



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

“ESTANDARIZACIÓN DE UNA PRUEBA DE
ELISA INDIRECTA A PARTIR DE PROTEÍNAS
INMUNODOMINANTES DE *Brucella canis*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

ALDO MORALES AGUILAR

Asesores:

Dr. Francisco Suárez Güemes

Dr. Alejandro Benítez Guzmán



Ciudad Universitaria, Ciudad de México

2016



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.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	6
Agente Etiológico	6
Características del género <i>Brucella</i>	6
Características de <i>Brucella canis</i>	7
Antecedentes	8
Descubrimiento del agente etiológico y distribución mundial de <i>Brucella canis</i>	8
Identificación y estudios en México sobre <i>Brucella canis</i> .	9
Salud Pública	10
Situación mundial y en México	10
Patogenia	12
Vías de transmisión	12
Signos clínicos y lesiones debidos a la infección por <i>Brucella canis</i>	13
Respuesta Inmune	14
Respuesta inmune celular	15
Respuesta inmune humoral	16
Diagnóstico	18
Pruebas Diagnósticas Clásicas	18
Prueba de Aglutinación Rápida en Placa con	

2-Mercaptoetanol (2ME-RSAT)	18
Prueba de Aglutinación en Tubo (TAT) y modificada con 2-Mercaptoetanol (TAT- 2ME)	19
Inmunodifusión en Gel Agar	19
Tecnologías Aplicadas al Diagnóstico	20
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	20
Ensayo Inmunocromatográfico (ICA)	21
Ensayo de Inmunoabsorción ligado a Enzimas (ELISA)	22
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	24
MATERIAL Y MÉTODOS	25
RESULTADOS	34
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	63
APÉNDICE: PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES	70

DEDICATORIAS

A mi madre, Rocío Aguilar Álvarez, por el apoyo constante e incondicional durante todos estos años. Gracias por enseñarme con tu ejemplo a salir adelante y ser mejor cada día. Este camino juntos no ha sido fácil pero gracias por hacerlo más ameno con el amor que me transmites día a día. Esta dedicatoria representa sólo una pequeña parte del gran amor y admiración que tengo por ti.

A mis hermanas y mi padre, por enseñarme a aprender a disfrutar de todas las cosas, pero sobre todo, por enseñarme la unión y la formación de un núcleo familiar. Sin su apoyo y amor todo esto no hubiera sido posible.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alejandro Benítez Guzmán: la realización de este trabajo no hubiera sido posible sin todo el apoyo, confianza, guía, paciencia y conocimientos aportados. Gracias por no sólo haberme enseñado a hacer cosas en el laboratorio sino por haberme brindado tu amistad. Este trabajo tiene impreso la esencia de tus enseñanzas.

Al Dr. Francisco Suárez Güemes: por el apoyo constante e incondicional que siempre he recibido y la oportunidad de trabajar con usted.

A la Dra. Beatriz Arellano Reynoso: por todos los consejos y el gran apoyo para la realización y conclusión de esta tesis, su apoyo fue importante para el presente trabajo.

A la M en C. Blanca Valladares Riveroll: Mi primer contacto con un laboratorio fue contigo y estoy muy agradecido de que haya sido así: me enseñaste a ser disciplinado, ordenado y a ser paciente cuando los experimentos no salían como queríamos. Gracias por también haberme brindado tu amistad y haber hecho del laboratorio un lugar ameno para trabajar.

A los integrantes del Laboratorio de Investigación en Brucelosis y Tuberculosis: Gracias a cada uno de ustedes por haber formado un buen equipo de trabajo, por el apoyo y consejos que nos hemos brindado entre nosotros. Mi estancia en el laboratorio no hubiera sido tan divertida sin la dinámica que formamos.

A los Doctores Efrén Díaz Aparicio y Francisco Aguilar Romero: por todo el apoyo y la confianza brindados, gracias por todas sus enseñanzas.

A mis amigas Gabriela, Eréndira y Susana: por las gratas y valiosas experiencias a su lado he vivido, por darle luz a mi camino y enseñarme a disfrutar la vida. Gracias por enseñarme lo que es tener una verdadera amistad.

RESUMEN

Brucella canis es el agente etiológico de la brucelosis canina, enfermedad infectocontagiosa que afecta a los caninos y al ser humano. Produce orquitis/epididimitis (unilateral o bilateral) así como fibrosis y atrofia testicular en machos, en hembras provoca abortos y reabsorciones embrionarias, lo cual conduce a fallo reproductivo en ambos sexos. El diagnóstico está basado en los hallazgos clínicos, pruebas serológicas y hemocultivo; este último se considera la única prueba definitiva para confirmar la infección. La prueba de Aglutinación Rápida en Placa (RSAT), considerada como una prueba tamiz, ha mostrado niveles de sensibilidad y especificidad alrededor de 70.5% y 83.3% respectivamente. RSAT es una prueba cualitativa y requiere de personal capacitado para su interpretación. Para esta prueba, se usa la cepa de *Brucella canis* RM6/66 Mucoide (-), que debe ser cultivada bajo un riguroso proceso para que no reduzca su especificidad. Ante esta perspectiva, es necesario el desarrollo y propuesta de nuevas pruebas diagnósticas. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una prueba de ELISA indirecta, utilizando proteínas inmunodominantes obtenidas a través de Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas (FPLC) para obtener un resultado cuantitativo.

Se llevó a cabo la comprobación de la reactividad antigénica de las proteínas inmunodominantes, y se usaron como antígenos en una prueba de Dot blot y una ELISA indirecta. Estas proteínas mostraron tener un óptimo desempeño, al necesitar 56 ng de ellas para obtener un resultado positivo en Dot blot, y lograr resultados positivos y negativos correctamente diferenciados con tan sólo 200 ng

de proteínas inmunodominantes y los sueros de perros negativos e infectados experimentalmente con *Brucella canis* en un factor de dilución 1:1000, en el sistema de ELISAi. De las proteínas purificadas fue identificada la proteína del choque térmico GroEL de *B. canis*.

Palabras clave: *Brucella canis*, Proteínas inmunodominantes, FPLC, ELISA-Indirecta, Diagnóstico serológico.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μg	Microgramo
nm	Nanómetro
ng	Nanogramo
fg	Femtogramo
mL	Mililitro
AB	Anticuerpo
LPS	Lipopolisacárido
2ME-RSAT	Prueba de Aglutinación Rápida en placa con 2-Mercaptoetanol
TAT	Prueba de aglutinación en tubo
pH	Potencial de iones hidrógeno
AGID	Inmunodifusión en Gel Agar
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
ELISA-i	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado en Enzimas Indirecto
ICA	Ensayo Inmunocromatográfico
FPLC	Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
WB	Western blot
TSA	Agar tripticasa soya

rpm	Revoluciones por minuto
<i>g</i>	Gravedades
HEPES	Ácido-H-2-hidroxietilpiperazina-N-2etanolsulfónico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
mA	Miliamperios
V	Voltios
kDa	Kilodaltones
SPF	Libre de patógenos específicos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
MPa	Megapascales
M	Molar
mM	Milimolar
BSA	Albúmina Sérica Bovina
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
DTT	Ditiotreitol
DO	Densidades ópticas
2D-PAGE	Electroforesis Bidimensional en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
LC-MS	Espectrometría de masas – Cromatografía líquida
hsp	Proteínas del choque térmico

LISTADO DE FIGURAS Y CUADROS

Fig. 1.- Fracción soluble de *B. canis* previo al fraccionamiento proteico.

Fig. 2.- Cromatograma del fraccionamiento proteico de *B. canis* obtenido a través de FPLC.

Fig. 3.- SDS-PAGE al 10%, teñido con Azul de Coomasie de las fracciones obtenidas a través de FPLC.

Fig. 4.- Western blot de las fracciones obtenidas a través de FPLC.

Fig. 5.- Dot blot con proteínas inmunodominantes.

Fig. 6.- Determinación de la cantidad de antígeno crudo a usar para el montaje del sistema de ELISAI.

Fig. 7.- Representación gráfica de los sueros de animales positivos y negativos al ser titulados bajo el sistema ELISAI.

Fig. 8.- Proteínas inmunodominantes y su funcionamiento como antígenos en el sistema de ELISAI

Fig. 9.- Isoelectroenfoco, electroforosis y Western blot de las proteínas inmunodominantes usadas en ELISAI.

Cuadro 1. Resultados de LC-MS de los puntos de proteínas obtenidos mediante 2D-PAGE.

INTRODUCCIÓN

Características del género *Brucella*

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de curso agudo, subagudo o crónico, es de distribución mundial, afecta a los animales domésticos, silvestres e incluso al ser humano. Las bacterias pertenecientes al género *Brucella* se caracterizan por ser cocobacilos Gram-negativos, aeróbicos, inmóviles, carentes de cápsula, flagelo y plásmidos, y sin la capacidad de generar esporas (1). Está determinado que la transmisión ocurre por el contacto cercano de hospedero a hospedero, a través de secreciones, contacto sexual y más comúnmente, por el consumo de fetos abortados. En el caso particular del ser humano, se ha identificado que la transmisión ocurre por el contacto con animales domésticos, a través de abrasiones, por inhalación o contaminación conjuntival con aerosoles, así como por el consumo de productos lácteos sin pasteurizar (2,3). El potencial patógeno del género *Brucella* está asociado a su capacidad de sobrevivir y alcanzar su nicho de replicación de forma intracelular; tanto en las células del sistema fagocítico mononuclear, así como en trofoblastos de animales gestantes (2).

Brucella pertenece al grupo de las α 2-Proteobacteria y está relacionada filogenéticamente con patógenos del suelo (*Rhizobium*, *Agrabacterium*) e intracelulares de los animales (*Bartonella*, *Rickettsia*) (4); las brucelas pueden clasificarse por sus características fenotípicas (relacionadas al LPS) y al hospedero preferencial al cual infectan. Aunque las brucelas exhiben especificidad de hospedero (con excepción de algunos serotipos de *B. suis*), la mayoría de ellas

pueden producir infecciones cruzadas (5). Dentro de las características fenotípicas, las brucelas, pueden dividirse en brucelas lisas; (aquellas que poseen su lipopolisacárido completo [compuesto por el lípido A, el polisacárido central y la cadena O externa]) donde están *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. neotomae*, *B. inopinata*, *B. papionis* y *B. vulpis* y en brucelas rugosas; (aquellas que poseen la cadena O corta o ausente) donde se ubican *B. canis* y *B. ovis* respectivamente (6).

Respecto al hospedero que infectan se conoce al definitivo por especie: *B. abortus* (bovinos), *B. melitensis* (caprinos y ovinos), *B. suis* (suinos), *B. ovis* (ovinos), *B. canis* (caninos), *B. ceti* (cetáceos), *B. pinnipedialis* (pinípedos), *B. microti* (ratón de la montaña), *B. neotomae* (rata del desierto), *B. inopinata* (aislada de un implante mamario) (7), *B. papionis* (babuinos) (8) y recientemente descrita *B. vulpis* (zorro rojo) (9).

Características de *Brucella canis*

Brucella canis es un cocobacilo intracelular facultativo Gram-negativo, que mide entre 1.0-1.5 µm de longitud, aeróbico, carente de cápsula y flagelos e incapaz de formar esporas. A diferencia de la mayoría de los integrantes del género *Brucella*, tiene una morfología colonial rugosa, debido a que su LPS posee una cadena O externa corta, además de tener un rango de hospederos limitado (donde sólo se reconoce la susceptibilidad de los caninos y el ser humano).

ANTECEDENTES

Descubrimiento del Agente etiológico y distribución mundial de *Brucella canis*.

Brucella canis fue la última especie de los animales domésticos en ser identificada, descrita en el año de 1966 por el Dr. Leeland Carmichael, quién logró aislarla a partir del feto, placenta y descargas vaginales de una perra que abortó a su camada, en un criadero de perros Beagle (10,11). A pesar de haber sido aislada inicialmente en criaderos de perros Beagle, la brucelosis canina afecta a todas las razas de perros; esta información fue dada a conocer con la publicación realizada 2 años después del descubrimiento (12,13).

La brucelosis canina ha sido diagnosticada en varias áreas geográficas, siendo común en centro y sudamérica (México, Argentina (14), Chile, Colombia, Brasil y Perú); también ha sido reportada en los estados del sur de los Estados Unidos, así como en Canadá. Respecto a Europa, los informes indican su presencia en Finlandia, Rusia, Hungría, Italia, Alemania, Austria, Grecia, Polonia, Checoslovaquia, Francia, España, Gran Bretaña y más recientemente, Suecia (15). Los casos en Asia han sido descritos en Japón, China, Korea, India, Filipinas, Malasia y Taiwan. En África hasta el momento sólo ha sido descrita en Nigeria (16).

Identificación y estudios en México sobre *Brucella canis*

En el caso particular de México, los primeros estudios se realizaron en 1974, pero no fue sino hasta el año siguiente que se publicaron los resultados por Flores y Segura, respecto a la presencia de la infección en el país. En este estudio, se realizaron pruebas de aglutinación en 500 sueros de perros en situación de calle, 203 muestras de sueros humanos y hemocultivos en las muestras de los 500 perros. 140 de los sueros de perro (28%) resultaron positivos en la prueba de Aglutinación Rápida en Placa, mientras que 27 sueros humanos (13.3%) también resultaron positivos a esta prueba. *Brucella canis* pudo ser aislada de 8 caninos (5.7%) (17). A partir de este estudio, se comenzaron a realizar más en el país para conocer la prevalencia de la brucelosis canina, realizándose 2 años después un estudio en 59 perros en situación de calle; 7 perros (11.8 %) resultaron positivos en la prueba serológica RSAT (18). Un estudio más reciente realizado en 2003 por Briseño y colaboradores, en perros machos con problemas reproductivos presentados al Hospital de Pequeñas Especies y el Departamento de Reproducción de la FMVZ-UNAM, reveló una positividad del 42.8 % (24 animales positivos por serología) y un 5.3% (3 animales positivos al hemocultivo) de un total de 56 animales muestreados (19).

SALUD PÚBLICA

Situación Mundial y en México

En el ser humano, la infección por *Brucella canis* no es del todo conocida, debido a varios factores y concepciones erróneas respecto a su prevalencia (20). A nivel mundial, la proporción de los casos de brucelosis debido a *Brucella canis* se desconoce o es reducida por varios aspectos: falta de pruebas diagnósticas de laboratorio específicas (el diagnóstico de laboratorio rutinario para la brucelosis humana fue desarrollado para detectar anticuerpos contra los antígenos de las cepas lisas, siendo incapaz de detectar antígenos de las cepas rugosas) (21), cuadro clínico no característico o diferencial de la infección por *Brucella canis* así como el bajo nivel de bacteremia que produce, lo cual complica el diagnóstico por hemocultivo (22).

Las formas de transmisión más comunes del perro al ser humano comprenden el estrecho contacto con un canino infectado (puede continuar diseminando la enfermedad meses después, incluso aunque la bacteremia en el animal haya cesado), con el feto de una perra que abortó o con secreciones vaginales durante el estro, así como la exposición directa a nivel de laboratorio al trabajar con la bacteria viva (20). Los médicos veterinarios y el personal que labora en criaderos de perros se consideran grupos ocupacionales en riesgo; estudios que han incluido a sujetos del primer grupo no han demostrado la seropositividad en ellos. Incluso aunque los signos y síntomas son característicos de la brucelosis, son inespecíficos

de la enfermedad causada por *Brucella canis*, factor que dificulta aún más la sospecha de la infección por esta bacteria. Recientemente, lesiones como la endocarditis ha sido descrita como producto de la infección por *Brucella canis* (23).

La información documentada en su mayoría corresponde a reportes de casos aislados, y pocos estudios recientes se han realizado en grupos de personas expuestas a *Brucella canis*. Estos estudios han tenido como objetivo el desarrollo de pruebas diagnósticas específicas para esta enfermedad, así como obtener datos sobre la prevalencia, aunque solamente revelan la presencia de la infección en el humano (20,22). La infección ha sido reportada en países como México, España, Argentina (22) y E.U.A (24).

Respecto a la situación en salud pública de México, la escasa información respecto a la identificación de esta infección no ha permitido reconocer el papel de *Brucella canis* en los casos de brucelosis reportados. La información disponible, de un estudio en un grupo determinado de sueros provenientes de diversos hospitales de la Ciudad de México, arrojó una positividad de 13.3 % del total de sueros probados (17). Estos datos han permitido asumir que no juega un papel importante en las infecciones humanas de brucelosis.

PATOGENIA

Vías de Transmisión

La brucelosis canina es una infección con vías de transmisión y dosis infectivas bien descritas. Por lo general, la bacteria penetra las membranas mucosas (oronasal, genital y conjuntival) siendo más común la ruta oronasal, con una dosis mínima infectiva de 10^6 microorganismos; las fuentes más frecuentes son el contacto con material abortado (que puede contener hasta 10^{10} microorganismos), descargas vaginales (la eliminación en las secreciones vaginales puede durar incluso hasta 6 semanas después de ocurrido el aborto) y semen. Para la vía conjuntival, se ha descrito que se necesita de una dosis de 10^4 - 10^5 microorganismos. Otras fuentes de infección son la orina, principalmente en machos infectados; la próstata y el epidídimo son el tejido “blanco” que funciona como un sitio efectivo para la emisión de bacterias, conteniendo entre 10^3 - 10^6 microorganismos/mL (el número suele ser menor en la orina de una hembra infectada) así como el semen (se ha demostrado que durante los 2 primeros meses de establecida la infección, el semen contiene una alta carga bacteriana, seguida de una baja esporádica que puede durar por años). Se ha documentado que heces así como secreciones nasales, oculares y saliva contienen una cantidad reducida de microorganismos, por lo cual no representan una fuente relevante para la transmisión (12,25).

Una vez que la bacteria ingresa a su hospedero, penetra los tejidos y es fagocitada por macrófagos y otras células fagocíticas, evitando su destrucción intracelular, de esta manera se transporta a los linfonodos, donde comienza su reproducción. Aproximadamente 4 semanas posteriores a este evento, se establece la bacteremia, que puede durar hasta 64 meses. *Brucella canis* tiene predilección por los órganos del aparato reproductor (próstata, epidídimo y testículo en el caso del macho, feto, útero grávido y placenta en la hembra (26) motivo por el cual las principales anomalías que se presentan son de tipo reproductivo (25).

Signos y lesiones debidos a la infección por *Brucella canis*

La brucelosis canina es una enfermedad caracterizada por provocar problemas reproductivos. Las principales lesiones en el macho son la orquitis/epididimitis (unilateral o bilateral), que progresa a fibrosis y atrofia testicular. El daño celular en el epidídimo inflamado induce un granuloma espermático, con la subsecuente ruptura de la barrera hematotesticular y fuga de espermatozoides que son fagocitados, induciendo una respuesta de anticuerpos anti-espermatozoides. Además de ello, se ha observado dermatitis escrotal, lesión asociada a la infección por bacterias secundarias debido a la constante lamedura (12,27).

El principal signo en la hembra es el aborto, que ocurre entre los 45-55 días de gestación; también se ha descrito la reabsorción embrionaria que sucede entre los 10-20 días de gestación. Así como ocurre con otras especies de *Brucella*, las infecciones por *Brucella canis* no interfieren con el ciclo estral, incluso la mayoría de

las hembras que presentan abortos, posteriormente pueden tener camadas. Algunos de los animales infectados por *Brucella* pueden permanecer sin signología clínica, debido a esto no son diagnosticados en el examen físico de rutina. Los signos no específicos, pero presentes en ambos sexos, son la linfadenitis, discoespondilitis, uveítis y artritis (25).

RESPUESTA INMUNE

Actualmente la información disponible sobre la respuesta inmune ante la infección por *Brucella canis* se ha obtenido a través del modelo ratón principalmente al evaluar candidatos como inmunógenos en estos animales, lo cual ha mostrado que la respuesta inmune es de tipo celular y humoral. Tomando en cuenta la respuesta inmune en general contra el género *Brucella*, investigaciones más recientes han descrito un poco más la respuesta celular y han identificado las principales clases de inmunoglobulinas producidas contra *Brucella* (y específicamente contra *Brucella canis*) cuando los ratones son enfrentados con cepas de campo.

Respuesta inmune celular

Una de las características distintivas de los miembros del género *Brucella* es su carácter intracelular facultativo, mediante el cual evaden la respuesta inmune innata y adquirida del hospedero, lo cual dificulta su eliminación. La respuesta inmune celular es esencial en el control y eliminación, donde los principales eventos son la activación de los macrófagos y los conjuntos de células T-CD8 y T-CD4+ que secretan citocinas específicas, con la finalidad de eliminar tales patógenos. Se ha podido documentar que en la fase temprana de la infección, las citocinas secretadas por los macrófagos (IL-1, IL-12 y TNF α) están implicadas en el control de la brucelosis, a través de la vía del interferón gamma (IFN γ). De hecho, el IFN γ reduce el crecimiento intracelular de *Brucella*, al activar a los macrófagos y promover la secreción del TNF α . Estos factores son necesarios, pero no suficientes para una eliminación eficaz de las brucelas. Otras moléculas reguladoras que también son producidas por los macrófagos, como los reactivos intermediarios del oxígeno y del óxido nítrico se ha comprobado que participan en la eliminación de *B. abortus* (3). Cabe destacar que una investigación reciente demostró que *B. canis* induce una respuesta proinflamatoria menor que las cepas clásicas (*B. abortus* y *B. melitensis*) al detectarse que los niveles de TNF α , IL-12 e IL-6 se mantuvieron cercanos a los niveles de referencia, así como niveles menores de IFN γ y una menor inducción de la inflamación del bazo, lo cual sugiere que esta suma de factores podría contribuir a la persistencia particular de *Brucella canis* en el organismo de perros infectados (28). La secreción de la IL-12 y TNF α por el macrófago es

importante para la polarización de las poblaciones de células T-CD4+ y la eliminación de *Brucella*. Por lo tanto, la secreción de la IL-12 es la encargada de polarizar la respuesta de las células T-CD4+ hacia Th1. Este conjunto de células se caracteriza por la secreción principalmente de IFN γ , el cual como ya se mencionó, se encarga de activar a los macrófagos para que eliminen a las bacterias. También es importante la participación de los Linfocitos T-CD8+. Así, mientras que la población de linfocitos T-CD4+ es importante por el perfil de citocinas que producen para la activación de los macrófagos, los linfocitos T-CD8 citotóxicos se encargan de eliminar a las células infectadas por *Brucella* (3)

Respuesta inmune humoral

A pesar de que la respuesta inmune efectiva contra los patógenos intracelulares es principalmente de tipo celular, la respuesta inmune humoral es montada contra este tipo de microorganismo. A través del modelo ratón, enfrentado con cepas virulentas de *Brucella canis*, se ha podido determinar la presencia de inmunoglobulinas de la clase IgG1, IgG2a, IgG2b e IgM. Tomando como base el conocimiento de la respuesta inmune contra el género *Brucella*, los anticuerpos de la clase IgM son los primeros en aparecer después de la infección y suelen estar dirigidos contra el LPS. Conforme la infección progresa y un porcentaje de estas bacterias son procesadas por los macrófagos, aparecen inmunoglobulinas de la clase IgG (subclases IgG2a e IgG2b) que generalmente están dirigidas contra antígenos internos de la bacteria. Este perfil de inmunoglobulinas producidas guarda relación ya que esta descrito que

las células T-CD4 de tipo Th1, cuando secretan IFN γ promueven que ocurra la secreción preferencial de las IgG de la subclase IgG2 (29).

Tomando en cuenta la información previamente descrita, la respuesta inmune celular y humoral trabajan en conjunto para controlar mejor la infección producida por *Brucella*.

DIAGNÓSTICO

Pruebas Diagnósticas Clásicas

Prueba de Aglutinación Rápida en Placa con 2-Mercaptoetanol (2ME-RSAT)

La prueba de 2ME-RSAT, desarrollada en 1974 como una prueba diagnóstica rápida, originalmente fue producida con una cepa de *Brucella ovis*, para posteriormente ser elaborada con una cepa de *Brucella canis*. Esta prueba es capaz de detectar tanto anticuerpos IgG como IgM, en presencia de 2-Mercaptoetanol, se rompen en los puentes disulfuro de la cadena J de la IgM para quedar como una molécula monomérica y no pentamérica como normalmente está en el suero. Esta modificación aumenta la especificidad de la prueba sin reducir su sensibilidad. Cabe aclarar que la prueba es capaz de identificar correctamente animales no infectados, aunque presenta resultados falsos positivos, debido a la reactividad cruzada por los determinantes antigénicos compartidos con otras bacterias Gram-negativas, afectando la especificidad de la prueba (12). El antígeno actualmente se elabora con la cepa RM6/66 de *Brucella canis*, inactivada por calor, teñida con Rosa de Bengala y concentrada al 6%, suspendida en una solución tampón con pH de 8.6 (este evita la aglutinación inespecífica de bacterias). El resultado se emite como positivo o negativo, dependiendo de la presencia o ausencia de aglutinación (30).

Prueba de Aglutinación en Tubo (TAT) y modificada con 2-Mercaptoetanol (2ME-TAT)

La prueba de aglutinación en tubo (TAT) y su modificación en presencia de 2-Mercaptoetanol (2ME-TAT) era una prueba utilizada como la de 2ME-RSAT, siendo capaz de identificar anticuerpos contra *Brucella canis* en perros positivos a la 2ME-RSAT. Contaba con el inconveniente de no poder detectar títulos de anticuerpos de 2-4 semanas después de la exposición a la bacteremia, característica que comparte con 2ME-RSAT. Así mismo, era eficaz en la detección de animales negativos, pero su especificidad era afectada por la reactividad cruzada (12).

Inmunodifusión en gel agar (AGID)

La prueba de inmunodifusión en gel agar se basa en el principio de la formación de una línea de precipitación observable a simple vista, por la migración de un antígeno y anticuerpos al colocarse en los pozos de un soporte de agarosa. Dos antígenos diferentes han sido utilizados: antígenos de pared y proteínas citoplasmáticas. El primer extracto ha mostrado tener menos sensibilidad y especificidad que el segundo, además de contar con el mismo inconveniente de 2ME-RSAT y 2ME-TAT de reactividad cruzada (12).

Tecnología Aplicada al Diagnóstico

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa ha surgido como una alternativa al diagnóstico serológico, al ser una prueba que detecta al agente etiológico y no la respuesta inmune humoral (31). Varios ensayos han sido desarrollados durante los últimos años, haciendo uso de diversas muestras, entre las que figuran hisopados vaginales, linfonodos y la placa leucoplaquetaria. Los resultados respecto a sensibilidad y especificidad son bastante altos, en comparación con el aislamiento por hemocultivo. Entre las ventajas que muestran estos ensayos de PCR destaca la cantidad de ADN a detectar, alcanzando niveles de 3.8 fg de ADN de *Brucella canis*. El principal inconveniente de esta prueba está relacionado directamente con la muestra a procesar: Al procesar sangre, la bacteria puede o no estar presente, debido a la bacteremia intermitente característica de la brucelosis canina, el uso de linfonodos es invasivo, haciendo al ensayo impráctico en animales vivos, y el uso de hisopados vaginales después del aborto se convierte en la muestra más factible a procesar por PCR (32,33). El avance alcanzado en estos ensayos permite la detección específica de *Brucella canis*, al diseñar y hacer uso de iniciadores que amplifican una región sólo presente en esta bacteria, pudiendo diferenciarla del resto de las especies de *Brucella* (31).

Ensayo Inmunocromatográfico (ICA)

Desarrollado como una prueba de detección rápida, el Ensayo Inmunocromatográfico (ICA) ha sido propuesto como una alternativa al diagnóstico serológico clásico, al montar sobre un dispositivo plástico una tira de nitrocelulosa con 2 ventanas, que contienen en un extremo una almohadilla de reactivos y en el otro una de absorción. Al ser colocada una gota de sangre completa, plasma o suero y posteriormente ser adicionado un diluyente, después de un tiempo estipulado la prueba arroja un resultado cualitativo, al aparecer o no en la ventana de reactivos 2 líneas coloreadas, que corresponden al control de la prueba y al suero probado. Para que el resultado pueda ser emitido como válido, siempre debe aparecer coloreada la línea de control. Si no ocurre la aparición de una línea coloreada en el apartado de prueba, el resultado es negativo, pero si aparece el resultado es positivo, pudiendo emitirse como débil, medio o fuerte dependiendo de la intensidad de la coloración (34). La ventaja más evidente del ensayo es el tiempo de lectura y la simplicidad de su realización, aunque en evaluaciones del mismo ha mostrado tener menor sensibilidad en la detección de animales en fase aguda o subaguda (en comparación con 2ME-RSAT y ELISAI) y un pobre desempeño en la detección de animales con infección crónica (comparado con ELISAI) (35).

Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) surgió como una alternativa a las pruebas diagnósticas clásicas y los grandes inconvenientes que estas tienen, como falta de estandarización y variables niveles de sensibilidad y especificidad. Elaborada sobre placas de poliestireno de 96 pozos, la prueba de ELISA actualmente tiene diversas modalidades. En el caso de la ELISA indirecta, un antígeno es colocado en la placa de poliestireno, para después ser bloqueados los sitios donde no se unió el antígeno y colocar en diversos factores de dilución el suero de los animales a ser probados. Posteriormente, al ser agregado un anticuerpo secundario (dirigido contra los anticuerpos presentes en la muestra de suero) marcado con un enzima, se obtiene el resultado al agregar el sustrato adecuado para dicha enzima. De esta forma, este ensayo emite un resultado cuantitativo (expresado en densidades ópticas) permitiendo de esta forma tener un resultado más exacto. Actualmente hay unas cuantas pruebas de ELISA desarrolladas para *B. canis*, todas ellas usando diferente tipo de antígeno: componentes de la pared bacteriana (antígenos de superficie) (36), extracto completo de las proteínas de citoplasma (37), bacterias completas inactivadas por calor (38) o extracto soluble caliente y extracto sonificado (39). Los resultados obtenidos de estas pruebas han mostrado tener niveles de sensibilidad y especificidad altos (>90%) situando de esta manera a ELISA como una de las pruebas más confiables para el diagnóstico serológico.

JUSTIFICACIÓN

El antígeno que se utiliza para la Aglutinación Rápida en Placa debe ser preparado bajo un riguroso proceso para que no reduzca su especificidad, además de ser una prueba cualitativa donde es necesaria la experiencia del personal para la interpretación de los resultados. Surge la necesidad de realizar la identificación y purificación de proteínas inmunodominantes de *B. canis*, para utilizarlas en la construcción de otras pruebas diagnósticas como la ELISA y el Dot blot con una sensibilidad y especificidad parecida o superior a la de la prueba actualmente ofrecida (30).

HIPÓTESIS

Las proteínas Inmunodominantes de *B. canis*, utilizadas como antígenos para estandarizar una prueba de ELISA indirecta proporcionarán niveles superiores de sensibilidad y especificidad, en comparación con la prueba de aglutinación rápida en placa (RSAT), actual prueba diagnóstica para esta enfermedad.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Desarrollar una ELISA indirecta a partir de la purificación de proteínas inmunodominantes de *B. canis* generadas mediante FPLC (Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas), para el diagnóstico serológico de Brucelosis en perros.

Objetivos específicos:

- Estandarizar la prueba de ELISA indirecta, mediante la utilización de extractos proteicos obtenidos por sonicación de *B. canis*, utilizando sueros de perros negativos y sueros positivos infectados experimentalmente con *B. canis*.
- Realizar la titulación de los sueros de perros negativos e infectados experimentalmente a través de ELISA indirecta.
- Obtener proteínas inmunodominantes de *B. canis* mediante FPLC y comprobar su reactividad antigénica a través de Western blot.
- Realizar la titulación de las proteínas inmunodominantes mediante ELISA indirecta.

- Identificación de las proteínas obtenidas (peso molecular y punto isoelectrico) mediante electroforesis en 2D (IEF + SDS-PAGE).
- Identificación mediante LC-MS y análisis de las proteínas obtenidas mediante 2D-PAGE.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepa bacteriana.

Se utilizó la cepa RM6/66 de *B. canis* (Cepa de referencia) (10), la cual fue cultivada en cajas de agar TSA a 37°C y posteriormente en caldo *Brucella*TM por 48 horas. De las placas de TSA, se tomaron 10 colonias, las cuales fueron posteriormente colocadas en 30 mL de medio líquido (caldo *Brucella*TM) y se siguió el crecimiento durante 48 horas, con agitación a 200 rpm a 37 °C. Pasado este tiempo, de este primer crecimiento se tomó 1 mL para inocularse en 1 L de medio líquido (caldo *Brucella*TM) para producir la biomasa. De igual forma, se siguió el crecimiento y una vez que se llegó al final de la fase exponencial (aproximadamente 48 horas) se realizó la inactivación bacteriana, en baño María a 85°C durante 50 minutos. La biomasa fue recuperada por centrifugación a 700 x g durante 30 minutos. En total se obtuvo biomasa bacteriana de *B.canis* de 3 L de caldo *Brucella*TM.

Sonicación de la biomasa bacteriana y centrifugación

Se tomaron 2 gramos de Biomasa de *B. canis* y se colocó en 10 mL de una solución que contenía 10mM HEPES y 5mM de PMSF, se inició el proceso usando un sonicador de pistilo grueso (Vibra Cell VCX 130 – Sonics) a 60 pulsos de 1 minuto con 70% de potencia, estos pulsos fueron alternados con descansos de 1 minuto. Para corroborar la ruptura celular, se realizó una tinción de Gram. Una vez sonicada la biomasa bacteriana, esta fue centrifugada a 700 x g durante 10 minutos a 4°C para poder obtener la fracción soluble (sobrenadante).

Sueros de animales negativos e infectados experimentalmente.

Se utilizaron los sueros de 6 animales (3 machos y 3 hembras) de la raza Beagle. De los 6 animales se obtuvieron tanto los sueros negativos como los positivos. Los criterios para considerarlos positivos era que el animal tuviera hemocultivo positivo y RSAT positivo; para los sueros negativos estos debían resultar negativos a las pruebas antes mencionadas. Los sueros negativos se obtuvieron antes de vacunar a los animales (día cero, animales SPF negativos) y los positivos después del desafío con una cepa de campo (día 35 post-desafío, animales infectados experimentalmente). Se usaron 2 sueros como controles (1 positivo y 1 negativo, 2 hembras) que cumplieron con los criterios antes mencionados para cada grupo (40)

Fraccionamiento a través de FPLC de la fracción soluble.

La fracción soluble fue tomada y sometida a fraccionamiento mediante cromatografía líquida rápida de proteínas, se utilizó la columna de intercambio aniónico (HiTrap™ Capto™ Q- GE) con el aparato de cromatografía líquida (AKTA Pure™- GE). Primero la columna fue equilibrada con un *buffer* de equilibración (5mM de Tris-HCl y 10 mM EDTA) ingresando 5 volúmenes (1 volumen = 1 mL). Posterior a ello, la muestra fue inyectada con un rango de flujo de 1 mL/min para después ser lavada la columna con 5 volúmenes de *buffer* de equilibración. Terminado este paso, fue ingresado el *buffer* de elusión (NaCl 1M) en un gradiente lineal de 0 al 100%, en 9 volúmenes de 1 mL. Cada una de las fracciones fue programada para obtenerse de un volumen de 0.5 mL. Para finalizar, la columna fue de nuevo equilibrada con otros 5 volúmenes de *buffer* de equilibración; durante todos los pasos la presión aplicada a la columna fue de 0.5 MPa.

SDS-PAGE y Western blot

Las fracciones obtenidas fueron resueltas utilizando geles de poliacrilamida al 10% siguiendo la metodología descrita por Laemmli (41) durante 75 minutos a 15 mA por cada gel. Se utilizó un marcador de peso molecular (Plus Prestained Protein Ladder – Thermo Scientific) y se resolvieron 2 veces la misma muestra, con la finalidad de tener una para tinción con Azul de Coomassie y otro para posteriormente ser transferido a una membrana de PVDF (Inmobilon P- Merck Milipore) y realizar Western blot; cada muestra fue colocada en el pozo con buffer de carga. El gel fue teñido con solución de Azul de Coomassie (PhastGel™ Blue R – GE Healthcare)

durante un lapso de 30 minutos, después del cuál en intervalos de 5 minutos se colocó solución desteñidora (10% Ácido acético, 30% Metanol y 60% Agua destilada) y se verificó que el proceso se llevará de manera satisfactoria hasta obtener el desteñido deseado. La solución desteñidora fue sustituida por agua destilada. Los geles fueron escaneados y posteriormente guardados en celofán dulce.

Para Western blot, las fracciones obtenidas a través de FPLC fueron resueltas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, en las mismas condiciones que los geles para tinción. Una vez terminada la corrida, se sacaron los geles con cuidado y fueron transferidos a membranas de PVDF. Antes de comenzar el proceso de transferencia la membrana fue pre-hidratada en metanol, y se procedió a colocar cada uno de los componentes dentro del casete de transferencia en el orden adecuado. Previo a su colocación dentro de la cámara, con un rodete se sacó el aire que posiblemente pudo haber quedado entre la membrana y el gel. Ya dentro de la cámara, esta se llenó con buffer de transferencia en cantidad suficiente. Las condiciones en las cuales se llevó a cabo la transferencia fueron 100 V durante 70 minutos. Para comprobar que el proceso de transferencia se realizó de manera exitosa, se utilizó una tinción reversible (Ponceau S Solution – Sigma Aldrich) para observar las bandas de proteína; para poder desteñir la membrana se utilizaron 2 compuestos: Agua destilada para hacerlo de manera lenta o PBS 1x, pH 7.4 para hacerlo de forma rápida. Una vez que la membrana se destiñó, se preparó leche descremada al 5% en PBS 1x, pH 7.4 con la finalidad de bloquear la membrana

durante un periodo de 1 hora, en agitación lenta a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, la leche descremada se eliminó por decantación y se lavó la membrana con PBS 1x, 3 veces en intervalos de 10 minutos, hasta comprobar que se eliminara cualquier resto de leche. En este punto, se preparó el anticuerpo primario (AB 1°) en un factor de dilución 1:1000 en PBS 1x; este anticuerpo se colocó con la membrana en agitación lenta, a 4°C durante toda la noche. Después del tiempo estipulado, el anticuerpo primario disuelto se eliminó por decantación y la membrana se lavó de nuevo 3 veces, con PBS 1x, pH 7.4 en agitación lenta. Se preparó el AB 2° con un factor de dilución 1:2000, en PBS 1x, pH 7.4 que contenía leche descremada al 5%. Se colocó el AB 2° con la membrana de PVDF durante 1 hora, en agitación lenta. Finalizado el tiempo, se removió por decantación el AB 2° y se realizaron los lavados como con el AB 1°. Se procedió a preparar el agente revelador, mediante la adición de 30 mg de 4-cloro-1-naftol (Sigma – Aldrich) a 10 mL de metanol. A esta mezcla se le colocaron 40 mL de PBS 1x, pH 7.4 y 20 µL de H₂O₂ al 30%. La membrana de PVDF fue expuesta a la mezcla final hasta observar las bandas de precipitación, momento en el cual fue adicionada agua destilada para detener la reacción. Las membranas de PVDF fueron escaneadas y guardadas lejos de la humedad y el sol.

Cuantificación de proteínas a partir de la elaboración de curva patrón.

Para poder llevar a cabo la cuantificación de los antígenos, se elaboró una curva patrón con BSA (Sigma Aldrich) mediante el método de Bradford (microensayo con nivel de detección 1.25 – 10 µg/mL). Para ello se colocaron en cubetas para

cuantificación valores de BSA crecientes y en intervalos regulares y se completó el valor hasta 800 μ L con H₂O MiliQ. La cubeta fue rellena a 1 mL con 200 μ L de reactivo de Bradford (Protein assay dye reagent concentrate – BioRad) a temperatura ambiente. Se homogenizó el contenido y después de 5 minutos se procedió a leer en un espectrofotómetro a 595 nm de longitud de onda (Ultrospec 3000 – Pharmacia Biotech). Cada uno de los valores de la curva se realizó por triplicado y se registraron los resultados para analizarse, promediarse y graficar con la finalidad de obtener la pendiente de la recta y obtener el valor de R², para de esta forma identificar si la curva servía para la cuantificación de antígenos.

Estandarización del modelo de ELISA i

Con el antígeno crudo sonificado cuantificado, se procedió a colocar el antígeno en las placas de poliestireno, por triplicado, con cantidades decrecientes del antígeno en un volumen final de 100 μ L por pozo. La placa se puso con su tapa y fue sellada con Parafilm™, se agitó lentamente durante 10 minutos y después fue colocada en incubación a 37°C durante toda la noche. Transcurrido el tiempo se procedió a lavar los pozos con 200 μ L de PBS + Tween 0.1% durante 1 minuto, golpeando el borde de la placa, después del tiempo estipulado se eliminó la solución de lavado y con una toalla desechable, se realizaron golpes firmes durante 3 ocasiones para dejar la placa lo más seca posible. La placa fue bloqueada con BSA al 1% en PBS 1x, pH 7.4, en cada pozo fueron colocados 100 μ L de la BSA preparada; la placa fue tapada y sellada con Parafilm™ y llevada a incubación a 37°C durante 1 hora. Durante este tiempo se prepararon tubos Eppendorf en los cuales se colocó el AB 1° con un factor

de dilución 1:200, en PBS 1x, pH 7.4. Transcurrida la hora se procedió a lavar la placa bajo el mismo esquema de lavado después de la primer incubación, procurando dejar los pozos lo más secos posibles. Se colocó 100µL de AB 1° en cada pozo y se incubó otra vez la placa; sellada con Parafilm™ a 37° C durante 1 hora. 10 minutos antes de terminado el tiempo, se preparó el AB 2° (AntiDog IgG HRP Conjugated – Sigma Aldrich) en PBS 1x con un factor de dilución 1:2000. Concluido el tiempo de incubación la placa se lavó como en las incubaciones anteriores, y procurando dejar los pozos lo más secos posibles, se pusieron 100µL de AB 2° por cada pozo. De nuevo la placa fue tapada y sellada con Parafilm™ y colocada en incubación a 37°C durante 1 hora. 25 minutos antes terminado el tiempo, se sacó de refrigeración el agente revelador de la prueba (ABTS – AMRESCO) para poder adicionarlo a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se lavó de nuevo la placa bajo el mismo esquema de lavado, y se adicionaron 100µL del agente cromogénico, cuidando el mismo de su exposición a la luz. Al término de su adición, se cubrió la placa con papel aluminio y se colocó en agitación durante 30 minutos. La placa fue leída después de los 30 minutos a 490 nm de longitud de onda en un lector de placas de ELISA (ELx808 – Biotek).

Titulación de sueros positivos y negativos en ELISA i

Se titularon de los sueros de perros negativos e infectados experimentalmente, con una cantidad determinada de antígeno por pozo, bajo el mismo esquema desarrollado en la estandarización del modelo de ELISA indirecta. Después del proceso de bloqueo de la placa con BSA, se colocaron por triplicado las muestras

de suero en un factor inicial 1:200 y hasta un factor 1:4000. La placa fue tapada y sellada con Parafilm™ para ser incubada durante 1 hora a 37°C. Después de éste tiempo el procedimiento se llevó a cabo de igual forma que en la estandarización de la ELISA i, con un AB 2° en un factor de dilución 1:2000. Los resultados de densidad óptica obtenidos mediante espectrofotometría con una lectura a 490 nm fueron registrados.

Electroforesis en 2D de proteínas inmunodominantes.

Las proteínas inmunodominantes fueron resueltas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, al 8% de manera bidimensional. Primero las proteínas fueron precipitadas utilizando un kit de precipitación y limpieza de proteínas (ReadyPrep™ 2-D CleanUp Kit – BioRad) y después la muestra se colocó en 125 µL de buffer de rehidratación (8M Urea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0.2% [w/v] Bio-Lyte™ 3-10 anfolitos y trazas de Azul de Bromofenol) y en tiras IPG de 7 cm para isoelectroenfoque con rangos de pH de 3-10 y 4-7 (ReadyStrip™ IPG strip – BioRad) durante 16 horas, con 1 mL de aceite mineral a 22°C. Transcurrido el tiempo, las tiras se colocaron en la cámara de isoelectroenfoque, previa colocación de 2 receptáculos de sales empapados con 8 µL de agua nanopura, cada uno en un extremo de los carriles usados de la cámara. De nuevo la tira fue cubierta con 1 mL de aceite mineral y el equipo de isoelectroenfoque fue configurado de la siguiente manera:

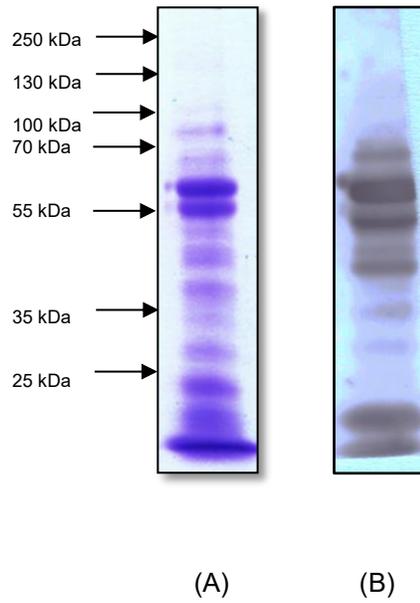
Tira de 7 cm	Voltaje	Tiempo	Voltaje- Hora	Rampa
Paso 1	250	20 min.	---	Lineal
Paso 2	4000	2 horas	---	Lineal
Paso 3	4000	---	10,000 V/Hr	Rápido
Total		5 horas	14,000	

Concluido el proceso de isoelectroenfoco, la tira fue equilibrada durante 10 minutos en 1 mL de *buffer* de equilibración I (6M Urea, 2% SDS, 0.375 M Tris-HCl [pH 8.8], 20% glicerol y 2% [w/v] DTT) y después en 1 mL de *buffer* de equilibración II (6 M Urea, 2% SDS, 0.375 M Tris-HCl [pH 8.8], y 20% glicerol) por 10 min. Al término del proceso, la tira fue colocada en un gel SDS-PAGE previamente preparado al 8%, llevándose a cabo una electroforesis estándar, a 15mA durante 75 minutos. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie o bien preparados para Western blot.

RESULTADOS

Perfil electroforético de la fracción soluble obtenida de *B. canis*

Una vez que *B. canis* fue cultivada en caldo *Brucella*TM, las bacterias fueron centrifugadas, sonicadas y posteriormente mediante centrifugación, se separó el sobrenadante de la pastilla sonicada (la fracción soluble). La fracción soluble fue resuelta mediante SDS-PAGE al 10% y teñida con azul de Coomassie para obtener un perfil electroforético. Los resultados indican la presencia de 12 bandas de diferentes tamaños que abarcan desde los 10 kDa hasta los 100 kDa (Fig. 1A). Posteriormente se realizó el Western blot para explorar su reactividad contra sueros de animales positivos. Los resultados mostraron la presencia de 9 bandas, las bandas que se encuentran en mayor proporción se ubican entre los 70 y 55 kDa (Fig. 1B). Las proteínas reactivas identificadas en la fracción soluble recibieron el nombre de inmunodominantes y posteriormente se procedió a formular un protocolo para la purificación mediante cromatografía.



SDS-PAGE (10%) Western blot

Fig. 1. Fracción soluble de *B.canis* previo al fraccionamiento protéico. SDS-PAGE (10%) (Fig. 1A) teñido con Azul de Coomassie, que permite ver las bandas de proteína presentes en tal fracción. Western blot (Fig. 1B) correspondiente de las bandas que dan una reacción positiva con el suero de un animal infectado.

Fraccionamiento proteico obtenido a través de FPLC

Mediante el principio de la cromatografía de intercambio iónico, se utilizó una columna para intercambio aniónico (Hi-Trap Cpto Q), la fracción soluble fue sometida a separación. Se utilizó un primer amortiguador de equilibrio (Tris-HCl 0.05M / EDTA 0.01M), cuando la columna quedó equilibrada, se introdujo la muestra (fase móvil) para su interacción con la columna (fase estacionaria). Los resultados obtenidos después de eluir de la fase estacionaria con un gradiente lineal de NaCl 1M se muestran en el cromatograma (Fig. 2), en donde se observan 2 picos de proteína, el primero de ellos en 15% de NaCl 1M y el segundo al 100%. Los resultados indican que el primer grupo de proteínas eluidas tienen una baja afinidad aniónica (proteínas del 15%) y el segundo pico con alta afinidad (100%). En ambos casos fue necesario resolver cada una de las fracciones para monitorear la salida de las proteínas inmunodominantes.

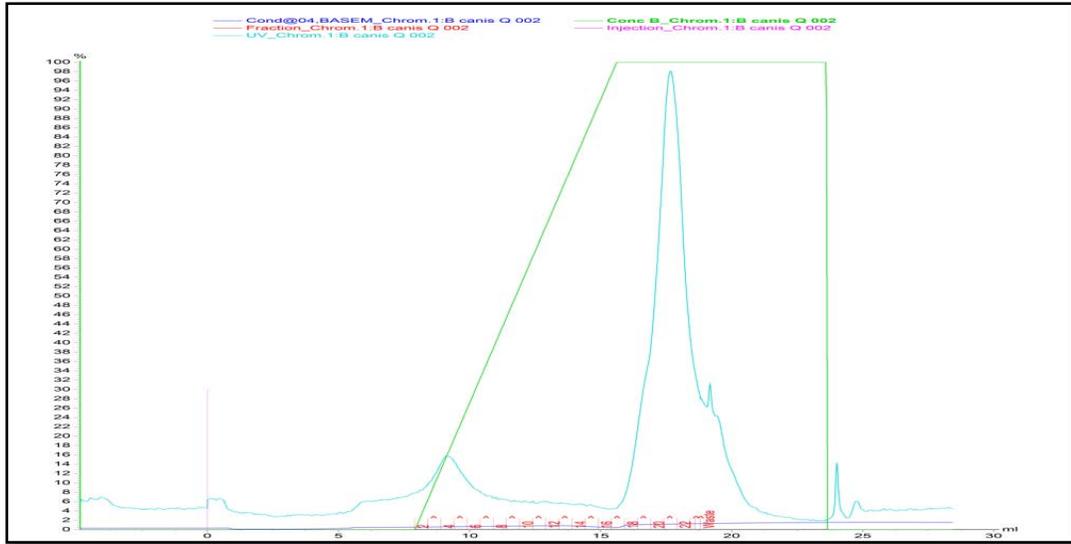


Fig. 2. Cromatograma del fraccionamiento proteico de *B. canis* obtenido a través de FPLC. La gráfica muestra el comportamiento de la muestra de proteína (Línea Azul) con la columna al ser introducido el *Buffer* de elusión en un gradiente lineal de 0 a 100%. El cromatograma muestra 1 primer pico de proteína (fracción 5) y el principal pico de proteína (entre las fracciones 21-23) donde se eluyó la mayor cantidad de proteína al estar el *buffer* de elusión de NaCl al 100%

Resolución de fracciones obtenidas mediante FPLC

Después de la obtención de 28 fracciones mediante cromatografía de intercambio aniónico, cada una de las fracciones fue resuelta mediante SDS-PAGE al 10% y teñidas con Azul de Coomassie. En la figura 3A se muestran las fracciones 12-18, correspondientes al primer pico de elusión (15% de NaCl), el patrón de bandeo observado muestra una disminución en el número de proteínas reactivas conforme avanza el fraccionamiento. A partir de la fracción 20, se observó sólo 2 bandas con un peso molecular comprendido entre los 70 y 55 kDa, éstas bandas corresponden al segundo pico de proteína del cromatograma (100% NaCl). En la figura 3B se observan las fracciones 21 a 28, en donde se pueden apreciar bandas con el mismo peso que en la fracción 19, conforme avanza el fraccionamiento (24-28) aparece una banda, ubicada entre los pesos moleculares antes mencionados. Una vez que fue obtenido un patrón de fraccionamiento reproducible, el siguiente paso fue comprobar la reactividad antigénica de cada una de las fracciones.

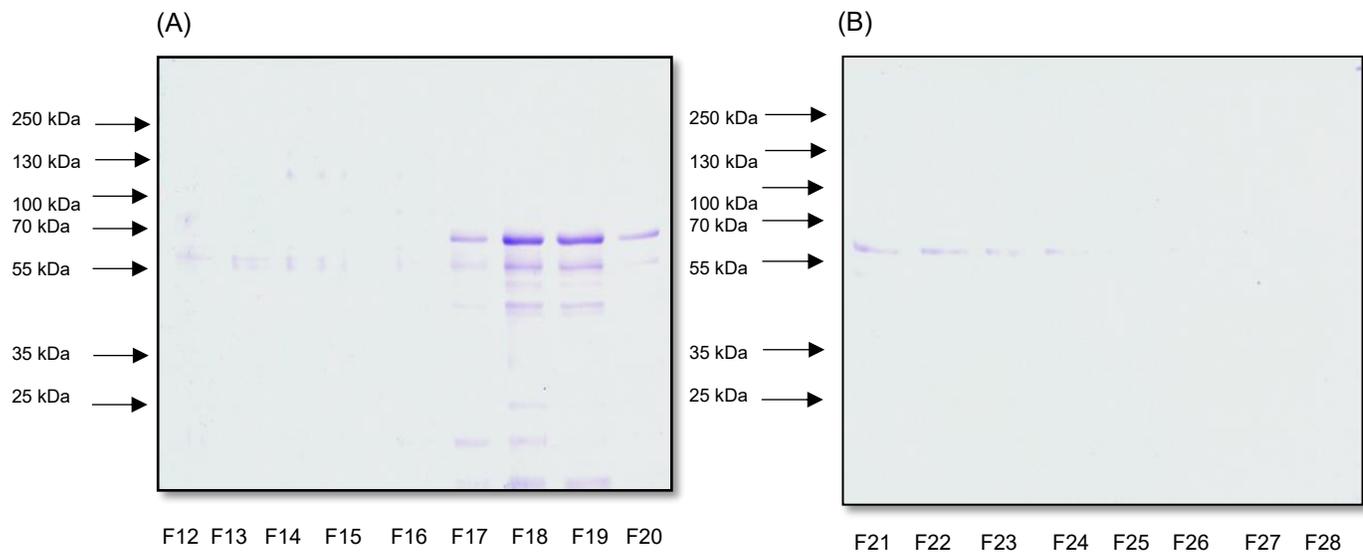


Fig. 3. SDS-PAGE al 10%, teñido con Azul de Coomasie de las fracciones obtenidas a través de FPLC. Las fracciones de la 12 a la 20 (Fig. 3A) y 21 a la 28 (Fig. 3B) fueron resueltas en SDS-PAGE. En las fracciones del primer gel se observan varias bandas, pero a partir de la fracción 20 sólo aparecen 2 y posteriormente 1. Esta información permite corroborar los puntos de proteína observados en el cromatograma con 2 bandas purificas en las fracciones 21 a 23. En el lado derecho están marcadas con flechas los pesos moleculares del marcador de peso molecular.

Reactividad antigénica de las fracciones obtenidas mediante cromatografía a través de Western blot.

Para poder determinar la reactividad a los sueros de las proteínas fraccionadas mediante cromatografía líquida, se realizó Western blot de las fracciones. Fueron utilizados sueros de animales positivos. En la Fig. 4 se observan los WB de las fracciones 12-20 (4A), en donde se observa la presencia de 3 bandas con características reactivas a los sueros. En la figura 4B se observa la presencia de 2 bandas reactivas a los sueros, correspondientes a las fracciones 21-28. Los resultados sugieren que las bandas que se aprecian en el SDS-PAGE (entre 70 y 55 kDa) y las observadas en el inmunoblot son las mismas. Las últimas fracciones (25-28) muestran una sola banda inmunoreactiva, con un peso molecular entre 70 y 55 kDa.

Debido a lo anterior se utilizaron las proteínas de las fracciones 21-24 como antígenos en diferentes pruebas serológica (Dot blot y ELISA-i).

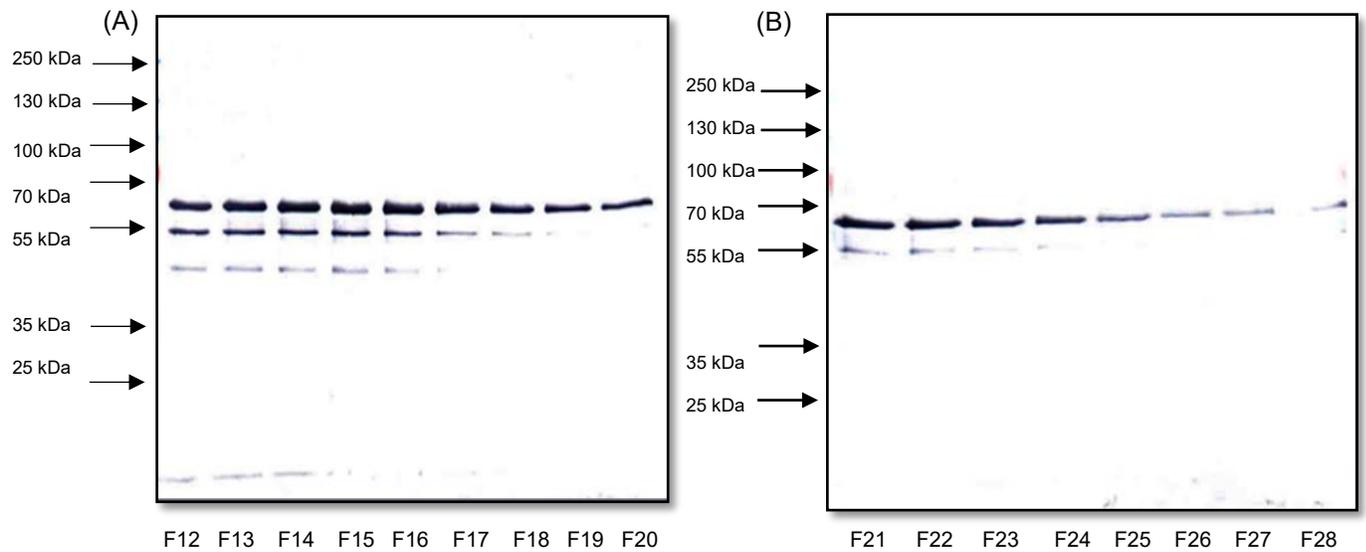


Fig. 4.- Western blot de las fracciones obtenidas a través de FPLC. Detección de las bandas inmunoreactivas por WB, desde las fracción 12 hasta la 28. El patrón de bandeo es consistente con los resultados observados en SDS-PAGE. En el lado izquierdo se indican con las flechas los pesos moleculares del marcador.

Dot blot de proteínas inmunodominantes.

Previo a la utilización de las proteínas inmunodominantes en el sistema de ELISAI, las proteínas fueron probadas como antígenos en una prueba de Dot blot sobre membranas de nitrocelulosa y en concentraciones decrecientes. La imagen muestra 56 ng de proteína total (de la fracción soluble) como control y diferentes concentraciones de las proteínas inmunodominantes (Fig. 5).

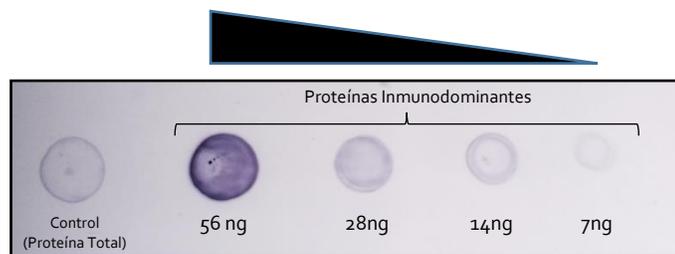


Fig. 5. Dot blot con proteínas inmundominantes. Proteínas inmunodominantes usadas en un valor inicial de 56 ng y decreciendo consecutivamente 1:2. Al lado izquierdo se observa el punto de proteína total de la fracción soluble en la misma concentración inicial que las proteínas inmunodominantes. La reacción se obtuvo con el suero diluido 1:1000 y el AB 2° en un factor 1:2000 reveladas mediante método cromogénico (4-cloro-1-naftol).

Estandarización del modelo de ELISAI mediante la utilización del antígeno crudo sonicado.

Una vez que comprobada la reactividad de las proteínas puras y el extracto crudo en pruebas colorimétricas como lo fue el Dot blot, comenzamos a estandarizar la ELISAI con las proteínas inmunodominantes. El primer paso fue utilizar al antígeno crudo sonicado como nuestro control positivo, de ésta forma determinamos la cantidad óptima de antígeno y el factor de dilución de los sueros a utilizar. Primero se colocó en las placas de poliestireno de 96 pozos el extracto crudo comenzando en una concentración de 460 ng y finalizando en 10 ng. Los resultados de la titulación de este antígeno se muestran en la Fig. 6, en donde se observa que al usar el suero de un animal positivo a hemocultivo y RSAT con un factor de dilución 1:200 se obtienen densidades ópticas por arriba de 0.7, Los valores más altos de D.O. oscilan entre las concentraciones de 460 y 230 ng de antígeno. Esta información permitió definir que 230 ng eran suficientes para usarlos en la titulación de los sueros.

Titulación del Antígeno

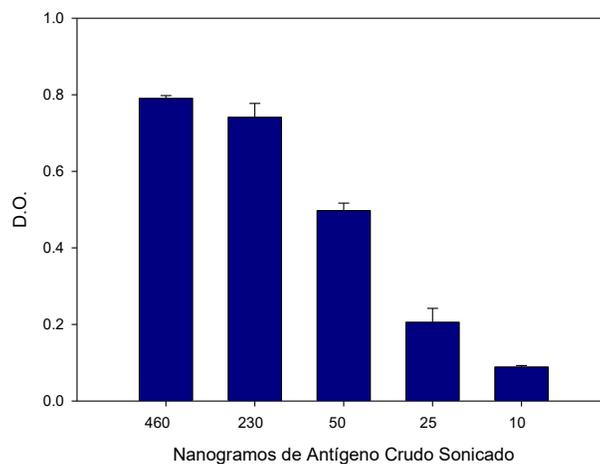


Fig. 6. Determinación de la cantidad de antígeno crudo a usar para el montaje del sistema de ELISAI. Antígeno crudo sonicado en diferentes concentraciones y su densidad óptica obtenida. Las condiciones del factor de dilución del suero (1:200) y del AB 2° (1:2000) utilizadas fueron las mismas para todas las concentraciones.

Titulación de sueros negativos y positivos mediante ELISAI

Una vez que se determinó la concentración de antígeno a utilizar, fueron titulados los sueros de perros infectados experimentalmente y de perros negativos (utilizados en estudios previos por González *et al*), en el sistema de ELISAI. En la Fig. 7A se muestra el comportamiento de los sueros positivos, comenzando en un factor de dilución 1:400 y terminando en un factor 1:4000; para el segundo grupo (Fig. 7B), se comenzó la titulación en un factor de dilución 1:200 hasta llegar a la dilución 1:2000. La información proporcionada por ambas gráficas (dónde los resultados están reportados en valores de densidad óptica) muestran que al seleccionar el factor de dilución 1:1000 para ambos grupos, se puede discrepar de los valores positivos a los negativos.

Titulación de Sueros

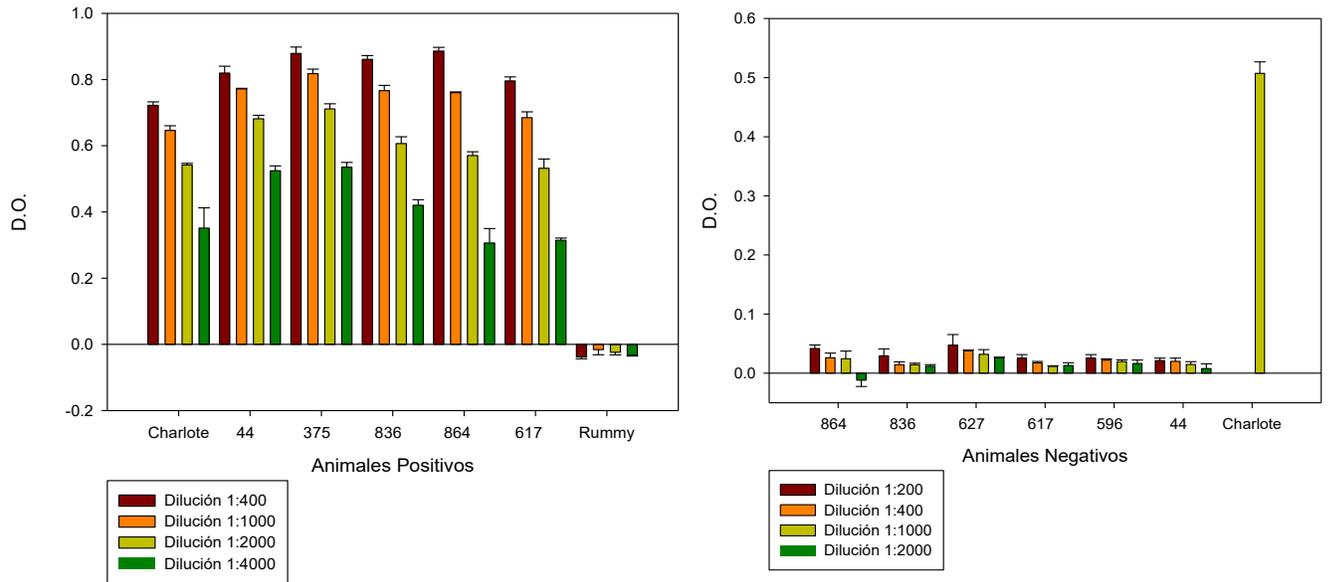


Fig. 7. Representación gráfica de los sueros de animales positivos y negativos al ser titulados bajo el sistema de ELISAI. Grupo de 7 animales, tanto positivos (7A) como negativos (7B) y sus correspondientes identificadores. Resultados obtenidos y graficados en densidades ópticas. Del lado derecho está el animal control negativo (7A) y el control positivo (7B).

ELISAI con proteínas inmunodominantes de *B. canis*

Una vez que se determinó la titulación del antígeno crudo (control positivo), la titulación de los sueros positivos y negativos, además de la obtención de las fracciones con proteínas inmunodominantes cuantificadas por el método de Bradford, procedimos a utilizarla a las fracciones el modelo de ELISAI que se había estandarizado. Utilizamos el factor de dilución 1:1000 tanto para sueros de animales positivos como para sueros negativos. Comenzando con una concentración de 400 ng y después con 200 ng. En la Fig 8 se muestra el comportamiento del suero de un animal positivo y uno negativo (resultado expresado en densidades ópticas); en el resultado se muestra valores de densidades ópticas similares entre el extracto crudo y las fracciones inmunodominantes, incluso disminuyendo a la mitad la concentración de proteína de cada una de las fracciones puras, el resultado permite diferenciar entre el suero de un animal negativo y el suero de un animal positivo, demostrando de esta manera la funcionalidad de las proteínas inmunodominantes como antígenos en el modelo de ELISAI. Debido a que los sueros de los animales utilizados en el estudio son positivos al aislamiento y al RSAT, los resultados sugieren que ésta prueba, podría tener una igual o mejor sensibilidad que las pruebas convencionales.

Una vez se comprobó la funcionalidad de las proteínas en la ELISA y con el fin de posteriormente comercializarla y validarla, fue necesario identificar, qué proteínas habían sido utilizadas como antígenos.

ELISAI de Proteínas inmunodominantes con suero de animal positivo y animal negativo

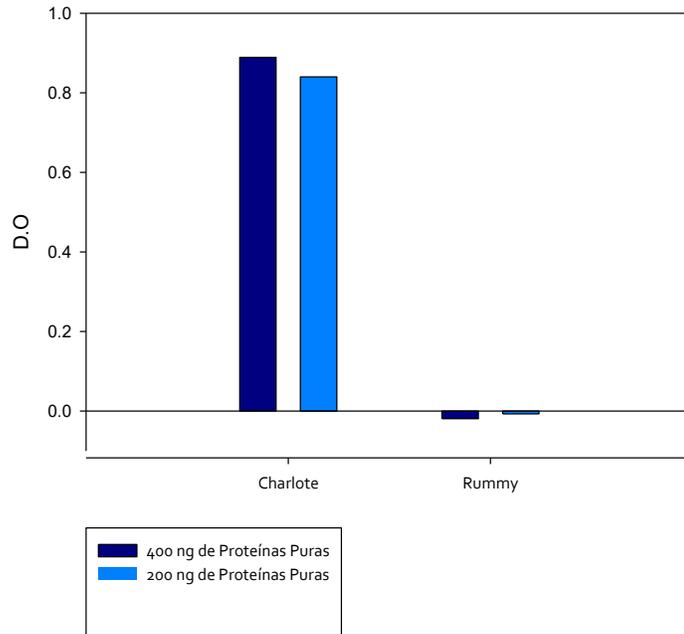


Fig 8. Proteínas inmunodominantes y su funcionamiento como antígenos en el sistema de ELISAI. 400 y 200 ng de proteínas inmunodominantes fueron usados con un factor de dilución del suero 1:1000 y el AB 2° 1:2000. Los valores de densidad óptica obtenidos son similares al antígeno crudo sonicado, de esta manera demostrando su funcionalidad en ELISAI.

Identificación de las proteínas purificadas de *B. canis* usadas en el sistema de ELISAI.

Para comenzar con la caracterización bioquímica de las proteínas utilizadas en la ELISAI, las proteínas fueron resueltas en geles de doble dimensión (2D-PAGE), con la finalidad de determinar el punto isoelectrico y peso molecular, además de poder obtener puntos de proteína para la posterior identificación de los mismos. Los resultados obtenidos después de resolver a la fracción 21 en una tira de gradiente de pH inmovilizado (IPG) con un rango de pH de 4-7 y comprobar la reactividad de las proteínas mediante Western blot con quimioluminiscencia fueron los siguientes (Fig 9); se observaron 5 diferentes puntos, ubicados en el rango de peso esperado; el primero de ellos en los 55 kDa, y los segundos; en los 70 kDa. Lo anterior indica que las bandas observadas en los SDS-PAGE correspondían a más de una proteína o bien isoformas de las mismas, por lo tanto el siguiente paso fue identificar los puntos con mayor señal en la quimioluminiscencia.

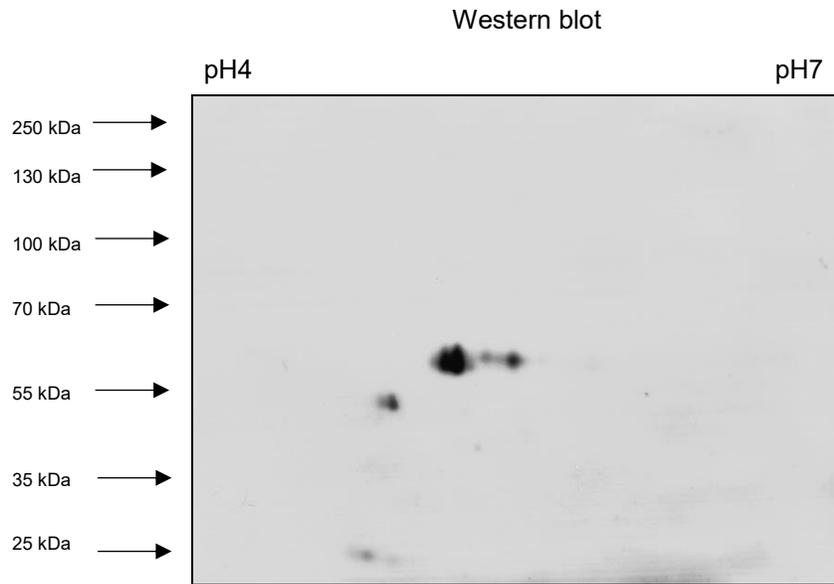


Fig 9. Isoelectroenfoque, electrofororesis y Western blot de las proteínas inmunodominantes usadas en ELISAI. Fracción 21 resuelta en SDS-PAGE y en Western Blot. Se identificaron 3 puntos principales de proteína, 2 con un peso aproximado de 64 kDa y uno con 55 kDa. El lado izquierdo esquematiza en flechas el marcador de peso molecular.

Identificación de GroEL de *B. canis* a través de espectrometría de masas.

Una vez que las proteínas inmunodominantes fueron resueltas en 2D-PAGE y teñidas con Azul de Coomassie, los puntos de proteína fueron recortados del gel y las muestras fueron sometidas a análisis por Espectrometría de masas y cromatografía líquida (LC-MS). Los resultados de las 3 muestras arrojan que es la misma proteína. En el caso de los 2 puntos con mismo peso molecular, pero con una ligera variación del punto isoelectrico, fueron identificados como la proteína GroEL de 60 kDa, con un porcentaje de cobertura del 30 y del 50 % respectivamente; los péptidos fueron encontrados en toda la extensión de la secuencia de la proteína. En el caso del punto de 55 kDa, la base de datos arroja que es la misma proteína GroEL de *B. canis*, solamente que este punto tiene una diferencia no sólo en el peso molecular sino en el punto isoelectrico; el porcentaje de cobertura obtenido por este es menor que los anteriores (21.98%) aunque fueron identificados 10 péptidos en la muestra (Fig 10).

Muestra 64 kDa - I

Accession	Description	Score	Coverage	# Peptides	MW [kDa]	calc. pI
A9MDV1	60 kDa chaperonin OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) GN=groL PE=3 SV=1 - [CH60_BRUC2]	44.47	29.85	6	57.5	5.15

MAAKDVKFGR TAREKMLRGV DILADAVKVT LGPKGRNVVI DKSFGAPRIT KDGVSVAKEV
 ELEDKFENMG AQMLREVASK TNDTAGDGTT TATVLGQAIV QEGAKAVAAG MNPMDLKRGI
DLAVNEVVAE LLKKAKKINT SEEVAQVGTI SANGEAEIGK MIAEAMQKVG NEGVITVEEA
 KTAETELEV V EGMQFDR**GYL SPYFVTNPEK** MVADLEDAYI LLHEKKLSNL QALLPVLEAV
 VQTSKPLLI AEDVEGEALA TLVVNKL RGG LKIAAVKAPG FGDRRK**AMLE DIAILTGGQV**
ISEDLGIKLE SVTL DMLGRA KKSISKENT TIVDGAGQKA EIDARVGQIK QQIEETTSYD
 DREKLQERLA KLAGGVAVIR VGGATEVEVK EKKDRVDDAL NATR**AAVEEG IVAGGGTALL**
RASTKITAKG VNADQEAGIN IVRRAIQAPA RQITTNAGEE ASVIVGK**ILE NTSETFGYNT**
ANGEYGD LIS LGIVDPKVV R**TALQNAASV AGLLITTEAM IAELPK**KDAA PAGMPGGMGG
 MGGMDF

Muestra 64 kDa – II

Accession	Description	Score	Coverage	# Peptides	MW [kDa]	calc. pI
A9MDV1	60 kDa chaperonin OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) GN=groL PE=3 SV=1 - [CH60_BRUC2]	108.2 1	51.47	10	57.5	5.15

MAAKDVKFGR TAREKMLRGV DILADAVKVT LGPKGRNVVI DKSFGAPRIT KDGVSVAKEV
 ELEDKFENMG AQMLREVASK **TNDTAGDGT TATVLGQAIV QEGAK**AVAAG MNPMDLK**RG**I
DLAVNEVVAE LLKKAKKINT SEEVAQVGTI SANGAEIIGK MIAEAMQ**VG** **NEGVITVEEA**
KTAETELEV EGMQFDRGYL SPYFVTNPEK **MVADLEDAI LLHEK**KLSNL QALLPVLEAV
 VQTSKPLLI AEDVEGEALA TLVVNKLKRG LKIAAVKAPG FGDRRK**AMLE** **DIAILTGGQV**
ISEDLGIKLE SVTLDMLGRA KKSISKENT TIVDGAGQKA EIDARVGQIK QQIETTSDY
 DREKLQERLA KLAGGVAVIR VGGATEVEVK EKKDRVDDAL NATR**AAVEEG** **IVAGGGTALL**
RASTKITAK**G** **VNADQEAGIN** **IV**RRAIQAPA **RQITTNAGEE** **ASVIVGK**ILE NTSETFGYNT
 ANGEYGLIS LGIVDPVKVV RTALQNAASV AGLLITTEAM IAELPKKDAA PAGMPGGMGG
 MGGMDF

Muestra de 55 kDa

Accession	Description	Score	Coverage	# Peptides	MW [kDa]	calc. pI
A9MDV1	60 kDa chaperonin OS=Brucella canis (strain ATCC 23365 / NCTC 10854) GN=groL PE=3 SV=1 - [CH60_BRUC2]	322.85	21.98	10	57.5	5.15

MAAKDVKFGR TAREKMLRGV DILADAVKVT LGPKGRNVVI DKSFGAPRIT KDGVSVAKEV ELEDKFENMG
 AQMLREVASK TNDTAGDGT TATVLGQAIV QEGAKAVAAG MNPMDLKRGI DLAVNEVVAE LLKKAKKINT
 SEEVAQVGTI SANGEAEIGK MIAEAMQKVG NEGVITVEEA KTAETELEV EGMQFDRGYL SPYFVTNPEK
 MVADLEDAYI LLHEKKLSNL QALLPVLEAV VQTSKPLLI AEDVEGEALA TLVVKLRGG LKIAAVKAPG
 FGDRRKAMLE DIAILTGGQV ISEDLGIK LE SVTLDM LGRA KKVSISKENT TIVDGAGQKA EIDARVGQIK
 QQIEETTSY DREKLQERLA KLAGGVAVIR VGGATEVEVK EKKDRVDDAL NATRAAVEEG IVAGGGTALL
 RASTKITAKG VNADQEAGIN IVRRAIQAPA RQITTNAGEE ASVIVGKILE NTSETFGYNT ANGEYGD LIS
 LGIVDPVKVV RTALQNAASV AGLLITTEAM IAELPKDAA PAGMPGGMGG MGGMDF

Fig. 10. Resultados de LC-MS de los puntos de proteínas obtenidos mediante 2D-PAGE.

Tablas que muestran los números de accesos de las proteínas identificadas en la base de datos, el nombre de identificación, el puntaje de la proteína, porcentaje de cobertura de los péptidos encontrados así como el número de ellos, y el peso molecular y punto isoeléctrico. Los primeros 2 puntos tienen el mismo peso pero diferente porcentaje de cobertura. El

tercer punto tiene un peso molecular menor y un punto isoelectrico diferente, a pesar de haber sido identificado como la misma proteina. El porcentaje de cobertura es menor y los peptidos encontrados tambien. Debajo de cada tabla en color viene indicada la secuencia completa de la proteina GroEL de *B. canis* y en color amarillo, los peptidos encontrados por el analisis.

DISCUSIÓN

La infección producida por *Brucella canis* tiene graves repercusiones reproductivas en los caninos y sigue representando un desafío a nivel de su diagnóstico. A pesar de que el diagnóstico definitivo se realiza a través del hemocultivo, las pruebas serológicas se utilizan principalmente para corroborar el diagnóstico, existiendo en la actualidad una gran cantidad de pruebas para tal fin. En el presente trabajo, se purificó e identificó a la proteína GroEL de 60 kDa que es una chaperona de *Brucella canis*, ésta proteína pertenece a una familia descrita como proteínas del choque térmico (hsps), como su nombre lo indica, fueron descubiertas y descritas cuando las células eran sometidas al choque térmico aunque actualmente (particularmente las hsps bacterianas) es conocido que su producción puede deberse no sólo por el incremento de la temperatura, sino por cambios en el pH del medio (acidez del mismo) o por estrés oxidativo (42). Debido a esto, actualmente son denominadas como proteínas de respuesta al estrés (43); esta familia se encuentra formada por varias subfamilias dentro de la cual se encuentra la hsp60 (chaperoninas), a la cual pertenece GroEL (44). Estructuralmente GroEL es una proteína que se encuentra compuesta por 2 discos, cada uno de ellos formado por 7 subunidades que se acomodan de forma simétrica alrededor de un eje, dentro de este eje es dónde la proteína GroEL, en unión con otra proteína (GroES) forman una cámara que permite a las cadenas polipeptídicas mal plegadas o desplegadas llegar a su estado plegado apropiado, para ejercer correctamente sus funciones, así como para evitar agregados proteícos debido a la exposición de residuos hidrófobos de las cadenas

polipeptídicas mal plegadas (45). Las proteínas de respuesta al estrés suelen estar presentes de manera normal en pequeñas cantidades, tanto en células eucariotas como en procariotas; hablando en específico de éstas últimas y en particular de bacterias con un estilo de vida intracelular, se ha determinado que son necesarias para que las bacterias puedan sobrevivir en éstas condiciones (46–48). Estudios realizados con miembros del género *Brucella* y con este grupo de proteínas, ha concluido que ante las condiciones encontradas en el ambiente intracelular, se aumenta la producción de las hsp's para permitir la adaptación de la bacteria a este medio; en consecuencia, se ha asociado que la expresión aumentada de estas proteínas está relacionada con su inmunodominancia durante la infección de los macrófagos. Un estudio reciente de la proteína GroEL de *Brucella melitensis*, a través de clonación, análisis informático y predicción de epítomos dio a conocer que esta proteína tiene 4 epítomos, los cuáles pueden ser detectados por las células del sistema inmune y que pueden estar relacionados con la inmunodominancia de la misma. Por lo tanto, estas proteínas podrían ser parte clave en la estimulación del sistema inmunológico ante una infección por *Brucella spp* (48).

En trabajos previos, realizados con otros miembros del género *Brucella* en modelos de infección experimental, se ha identificado a las proteínas del choque térmico como antígenos inmunodominantes. Uno de estos trabajos, realizado con *Brucella ovis*, identificó a través del uso de anticuerpos monoclonales un integrante (proteína DnaK de 60 kDa) de esta familia de proteínas (49). Además de este trabajo, hay otros estudios en donde se han identificado a otros miembros de las proteínas del

choque térmico en otras especies del género *Brucella*, poniendo de manifiesto que en general la familia está caracterizada por ser inmunodominante (42,47). En estos trabajos, la identificación de varios miembros de las hsp ha sido realizada a través de Western blot con del uso de anticuerpos monoclonales dirigidos a motivos dentro de las proteínas de choque térmico, pero no se ha identificado directamente. En este trabajo, la identificación de la Chaperonina de *Brucella canis*, GroEL, se realizó mediante Espectrometría de masas -Cromatografía líquida. Este método puede, a través de la obtención de la huella de péptidos (conjunto de picos de los péptidos obtenidos después de la acción de una enzima proteolítica sobre un punto de proteína obtenido por 2D-PAGE) identificar de modo directo proteínas. Por lo tanto, este es el primer trabajo en el cual mediante este método se identifica a un integrante de las proteínas del choque térmico. Esto sugiere además que este método podría ser viable para la identificación de los otros miembros de las hsps. Es importante mencionar que el género *Brucella* exhibe varios antígenos inmunodominantes; adicionalmente han sido identificadas varias proteínas de membrana externa (17 kDa, 19 kDa y 29 kDa) y el Lipopolisacárido rugoso (RLPS). La localización de estos antígenos difiere de las proteínas de choque térmico, ya que tanto las proteínas de membrana externa como el LPS están expuestas de forma más directa a las células del sistema inmune, facilitando su identificación y procesamiento por estas células.

De manera interesante, la obtención de las proteínas de membrana externa se realiza en un proceso más largo, donde se requiere el uso de equipo especializado (ultracentrifugas) además de obtener una cantidad de antígeno baja. La obtención

de las proteínas del choque térmico, contenidas en la fracción soluble se realiza en un proceso más simple. Con base en esto, uno de los principales objetivos en el desarrollo de pruebas diagnósticas es el uso de antígenos de fácil obtención, en pruebas que se realicen en tiempo reducido y con la menor cantidad de materiales. En este trabajo se utilizaron estas proteínas para el desarrollo de una prueba de ELISA indirecta (ELISA-i), a través de la cual se determinó que la cantidad de antígeno óptima a utilizar era de 200 ng. En comparación con otras pruebas de ELISA-i elaboradas para el diagnóstico de brucelosis canina (30,39), en este trabajo hemos optimizado la cantidad de antígeno utilizado desarrollar una prueba de ELISA-i, siendo esta una característica deseable. Además, también se logró mejorar la prueba al obtener resultados que permiten diferenciar a animales positivos de negativos, los valores que observamos fueron en un factor de dilución del suero 1:1000; lo anterior es algo deseable al elaborar pruebas diagnósticas. Para complementar el resultado obtenido por ELISA-i, en este trabajo se construyó una prueba de Dot blot, en la cual se demostró que la cantidad de proteínas inmunodominantes utilizadas para obtener un resultado positivo es baja (tan sólo de 56 ng). En esta prueba fue evidente que el utilizar estas proteínas ayuda a optimizar la prueba, ya que incluso la señal emitida es mejor en comparación con el punto control de proteína total. Este hecho es debido a la cantidad de anticuerpos específicos dirigidos contra GroEL puede evidenciarse mejor al sólo utilizarla como antígeno y evitar los anticuerpos presentes contra las otras proteínas presentes en la fracción soluble. Con esto podemos concluir que la utilización de este antígeno específico, nos permitió optimizar las condiciones para obtener resultados positivos y negativos correctamente diferenciados. Otro punto importante a destacar fue la

obtención de una prueba cuantitativa (ELISA-i) y otra cualitativa (Dot blot); ambas pruebas pueden ser utilizadas para el diagnóstico serológico en sustitución de las pruebas diagnósticas clásicas.

Las pruebas de ELISA-i desarrolladas para el diagnóstico serológico de brucelosis canina están basadas en el uso de bacterias completas, conjuntos de antígenos de pared o antígenos internos (39,50). En este trabajo, se realizó la construcción de 2 pruebas diagnósticas con proteínas inmunodominantes específicas, lo cual nos permitió optimizar las condiciones de montaje de ambas pruebas, al detectar sólo los anticuerpos dirigidos contra estas proteínas inmunodominantes; como fue mostrado en el primer resultado, de todas las bandas presentes en la fracción soluble, sólo se utilizaron 2 en las cuales se encuentra la proteína del choque térmico GroEL.

Para finalizar, respecto al análisis de LC-MS donde se identificaron los 3 puntos de proteína como la misma resulta interesante. De los 2 puntos localizados en el mismo peso molecular y con una ligera diferencia en punto isoeléctrico, fueron identificados péptidos en toda la extensión de la proteína, con lo cual el punto más pequeño obtuvo una cobertura de casi el 30%, mientras que el más grande obtuvo una del 51 %. El análisis sugiere que estos puntos de proteína podrían ser isoformas, posiblemente en las regiones de la proteína no cubierta hayan mutaciones puntuales en aminoácidos polares con carga, lo cual podría modificar el punto isoeléctrico. El análisis también sugiere en las mismas regiones no cubiertas de la

proteína, podría haber alguna modificación postraducciona en aminoácidos básicos e hidroxilados. Para el punto de 55 kDa, este sufrió un cambio en el punto isoeléctrico así como en el peso molecular; a pesar de ello mediante los péptidos identificados este punto también se identificó como la chaperonina GroEL. Los péptidos identificados sólo cubren en 21 % del total de la cobertura de la proteína, y fueron identificados a partir de la mitad de la secuencia completa, con lo cual se sugiere que podría ser una forma truncada o degradada de la chaperonina GroEL (probablemente sin un fragmento del extremo N-terminal).

Respecto al proceso de obtención de las proteínas del choque térmico, un estudio realizado para comparar la producción de GroEL en *Brucella abortus* y *Brucella melitensis* determinó que la producción de éste antígeno es mayor a 42°C (46). Con base en esta información, una de las perspectivas de este trabajo es modificar las condiciones de crecimiento de *Brucella canis*, para así obtener una mayor cantidad de antígeno y optimizar el proceso de producción. En este trabajo, a partir de LC-MS (Espectrometría de masas - cromatografía líquida) fue posible la identificación de la proteína GroEL de *Brucella canis*, estos datos permitirían en un futuro la elaboración de esta proteína de forma recombinante y evaluar su uso en el montaje de una prueba diagnóstica similar.

CONCLUSIONES

- 1.- Se estandarizó una prueba de ELISA-i para brucelosis canina.
- 2.-Se determinó la cantidad de antígeno a utilizar (200 ng).
- 3.- Se obtuvo un protocolo de purificación para la obtención de GroEL.
- 4.- Con las proteínas purificadas se estandarizó una prueba de Dot blot.
- 5.- Se identificó a GroEL mediante LC-MS.

BIBLIOGRAFÍA

1. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. Brucellosis: A re-emerging zoonosis. *Vet Microbiol.* 2010;140(3-4):392–8.
2. Moreno E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Front Microbiol.* 2014;5(MAY):1–18.
3. Elfaki MG, Alaidan AA, Al-Hokail AA. Host response to *Brucella* infection: review and future perspective. *J Infect Dev Ctries.* 2015;9(7):697–701.
4. Moreno E, Cloeckaert A, Moriyón I. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol.* 2002;90(1-4):209–27.
5. Galińska EM, Zagórski J. Brucellosis in humans--etiology, diagnostics, clinical forms. *Ann Agric Environ Med.* 2013;20(2):233–8.
6. Sánchez-Jiménez MM, Giraldo-Echeverri CA, Olivera-Angel M. Infección por *Brucella canis* en humanos: propuesta de un modelo teórico de infección a través de la ruta oral. *Infectio.* 2013;17(4):193–200.
7. Scholz HC, Nöckler K, Lliner CG, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, et al. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60(4):801–8.
8. Whatmore AM, Davison N, Cloeckaert A, Al Dahouk S, Zygmunt MS, Brew SD, et al. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014;64(Pt 12):4120–8.

9. Hofer E, Hammerl JA, Zygmunt MS, Cloeckaert A, Koylass M, Whatmore AM, et al. *Brucella vulpis* sp. nov., a novel Brucella species isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Austria. *Int J Syst Evol Microbiol* [Internet]. 2016;66(5):2090–8.
10. Carmichael LE, Kenney RM. Canine abortion caused by *Brucella canis*. *J Am Vet Med Assoc* [Internet]. 1968;152(6):605–16.
11. Carmichael LE, Bruner DW. Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *Cornell Vet* [Internet]. 1968;48(4):579–92.
12. Hollett RB. Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. *Theriogenology*. 2006;66(3):575–87.
13. Spink WW, Morisset R. Epidemic canine brucellosis due to a new species: *Brucella canis*. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 1970;81:43–50.
14. López G, Ayala SM, Efron AM, Gómez CF, Lucero NE. A serological and bacteriological survey of dogs to detect *Brucella* infection in Lomas de Zamora, Buenos Aires province. *Rev Argent Microbiol*. 2009;41(2):97–101.
15. Holst B, Löfqvist K, Ernhölm L, Eld K, Cedersmyg M, Hallgren G. The first case of *Brucella canis* in Sweden: background, case report and recommendations from a northern European perspective. *Acta Vet Scand* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2012;54(1):18.
16. Wanke MM. Canine brucellosis. *Anim Reprod Sci*. 2004;82-83:195–207.

17. Flores Castro, Ricardo, Segura R. Estudio sobre *Brucella canis* en México. Técnica Pecu. 1975;54–8.
18. Flores-Castro R, Güemes, Suárez F, Ramirez-Pfeiffer C, Carmichael LE. Canine brucellosis: Bacteriological and serological investigation of naturally infected dogs in Mexico City. J Clin Microbiol. 1977;6(6):591–7.
19. Briseño González H, Páramo Ramírez RM, Flores Castro R, Suárez Güemes F. Problemas reproductivos en perros machos infectados con *Brucella canis*. Vet México. 2004;35(2):121–8.
20. Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Jacob N. Diagnosis of human brucellosis caused by *Brucella canis*. J Med Microbiol. 2005;54(5):457–61.
21. Kazmierczak J. Public Health Implications of *Brucella canis* Infections in Humans. In: summary findings and recommendations of the *Brucella canis* workgroup, National Association of State Public Health Veterinarians. 2012. p. 1–10.
22. Krueger WS, Lucero NE, Brower A, Heil GL, Gray GC. Evidence for Unapparent *Brucella canis* Infections among Adults with Occupational Exposure to Dogs. Zoonoses Public Health. 2014;61(7):509–18.
23. Manias V, Nagel A, Mollerach A, Mendosa MA, Freyre H, Gómez A, et al. Endocarditis por *Brucella canis*: Primer caso documentado en un paciente adulto en Argentina. Rev Argent Microbiol. 2013;45(1):50–3.

24. Dentinger CM, Jacob K, Lee L V., Mendez HA, Chotikanatis K, Mcdonough PL, et al. Human *Brucella canis* Infection and Subsequent Laboratory Exposures Associated with a Puppy, New York City, 2012. *Zoonoses Public Health*. 2015;62(5):407–14.
25. Greene CE. *Infectious Diseases Of The Dog and Cat*. 4th ed. Greene CE, editor. Elsevier. U.S.A.: Elsevier Ltd; 2012.
26. Lowrie DB, Kennedy JF. Erythritol and threitol in canine placenta: possible implication in canine brucellosis. *FEBS Lett* [Internet]. 1972;23(1):69–72.
27. Reilly TJ, Calcutt MJ, Wennerdahl L a, Williams F, Evans TJ, Ganjam IK, et al. Isolation of *Aureimonas altamirensis*, a *Brucella canis*-like bacterium, from an edematous canine testicle. *J Vet Diagn Invest* [Internet]. 2014
28. Chacón-Díaz C, Altamirano-Silva P, González-Espinoza G, Medina MC, Alfaro-Alarcón A, Bouza-Mora L, et al. *Brucella canis* is an intracellular pathogen that induces a lower proinflammatory response than smooth zoonotic counterparts. *Infect Immun*. 2015;83(12):4861–70.
29. Palomares-Resendiz E, Arellano-Reynoso B, Hernández-Castro R, Tenorio-Gutiérrez V, Salas-Téllez E, Suárez-Güemes F, et al. Immunogenic Response of *Brucella canis* virB10 and virB11 Mutants in a Murine Model. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2(35).
30. González AM. Comparación de las Pruebas de ELISA indirecta, inmunodifusión doble y aglutinación rápida en placa para el diagnóstico de brucelosis canina (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma

de México; 2015.

31. Kang S-I, Lee S-E, Kim J-Y, Lee K, Kim J-W, Lee H-K, et al. A new *Brucella canis* species-specific PCR assay for the diagnosis of canine brucellosis. "Comparative Immunol Microbiol Infect Dis. 2014;37(4):237–41.
32. Aras Z, Uçan US. Detection of *Brucella canis* from inguinal lymph nodes of naturally infected dogs by PCR. Theriogenology. 2010;74(4):658–62.
33. Keid LB, Soares RM, Vasconcellos SA, Chiebao DP, Salgado VR, Megid J, et al. A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. Theriogenology. 2007;68(9):1260–70.
34. Kim JW, Lee YJ, Han MY, Bae DH, Jung SC, Oh JS, et al. Evaluation of immunochromatographic assay for serodiagnosis of *Brucella canis*. J Vet Med Sci. 2007;69(11):1103–7.
35. Wanke MM, Cairó F, Rossano M, Laiño M, Baldi PC, Monachesi NE, et al. Preliminary Study of an Immunochromatography Test for Serological Diagnosis of Canine Brucellosis. Reprod Domest Anim. 2012;47(SUPPL. 6):370–2.
36. Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Lopez G. Sensitivity and specificity of an indirect enzyme-linked immunoassay for the diagnosis of *Brucella canis* infection in dogs. J Med Microbiol. 2002;51(8):656–60.
37. Baldi PC, Wanke MM, Loza ME, Monachesi N, Fossati CA. Diagnosis of canine brucellosis by detection of serum antibodies against an 18 kDa cytoplasmic protein of *Brucella spp.* Vet Microbiol. 1997;57((2-3)):273–81.

38. Barrouin-Melo SM, Poester FP, Ribeiro MB, de Alcântara AC, Aguiar PHP, Nascimento IL, et al. Diagnosis of canine brucellosis by ELISA using an antigen obtained from wild *Brucella canis*. Res Vet Sci. 2007;83(3):340–6.
39. de Oliveira MZD, Vale V, Keid L, Freire SM, Meyer R, Portela RW, et al. Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucella canis*. Res Vet Sci. 2011;90(3):425–31.
40. González-Rodríguez AD. Respuesta inmunológica de perros vacunados con *Brucella canis*. Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.
41. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680–5.
42. Cloeckaert A, Grépinet O, Salih-Alj Debbarh H, Zygmunt MS. Overproduction of the *Brucella melitensis* heat shock protein DnaK in *Escherichia coli* and its localization by use of specific monoclonal antibodies in *B. melitensis* cells and fractions. Res Microbiol. 1996;147(3):145–57.
43. Moseley P. Stress proteins and the immune response. Immunopharmacology. 2000;48(3):299–302.
44. Zugel U, Kaufmann SH. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. ClinMicrobiolRev. 1999;12(0893-8512 (Print)):19–39.
45. Ding X, Boney-montoya J, Owen BM, Bookout AL, Coate C, Mangelsdorf DJ, et al. GroEL stimulates protein folding through forced unfolding. Nat Struct Mol Biol. 2008;15(3):303–11.

46. Amirmozafari N, Ghazi F, Mostafazadeh A, Mostafaie A, Rajabnia R. Comparison of heat shock response in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. PakJBiolSci [Internet]. 2008;11(2):188–94.
47. Roop RM, Fletcher TW, Sriranganathan NM, Boyle SM, Schurig GG. Identification of an Immunoreactive *Brucella abortus* Htra Stress-Response Protein. Infect Immun [Internet]. 1994;62(3):1000–7.
48. Sekhavati MH, Heravi RM, Tahmoorespur M, Yousefi S, Abbassi-Dalooi T, Akbari R. Cloning, molecular analysis and epitopes prediction of a new chaperone GroEL *Brucella melitensis* antigen. Iran J Basic Med Sci. 2015;18(5):499–505.
49. Kittelberger R, Hilbink F, Hansen MF, Ross GP, de Lisle GW, Cloeckaert a, et al. Identification and characterization of immunodominant antigens during the course of infection with *Brucella ovis*. J Vet Diagn Invest. 1995;7(2):210–8.
50. Barkha S, Dharmendra Kumar S, Dhirendra Kumar S. Immunochemical characterization of antigens of *Brucella canis* and their use in seroprevalence study of canine brucellosis. Asian Pac J Trop Med. 2011;4(11):857–61.

APÉNDICE: PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

1) PBS 10x, pH 7.4

Cloruro de Sodio (NaCl)	87.7 g
Fosfato de Sodio Monobásico (NaH ₂ PO ₄)	1.5 g
Fosfato de Sodio Dibásico (Na ₂ HPO ₄)	13 g

Se disuelven los compuestos en 900 mL de agua destilada y se afora a 1L. El pH se ajusta a 7.4.

2) PBS 1x, pH 7.4

PBS 10x	100 mL
Agua destilada	900 mL

3) PBS –Tween 20 (0.1%)

Tween 20	1 mL
PBS-1x pH 7.4	cbp 1L

4) EDTA 0.5 M

EDTA	37.22 g
Agua destilada	cbp 200 mL

Disolver con lunetas de NaOH hasta alcanzar un pH de 7, posteriormente ajustar con gotas de NaOH hasta que alcance pH 8.

5) Tris-HCl pH 6.8 0.5 M

Tris-HCl	7.88 g
Agua destilada	cbp. 100 mL.

Una vez aforado a 100 mL ajustar el pH con NaOH.

6) Buffer de Equilibrio

Tris-HCl (0.05 M)	3.94 g
EDTA (0.01 M)	10 mL de EDTA 0.5 M
Agua destilada	cbp. 500 mL

Debe esterilizarse por autoclave y desgasificarse.

7) Buffer de Elusión

NaCl (1 M)	29.22 g
Agua destilada	cbp. 500 mL

Debe esterilizarse por autoclave y desgasificarse.

8) Buffer de Carga (2x)

Tris-HCl pH 6.8 (0.5 M)	1 mL
Glicerol	0.8 mL
SDS al 10 %	1.6 mL
β -Mercaptoetanol	0.4 mL
Agua destilada	4 mL
Azul de Bromofenol (0.1%)	0.2 mL

9) Buffer de Corrida

Glicina (0.192 M)	14.4 g
Tris base (0.025 M)	3 g
SDS	1 g
Agua destilada	cbp. 1 L

10) Buffer de transferencia

Tris base	4.8 g
Glicina	23 g
Metanol	320 mL
SDS al 10 %	100 μ L
Agua destilada	1.6 L

11) Stock de tinción de Azul de Coomassie

Tableta "PhastGel Blue R-350"	1
Agua destilada	80 mL
Metanol	120 mL

12) Solución de tinción de Azul de Coomassie

Solución stock de tinción	100 mL
Ácido Acético	20 mL
Agua Destilada	80 mL

13) Solución desteñidora

Ácido Acético	50 mL
Metanol	150 mL
Agua Destilada	300 mL

14) Solución Reveladora

4-Cloro-1-Naftol	30 mg
Metanol	10 mL
PBS 1x	40 mL
Peróxido de Hidrógeno (30%)	30 μ L

Disuelva el 4-Cloro-1-Naftol en metanol, posteriormente agregue el PBS 1x y agregue el peróxido de hidrógeno. La solución deberá protegerse de la luz.