estudio comparado de la eficacia de vacunas vivas preparadas con cepa RB51 de *Brucella abortus* y Rev 1 de *Brucella melitensis* ante la infección experimental por *Brucella melitensis* de ovejas grávidas. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20(3), 741-747.
37. Jensen, A. E., Ewalt, D. R., Cheville, N. F., Thoen, C. O. and J. B. Payeur. 1996. Determination of stability of *Brucella abortus* RB51 by use of genomic fingerprint, oxidative metabolism, and colonial morphology and differentiation of strain RB51 from *B abortus* isolates from bison and elk. *J. Clin. Microbiol.* 34(3): 628-633.
38. Kalaycioglu S., Imren Y., Erer D., Zor H., and D. Arman. 2005. *Brucella* endocarditis with repeated mitral valve replacement. *J. Card. Surg.* 20(2):189-192.
39. Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., Winn, W. C. 2001. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Panamericana. 5a. ed. Madrid, España. Pp. 424-430.
40. Kovach, M. E., Elzer, P. H., Robertson, G. T., Chirhart-Gilleland, R. L., Christensen, M. A., Peterson, K. M. and R. M. Roop II. 1997. Cloning and nucleotide sequence analysis of *Brucella abortus* gene

encoding and 18 kDa immunoreactive protein. *Microbial Pathogenesis*. 22: 241-246.

41.Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.

42.Leal, H. M., 2000. Evaluación de la respuesta inmune en becerras de la raza Holstein vacunadas con la cepa RB51 de *Brucella abortus*. Tesis de Licenciatura. FES Cuatlitlán-UNAM. Pp. 56. Pág. 1.

43.Leal, H. M., 2003. Respuesta inmune en bovinos vacunados con RB51, a la exposición natural con *Brucella abortus* y eliminación de la cepa vacunal en leche y exudado vaginal. Tesis de Maestría. FES Cuautitlan-UNAM. Pp. 1.

44.Leal, H. M., Díaz, E., Hernández, L. y F. Suárez, F., 1999. *Brucella abortus* RB51 vaccination and revaccination in cattle introduced in a flock with a Brucellosis outbreak. In: Proceedings of the 50th Annual Meeting of the Conference of Research Workers Animal Disease, Chicago, IL, USA. Pp. 171-188.

45.Leal-Hernández, M., Díaz-Aparicio, E., Pérez, R., Hernández-Andrade, L., Arellano-Reynoso, B., Alfonseca, E. and F. Suárez-Güemes. 2005. Protection of *Brucella abortus* RB51 revaccinated cows, introduced in a herd with active Brucellosis with presence of atypical humoral response. *Com. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 28: 63-70.

46.Leal-Klevezas, D. S., Barbosa-Pliego, A., Flores-Trujillo, M., López, M. A. y J. P. Martínez. 1999. Epidemiología molecular de un foco

- primario de brucelosis en el Estado de México. *Biotecnología Aplicada*. 16(3), 149-153.
47. López, M. A. 1989. Brucellosis en Latin America. Young, E. J., Corbel, M. H., editors. *Brucellosis: clinical and laboratory aspects*. Boca Ratón. CRC Press Inc. 151-161.
48. Mantur B.G., Akki A.S., Mangalgi S.S., Patil S.V., Gobbur R.H., and B. V. Peerapur. 2004. Childhood brucellosis-a microbiological, epidemiological and clinical study. *J. Trop.Pediatr.* 50(3):153-157.
49. Martínez, M. O. L., 2004. Elaboración de una sonda a partir de un fragmento del gen *omp2* de *Brucella melitensis*. Tesis de Maestría. FES Cuatlitlán-UNAM. Pp. 68.
50. Martínez, T. G., Pizarra, C.J., Moreno, E., and U. I. Moriyón. 1995. The outer membranes of *Brucella spp.* are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect and Inmun.* 63(8), 3054-3061.
51. McGillivery, D. J., Webber, J. J. and L. D. Edwards. 1988. Restriction endonuclease analysis of *Brucella abortus*. *Res. Vet. Sci.* 45: 251-252.
52. Mittal, K. R., and I. R. Tizard. 1980. Studies on the relationship between *Yersinia enterocolitica* 0.9 and *Brucella abortus* agglutinins in naturally infected animals. *Res. Vet. Sci.* 28(3), 311-314.
53. Morales, A. J. F. 2004. Evaluación de mecanismos de patogenicidad de aislados de *Mannheimia haemolytica* A2 productores de neumonías en ovinos. Tesis de Doctorado. FES-UNAM. Pp. 48.

54. Moreno, E. D., Berman, T., and L. A. Boettcher. 1981. Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infection and Immunity*. 31, 362-370.
55. Moriyón, U. I., y I. López-Goñi. 1998. Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Int. Microbiol.* 1, 19-26.
56. Moriyón, U. I., y I. López-Goñi. 2001. Estructura genética y fisiología del género *Brucella*. En Diagnóstico de Brucelosis. E. Díaz, L. Hernández, G. Valero, B. Arellano y cols. editores. INIFAP, SAGAR. Pp. 17-27.
57. Murray, P. R., Rosenthalk, K. S., Kobayashi, G. S., and M. A. Pfaller. 2003. Microbiología Médica. 4ª ed. Ed. Mosby- Elsevier Science. España.
58. Nielsen, K. 1990. The serological response of cattle immunized with *Yersinia enterocolitica* 0.9 or to *Yersinia* and *Brucella abortus* antigens in enzyme immunoassay. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 24(4), 373-382.
59. Olsen, S. Available vaccines for the control of *brucellosis* in animals. 1999. Reunión de consulta de expertos de la OPS/OMS sobre vacunas y estrategias de vacunación en los programas de control/erradicación de la brucelosis. Santiago de Chile 16 al 18 de Noviembre. Pp. 30-33.
60. Olsen, S. C. 2000. Immune responses and efficacy after administration of a commercial *Brucella abortus* strain RB5I vaccine to cattle. *Veterinary Therapeutics.* 1, 183-191.

61. Olsen, S. C., Bricker, B., Palmer, M. V. and A. E. Jensen. 1999. Responses of cattle to two dosages of *Brucella abortus* strain RB51: serology, clearance and efficacy. *Res. Vet .Sci.* 66, 101-105.
62. Outteridge, P. M. 1989. Inmunología Veterinaria. Ed. Acribia. España. Pp. 124-129.
63. Ozden M., Demirdag K., Kalkn A., Ozdemir H., and P. Yuce. 2005. A case of *Brucella* spondylodiscitis with extended, multiple-level involvement. *South Med. J.* 98(2): 229-231.
64. Riezu-Boj, J. I., Moriyon, I., Blasco, J. M. Gamazo, C. and R. Díaz. 1990a. Antibody response to *Brucella ovis* outer membrane proteins in ovine brucellosis. *Infect. Immun.* 58, 489-494.
65. Riezu-Boj, J. I., Moriyon, I., Blasco, J. M. Gamazo, C., Díaz, R. y A. J. Winter. 1990b. Analysis by immunoblot of the antibody response of sheep infected by smooth and rough brucella to outer membrane proteins extracted with hot saline. *Infect. Immun.* 58, 489-494.
66. Roop, R. M., Jeffers, G., Bagchi, T., Walke, R. J. and F. M. Enright. 1991. Experimental infection of goats fetuses in utero with a stable, rough mutant of *Brucella abortus*. *Res. Vet. Sci.* 51, 123-127.
67. Saldarriaga, O. A. y M. T. Rugeles. 2002. Inmunobiología de la infección por *Brucella spp*: Fundamentos para una estrategia vacunal. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 15(2).
68. Samartino, L. 2003. Conceptos generales sobre brucelosis bovina. Jornada de Actualización sobre Brucelosis Bovina, Rocha, Argentina.

69. Schurig, G. G., Roop, R. M., Bagchi, T., Boyle, S., Buhrman, O. and N. Sriranganathan. 1991. Biological properties of RB51, a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microb.* 28, 171-188.
70. Sowa, B.A. 1990. Membrane proteins of *Brucella spp.* in "Advances in brucellosis research". *Texas. A. & M. University Press.* College Station. USA. Pp. 89-105.
71. Tobias, L., Schurig, G. G. and O. O. Cordes. 1992. Comparative behaviour of *Brucella abortus* strain 19 and RB51 in pregnant mouse. *Res. Vet. Sci.* 3, 179-183.
72. Uzal, F. A., Samartino, L., Schurig, G., Carrasco, A., Nielsen, K., Cabrera, R. F. and H. R. Taddeo. 2000. Effect of vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 on heifers and pregnant cattle. *Veterinary Research Communications.* 24: 143-151.
73. Vemulapalli, R., Cravero, S., Calvert, C. L., Toth, T. E., Sriranganathan, N., Boyle, S. M., Rossetti, O. L. and G. G. Schurig. 2000. Characterization of specific immune responses of mice inoculated with recombinant vaccinia virus expressing an 18-Kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7(1): 114-118.
74. Vemulapalli, R., He, Y., Cravero, S., Sriranganathan, N., Boyle, S. and G. G. Schurig. 2000. Overexpression of protective antigen as a novel approach to enhance vaccine efficacy of *Brucella abortus* strain RB51. *Infect. Immun.* 68(6): 3286-3288.

