

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Omp31 RECOMBINANTE DE *Brucella ovis*
EN EL SISTEMA DE *Escherichia coli* PARA SU USO COMO ANTÍGENO EN EL
DIAGNÓSTICO DE EPIDIDIMITIS CONTAGIOSA DEL CARNERO.

Por

MAGDA CELINA NAVARRO SOTO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRA EN CIENCIAS con acentuación en Inmunobiología

Julio 2012

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Omp31 RECOMBINANTE DE *Brucella ovis*
EN EL SISTEMA DE *Escherichia coli* PARA SU USO COMO ANTÍGENO
EN EL DIAGNÓSTICO DE EPIDIDIMITIS CONTAGIOSA
DEL CARNERO.

Comité de Tesis:

Dr. Ricardo A. Gómez Flores
Director Interno

Dr. Moisés Franco Molina
Secretario

Dra. Patricia Tamez Guerra
Vocal

Dra. Genoveva Álvarez Ojeda
Directora Externa

Dr. Alberto Morales Loredo
Asesor externo

Dr. Carlos Ramírez Pfeiffer
Asesor externo

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, el Dr. Ricardo Gómez Flores y el Dr. Carlos Ramírez Pfeiffer, quienes me brindaron su confianza al poner en mis manos la elaboración de este proyecto. En especial a la Dra. Genoveva Álvarez Ojeda del INIFAP y al Dr. Alberto Morales Loredó del LCRM por haberme orientado con sus amplios conocimientos y experiencia para lograr el objetivo de esta investigación.

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, especialmente a los maestros del Departamento de Inmunología y Virología quienes acrecentaron con sus cátedras mi interés por la Ciencia.

A mis tutores, en especial a la Dra. Patricia Tamez que con su ejemplo de vida y sus acertados comentarios me ayudó a llevar a buen término esta investigación.

Al personal del Laboratorio de Inmunobiología y Acarreadores de Drogas y de la Unidad de Formulación de Biológicos, en especial a Queta Monreal por compartir sus conocimientos incondicionalmente; y a sus tesis de posgrado, quienes dieron el toque alegre y de compañerismo a lo largo de este período.

Al personal del Laboratorio de Biotecnología del LCRM, en especial a Belén y Yelena por su asesoría técnica brindada para lograr los objetivos de este proyecto.

Al INIFAP por haber colaborado con el financiamiento de este proyecto.

Al Comité de Fomento y Protección Pecuaria del estado de Nuevo León por facilitar sus instalaciones.

Al CONACYT por haberme otorgado la beca que hizo posible financiar los estudios que me llevaron a la obtención del grado de Maestra en Ciencias con acentuación en Inmunobiología.

DEDICATORIA

A MI ESPOSO

Que con su amor y apoyo incondicional fue quien me impulsó a alcanzar ésta y muchas otras metas más.

A MIS PADRES

Por sus sabias enseñanzas que me han llevado a lo largo de mi vida a continuar superándome para lograr ser una persona cada día mejor y útil a la sociedad.

A MIS HERMANOS Y HERMANAS

Que con su ejemplo han sabido demostrar que con esfuerzo y dedicación todo lo que se sueña se puede realizar en esta vida.

A MIS ABUELOS Y ABUELAS

Quienes desde el Cielo cuidan e interceden ante Dios por todos y cada uno de los miembros de mi familia. En especial a mis abuelos Guadalupe Soto y Facundo Navarro quienes me enseñaron con su trabajo en el campo el amor y respeto hacia la naturaleza.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
PÁGINA DE TÍTULO.....	i
APROBACIÓN DE TESIS POR EL COMITÉ DE TESIS.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
TABLA DE CONTENIDO.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS.....	xi
NOMENCLATURA.....	xii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 Historia de la brucelosis.....	5
2.2 Etiología.....	5
2.3 Importancia de la brucelosis en ovinos.....	6
2.4 Control de la brucelosis.....	7
2.4.1 Vacunación.....	7
2.5 Diagnóstico de la brucelosis ovina.....	8
2.5.1 Método clínico para brucelosis ovina causada por <i>B. ovis</i>	8
2.5.2 Método bacteriológico.....	9
2.5.3 Diagnóstico serológico.....	9
2.5.3.1 Antígenos inmunodominantes de <i>Brucella</i> sp.....	10
2.5.3.1.1 El lipopolisacárido rugoso.....	12

2.5.3.1.2 Las proteínas de la membrana externa (OMPs) de <i>Brucella</i> sp.....	12
2.5.3.2 Pruebas de diagnóstico serológico para <i>B. ovis</i>	14
2.5.3.2.1 Inmunodifusión en gel de agarosa (IDG).....	14
2.5.3.2.2 Fijación del complemento (FC).....	14
2.5.3.2.3 ELISAi.....	15
2.6 Las proteínas recombinantes.....	15
2.7 Justificación.....	16
3. HIPÓTESIS.....	17
4. OBJETIVOS.....	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos particulares.....	18
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
5.1 Material biológico.....	19
5.2 Técnicas de manipulación de ADN.....	19
5.2.1 Técnica de Extracción de ADN por el método de kit de extracción PureLink Genomic DNA Minikit (Invitrogen®).....	19
5.3 Diseño de iniciadores.....	20
5.4 Transformación bacteriana.....	20
5.4.1 Reactivación de células calcio competentes para transformación.....	20
5.4.2 Clonación de los productos de PCR.....	21
5.4.2.1 Obtención del inserto para clonación.....	21
5.4.2.2 Reacción de ligación.....	22
5.4.3 Transformación de las células calcio competentes DH5 α	23
5.4.4 Selección y análisis de clones DH5 α positivas.....	23
5.4.4.1 Identificación de las bacterias recombinantes mediante PCR.....	23
5.4.4.2 Verificación de la clona transformada.....	24
5.4.4.2.1 Purificación del ADN plasmídico mediante el método de extracción Wizard® Plus SV Minipreps (Promega®).....	24
5.4.4.2.2 Digestión enzimática.....	24
5.4.4.2.3 Secuenciación.....	25
5.5 Subclonación en células TOP10.....	25
5.6 Expresión de la proteína recombinante.....	26
5.6.1 Cinética de crecimiento.....	26
5.6.2 Análisis de la cinética de crecimiento mediante geles de poliacrilamida y Western blot.....	27
5.6.3 Escalado de la expresión de la proteína recombinante.....	28
5.7 Purificación de la proteína recombinante mediante columna de afinidad.....	29

5.7.1 Identificación de la expresión de la proteína recombinante purificada.....	29
5.8 Análisis inmunoenzimático de la proteína recombinante.....	29
5.8.1 Biológicos.....	30
5.8.1.1 Sueros ovinos controles positivo y negativo.....	30
5.8.1.2 Sueros ovinos de referencia NOM.....	30
5.8.1.3 Sueros caprinos y bovinos.....	30
5.8.2 Procedimiento técnico de ELISAI.....	30
6. RESULTADOS.....	32
6.1 Técnica de extracción de ADN por el método de kit de extracción PureLink Genomic DNA Minikit (Invitrogen®).....	32
6.2 Diseño de iniciadores en la secuencia del gen <i>omp31</i> de <i>B. ovis</i>	33
6.3 Obtención del inserto para clonación.....	34
6.4 Transformación de células, calcio competentes, DH5- α de <i>E. coli</i>	35
6.5 Verificación de la clona transformada.....	35
6.5.1 Digestión enzimática.....	35
6.5.1.1 Digestión enzimática virtual.....	36
6.5.1.2 Digestión del ADN plasmídico.....	37
6.5.2 Secuenciación.....	38
6.6 Transformación de las células calcio-competentes TOP10 para expresión.....	39
6.7 Cinética de crecimiento.....	40
6.8 Escalado de la inducción y purificación de la proteína mediante columna de afinidad Ni-NTA Fast Start (Qiagen®).....	42
6.9 Análisis inmunoenzimático de la proteína recombinante.....	44
7. DISCUSIONES.....	48
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	53
APÉNDICES.....	54
Diagrama general de la metodología.....	54
Protocolo para preparar células calciocompetentes.....	60
Protocolo para la realización del <i>Western blot</i>	62
Protocolo para la realización del ELISAI.....	65
LITERATURA CITADA.....	66
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág
1	Modelo hipotético de las principales estructuras de la membrana externa de <i>Brucella</i> sp.	10
2	Modelo esquemático de la estructura del LPS de <i>Brucella</i> sp.	11
3	Mapa que muestra las características del vector pBAD/ThioTOPO®.	22
4	ADN genómico de <i>Brucella ovis</i> .	32
5	Secuencia de 708 pares de bases del gen <i>omp31</i> obtenida de la base de datos del NCBI.	33
6	Productos de PCR de <i>B. ovis</i> .	34
7	Gel de agarosa al 1.5 % donde se muestran las bandas a la altura de ~700 pb correspondientes a las colonias DH5- α transformadas.	35
8	Geles de agarosa al 1.5% virtuales realizados con el programa NEBcutter 2.0.	36
9	Digestión enzimática del ADN plasmídico proveniente de las colonias transformadas.	37
10	Secuencia que confirma la correcta clonación del producto de PCR en el vector pBAD/Thio-TOPO®	38
11	Alineamiento de la secuencia introducida al BLAST (obtenida de la secuenciación del vector pBAD/Thio-TOPO- <i>omp31</i>) con la secuencia del gen <i>omp31</i> de <i>Brucella ovis</i> cepa Reo 198	39
12	Colonias de <i>E. coli</i> TOP10 transformadas con vector pBAD/TOPO® Thiofusion™ / <i>omp31</i> .	40
13	Cinética de crecimiento	41
14	Western blot de la cinética de crecimiento en donde se muestra la banda correspondiente a la proteína Omp31 recombinante.	41

15	Determinación de la concentración de arabinosa (%).	42
16	Purificación de la proteína Omp31 recombinante.	43
17	<i>Western blot</i> donde se confirma la purificación de la proteína Omp31 recombinante.	44
18	Gráfica donde se muestra la DO corregida de los sueros caprinos de campo positivos y negativos a brucelosis (<i>B. melitensis</i>) y los controles positivo y negativo.	45
19	Gráfica donde se muestra la DO corregida de los sueros ovinos de campo positivos y negativos a epididimitis contagiosa del carnero (<i>B. ovis</i>) y los controles positivo y negativo.	46
20	Gráfica donde se muestra la DO corregida de los sueros bovinos de campo positivos y negativos a brucelosis (<i>B. abortus</i>) y los controles positivo y negativo.	47

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pág.
1. Volumen utilizado de los reactivos utilizados para la realización del PCR.	55
2. Condiciones de temperatura y ciclos para amplificación del gen <i>omp31</i> mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.	56
3. Volumen de los reactivos utilizados en la reacción de ligación.	57
4. Volúmenes de arabinosa tomados a partir de la solución inicial al 20% para obtener las diferentes concentraciones en la cinética de crecimiento e inducción.	58
5. Valores DO ₄₀₅ corregidos ($DO_{\text{muestra}} - DO_{\text{negativo}}$) obtenidos de la prueba ELISA indirecta realizada con la proteína recombinante Omp31 a sueros de rumiantes.	59

NOMENCLATURA

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNp	ADN plasmídico
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
CENID	Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias
CFPPNL	Comité de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Nuevo León
cm	Centímetros
DO	Densidad óptica
DO ₅₅₀	Densidad óptica a 550 nm
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas
ELISAI	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas de tipo indirecto
<i>et al.</i>	Y colaboradores
FC	Fijación del Complemento
FPA	Fluorescencia polarizada
g	gramos
h	horas
HCl	Ácido clorhídrico
HRP	Enzima peroxidasa de rábano
HS	Extracto salino caliente

IDG	Inmunodifusión en gel de agarosa
IgG	Inmunoglobulina G
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido
kb	Kilobases
KCl	Cloruro de potasio
kDa	KiloDaltons
L	Litro
LB	Medio Luria Bertani
LCRM	Laboratorio Central Regional de Monterrey
LPS	Lipopolisacárido
LPS-R	Lipopolisacárido rugoso
LPS-S	Lipopolisacárido liso
M	Concentración molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Concentración milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NCBI	National Center Biotechnological Information
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
No	Número

NOM	Norma Oficial Mexicana
OIE	World Organisation for Animal Health
OMP	Proteína de membrana
OMPs	Proteínas de membrana
p/v	Peso/volumen
Pág	Página
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PT	Prueba de tarjeta
PVDF	Membrana de fluoruro de polivinilideno
rpm	Revoluciones por minuto
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SDS	Docecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS
seg	Segundos
sp	Especie
T	Timina
TBE	Solución amortiguadora tris-boratos-EDTA
TOP10	Cepa <i>Escherichia coli</i> de expresión
Tris-NaCl	Tris[hidroximetil]aminometano-cloruro de sodio
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
ufc	Unidades formadoras de colonias
UV	Luz ultravioleta

V	Voltios
v/v	Volumen/volumen
Vol	Volumen
MgCl	Cloruro de Magnesio
μg	Microgramo
μL	Microlitros
%	Porciento
°C	Grados Celsius

RESUMEN

La epididimitis infecciosa del carnero causada por *Brucella ovis* se considera de gran importancia a nivel pecuario, ya que puede afectar de manera considerable a la explotación ovina, provocando una reducción de entre un 15% a un 30% en el porcentaje de corderos nacidos y por lo tanto, la producción de carne y lana se ve disminuida. El diagnóstico serológico es el método más utilizado para confirmar esta enfermedad. Las técnicas más utilizadas son las de fijación del complemento (FC), la prueba de inmunodifusión en gel de agarosa (IDG), y el inmunoensayo enzimático indirecto (ELISAI), empleando antígenos de superficie solubles (extracto salino caliente) obtenidos a partir de *B. ovis*. El uso práctico del extracto salino caliente (HS) de *Brucella ovis* en las pruebas de diagnóstico, no ha sido del todo satisfactorio. Se ha dicho que la proteína de membrana Omp31 de *Brucella* es lo suficientemente inmunogénica para producir anticuerpos en los animales susceptibles. En este trabajo se clonó y se expresó el gen *omp31* de *B. ovis* en el sistema de *E. coli*, utilizando las cepas DH5 α y TOP10. Se obtuvo la proteína Omp31 recombinante la cual se utilizó para analizar, mediante ELISA indirecta, 10 sueros ovinos positivos y 10 negativos a IDG; 10 sueros caprinos positivos y 10 negativos a PT 3% y FC; 10 sueros bovinos positivos a cultivo microbiológico y FPA y 10 sueros negativos a PT (8%) y FPA. Los resultados de las muestras de suero caprino y ovino, mostraron reconocimiento de los anticuerpos séricos hacia la proteína Omp31 recombinante, pero no se observó diferencia entre las densidades ópticas (DO) de los sueros positivos y negativos en ambas especies animales. En cambio, las muestras procedentes de bovinos no sólo mostraron reconocimiento antígeno-anticuerpo, sino también, se observó que las diferencias entre las DO de los sueros positivos y los negativos fueron marcadamente diferentes, mostrando las mayores lecturas los sueros correspondientes a los casos positivos. Estos resultados muestran la capacidad de la proteína Omp31 recombinante para detectar anticuerpos contra *B. ovis* en sueros ovinos, así como la presencia de reacción cruzada con otras especies de brucelas en los sueros de bovino y caprino.

ABSTRACT

Infectious epididymitis in sheep caused by *Brucella ovis* is considered of great importance to livestock, as it may significantly affect the sheep farming and market, causing a reduction between 15% to 30% in the percentage of lambs born and therefore, the meat and wool production is diminished. Serological diagnosis is the most common method used to confirm the disease. Other techniques used include complement fixation (CF), immunodiffusion in agarose gel (GDI) and the indirect enzyme immunoassay (ELISAI) using soluble surface antigens (hot saline extract) obtained from *B. ovis*. The practical use of hot saline extract (HS) from *Brucella ovis* in diagnostic tests has not been entirely satisfactory. It is known that the membrane protein Omp31 of *Brucella* is sufficiently immunogenic to raise antibodies in susceptible animals. In the present work, the omp31 gene of *B. ovis* was cloned and expressed in the *E. coli* system, using the strains DH5a and TOP10. We obtained the recombinant Omp31 protein which was used to analyze, by indirect ELISA, 10 positive and 10 negative sheep sera to IDG, 10 positive and 10 negative goat sera to 3% PT and FC; 10 bovine sera positive to microbiological culture and FPA and 10 negative sera to PT (8%) and FPA. The results of the serum samples from goats and sheep, showed recognition of serum antibodies to the recombinant Omp31 protein, but no difference was observed between the optical densities (OD) of positive and negative sera in both animal species. In contrast, samples from cattle not only showed antigen-antibody recognition, but also it was observed that the differences between the OD for the positive and negative sera were markedly different, showing the highest readings for sera positive cases. These results showed the ability of the recombinant Omp31 protein to detect antibodies against *B. ovis* in sheep sera and the presence of cross-reaction with other species of *Brucella* in cattle and goat sera.

1. INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad bacteriana causada por microorganismos pertenecientes al género *Brucella*. Las especies involucradas en la brucelosis ovina son *B. melitensis* y *B. ovis*. La primera es una cepa lisa que origina la brucelosis ovina, mientras que la última pertenece a las cepas rugosas y es la causante de la epididimitis contagiosa del carnero. Aunque no se han reportado casos de humanos infectados con esta especie de brucela, la enfermedad se considera de importancia a nivel pecuario ya que puede afectar de manera considerable a la explotación ovina provocando una reducción de entre un 15% a un 30% en el porcentaje de corderos nacidos y por lo tanto, la producción de carne y lana se ve disminuida.

Debido a que esta enfermedad muchas veces no presenta signos evidentes, su presencia sólo se detecta cuando se lleva a cabo la movilización de los carneros destinados a la venta ya que en ese momento a los animales se les realiza la prueba diagnóstica y el examen clínico del aparato reproductor. La existencia de lesiones clínicas (epididimitis unilateral y ocasionalmente bilateral) en los carneros puede ser indicativa de la existencia de la infección, pero no siempre está presente y es necesario realizar estudios de laboratorio para confirmar el diagnóstico, el cual puede basarse en métodos directos o indirectos.

El diagnóstico directo se realiza por medio del aislamiento bacteriológico en medios selectivos adecuados para *B. ovis* a partir de muestras de semen y tejido de los carneros o de fluidos vaginales y leche de las ovejas. Sin embargo, para el diagnóstico de rutina se prefiere el diagnóstico indirecto el cual se realiza mediante pruebas serológicas.

Para diagnóstico serológico se pueden utilizar la técnica de fijación de complemento (FC), la prueba de inmunodifusión en gel de agarosa (IDG), y el

inmunoensayo enzimático indirecto (ELISAI), empleando antígenos de superficie solubles (extracto salino caliente) obtenidos a partir de *B. ovis*. Con respecto a la sensibilidad, una combinación de las técnicas IDG y ELISA parece ofrecer los mejores resultados. Sin embargo, la prueba IDG sigue siendo el ensayo más factible para el diagnóstico de *B. ovis* debido a que es de menor costo y es más sencillo de realizar.

En años recientes, la búsqueda de nuevos y mejores antígenos mediante el uso de la biotecnología ha permitido mejorar la calidad diagnóstica de muchas de las pruebas serológicas convencionales utilizadas para detectar diversas enfermedades infecciosas, pero en el caso de la brucelosis ovina, aún no se han logrado avances significativos.

Se ha dicho que la proteína de membrana Omp31 de *Brucella* es lo suficientemente inmunogénica para producir anticuerpos en los animales susceptibles, lo que la convierte en blanco de análisis de obtención mediante métodos biotecnológicos que permitan lograr una proteína Omp31 recombinante de calidad suficiente para usarse en las pruebas serológicas como ELISAI y FPA.

En este trabajo se clonó y se expresó el gen *omp31* de *B. ovis* en el sistema de *E. coli*, utilizando las cepas DH5 α y TOP10. Se obtuvo la proteína Omp31 recombinante, la cual se analizó mediante ELISAI. Los resultados muestran la capacidad de la proteína Omp31 recombinante para detectar anticuerpos contra *B. ovis* en sueros ovinos, así como otras brucelas en sueros de bovino y caprino. Estos resultados dan pie para realizar futuras investigaciones dirigidas a determinar la utilidad práctica de esta proteína en pruebas de diagnóstico serológicas como ELISA y FPA para el diagnóstico de brucelosis en los rumiantes domésticos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Historia de la brucelosis

La brucelosis es una enfermedad que se conoce en el Mediterráneo desde épocas antiguas (Godfroid *et al.*, 2005). En 1887, el científico australiano David Bruce aisló por primera vez el agente causal de la fiebre ondulante, al que denominó “*Micrococcus melitensis*” (Cutler *et al.*, 2005). Más tarde, Zammit en 1905 descubrió la naturaleza zoonótica de la enfermedad al aislar *Brucella melitensis* de leche de cabras. Recientemente, mediante el estudio de restos óseos por técnicas moleculares se ha demostrado su existencia como causa de enfermedad en la población de Butrint, Albania durante la Edad Media (Mutolo *et al.*, 2011).

2.2 Etiología

La brucelosis es causada por bacterias del género *Brucella*, las cuales se caracterizan por ser cocobacilos gram-negativos, intracelulares, facultativos (Gomes-Costa *et al.*, 2006), de crecimiento lento que no poseen cápsulas ni forman esporas (Castro *et al.*, 2005).

Aunque brucelosis es el término global dado a la infección causada por las bacterias pertenecientes al género *Brucella* (Gopaul *et al.*, 2007) en realidad se reconocen seis especies capaces de provocar infección en los animales: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* y *B. neotomae*. Esta clasificación está basada en la diferencia de patogenicidad y la preferencia de hospedero. Las principales especies patógenas para el humano son *B. melitensis*, el principal agente etiológico de la brucelosis caprina y ovina; *B. suis* causante de la brucelosis en cerdos y *B. abortus*, responsable de la brucelosis bovina. Las especies *B. canis* y *B. ovis* producen la brucelosis canina y la epididimitis

contagiosa del carnero, respectivamente. *B. neotomae* se aisló de ratas del desierto. Se han reportado otras especies de este género obtenidas de una gran variedad de animales salvajes tales como bisontes, cerdos salvajes, zorros, búfalos africanos y caribúes (Gomes-Costa *et al.*, 2006). Además de las seis especies descritas, recientemente se han clasificado dos especies más, encontradas en mamíferos marinos llamadas *B. ceti* (cetáceos) y *B. pinnipediae* (pinípedos), las cuales son capaces de producir infección en humanos y se ha reportado una más asociada a la rata de campo denominada *B. microti*. Algunas especies de *Brucella* son a la vez divididas en subgrupos conocidos como biovariedades, de las cuales las de mayor interés epidemiológico son las pertenecientes a *B. abortus* y *B. melitensis* (Gopaul *et al.*, 2007).

2.3 Importancia de la brucelosis en los ovinos

En términos generales se puede decir que en los ovinos, la infección por *B. melitensis* tiene importancia clínica en las hembras y machos, mientras que *B. ovis* en los machos (Cuéllar, 2005).

Brucella ovis es de tipo rugoso estable y no tiene potencial zoonótico, pero en ovinos el organismo causa infecciones crónicas clínicas o subclínicas de índole reproductivo. Los ovinos machos adultos son los más susceptibles, aunque los jóvenes también pueden adquirirla a partir de los cuatro meses de edad (Tsolis *et al.*, 2009).

Esta enfermedad se caracteriza clínicamente por uno o más de los siguientes síntomas: epididimitis, baja calidad del semen, presencia de granulomas espermáticos (formados por el esperma extravasado) y fibrosis progresiva del epidídimo (uni- o bilateral, con la subsecuente disminución de la fertilidad) en machos adultos. En las hembras puede causar fallas en la concepción, reabsorción embrionaria (Bulgin, 1990), infección genital, abortos y corderos nacidos débiles o muertos (Myers y Siniuk, 1970, Myers, 1973).

Esto puede afectar fuertemente la producción ovina provocando una reducción en el porcentaje de nacimientos por arriba del 30% en rebaños expuestos por primera vez a la enfermedad y de un 15% a 20% en rebaños en la cual es endémica (Bulgin, 1990).

La brucelosis por *B. melitensis* en ovinos tiene una presentación similar, quizá menos notoria que en caso de las cabras. El hecho que hay que destacar es que esta especie la comparten por igual caprinos, ovinos y bovinos y con las tres especies animales existe el riesgo de transmisión al humano. Los signos están asociados a la preñez, ocurriendo brotes de aborto hacia el final de la gestación. Otros signos menos frecuentes en las borregas con brucelosis son: retención placentaria, mastitis, nacimiento de corderos débiles, pérdida de peso y claudicaciones por artritis (Cuéllar, 2005), sinovitis y signos nerviosos (Blood y Radostits, 1992).

2.4 Control de la brucelosis ovina

El control y la erradicación de la brucelosis se considera de interés nacional para México y para ello la SAGARPA implementó la Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, *Campaña Nacional contra la Brucelosis* (NOM 1996) que es obligatoria para los productores y cuyos planes de control se basan principalmente en campañas masivas de vacunación, así como de diagnóstico y eliminación de los animales positivos a las pruebas de diagnóstico confirmatorio.

2.4.1 Vacunación

El principal objetivo de la vacunación es mejorar la producción general del rebaño. La vacunación contra infecciones zoonóticas está dirigida a reducir o eliminar el riesgo para el consumidor y en algunos casos mejorar la productividad del animal individual. Además el uso de vacunas ha tenido un impacto significativo en la salud pública al reducir el uso de farmacéuticos

veterinarios y por ende, sus residuos en la cadena alimentaria humana (Meeusen *et al.*, 2007).

En los pequeños rumiantes se emplea la dosis reducida de la cepa Rev 1 de *B. melitensis* de 1×10^5 unidades formadoras de colonias (ufc) por vía subcutánea. A esta dosis, no existe evidencia de que las cabras y ovejas adultas eliminen brucelas a través de la leche en los primeros 90 días posvacunación (Martínez *et al.*, 2005) y resultan negativas a serología de tres a siete meses después de la inmunización (Díaz *et al.*, 1984; Mancera *et al.*, 1992).

2.5 Diagnóstico de la brucelosis ovina.

Para el diagnóstico de la brucelosis, se pueden emplear en conjunto los siguientes métodos: el clínico, el epidemiológico, el aislamiento e identificación bacteriana, técnicas moleculares (PCR) y la interacción inmunológica ya sea de células expuestas al antígeno o por la demostración de anticuerpos en fluidos corporales (Nielsen *et al.*, 1994).

2.5.1 Método clínico para brucelosis ovina causada por *B. ovis*.

El diagnóstico de la epididimitis infecciosa del carnero en los rebaños está basado en la palpación escrotal, cultivo de semen, test serológicos o la combinación de los tres (Méndez *et al.*, 1999), siendo también de utilidad revisar los índices reproductivos de la explotación (Rojas, 2003). El primero se realiza localizando al epidídimo en la parte baja del escroto. Los carneros afectados severamente tienen por lo menos un epidídimo agrandado y pueden mostrar dolor cuando el testículo es manipulado (Cuéllar, 2005). Algunos animales infectados no presentan alteraciones testiculares detectables mediante palpación, por lo que es necesario recurrir a pruebas serológicas y bacteriológicas para establecer un diagnóstico preciso (Méndez *et al.*, 1999).

El examen físico de los testículos buscando signos de epididimitis o el cultivo de semen para el aislamiento de *B. ovis* no es confiable para identificar a todos los machos infectados ya que esas pruebas resultan imprácticas cuando los rebaños son muy grandes, debido a que se puede esperar que muchas muestras sean contaminadas. Además, la evidencia clínica de epididimitis también puede ser originada por otras etiologías diferentes a *B. ovis* (Myers, 1973) como pueden ser *Actinobacillus seminis*, *A. actinomycetem comitans*, *Histophilus ovis*, *Haemophilus* spp., *Corynebacterium pseudotuberculosis ovis*, *B. melitensis* y *Chlamydia abortus* (antes *Chlamydia psittaci*). También se debe considerar que muchas lesiones del epidídimo en carneros son granulomas espermáticos estériles que provienen de traumatismos (OIE, 2008).

2.5.2 Método bacteriológico

En el diagnóstico de brucelosis, el *estándar de oro* continúa siendo el aislamiento de la bacteria. Se debe intentar obtener el organismo causal en todo animal o población con resultados serológicos positivos (Godfroid, 2002). Para el aislamiento de *B. ovis* de animales vivos la muestra más recomendada es el semen obtenido por electroeyaculación, o bien, la toma de muestra de la cavidad prepucial mediante hisopos. Las muestras más adecuadas para aislar *B. ovis* postmortem son el epidídimo, glándulas bulbouretrales, vesículas seminales, ampollas del conducto deferente, diversos nódulos linfáticos, testículos y bazo. También el agente puede ser aislado desde el feto abortado y la placenta (Rojas, 2003).

2.5.3 Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico se basa en la demostración de anticuerpos frente a antígenos de *B. ovis*. Las técnicas con las que se han obtenido mejores resultados son la prueba de fijación del complemento (FC), la prueba de

inmunodifusión doble en gel de agarosa (IDG) y el inmunoensayo enzimático indirecto (ELISAi) (Díaz, 1998; OIE, 2008).

2.5.3.1 Antígenos inmunodominantes de *Brucella* sp.

Dentro del género *Brucella* se han identificado los siguientes antígenos: lipopolisacáridos LPS-S (especies lisas), LPS-R (especies rugosas); proteínas de membrana externa (OMP), las cuales a su vez se clasifican en grupo 1 (88 a 94 kDa), grupo 2 (35 a 39 kDa) y grupo 3 (25 a 31 kDa); proteínas periplásmicas; proteínas citoplásmicas (Salas *et al.*, 2001) (Figura 1).

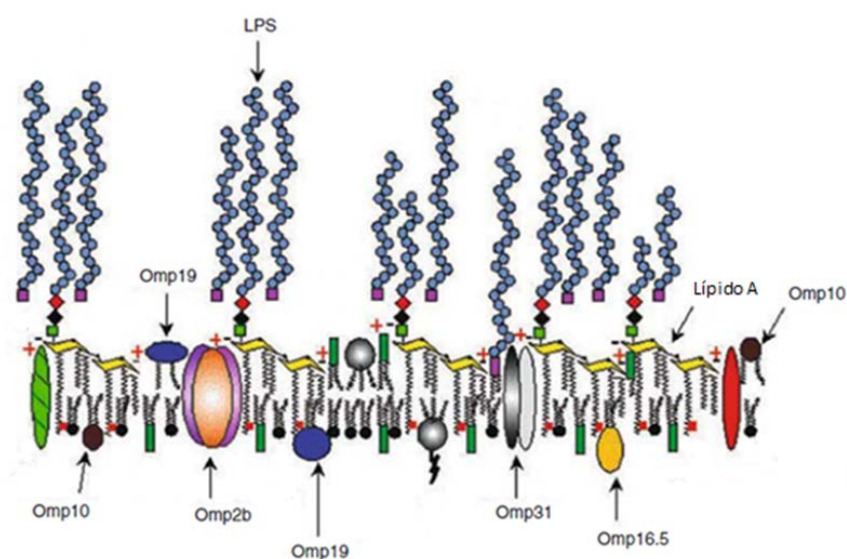


Figura 1. Modelo hipotético de las principales estructuras de la membrana externa de *Brucella* sp. Las proteínas de membrana (OMP) están indicadas por su peso molecular en kDa. (Modificado de Moreno y Moriyón, 2006).

El lipopolisacárido del género *Brucella* consta de una parte glucolipídica (lípidos A), insertada en la membrana externa y otra polisacáridica dirigida hacia el exterior. Esta última se divide en dos secciones: el núcleo, más interno, y la cadena O (Figura 2). Las especies

B. ovis y *B. canis* carecen de esta cadena O de forma natural (especies rugosas) y las especies *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* (especies lisas) la poseen de manera característica pero pueden llegar a perderla por mutación (mutantes rugosos o LPS-R). El LPS de la fase lisa (LPS-S) de las brucelas es marcadamente inmunodominante en la respuesta serológica. Por esto último, la generalidad de las pruebas serológicas detectan anticuerpos frente al LPS-S y el empleo de suspensiones bacterianas o antígenos deficientes de la cadena O conduce a errores diagnósticos (Moriyón y López-Goñi, 2001).

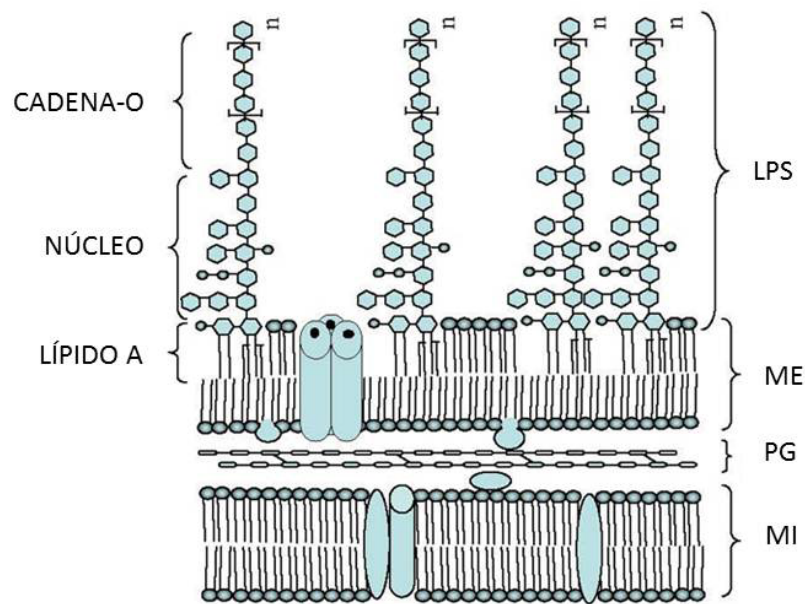


Figura 2. Modelo esquemático de la estructura del LPS de *Brucella* sp. LPS, lipopolisacárido; ME, membrana externa; PG, peptidoglicano; MI, membrana interna. (Tomado y modificado de Cardoso *et al.*, 2006)

2.5.3.1.1 El lipopolisacárido rugoso.

Cuando las células rugosas de *Brucella* se extraen con solución salina mediante calor (método salino caliente, HS), se consiguen extractos antigénicos solubles en agua, cuyo componente mayoritario precipita con sueros frente a *Brucella* de tipo rugoso. Por esta razón los extractos HS han sido mencionados como el *antígeno específico rugoso* o, cuando se obtienen a partir de *B. ovis*, como el *antígeno específico de B. ovis*. Debido a su solubilidad en agua y alto contenido en epítopes relevantes de la superficie celular, el extracto HS es el mejor antígeno de diagnóstico, y ha sido muy utilizado para el diagnóstico serológico de la infección por *B. ovis* (OIE 2002).

2.5.3.1.2 Las proteínas de membrana OMP de *Brucella* sp.

Aunque las diferentes especies de *Brucella* se encuentran genéticamente muy relacionadas entre sí, existen diferencias de patogenicidad y preferencia de hospedero que pueden estar favorecidas, al menos en parte, por la composición de la membrana externa (Martin-Martin *et al.*, 2009). La membrana externa es una estructura que está implicada en la interacción de las bacterias gram-negativas con el ambiente que las rodea. Entre sus componentes principales se encuentran el LPS y las proteínas de la membrana externa (OMPs). Debido a que no existe la cadena O del LPS en las especies rugosas de *Brucella* sp. (*B. ovis*, *B. canis* y *B. abortus* RB51) las OMPs están más expuestas en la superficie y su papel en la virulencia de la bacteria ha tomado gran importancia para la búsqueda de antígenos que puedan ser usados en el desarrollo de vacunas o métodos diagnósticos (Caro-Hernández *et al.*, 2007). Las principales OMPs de *Brucella*

inicialmente fueron identificadas y clasificadas de acuerdo a su peso molecular (Moreno y Moriyón, 2006). De esta forma, las proteínas de membrana que están dentro del grupo 1 tienen aparente peso molecular de 94-88 kDa, las del grupo 2 (omp2a y omp2b) tienen un peso molecular de entre 36-38 kDa y las del grupo 3 (omp25 y omp31), de 25-27 y 31-34 kDa, respectivamente (Cassataro *et al.*, 2004). En *Brucella* las principales OMPs son la Omp25 y la Omp31 (pertenecientes al grupo 3), excepto para *B. abortus* donde se ha demostrado mediante técnicas moleculares que carece del gen que codifica para esta proteína y por lo tanto, la omp31 no puede estar presente en la membrana externa de esta especie (Cloeckaert *et al.*, 1996).

Se ha demostrado que existe buena reactividad contra la proteína Omp31 extraída de *B. ovis* en sueros provenientes de ovinos infectados experimentalmente con esta bacteria y con anticuerpos monoclonales específicos contra la proteína de membrana Omp31 extraída de *B. ovis*, pero poca reactividad contra la proteína Omp31 recombinante de *B. melitensis* (Kittelberger *et al.*, 1998). Esta característica es atribuida a la existencia de diferencias en nueve nucleótidos entre los genes *omp31* de ambas cepas de *Brucella* que modifican fuertemente las propiedades antigénicas de las proteínas codificadas (Vizcaíno *et al.*, 2001), lo que sugiere que esta proteína podría tener utilidad como antígeno para el desarrollo de pruebas de diagnóstico específicas para la detección de epididimitis infecciosa del carnero causada por *B. ovis*.

2.5.3.2 Pruebas de diagnóstico serológico para *B. ovis*

El diagnóstico serológico es el método más eficiente para el diagnóstico de epididimitis infecciosa del carnero. Existe una gran variedad de pruebas serológicas pero no todas están aceptadas por la OIE para su uso como pruebas confirmatorias. Entre las más usadas son la de fijación del complemento (FC), la inmunodifusión en gel (IDG) y la ELISA debido a que estas pruebas tienen mejor desempeño (Marín *et al.*, 1999).

2.5.3.2.1 Inmunodifusión en gel de agarosa (IDG)

Es una técnica simple, de fácil interpretación y bajo costo y cuando está correctamente estandarizada se obtienen excelentes resultados comparables con los de la FC. Su desventaja radica en que sus resultados son solamente de tipo cualitativo. Cuando esta prueba se realiza con el extracto salino (HS) tiene una sensibilidad del 91.6% y una especificidad del 100%.

2.5.3.2.2 Fijación del complemento

Es una prueba de referencia a nivel internacional con alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo, presenta inconvenientes tales como la existencia de falsos positivos y problemas prácticos como la necesidad de inactivar los sueros, la dificultad de realizarla con sueros hemolizados o con poder anti complementario y la existencia de fenómenos de zona (Myers *et al.*, 1972).

2.5.3.2.3 ELISAI

Es una técnica relativamente moderna de diagnóstico que ofrece entre otras ventajas la de permitir el procesamiento simultáneo de un gran número de muestras. Generalmente, sus resultados no se ven alterados por la hemólisis o anti complementariedad (Vigliocco *et al.*, 1997; Álvarez *et al.*, 2007). Sin embargo, se sabe que su uso con el HS da una reacción inespecífica fuerte y reacción cruzada con sueros de animales infectados por *B. melitensis*.

2.6 Las proteínas recombinantes

En ingeniería genética, el aislamiento de un gen determinado que tiene información para codificar cierta proteína, y su introducción al ADN de un organismo distinto del inicial (ADN recombinante) resulta en la obtención de un organismo genéticamente modificado que producirá la proteína de interés (proteína recombinante). Entre los muchos sistemas disponibles para la producción de proteínas recombinantes, *Escherichia coli* es el más ampliamente utilizado en biotecnología debido a sus características de crecimiento rápido, alta densidad de producción y menor costo de los sustratos, además su genética está ampliamente caracterizada y aunado a esto, existe de un gran número de cepas y vectores disponibles para su uso en este sistema (Baneyx, 1999).

En términos generales, la obtención de una proteína recombinante se realiza mediante la construcción de un plásmido que codifique para la proteína deseada, el cual se introduce a una célula hospedera (ej. *E. coli*) que se hace crecer en medio de cultivo líquido enriquecido y se induce su expresión mediante la adición al medio de un sustrato adecuado para el plásmido (ej. IPTG, arabinosa). Luego se cosechan y lisan las células, se purifica la proteína obtenida y se comprueba su expresión por medio de SDS-PAGE y/o *Western blot*.

Los avances en biotecnología ha hecho que con la clonación molecular sea relativamente fácil obtener antígenos individuales para ser usados como vacunas. Así mismo, esta tecnología ha sido utilizada para la obtención de nuevos y mejores antígenos que mejoren de manera significativa la eficiencia de las pruebas diagnósticas serológicas.

2.7 Justificación

En los últimos 15 años la población de ovinos ha fluctuado entre los 6 y 7 millones de cabezas, con una tasa media de crecimiento anual del 1 por ciento (SAGARPA, 2012). Al ser una industria creciente en México, se debe considerar la necesidad de contar con los métodos de sanidad animal que permitan controlar o erradicar las posibles enfermedades en los ovinos. Entre estas enfermedades importantes se encuentra la epididimitis infecciosa del carnero causada por *B. ovis*, la cual produce pérdidas económicas debidas fundamentalmente a la disminución de los porcentajes de parición, baja fertilidad y la consiguiente eliminación de los animales reproductores. Lamentablemente, en cuestiones diagnósticas se hace evidente la necesidad de desarrollar métodos serológicos más confiables que mejoren el desempeño de las técnicas utilizadas para su diagnóstico. La obtención de proteínas recombinantes mediante la clonación de genes en el sistema *E. coli* ha permitido la obtención en grandes cantidades de antígenos capaces de interactuar con los anticuerpos específicos en sueros animales, eliminando el subsecuente riesgo que representa el manipular microorganismos patógenos directamente.

Debido al dudoso desempeño que actualmente ofrece el uso del HS en el diagnóstico de la epididimitis contagiosa del carnero, en este trabajo se buscó clonar y expresar el gen *omp31* de *B. ovis* en el sistema de *E. coli* y obtener la proteína Omp31 recombinante purificada mediante columna de afinidad para determinar su posible uso como antígeno específico para la detección de anticuerpos contra *B. ovis* en sueros ovinos mediante la técnica ELISAI.

3. HIPÓTESIS

Con el sistema de *Escherichia coli* se puede clonar y expresar el gen *omp31* de *Brucella ovis* y la proteína recombinante obtenida puede ser usada en pruebas ELISA para detectar anticuerpos contra epididimitis contagiosa del carnero en sueros ovinos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar la efectividad de la proteína de membrana Omp31 recombinante de *Brucella ovis* como antígeno para el diagnóstico de brucelosis en ovinos.

4.2 Objetivos Particulares

1. Clonación del gen *omp31* de *Brucella ovis* en el sistema de *Escherichia coli*.
2. Expresión y purificación de la proteína Omp31 recombinante a evaluarse como antígeno en las pruebas de ELISAI.
3. Efectividad del antígeno Omp31 recombinante para detectar anticuerpos contra *Brucella* en ELISAI utilizando sueros de rumiantes.

6. MÉTODOS

6.1 Material Biológico

En la extracción del ADN, se utilizó como control positivo la cepa REO-198 de *Brucella ovis*, así como sueros positivos, donados por el Dr. Efrén Díaz Aparicio del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal, (CENID-Microbiología) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). También, se usaron sueros positivos y negativos de cabra, donados por el Laboratorio Central Regional de Monterrey A. C. (LCRM), dependiente del Comité de Fomento y Protección Pecuaria del estado de Nuevo León (CFPPN).

Además se usó la cepa de expresión y clonación TOPO F- *mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lac74 recA1 araD139(araleu) 7697 galUgalKrpsL (StrR) endA1 nupG* y el vector de clonación pBAD/Thio-TOPO® vector (Invitrogen®).

6.2 Técnicas de manipulación de ADN

6.2.1 Técnica de Extracción de ADN por el método de kit de extracción PureLink Genomic DNA Minikit (Invitrogen®).

Se tomó una colonia de *B. ovis* y se incubó en 3 mL de caldo Luria Bertani (LB) a 37°C durante 24 h, con agitación de 160 rpm. Se tomó 1-mL del cultivo y se colocó en un tubo Eppendorf® de 1.5 mL. Se centrifugó en una microcentrífuga Minispin (Eppendorf®) a velocidad máxima durante 5 min. El sobrenadante se eliminó por decantación y el tubo se dejó invertido sobre un papel secante para eliminar los restos de medio. Para la extracción del ADN genómico de *B. ovis* a partir del paquete celular obtenido, utilizando el kit de extracción PureLink Genomic DNA Minikit (Invitrogen®) según las indicaciones del fabricante para bacterias Gram negativas.

Durante el procedimiento, como control negativo se realizó el mismo protocolo pero se usó agua destilada estéril en lugar de cultivo, con el fin de descartar contaminaciones de la muestra durante el proceso de extracción.

El ADN extraído se analizó en un gel de agarosa al 0.8%, cargando en cada pocillo un volumen de 2 μ l de solución de carga (azul de bromo fenol (0.05% p/v), sucrosa (40% p/v), EDTA (0.1 M, pH 8.0), y SDS (0.5% p/v) más 2 μ l de muestra. Se aplicó una corriente eléctrica de 100 V y posteriormente se tiñó el gel con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL), y se visualizó bajo luz ultravioleta en un transiluminador UV (UVP[®]).

6.3 Diseño de iniciadores

Los iniciadores 5' o complementario y 3' o reversa se diseñaron mediante el programa Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) poniendo como base la secuencia del gen *omp31* reportada por Vizcaíno *et al.* (1996) en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF366069.1>). Posteriormente, se revisó el marco de lectura abierto, por sus siglas en inglés Open Reading Frame (ORF), y se procedió a realizar un PCR virtual mediante el programa Amplify 2.0 para verificar el producto a obtener. Analizados los datos anteriores, se procedió a mandar sintetizar los dos iniciadores (Alpha DNA).

6.4 Transformación bacteriana

6.4.1 Reactivación de células calcio competentes para transformación.

Se reactivaron las cepas DH5 α y TOP10 de *E. coli* calcio competentes realizando el siguiente procedimiento por separado para ambas cepas: Se pre-enfrió todo el material a utilizar en un refrigerador a 4°C, excepto los caldos de incubación que se mantuvieron a 37°C. Se tomó una colonia de la cepa y se incubó en 4 mL de caldo LB sin ampicilina a 37°C toda la noche en agitación (260 rpm, OD₅₅₀=1.0-2.0). Se tomaron 200 μ L del cultivo y se inocularon en 50 mL de caldo LB sin ampicilina, se incubó a 37°C en agitación (260 rpm) hasta

alcanzar una $OD_{550} \approx 0.6$, la cual se midió en un espectrofotómetro modelo Genova (Jenway®). Una vez que el cultivo alcanzó la densidad óptica deseada, se distribuyeron 1.5 mL del cultivo en tubos Eppendorf® de 2 mL estériles. Se incubaron en hielo durante 10 min y se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se dejaron invertidos sobre un papel secante durante un minuto para que se eliminen los restos de medio. Se agregó a cada tubo 700 µL de solución MgCl-CaCl₂ (80 mM; 20 mM, respectivamente) pre enfriado y se incubaron durante 10 min en hielo. Pasado este tiempo, se centrifugaron por 10 min a 5000 rpm. Se retiró el sobrenadante de cada tubo y se dejaron invertidos durante 1-min sobre papel secante. La pastilla obtenida se resuspendió con 70 µL de solución CaCl₂, 0.1 M y se incubó a 4°C durante 18 h. Después de esto, a cada tubo se le agregó 30 µL de glicerol estéril, se agitaron invirtiendo el tubo dos o tres veces y posteriormente los tubos se congelaron a -70°C hasta su uso (Sambrook y Russell, 2001).

6.4.2 Clonación de productos de PCR

6.4.2.1 Obtención del inserto para clonación

Se realizaron reacciones de PCR en volúmenes de 25 µL (Tabla 1) según los parámetros de estandarización realizados por Tamez-Vielma en 2010 (Tabla 2) usando el termociclador Touchgene Gradient (Techne®). Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5%, en amortiguador TBE 1X (45mM Tris-borato; 1mM EDTA) cargando en cada pocillo un volumen de 2 µL de solución de carga (azul de bromofenol (0.05% p/v), sucrosa (40% p/v), EDTA (0.1 M, pH 8.0), y SDS (0.5% p/v) más 2 µL de muestra. Se utilizó una cámara de electroforesis Sub System 70 (Labnet®) aplicando una corriente eléctrica de 100 V constantes durante 40 min. Posteriormente se tiñó el gel con bromuro de etidio (0.5 µg/mL), y se visualizó bajo luz ultravioleta en un transiluminador UV (UVP®).

6.4.2.2 Reacción de ligación

Para clonar el gen *omp31* de *B. ovis* se utilizó el plásmido pBAD/TOPO[®] Thiofusion[™] Expression Kit (Invitrogen[™]), el cual posee 6 histidinas en el extremo C-terminal, un gen de resistencia a ampicilina y el promotor *araBAD* (figura 3).

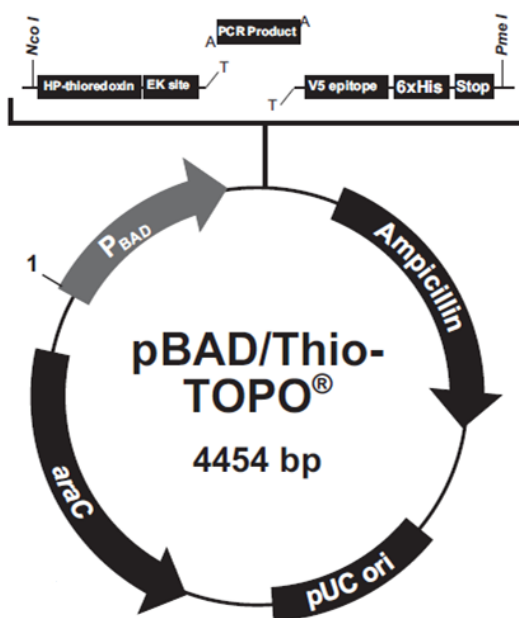


Figura 3. Mapa que muestra las características del vector pBAD/ThioTOPO[®].

La reacción de ligación se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante. Se mezclaron suavemente los reactivos (descritos en la tabla 3), y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la transformación de la cepa DH5 α .

6.4.3 Transformación de las células calcio competentes DH5 α .

Para obtener las células transformadas se procedió de la siguiente manera: Se añadieron 2 μ L de la reacción de ligación a cada vial de células DH5 α calcio competentes. Se mezclaron por inversión sin pipeteo ni vórtex. Se incubaron en hielo durante 30 min a 42°C en baño María sin agitación durante 30 seg. Pasado este tiempo se colocaron los tubos de nuevo en hielo y se les añadió 250 μ L de medio SOC a temperatura ambiente. Se taparon los tubos y se agitaron horizontalmente a 200 rpm a 37°C.

Se sembraron 150 μ L de cada transformación realizada en placas selectivas de agar LB adicionado con 100 μ g/mL de ampicilina (Pierce®). Se incubaron durante toda la noche a 37°C.

6.4.4 Selección y análisis de clonas DH5 α positivas

6.4.4.1 Identificación de las bacterias recombinantes mediante PCR

Para seleccionar colonias recombinantes positivas obtenidas se realizaron análisis de PCR simple con los iniciadores diseñados, en volúmenes de 25 μ L según los parámetros de estandarización realizados por Tamez-Vielma (2010) usando el termociclador Touchgene Gradient (Techne®). Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5%, en amortiguador TBE 1X (45mM Tris-borato; 1-mM EDTA) cargando en cada pocillo un volumen de 2 μ L de solución de carga (azul de bromofenol (0.05% p/v), sucrosa (40% p/v), EDTA (0.1 M, pH 8.0), y SDS (0.5% p/v) más 2 μ L de muestra. Se utilizó una cámara de electroforesis Sub System 70 (Labnet®) aplicando una corriente eléctrica de 100 V constantes durante 40 min. Posteriormente se tiñó el gel con bromuro de etidio (0.5 μ g/mL), y se visualizó bajo luz ultravioleta en un transiluminador UV (UVP®).

6.4.4.2 Verificación de la clona transformada

Debido a que el producto de PCR se puede clonar en el inserto en cualquier dirección, se analizó la orientación en las colonias positivas sometiendo el ADN plasmídico a análisis de restricción y por secuenciación.

6.4.4.2.1 Purificación del ADN plasmídico mediante el método de extracción Wizard[®] Plus SV Minipreps (Promega[®])

Las colonias que fueron positivas a PCR, se incubaron en 5 mL de caldo LB con 100 µg/mL de ampicilina a 37°C durante toda la noche en agitación ($OD_{600} \sim 1.0-2.0$). Se separaron alícuotas de 250 µl en tubos criogénicos adicionados con 75 µL de glicerol al 40% estéril, se etiquetaron y se almacenaron a -70°C. Se reservaron 3 mL de cada cultivo para proceder a la purificación del ADN plasmídico utilizando el kit comercial de extracción Wizard[®] Plus SV Minipreps (Promega[®]) según las especificaciones del fabricante. Se verificó el producto obtenido de la purificación en gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X utilizando la cámara Sub System 70 (Labnet[®]) a 100 V durante 40 min. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó en el transiluminador ultravioleta.

6.4.4.2.2 Digestión enzimática

Se realizó una digestión virtual de la secuencia completa del vector de clonación conteniendo el inserto posicionado de la manera correcta y otra con el vector conteniendo el inserto al revés mediante el programa NEBcutter V.2 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Se escogió la enzima *RsaI*

para realizar los cortes y se observaron los patrones de digestión esperados para cada caso en un gel de agarosa virtual.

Se tomaron los ADN plasmídicos purificados de las colonias positivas a PCR y se realizó la digestión enzimática con la enzima *RsaI*. Posteriormente se analizaron en un gel de agarosa al 1.5 % en buffer TBE y teñido con bromuro de etidio y se compararon con los patrones obtenidos virtualmente. De las colonias que mostraron un patrón similar al esperado para el inserto alineado correctamente se seleccionó una para someterla a secuenciación.

6.4.4.2.3 Secuenciación

El ADN plasmídico de la clona positiva se mandó a secuenciación al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, ubicado en San Luis Potosí, México.

6.4.5 Subclonación en células TOP10.

El ADN plasmídico secuenciado se utilizó para transformar la cepa TOP10 de *E. coli*, la cual se caracteriza por ser una cepa de expresión bastante eficiente. La transformación se llevó a cabo agregando a cada vial de células calciocompetentes TOP10 2 μ l del plásmido clonado. Se mezclaron suavemente sin pipeteo ni vórtex. Se incubaron en hielo durante 30 min y luego a 42°C en baño María sin agitación durante 30 seg. Pasado este tiempo se colocaron los tubos en hielo y se les añadió 250 μ L de medio SOC a temperatura ambiente. Se taparon los tubos y se agitaron horizontalmente a 200 rpm a 37°C durante 1-h.

Se sembraron 150 μ L de cada transformación realizada en placas selectivas de agar LB adicionado con 100 μ g/mL de ampicilina. Se incubaron durante toda la noche a 37°C. Las colonias obtenidas se sometieron a PCR para seleccionar las positivas a transformación.

6.5 Expresión de la proteína recombinante.

6.5.1 Cinética de crecimiento

Para conocer la concentración de arabinosa más adecuada y el tiempo de inducción necesario para obtener la cantidad óptima de proteína recombinante, se realizó una cinética de crecimiento a diferentes concentraciones de arabinosa (Sigma®).

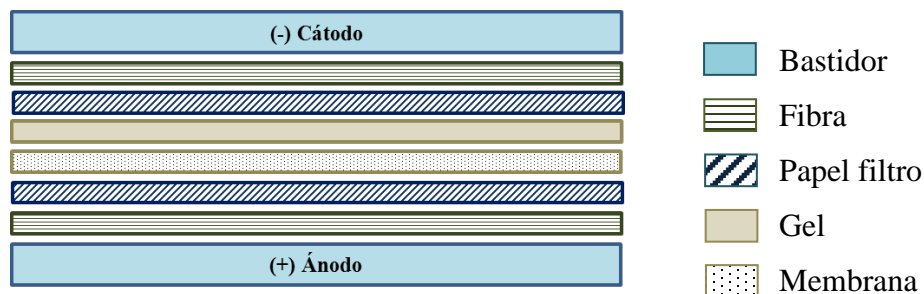
Se tomó una colonia TOP10 recombinante y se incubó en medio selectivo LB con 50 μ g/mL de ampicilina a 37°C en agitación (260 rpm) durante 24 h, hasta obtener una $OD_{600}=1.0-2.0$. Se etiquetaron tubos Falcon® con los números del 1 al 5. Se les adicionaron 10 mL de caldo LB conteniendo 50 μ g/mL de ampicilina. A cada tubo se le inoculó 100 μ L del cultivo y se incubaron a 37°C con agitación vigorosa hasta alcanzar una $OD_{600}\sim 0.5$. En este punto, se colectó una muestra de 1-mL de cada tubo y se colocó por separado en tubos Eppendorf® previamente etiquetados como tiempo cero. Las células se centrifugaron a máxima velocidad en una microcentrífuga Minispin (Eppendorf®) durante 30 seg. La pastilla obtenida se congeló a -70°C hasta su uso. Mientras las células estaban en incubación, se prepararon cuatro soluciones seriadas de arabinosa (Sigma®) con agua estéril y en condiciones asépticas (20%, 2%, 0.2%, 0.02% y 0.002%). Se añadió la cantidad descrita de arabinosa a cada tubo según la descripción de la Tabla 4. Se incubaron a 37°C en agitación vigorosa durante 4 hrs, tomando 1-mL de muestra de cada tubo en intervalos de 1-h. Estas muestras recibieron el mismo procedimiento descrito para las tomadas en tiempo cero. Como control negativo se utilizó una colonia TOP10 no transformada y se sometió al mismo procedimiento.

6.5.2 Análisis de la cinética de crecimiento mediante geles de poliacrilamida y *Western blot*.

Cada una de las muestras obtenidas durante la cinética se resuspendieron en 20 μL de buffer de carga 1X (anexo). Se colocaron en un Thermomixer Compact (Eppendorf®) a una temperatura de 95°C y se centrifugaron a velocidad máxima por 10 seg. Se tomaron alícuotas de 10 μL de cada una de las muestras y se fraccionaron en un gel de poliacrilamida al 15% (Sambrook y Russell, 2001) aplicando 100 V constantes durante 120 min. Un pocillo de cada gel se cargó con 5 μL de marcador de proteínas Kaleidoscope Prestained Standards (Biorad®). Se obtuvieron dos geles de poliacrilamida con las diferentes muestras de la cinética.

Para detectar la presencia de la proteína de interés, uno de los geles obtenidos se sumergió en tinción de Coomassie durante 4 h, posteriormente se enjuagó con agua destilada y se introdujo en solución desteñidora durante 24 h para obtener la mayor visibilidad de las bandas. El otro gel se utilizó para realizar una transferencia de proteínas mediante el método *semi-dry*.

Para la identificación de la proteína recombinante mediante *Western blot*, primero se realizó la transferencia del gel de poliacrilamida restante utilizando un bastidor modelo EC140 (Thermo®) y membrana Immobilon®-P^{SQ} (Millipore®) acomodando sus componentes de acuerdo a la siguiente figura:



Una vez acomodado el “sándwich” se cerró el bastidor, se colocó en la cámara de electroforesis EC 120 (Mini- Vertical System, Thermo®) y se llenó con 100 mL de buffer de transferencia 1X pre enfriado (anexo). Se le aplicó un tiempo de transferencia de 2 h a 25 V a temperatura ambiente. La membrana transferida se sometió a la técnica de *Western blot* (ver apéndices) utilizando anticuerpo anti histidinas como primario y anti-IgG de ratón conjugado con HRP como secundario.

6.5.3 Escalado de la expresión de la proteína recombinante.

Una vez confirmada la expresión de la proteína recombinante mediante *Western blot* y analizada la concentración de arabinosa y el tiempo adecuado de inducción se procedió a obtenerla en mayor cantidad. Se tomó una colonia recombinante y se incubó en 10 mL de caldo LB adicionado con 50 µg/mL de ampicilina durante 24 h hasta alcanzar una $DO_{600}=1.0-2.0$. Se inocularon 10 mL del cultivo a 250 mL de caldo LB (50 µg/mL de ampicilina) y se incubaron a 37°C en agitación vigorosa hasta una $DO_{600}\sim 0.5$. Una vez que alcanzó este punto, se agregó la arabinosa a una concentración final de 0.02%, según los resultados mostrados por la cinética de crecimiento realizada anteriormente. Se incubó a 37°C, en agitación vigorosa durante 4 h. Al término de este tiempo, se colectaron las células con ayuda de una centrífuga Hettich® (9000 rpm/4°C/10 min). La pastilla obtenida se guardó en congelación (-20°C) hasta su uso.

Para verificar la expresión de la proteína se tomaron muestras de 1-mL en tubos Eppendorf® desde el tiempo cero hasta cumplidas las cuatro horas de inducción. Las células se colectaron por centrifugación a velocidad máxima en una mini centrífuga durante 10 seg, se retiraron los sobrenadantes y las células colectadas se guardaron en congelación (-20°C) hasta su uso. Estas muestras fueron analizadas mediante un gel de poliacrilamida al 15%, teñido con Coomassie.

6.6 Purificación de la proteína recombinante mediante columna de afinidad.

El vector pBAD/TOPO® Thiofusion™ (Invitrogen™) agrega una cola de 6 histidinas a la proteína recombinante, la cual por su atracción al níquel puede ser purificada fácilmente en matrices de cromatografía de afinidad, por lo tanto la purificación de la misma se llevó a cabo mediante la utilización del kit de purificación QIAexpress® Ni- NTA Fast Start (Qiagen®), según las especificaciones del fabricante.

6.6.1 Identificación de la expresión de la proteína recombinante purificada.

Durante el proceso de purificación se tomaron muestras en cada uno de los pasos y para confirmar la correcta purificación de la proteína recombinante se analizaron en un gel de poliacrilamida al 15% teñido con azul de Coomassie y mediante *Western blot*.

6.7 Análisis inmunoenzimático de la proteína recombinante.

Para determinar la capacidad de la proteína Omp31 de actuar como antígeno para detección de anticuerpos contra *Brucella ovis*, se realizó un análisis inmunoenzimático (ELISAi) con sueros negativos y positivos provenientes de rumiantes de diferente procedencia.

6.7.1 Biológicos

6.7.1.1 Suero ovino control positivo y negativo

Debido a la poca disponibilidad de sueros ovinos positivos a aislamiento de brucelosis ovina, se utilizaron como sueros control los estándares tanto negativo como positivo provenientes del kit comercial para la detección de anticuerpos de *Brucella ovis* CHEKIT[®] (IDEXX[®]).

6.7.1.2 Sueros ovinos de referencia NOM.

Para realizar el análisis se utilizaron sueros ovinos provenientes del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal (CENID-Microbiología) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), y clasificados como positivos y negativos mediante la prueba de IDG según el criterio de la NOM.

6.7.1.3 Sueros caprinos y bovinos

Se utilizaron 10 sueros positivos y 10 negativos de cada especie animal, remitidos al LCRM-CFPNL para detección de brucelosis según la NOM.

6.7.2 Procedimiento técnico de ELISAI

Para el desarrollo de la técnica ELISA indirecta, se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano recubierto con 10 µg de la proteína recombinante resuspendida en 100 µL de solución amortiguadora de carbonatos (pH 8.0). Se realizaron diluciones 1:200 de los sueros a analizar en solución amortiguadora de carbonatos (pH 8.0) y previo lavado de la placa tres veces con la misma solución se cargó con 100 µL de suero diluido en cada pocillo. Se

incubó durante 1-h en cámara húmeda a 37°C; pasado este tiempo se lavaron los pocillos tres veces con solución amortiguadora de carbonatos (pH 8.0) y cada pocillo se cargó con 100 µL de conjugado IgG anti-rumiante (IDEXX®). Se incubó durante 1-h a 37°C en cámara húmeda y se lavaron tres veces con solución amortiguadora de carbonatos (pH 8.0). Se le agregó a cada pocillo 100 µL de sustrato TMB y se incubó 15 min a temperatura ambiente en condiciones de obscuridad. Al completar este tiempo se añadieron 100 µL de solución de frenado para detener la reacción y la placa se leyó en un lector de microplacas Beckman Coulter 880 a 405 nm.

6. RESULTADOS

6.1. Técnica de extracción de ADN por el método de kit de extracción PureLink Genomic DNA Minikit (Invitrogen®).

Mediante el kit PureLink Genomic DNA Minikit (Invitrogen®), según las especificaciones del fabricante, se extrajo el ADN genómico a partir de la cepa Reo 198 de *Brucella ovis*, el cual se utilizó como molde para obtener el inserto para la clonación. El ADN se visualizó en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio observando una banda bien definida en el carril donde se colocó la muestra. El carril del control negativo no presentó ninguna banda, lo que demuestra que el procedimiento se realizó de manera correcta y sin contaminaciones (Figura 4).

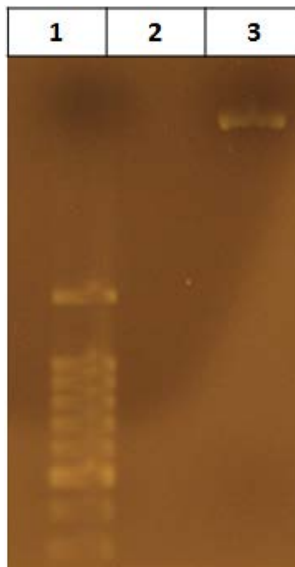


Figura 4. ADN genómico de *Brucella ovis*. De izquierda a derecha: carril 1, marcador; carril 2, control negativo; carril 3, ADN. Gel de agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio.

6.2 Diseño de iniciadores en la secuencia del gen *omp31* de *B. ovis*

El diseño de los iniciadores se realizó a partir de la secuencia del gen *omp31* reportada por Vizcaíno *et al.* (2001) en el National Center of Biotechnology (NCBI). Los iniciadores fueron: 5'-TCCGTAATTTTGGCGTCCAT-3' y 5'-TAGTTCAGACCGACGCGAACA-3', nombrándose como LCR04f (20 pares de bases) y LCR04r (21 pares de bases), respectivamente. La revisión del marco de lectura se puede observar en la figura 5. El análisis de PCR virtual realizado con la secuencia del gen *omp31* y los iniciadores resultó en un fragmento de 708 pares de bases.

```
ATG AAG TCCGTAATTTTGGCGTCCAT CGCCGCTATGTTCCGCACGTCCGCTATGGCTGC
CGACGTGGTTGTTTCTGAACCTTCCGCCCTACTGCTGCTCCTGTTGACACCTTCTCGT
GGACCGGCGGCTATATCGGTATCAACGCCGGTTACGCAGGCGGCAAGTTCAAGCATCCA
TTTTCTAGCTTTGACAAGGAAGACGGCGAACATGTTTCCGGTTCGCCCAGTAACAGC
TGGCGGCTTCGTCGGTGGTGTTCAGGCCGGTTACA ACTGGCAGCTCGACAACGGCGTCG
TGCTCGGCGCGGAAACCGACTTCCAGGGATTGAGCGTTACGGGTTCGATTTAGCCGGT
GCCAGCAGTCTCGAAGGCAACGCTGAAACCAAGGTCGAGTGGTTCGGCACAGTTCGTGC
CCGTCTTGGCTACACGGCTACCGAACGCCTCATGGTTTATGGTACCGGCGGTCTGGCCT
ATGGTAAGGTCAAGTCTGCGTTCAACCTGGGTGATGATGCACCTGCCCTGCACACGTGG
TCCGACAAGACGAAAGCTGGCTGGACCCTCGGCGCTGGTGTGCTGAATATGCCATCAACAA
CAACTGGACGCTCAAGTCGGAATACCTCTACACCGACCTCGGCAAGCGCAACCTCGTCG
ACGTTGACAATAGCTTCTTGAGAGCAAGGTCAATTTCCACAC TGTTCGCGTCCGGTCTG
AACTACAAGTTC TAA
```

Figura 5. Secuencia de 708 pares de bases del gen *omp31* obtenida de la base de datos del NCBI en donde se indica: en amarillo, codón de inicio; en rojo, los iniciadores LCR04f y LCR04r que flanquean el fragmento de interés (gris); verde, codón de término.

6.3 Obtención del inserto para clonación

El vector de clonación pBAD/Thio-TOPO® vector (Invitrogen®) es un vector activado que posee un residuo de timidina (T) libre en cada uno de sus extremos 3', esto permite ligar insertos de PCR que contienen en sus extremos 3' un residuo de adenina (A) libre añadido por la *Taq*polimerasa.

Con el ADN genómico de la cepa de *B. ovis* de referencia se realizaron reacciones de PCR simples y los productos se observaron en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio. Se observaron bajo luz ultravioleta en un transiluminador UV (UVP®), logrando obtener bandas de alrededor de 708 pares de bases (pb) acordes con lo esperado (Figura 6). El producto obtenido se utilizó para realizar las reacciones de ligación (ver anexo).

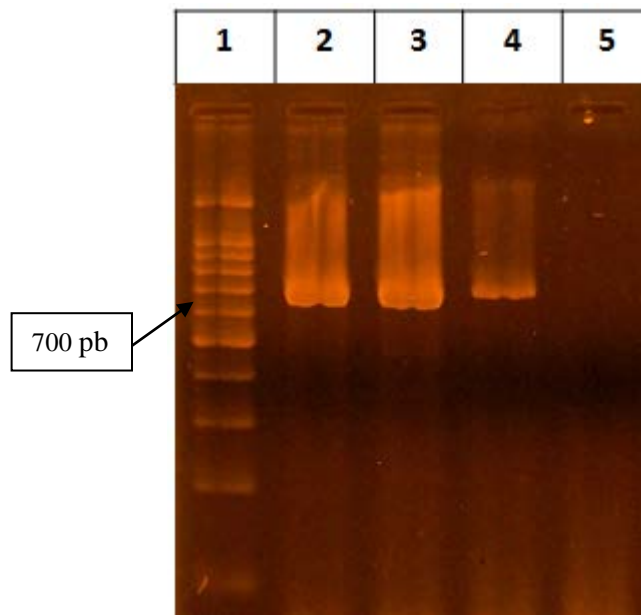


Figura 6. Productos de PCR de *B. ovis*. Carril 1, marcador; carril 2, muestra 1; carril 3, muestra 2; carril 4, muestra 3; carril 5 control negativo.

6.4 Transformación de células, calcio competentes, DH5- α de *E. coli*.

Para obtener las células transformadas se añadieron 2 μ L de la reacción de ligación a cada vial de células DH5- α calcio-competentes y se sembraron 150 μ L de cada transformación realizada en placas selectivas de agar LB adicionada con ampicilina. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C. De este proceso se obtuvieron 10 colonias, mismas que se sometieron a PCR simple con los iniciadores LCR04f y LCR04r para seleccionar las positivas a transformación. Del total de las colonias transformadas, sólo cuatro resultaron positivas a PCR (Figura 7).

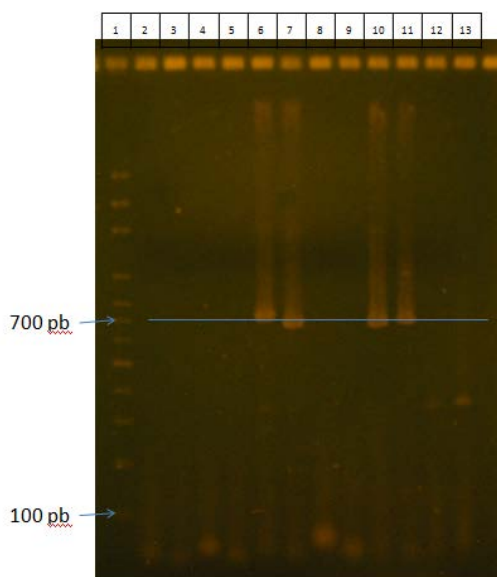


Figura 7. Gel de agarosa al 1.5 % donde se muestran las bandas a la altura de ~700 pb correspondientes a las colonias DH5- α transformadas en los carriles 6, 7, 10, 11; carril 1 marcador; carril 2 colonia DH5- α no transformada (control negativo).

6.5 Verificación de la clona transformada.

6.5.1 Digestión enzimática

Debido a que el producto de PCR se puede clonar en el vector en cualquier dirección, se analizó la orientación del inserto en las cuatro colonias

positivas, sometiendo la secuencia completa del plásmido a una digestión enzimática virtual y posteriormente el ADN plasmídico de las clonas a análisis de restricción utilizando la enzima *RsaI*.

6.5.1.1 Digestión enzimática virtual

Con la digestión enzimática virtual de la secuencia completa del vector de clonación se pudo determinar el número de segmentos y el patrón de bandas que se podrían encontrar en el gel de agarosa al realizar la simulación de la digestión con la enzima de restricción *RsaI* tanto para el caso del inserto alineado de la manera correcta como para el caso del inserto alineado al revés (ver figura 8).

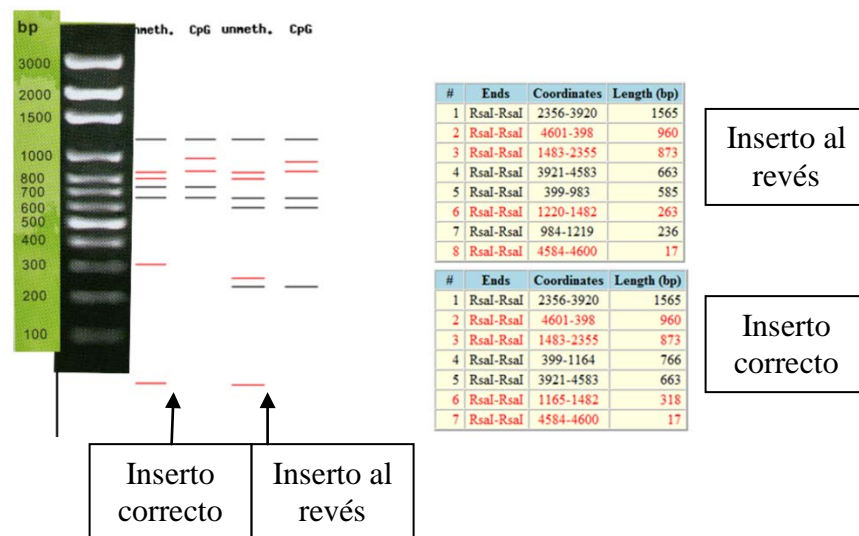


Figura 8. Geles de agarosa al 1.5% virtuales realizados con el programa NEBcutter 2.0. Se observa la cantidad de segmentos así como el tamaño de los mismos, que se espera encontrar en una digestión enzimática con enzima *RsaI* del vector pBAD/TOPO[®] Thiofusion[™] /omp31.

6.5.1.2 Digestión del ADN plasmídico

Una vez obtenidos los patrones de corte esperados, se tomaron los ADN plasmídicos purificados de las colonias positivas a PCR y se realizó la digestión enzimática con la enzima *RsaI*. Posteriormente se analizaron en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y se compararon con los patrones obtenidos virtualmente. De las cuatro colonias analizadas, dos (la colonia 10 y la 11) mostraron un patrón similar al esperado para el inserto alineado correctamente (Figura 9) y se escogió una de ellas para someterla a secuenciación. Ambas colonias se incubaron en caldo LB adicionado con 100 µg/mL de ampicilina y se congelaron con glicerol (40%) a -70 °C para su conservación. Las colonias que se observaron con un patrón diferente al esperado se desecharon.

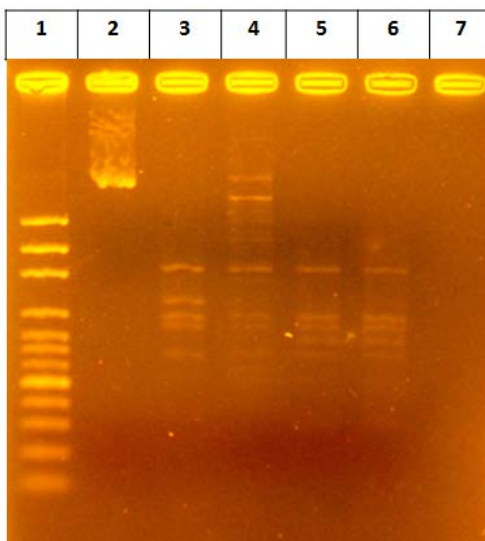


Figura 9. Digestión enzimática del ADN plasmídico proveniente de las colonias transformadas. Los carriles 5 y 6 corresponden a las colonias 10 y 11 y sus patrones son iguales a los esperados en la digestión enzimática en el inserto alineado correctamente. De izquierda a derecha: carril 1, marcador; carril 2 ADN plasmídico sin cortes; carril 3, colonia 6; carril 4, colonia 7; carril 5, colonia 10; carril 6, colonia 11; carril 7, control negativo. Gel de agarosa 1.5%, tinción con bromuro de etidio.

6.5.2 Secuenciación

El ADN plasmídico de la clona positiva No. 10 se mandó a secuenciación al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, ubicado en San Luis Potosí, México. La secuencia reportada (Figura 10) mostró una identidad máxima (Maximum Identity) del 99% con la secuencia de *B. ovis* Reo 198 reportada en el NCBI (Figura 11).

```
GGCTGTACGGTGAAGACGATGACAAGCTCGCCCTTCCGTAATTTTGG
CGTCCATCGCCGCTATGTTTCGCCACGTCCGCTATGGCTGCCGACGTGG
TTGTTTCTGAACCTTCCGCCCTACTGCTGCTCCTGTTGACACCTTCTC
GTGGACCGGCGGCTATATCGGTATCAACGCCGGTTACGCAGGCGGCA
AGTTCAAGCATCCATTTTCTAGCTTTGACAAGGAAGACGGCGAACAT
GTTTCCGGTTCGCCCCGACGTAACAGCTGGCGGCTTCGTCGGTGGTGTT
CAGGCCGGTTACAACCTGGCAGCTCGACAACGGCGTCGTGCTCGGCGC
GGAAACCGACTTCCAGGGATTGAGCGTTACGGGTTTCGATTTCTGCCG
GTGCCAT
```

Figura 10. Secuencia que confirma la correcta clonación del producto de PCR en el vector pBAD/Thio-TOPO® vector (Invitrogen®). Secuenciado en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, México.

```
> gb|AF366069.1|AF366069 Brucella melitensis biovar Ovis strain Reo 198 outer membrane protein Omp31 (omp31) gene, complete cds
Length=723
```

```
Score = 645 bits (349), Expect = 0.0
Identities = 351/352 (99%), Gaps = 0/352 (0%)
Strand=Plus/Plus
```

```
Query 36 TCCGTAATTTTGGCGTCCATCGCCGCTATGTTTCGCCACGTCCGCTATGGCTGCCGACGTG 95
      |||
Sbjct 7 TCCGTAATTTTGGCGTCCATCGCCGCTATGTTTCGCCACGTCCGCTATGGCTGCCGACGTG 66

Query 96 GTTGTTTCTGAACCTTCCGCCCTACTGCTGCTCCTGTTGACACCTTCTCGTGGACCGGC 155
      |||
Sbjct 67 GTTGTTTCTGAACCTTCCGCCCTACTGCTGCTCCTGTTGACACCTTCTCGTGGACCGGC 126

Query 156 GGCTATATCGGTATCAACGCCGGTTACGCAGGCGGCAAGTTCAGCATCCATTTTCTAGC 215
      |||
Sbjct 127 GGCTATATCGGTATCAACGCCGGTTACGCAGGCGGCAAGTTCAGCATCCATTTTCTAGC 186

Query 216 TTTGACAAGGAAGACGGCGAACATGTTTCCGGTTCGCCCGACGTAACAGCTGGCGGCTTC 275
      |||
Sbjct 187 TTTGACAAGGAAGACGGCGAACATGTTTCCGGTTCGCCCGACGTAACAGCTGGCGGCTTC 246

Query 276 GTCGGTGGTGTTCAGGCCGGTTACAACGGCAGCTCGACAACGGCGTCGTGCTCGGCGCG 335
      |||
Sbjct 247 GTCGGTGGTGTTCAGGCCGGTTACAACGGCAGCTCGACAACGGCGTCGTGCTCGGCGCG 306

Query 336 GAAACCGACTTCCAGGGATTGAGCGTTACGGGTTTCGATTTCTGCCGGTGCCA 387
      |||
Sbjct 307 GAAACCGACTTCCAGGGATTGAGCGTTACGGGTTTCGATTTCTGCCGGTGCCA 358
```

Figura 11. Se muestra el alineamiento de la secuencia introducida al BLAST (obtenida de la secuenciación del vector pBAD/Thio-TOPO-*omp31*) con la secuencia del gen *omp31* de *Brucella ovis* cepa Reo 198 reportada por Vizcaíno (2001) en el NCBI.

6.6 Transformación de las células calcio-competentes TOP10 para expresión.

El ADN plasmídico secuenciado se utilizó para transformar la cepa TOP10 de *E. coli*, la cual se caracteriza por ser una cepa de expresión bastante eficiente. Una vez transformada, las células TOP10 se sembraron en placas selectivas de agar LB adicionado con ampicilina. Se incubaron durante toda la noche a 37°C (Figura 12). Las colonias obtenidas se sometieron a PCR para seleccionar las positivas a transformación.



Figura 12. Colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con vector pBAD/TOPO[®] Thiofusion[™] /omp31. Agar LB con 100 µg/mL de ampicilina.

6.7 Cinética de crecimiento

Una vez que las células TOP10 se transformaron con el plásmido clonado y se aislaron las colonias en placa, se tomó una de las mismas para realizar una cinética de crecimiento y así conocer la concentración de arabinosa más adecuada y el tiempo de inducción necesario para obtener la cantidad óptima de proteína Omp31 recombinante. Cada una de las muestras obtenidas durante la cinética se procesó para su análisis mediante gel de poliacrilamida al 15% en donde claramente se distingue el incremento en la intensidad de las bandas a la altura de los ~42 kDa a partir de la hora de inducción e indicando con esto el tiempo en que las bacterias entran en fase logarítmica. Se puede ver también que la disposición de nutrientes esenciales para que la bacteria continuara con su metabolismo se conservó hasta más allá de la hora 4 (Figura 13 y 15). Para confirmar la presencia de la proteína de interés, se realizó un análisis de Western blot de la cinética, observando claramente en la membrana la banda correspondiente a la proteína Omp31 coincidiendo con la banda del marcador de peso molecular de proteínas de ~42 kDa (Figura 14).

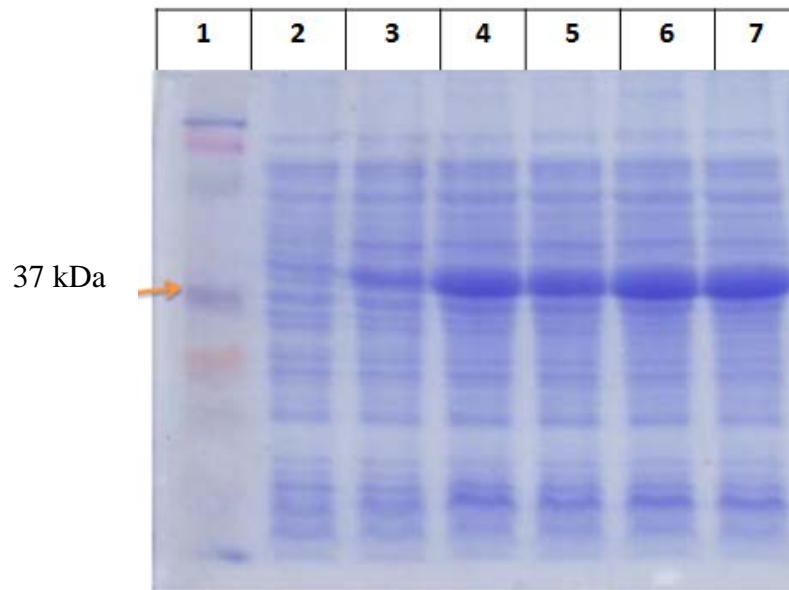


Figura 13. Cinética de crecimiento. De izquierda a derecha: carril 1, marcador; carril 2, tiempo cero; carril 3, 1 hora; carril 4, hora 2; carril 5, hora 3; carril 6, hora 4; carril 7, hora 5. Gel de poliacrilamida al 15%; arabinosa al 0.02%.



Figura 14. Western blot de la cinética de crecimiento en donde se muestra la banda correspondiente a la proteína Omp31 recombinante. De izquierda a derecha: carril 1, marcador; carril 2, tiempo cero; carril 3 al 8, muestras correspondientes a la hora 1 hasta las 6 de inducción; carril 9, control negativo (TOP10 no transformada); carril 10, control anti-histidinas.

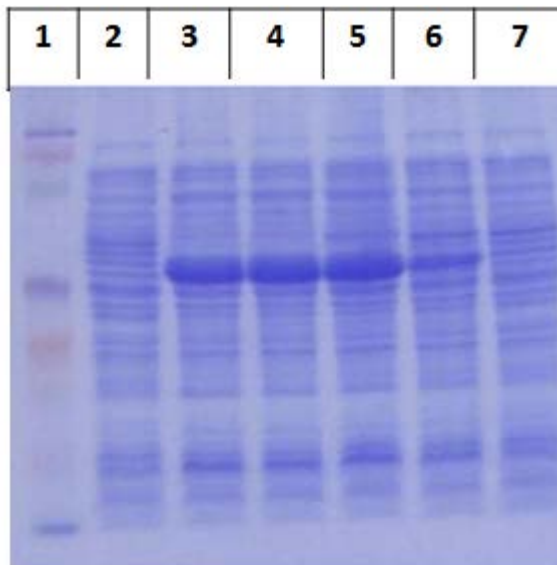


Figura 15. Determinación de la concentración de arabinosa (%). Hora 4 de inducción. De izquierda a derecha: carril 1, marcador; carril 2, 20%; carril 3, 2.0%; carril 4, 0.2%; carril 5, 0.02%; carril 6, 0.002%; carril 7, TOP10 no transformada.

Debido a los resultados anteriores, se seleccionó la concentración de arabinosa de 0.02% y las 4 h de inducción para proseguir con el escalado de la producción de la proteína recombinante y su posterior purificación mediante columna de afinidad.

6.8 Escalado de la inducción y purificación de la proteína mediante columna de afinidad Ni-NTA Fast Start (Qiagen®).

Tomando los datos de la cinética, se indujo la expresión de la proteína en volúmenes de 250 mL de caldo LB adicionado con 50 µg/mL de ampicilina y con una concentración de 0.02% de arabinosa estéril. Las células se cosecharon por centrifugación y se pesaron obteniendo un volumen promedio de 2 g de peso húmedo por cada 250 mL de cultivo. El paquete de células obtenido se sometió al proceso de purificación desnaturizante mediante el kit QIAexpress® Ni-NTA Fast Start (Qiagen®) (Figura 16). Al final de la purificación, se cuantificó la proteína obtenida con

ayuda de un espectrofotómetro NanoDrop 2000c UV-Vis (Thermo Scientific®), resultando en una recuperación de 2 mg de proteína por cada litro de cultivo purificado.

Para detectar la presencia de la proteína de interés se realizó una transferencia de proteínas mediante el método *Western blot semi-dry* (Figura 17).

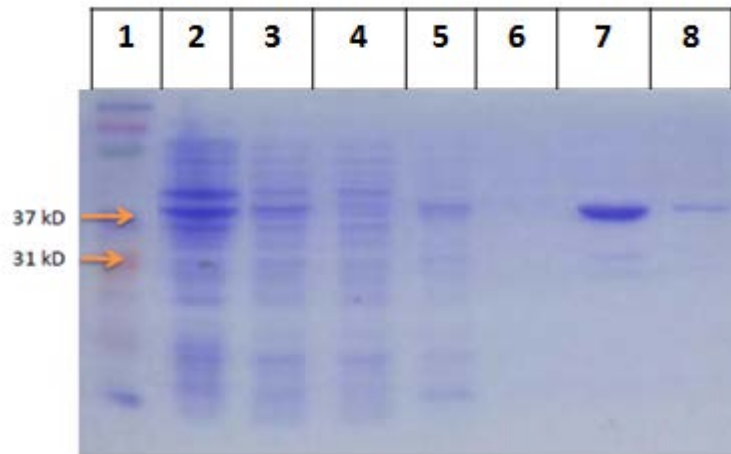


Figura 16. Purificación de la proteína Omp31 recombinante. De izquierda a derecha: carril 1, marcador; carril 2, Lisado; carril 3, sobrenadante; carril 4, sobrenadante pasado por columna; carril 5, lavado 1; carril 6, lavado 2; carril 7, elución 1, carril 8, elución 2. Gel de poliacrilamida al 15%, tinción de Coomassie.

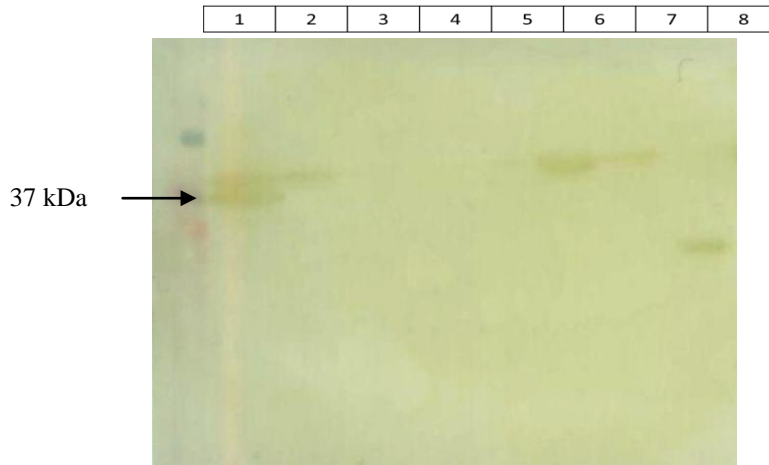


Figura 17. *Western blot* donde se confirma la purificación de la proteína Omp31 recombinante. Se observa una única banda a la altura de ~42 kD en los carriles 6 y 7 correspondientes a la proteína. De izquierda a derecha: carril 1, marcador; carril 2, lisado; carril 3, lisado pasado a través de columna; carril 4, lavado 1; carril 5, lavado 2; carril 6, elución 1; carril 7, elución 2; carril 8, control anti histidinas.

6.9 Análisis inmunoenzimático de la proteína recombinante.

Para determinar si la proteína Omp31 recombinante es capaz de actuar como antígeno en la detección de anticuerpos contra *Brucella ovis*, se realizó un análisis inmunoenzimático de tipo indirecto (ELISAi) con sueros negativos y positivos a brucelosis según la NOM provenientes de rumiantes domésticos (*B. melitensis*, caprinos; *B. abortus*, bovinos; *B. ovis*, ovinos). La cantidad de sueros utilizados, así como las densidad ópticas (DO) corregidas de las diferentes especies analizadas se muestran en la Tabla 5. El análisis de los resultados de las muestras de suero caprino y ovino, mostró reconocimiento de los anticuerpos séricos hacia la proteína Omp31 recombinante, pero no se observó diferencia entre positivos y negativos en ambas especies animales (Figuras 18 y 19). En cambio, las muestras procedentes de bovinos también se mostraron reconocimiento antígeno-anticuerpo pero además, las diferencias entre las DO de los sueros positivos y los negativos fueron marcadamente diferentes, mostrando las mayores lecturas los sueros correspondientes a los casos positivos.

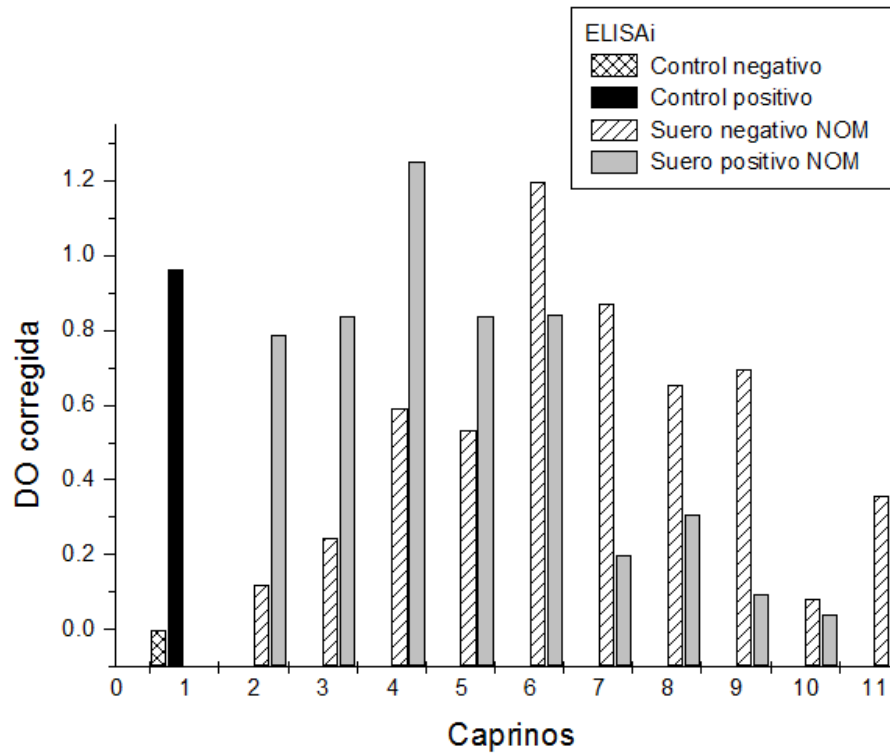


Figura 18. Gráfica donde se muestra la DO corregida de los sueros caprinos de campo positivos y negativos a brucelosis (*B. melitensis*) y los controles positivo y negativo.

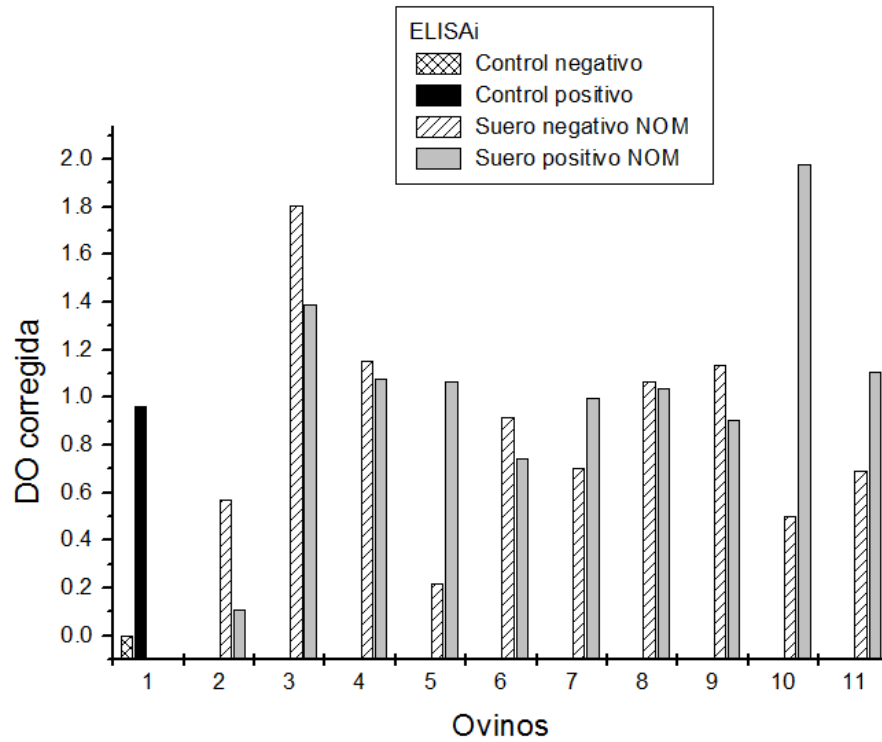


Figura 19. Gráfica donde se muestra la DO corregida de los sueros ovinos de campo positivos y negativos a epididimitis contagiosa del carnero (*B. ovis*) y los controles positivo y negativo.

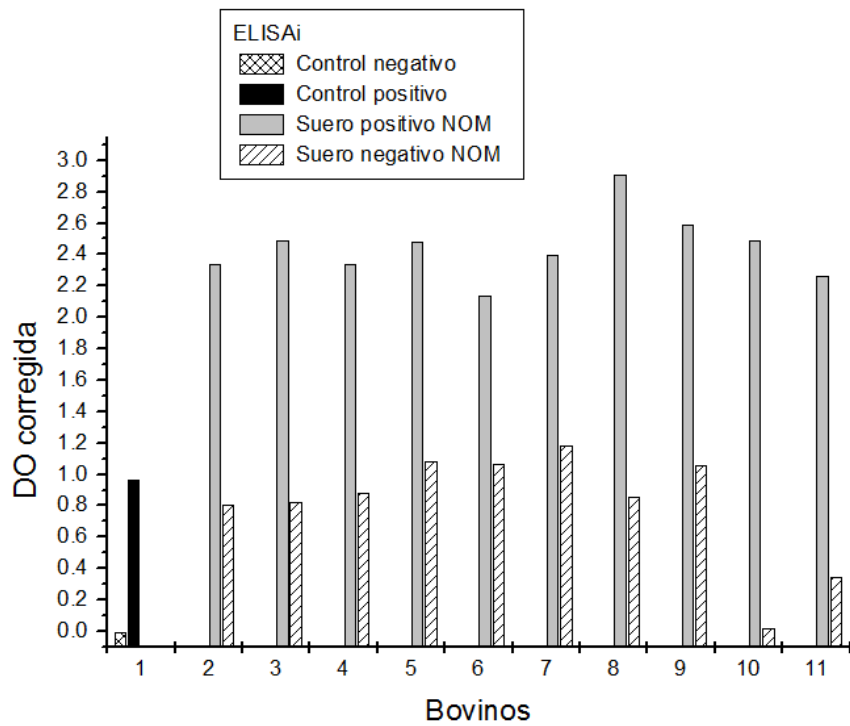


Figura 20. Gráfica donde se muestra la DO corregida de los sueros bovinos de campo positivos y negativos a brucelosis (*B. abortus*) y los controles positivo y negativo.

7. DISCUSIONES

Para el control y erradicación de las enfermedades infecciosas en los animales se necesita contar, con métodos diagnósticos más eficaces que permitan diferenciar con exactitud al animal enfermo del sano y así evitar posibles errores diagnósticos que se reflejarían indudablemente en importantes pérdidas económicas para la explotación. Actualmente, para el diagnóstico de la epididimitis contagiosa del carnero, se utiliza como antígeno el extracto salino caliente (HS) de *Brucella ovis* el cual se ha demostrado que presenta problemas de desempeño en las diferentes pruebas serológicas dirigidas a determinar la presencia de anticuerpos contra tal microorganismo. En el género *Brucella*, se ha descubierto que las proteínas de membrana externa, en especial las pertenecientes al grupo 3 (Omp25/Omp31), son lo suficientemente inmunogénicas para conferir cierta protección contra la enfermedad y se han propuesto como opción para el desarrollo de vacunas de ADN ya que inducen en el sistema inmunológico tanto una respuesta celular como humoral.

En el presente estudio se realizó la clonación y expresión del gen *omp31* de *Brucella ovis* con el fin de obtener la proteína Omp31 recombinante purificada mediante columna de afinidad y determinar su posible utilidad en la detección de anticuerpos contra *Brucella ovis* en sueros ovinos en las diferentes técnicas serológicas como pueden ser ELISA, FPA, IDG.

Para la obtención del inserto a clonar, se diseñaron oligonucleótidos a partir de la secuencia reportada por Vizcaíno *et al.* (2001) en el NCBI y mediante la técnica de PCR simple estandarizada por Tamez-Vielma *et al.* (2010) para su uso con *Brucella*, se logró amplificar un fragmento de 708 pb, mismo que se utilizó para realizar la ligación con el vector pBAD/thio TOPO y la posterior transformación de células de alta eficiencia *E. coli* DH5 α . Con el uso de la tecnología TOPO, se debe considerar que al inserto, por acción de la *Taq*polimerasa, se le adiciona un residuo de adenina (A) en el extremo 3' de cada cadena misma que se unirá en el residuo de timina (T) libre que posee en el

extremo 3' de cada cadena del vector activado. Debido a esto, el inserto se puede posicionar en cualquier dirección produciendo modificaciones en el producto esperado; por lo tanto, es necesario confirmar mediante análisis con enzimas de restricción y/o secuenciación la correcta clonación del producto de PCR en el vector. En este proyecto se realizaron ambas pruebas de verificación. La restricción enzimática del ADN plasmídico de la cepa DH5 α transformada, se realizó con la enzima *RsaI* dando en dos de las colonias analizadas la cantidad y tamaño de fragmentos esperados. Por otro parte, los resultados obtenidos de la secuenciación se analizaron mediante el programa BLAST del NCBI dando la secuencia obtenida un 90% de similitud y un 99% de identidad máxima con la secuencia reportada por Vizcaíno *et al.* (2001) para la proteína de membrana Omp31 de *Brucella ovis*, con lo cual se confirmó el éxito del proceso.

Para expresar la proteína, se requirió subclonar el ADN plasmídico (pBAD/Thio TOPO/*omp31*) de la cepa DH5 α en la cepa TOP10 de *E. coli* la cual está entrenada para producir proteína en mayor cantidad. Una vez transformada, se realizó la cinética de crecimiento para determinar la cantidad de arabinosa y el tiempo óptimos de inducción dando como resultado una concentración de arabinosa ideal de 0.02% y un tiempo de 4 h de incubación a 37°C en agitación constante (260 rpm). Al analizar los resultados en un gel de poliacrilamida al 15% teñido con Coomassie, se observó una banda bastante marcada a la altura de los ~43 kDa. El hecho de obtener una banda de más peso molecular que el esperado para la proteína Omp31, el cual oscila entre 29-32 kDa, se debe a que al momento de ser sintetizada el sistema TOPO agrega a la nueva proteína una secuencia líder (tiorredoxina) de aproximadamente 12 kDa que mejora su eficiencia de traslación y en algunos casos mejora la solubilidad de la nueva proteína. Esta secuencia puede ser removida con ayuda de la enzima enteroquinasa. En el caso de la proteína Omp31 recombinante obtenida en este trabajo, no fue posible realizar la remoción del segmento líder debido a que en las condiciones del proceso, la proteína formaba precipitados insolubles que hacían imposible su manejo y se decidió continuar con los análisis sin realizar el corte. La confirmación de la expresión de la proteína se llevó a cabo mediante análisis de *Western blot* con anticuerpos anti histidinas como primario y anti IgG de ratón conjugado con HRP como secundario en membrana de PVDF.

Considerando que ya se conocían las mejores condiciones para expresar la proteína OMP31 recombinante se continuó con la siguiente fase del proyecto que consistió en escalar la producción de la proteína a 250 mL de caldo LB adicionado con 100 µg/mL de ampicilina para obtener el paquete celular adecuado para su uso en columnas de afinidad de 1-cm de largo (Ni-NTA Fast Start, Qiagen®). Se realizó la purificación de la proteína tanto en condiciones nativas como en condiciones desnaturizantes para determinar si la proteína se encontraba en cuerpos de inclusión. Los resultados de esas purificaciones se analizaron mediante geles de poliacrilamida al 15% teñidos con azul de Coomassie mostrando una banda muy marcada en el carril correspondiente al lisado completo bajo condiciones nativas pero no en los demás carriles (no mostrado); para el caso de las condiciones desnaturizantes, se observó la banda esperada tanto en el carril del lisado completo como en los carriles correspondientes a las eluciones confirmando de esta manera que la proteína se encontraba inmersa en cuerpos de inclusión y que las condiciones óptimas de purificación eran las desnaturizantes.

Para determinar la capacidad de unión antígeno-anticuerpo de la Omp31 recombinante, y por lo tanto, su posible uso como marcador en pruebas diagnósticas serológicas, la proteína recombinante se renaturalizó mediante diálisis con agua destilada estéril en refrigeración a 4°C y se liofilizó. Una vez obtenida la proteína recombinante purificada se realizaron inmunoensayos enzimáticos de tipo indirecto (ELISAI) utilizando sueros de rumiantes catalogados como positivos y negativos a brucelosis según la NOM-041-ZOO-1995 *Campaña Nacional contra la Brucelosis*. En general, los sueros ovinos y caprinos analizados mediante esta prueba mostraron variada reactividad tanto en los sueros positivos como en los negativos lo que puede explicarse debido a que: *primero*, puede existir un cambio en las propiedades antigénicas de la proteína recombinante sintetizada en el sistema de *E. coli*; *segundo*, la técnica ELISAI utilizada necesita ser estandarizada para la proteína Omp31 recombinante para definir cuál es la cantidad de antígeno y las diluciones óptimas para la ejecución de ese ensayo con sueros de campo; *tercero*, la cantidad de sueros utilizados necesita ser mayor para obtener un panorama más exacto acerca de la especificidad y sensibilidad de la prueba y

así mismo, obtener el punto de corte adecuado para catalogar a los sueros de campo como positivos o negativos.

La existencia de reacción cruzada entre ambas cepas de *Brucella* se puede explicar debido a la homología tan cercana entre las Omp31 de *B. melitensis* y *B. ovis* y concuerda con lo reportado por Caro-Hernandez *et al.* (2007) quien refiere la existencia de una fuerte reacción con Omp31 de *B. ovis* en pruebas ELISAI con anticuerpos monoclonales específicos para Omp31 recombinante de *B. melitensis* a pesar de las diferencias de nueve nucleótidos en los genes *omp31* de ambas cepas encontradas por Vizcaíno *et al.* (2001) quien menciona que tales diferencias modifican las propiedades antigénicas de Omp31 en *B. ovis*. En cambio, los sueros provenientes de bovinos mostraron una marcada reactividad en los sueros positivos a diferencia de los negativos cuya reactividad fue menor, aunque esos resultados son cuestionables debido a lo reportado por Vizcaíno *et al.* (1997), quien menciona que *B. abortus*, principal especie de *Brucella* que afecta a ganado bovino, carece de un fragmento de ADN de aproximadamente 10 kb donde probablemente se encuentra la secuencia del gen *omp31*, entre otros genes, y por lo tanto esta especie de *Brucella* carece de esta proteína de membrana y no debería existir reactividad en los sueros bovinos analizados. Sin embargo, se ha descrito en *B. abortus* una proteína de membrana denominada Omp31b (~31 kDa) la cual tiene cierta similitud con la Omp31 de las otras cepas de *Brucella*. Debido a esto, la secuencia nucleotídica de la proteína Omp31 recombinante de *B. ovis* obtenida se comparó con la secuencia de Omp31b reportada en el BLAST por Kim *et al.* (2011) obteniendo una homología del 77%, porcentaje relativamente alto con el que podría explicarse la reacción cruzada observada en los sueros bovinos.

En general, en este trabajo se logró obtener la proteína Omp31 recombinante de *Brucella ovis* mediante el sistema *E. coli* y se realizaron análisis preliminares de ELISAI que avalan la capacidad de la Omp31 recombinante para inducir una reacción antígeno-anticuerpo en sueros de campo provenientes de rumiantes. Cabe mencionar que debido a las inconsistencias encontradas entre la reactividad de los sueros positivos y negativos de los sueros ovinos y caprinos, es recomendable realizar más estudios dirigidos a

dilucidar las razones de tales resultados y a mejorar las condiciones de desarrollo de la técnica ELISAi.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- 1.- En el presente trabajo se alcanzaron satisfactoriamente los objetivos general y particulares del proyecto y se demostró que con el sistema *E. coli* y el uso de la tecnología TOPO es posible clonar y expresar con éxito el gen *omp31* de *Brucella ovis*.
- 2.- También se logró purificar mediante columnas de afinidad la proteína Omp31 recombinante en cantidad suficiente para llevar a cabo el proyecto, pero es necesario realizar un escalamiento en la producción si existe el interés de obtenerla en mayor cantidad.
- 3.- La proteína recombinante pudo ser usada en pruebas ELISAI para determinar su capacidad de unión antígeno-anticuerpo. Con los resultados obtenidos, se demostró que la proteína Omp31 recombinante produce reactividad con sueros de campo procedentes de diferentes especies de rumiantes y no sólo con sueros ovinos con epididimitis infecciosa del carnero causada por *B. ovis*.
- 4.- Es necesario realizar otros ensayos que involucren mayor cantidad de sueros para determinar la verdadera utilidad de la proteína Omp31 recombinante de *B. ovis* en el diagnóstico de la brucelosis en las diferentes especies de rumiantes domésticos.
5. Se debe explorar de manera más amplia los resultados de las ELISAI realizadas con sueros bovinos, cuyo comportamiento de las densidades ópticas fueron lo más cercano a lo esperado para un antígeno marcador en pruebas ELISAI y para determinar si es posible su validación como antígeno para su uso en esta prueba y en otras como la FPA.
- 6.- Otra área de interés para el uso de esta proteína sería la evaluación de su capacidad inmunogénica con el fin de utilizarla como antígeno de prueba para el desarrollo de vacunas más eficientes que induzcan una mejor protección contra la brucelosis en animales domésticos.

APÉNDICES

DIAGRAMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA

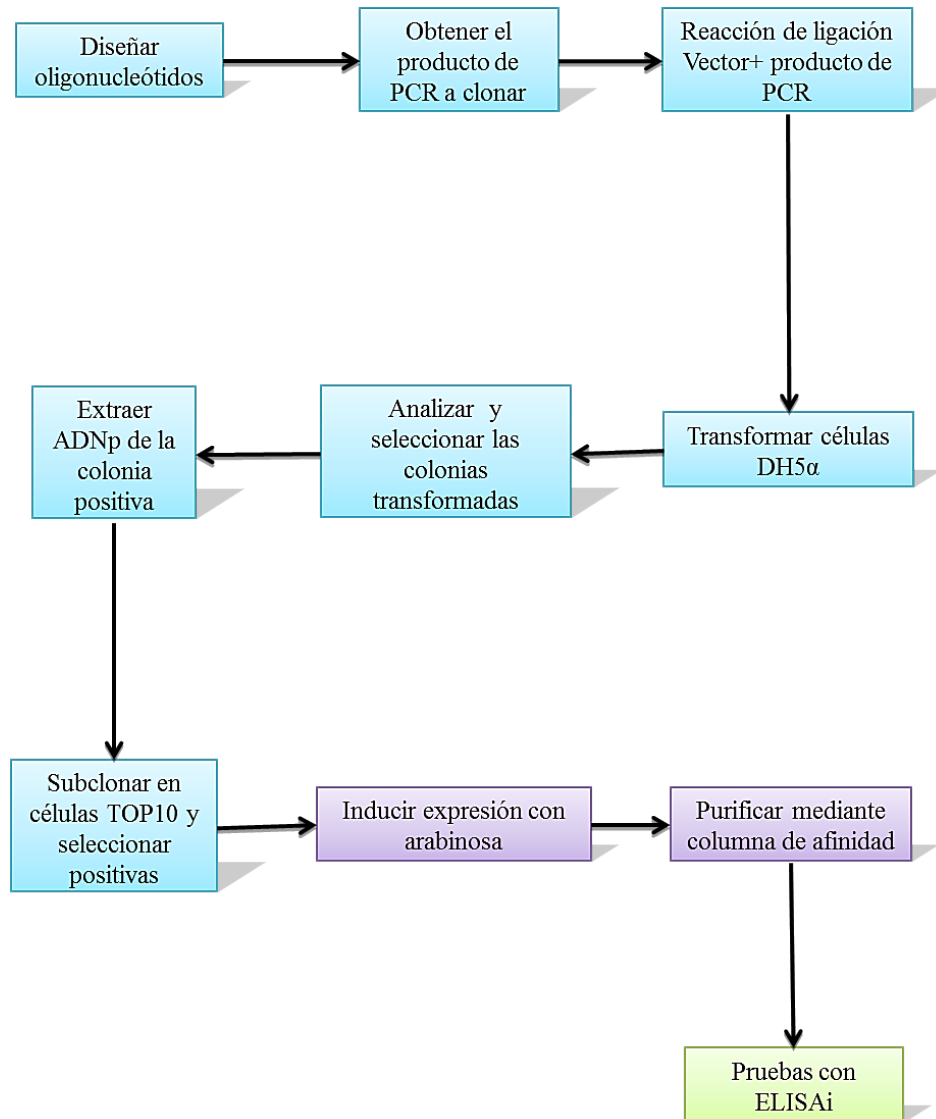


TABLA 1

Tabla 1. Volumen de los reactivos utilizados para la realización del PCR (Tamez-Vielma, 2010).

Reactivos	μL
ADN molde*	2.0
Buffer 10x ⁺	3.0
dNTP's	2.5
LCR04f	1.0
LCR04r	1.0
H ₂ O	15.2
Taq polimerasa	0.3
TOTAL	25

* Dilución 1:10

+ El buffer incluye MgCl₂

TABLA 2

Tabla 2. Condiciones de temperatura y ciclos para la amplificación del gen *omp31* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (Tamez-Vielma, 2010).

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)	CICLOS
Desnaturalización inicial	94	2	1
Desnaturalización	94	1	35
Alineamiento	52	1	
Extensión	72	30 (1 min)	
Extensión final	72	10	1

TABLA 3

Tabla 3. Volumen de los reactivos utilizados en la reacción de ligación.

Reactivo	<i>E.coli</i> calcio competente
Producto de PCR	4 μ L
Solución salina	1 μ L
Vector	1 μ L
Volumen final	6 μ L

TABLA 4

Tabla 4. Volúmenes de arabinosa tomados a partir de la solución inicial al 20% para obtener las diferentes concentraciones en la cinética de crecimiento e inducción.

Tubo	Solución inicial (%)	Volumen (mL)	Concentración final (%)
1	0.002	0.09	0.00002
2	0.02	0.09	0.0002
3	0.2	0.09	0.002
4	2	0.09	0.02
5	20	0.09	0.2

TABLA 5

Tabla 5. Valores DO405 corregidos (DOMuestra- DOnegativo) obtenidos de la prueba ELISA indirecta realizada con la proteína recombinante Omp31 a sueros de rumiantes.

SUERO	Caprino (-)	Caprino (+)	Ovino (-)	Ovino (+)	Bovino (+)	Bovino (-)
1	0.1189	0.7895	0.5723	0.1106	2.3384	0.8120
2	0.2446	0.8376	1.8073	1.3936	2.4878	0.8274
3	0.5905	1.2516	1.1539	1.0782	2.3384	0.8852
4	0.5315	0.8386	0.2199	1.0696	2.4801	1.0887
5	1.1990	0.8423	0.9204	0.7472	2.1356	1.0697
6	0.8711	0.2011	0.7063	1.0012	2.4034	1.1845
7	0.6543	0.3090	1.0705	1.0370	2.9137	0.8552
8	0.6974	0.0964	1.1369	0.9038	2.5925	1.0598
9	0.0832	0.0405	0.5056	1.9788	2.4877	0.0232
10	0.3583	0.6329	0.6946	1.1094	2.2628	0.3488

PROTOCOLO PARA PREPARAR CÉLULAS *E. coli* CALCIO COMPETENTES

Placas con agar LB sin ampicilina

Cultivo de las cepas DH5 α y TOP10

Centrífuga a 4 °C

Tubos Eppendorf® de 1.5 mL

Filtros de PVDF Millex® GV de 0.22 μ m (Millipore®)

Hielo

Solución Mg- CaCl₂ (80 mM; 20 mM respectivamente)

Solución CaCl₂ (0.1 M)

Glicerol estéril

Caldo LB sin ampicilina

Incubadora a 37 °C con agitación.

Criotubos

Pipetas y puntillas

Las soluciones se prepararon de la siguiente manera:

a) MgCl₂-CaCl₂

Se pesaron 0.8132 g de MgCl₂ y 0.147 g de CaCl₂, se aforó a 50 mL con agua destilada y se esterilizó mediante filtro de PVDF Millex® GV de 0.22 μ m (Millipore®).

La solución se guardó en refrigeración a 4 °C.

b) CaCl₂ (1 M)

Se pesaron 7.35 g de CaCl₂, se aforó a 50 mL con agua destilada, se filtró y guardó en refrigeración a 4 °C.

Para preparar la solución de trabajo de CaCl₂ (0.1 M) se tomaron 5 mL de la solución CaCl₂ (1 M), se añadieron 45 mL de agua destilada y se esterilizó mediante

filtro de PVDF Millex® GV de 0.22 µm (Millipore®). Una vez filtrada, se guardó en refrigerador a 4 °C.

Procedimiento:

1. Todo el material, excepto los caldos de incubación se pre enfriaron en refrigerador a 4 °C.
2. Se descongelaron y activaron las células *E. coli* DH5α y TOP10 en 3 mL de caldo LB sin ampicilina incubándolas a 37°C toda la noche en agitación. Posteriormente, se sembraron en agar LB sin ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C. Se tomó una colonia y se incubó en 4 mL de caldo LB sin ampicilina a 37°C, a 260 rpm, durante toda la noche.
3. Se tomaron 200 µl del cultivo y se inoculó en 50 mL de caldo LB sin ampicilina. Se incubó hasta alcanzar una $DO_{550} = 0.6$ (~3 h; a 37 °C; 260 rpm).
4. Una vez alcanzado esta DO, se distribuyeron 1.5 mL del cultivo en tubos Eppendorf® de 1.5 mL. Se incubaron en hielo durante 10 min. Se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se decantó el medio con pipeta y los tubos se dejaron secar invertidos sobre un papel durante 1-min para eliminar los restos de medio.
5. Se les agregó a cada tubo 700 µL de solución MgCl-CaCl₂ pre enfriado dejándolo incubar durante 10 min en hielo. Se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm/ 4°C. Se retiré el sobrenadante por decantación y se dejó secar invertido sobre un papel durante 1-min.
6. El pellet se resuspendió con 700 µL de solución CaCl₂ (0.1 M) se incubó a 4°C durante 12-18 h. Se agregó a cada tubo 300 µL de glicerol estéril y se congelaron a -70°C hasta su uso.

PROTOCOLO PARA LA REALIZACIÓN DEL WESTERN BLOT

Material:

2 fibras

8 hojas de papel filtro del tamaño del gel

Membrana PVDF^{SQ} (Immobilion®)

Gel SDS con las proteínas

1.5 L de amortiguador de transferencia *semy-dry* (25mMTris base; 150 mM de glicina; 10% metanol).

Charolas

Cámara de electroforesis

Metanol absoluto

Guantes

Procedimiento para el acomodo del blot de transferencia:

1. Se pre-enfrió el amortiguador de transferencia en refrigerador a 4°C. El papel filtro y las fibras se humedecieron en refrigeración durante 10 min inmersas en amortiguador de transferencia.
2. Se sacó el gel de poliacrilamida del casete y se enjuagó con agua bidestilada para remover los restos de SDS. Posteriormente se equilibró sumergido en amortiguador de transferencia durante 5 min en refrigeración.
3. Se humedeció la membrana de PVDF en metanol absoluto durante 15 seg a 10 min y posteriormente se equilibró en amortiguador de transferencia durante 10 min en refrigeración.
4. Se acomodaron todos los componentes en el blot. Para evitar la formación de burbujas entre las capas, se hizo pasar una pipeta Pasteur a manera de rodillo de manera firme pero suave. El acomodo de los componentes debe hacerse en menos de 15 min.

5. Se colocó el blot en la cámara de electroforesis llenando el interior del mismo con aproximadamente 100 mL de amortiguador de transferencia hasta el nivel indicado en la cámara.
6. Correr la transferencia a 25-30 V; 70 mA; 2 h; a temperatura ambiente.
7. Una vez que terminó la transferencia se retiró con cuidado la membrana con ayuda de unas pinzas.
8. La membrana se sumergió en agua milliQ y luego en metanol absoluto para proceder al secado o se enjuagó en agua milliQ para realizar la visualización de las proteínas mediante el colorante reversible rojo de Ponceau.

Detección:

Para detectar la proteína de interés, se realizó el procedimiento que se describe a continuación:

1. Si la membrana de PVDF transferida está seca, humedecerla por lo menos 15 seg en metanol absoluto.
2. Lavar la membrana 2 veces durante 10 min con TBS (10 mM Tris-Cl, pH 7.5; 150 mM NaCl) a temperatura ambiente.
3. Incubar la membrana en solución de bloqueo (BSA 3% (p/v) en amortiguador TBS) a temperatura ambiente durante 1-h.
4. Lavar la membrana 2 veces durante 10 min con amortiguador TBS-Tween/Triton (20 mM Tris-Cl, pH7.5; 500 mM NaCl; Tween 20 al 0.05% (v/v); Triton X-100 0.2% (v/v)).
5. Lavar la membrana con TBS por 10 min a temperatura ambiente.
6. Incubar en anticuerpo antihistidinas (diluido 1:2000 en solución bloqueadora de BSA 3%), en agitación a 4°C toda la noche.

7. Lavar 2 veces durante 10 min en amortiguador TBS-Tween/Triton a temperatura ambiente.
8. Lavar por 10 min en TBS a temperatura ambiente.
9. Incubar la membrana durante 1 h a 4°C con el anticuerpo secundario Anti-IgG de ratón diluido 1:20,000 en una solución de TBS con 10% de leche descremada en polvo.
10. Lavar 4 veces durante 10 min en amortiguador TBS-Tween/Triton a temperatura ambiente.
11. Añadir el sustrato apropiado para el anticuerpo secundario usado hasta que la señal sea visible (5-15 min).
12. Enjuagar dos veces la membrana con agua milliQ para cortar la reacción.
13. Secar la membrana a temperatura ambiente sobre un papel filtro.

PROTOCOLO PARA LA REALIZACIÓN DEL ELISAi

1. Se colocaron 5 μg de proteína Omp31 recombinante diluidos en 100 μL de buffer de carbonatos pH 9.0 en cada uno de los pocillos de una placa de poliestireno de 96 pozos con fondo plano.
2. La placa se incubó durante 2 h a temperatura ambiente y posteriormente se congeló a -70°C hasta su uso.
3. La placa se descongeló y se lavó con 200 μL de solución de lavado PBS-Tween 0.05% (PBST) durante 10 min a temperatura ambiente en un agitador de placas. Este procedimiento se repitió cuatro veces.
4. La placa se bloqueó con una solución de TBS con 2% de leche descremada durante 2 h a temperatura ambiente y posteriormente se lavó de la misma manera que el paso anterior.
5. Los sueros y los controles se diluyeron en PBST a una relación de 1:200 y se añadieron 100 μL de estas diluciones a cada pocillo en la placa. Se incubaron a 37°C en cámara húmeda durante 1-h.
6. Se lavaron según las indicaciones del paso 3 y posteriormente se añadió a cada pozo 100 μL del conjugado IgG antirrumiante (HRP). Se incubó una hora a 37°C en cámara húmeda.
7. Se lavó la placa según las indicaciones del paso 3.
8. Se agregó a cada pozo 100 μL de TMB y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min en condiciones de oscuridad.
9. Se agregaron 100 μL de solución de frenado (IDDEX®) y se procedió a leer en un lector de placas Beckman Coulter 880 a 405 nm.

LITERATURA CITADA

- Álvarez JF, Veneros R, González O. 2007. Validación operacional de un ELISA comercial para *Brucella ovis*, Chile. Archivos de Medicina Veterinaria. 39 (3): 275-280.
- Baneyx F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Current Opinion in Biotechnology. 10 (5):411-421.
- Blood DC, Radostits OM. 1992. Medicina Veterinaria. 7ª Edición. McGraw-Hill Interamericana. 1: 749-750.
- Bulgin MS. 1990. Epididymitis in rams and lambs. Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice 6:683-690.
- Cardoso GP, Macedo CG, Azevedo V and Oliveira CS. 2006. *Brucella* spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. Microbial Cell Factories 5:13.
- Caro-Hernandez P, Fernandez LL, De Miguel MJ, Martin-Martin A, Cloeckaert A, Grilló MJ, Vizcaino N. 2007. Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. Infection and Immunity. 75 (8): 4050-4061.
- Cassataro J, Pasquevich K, Bruno L, Wallach JC, Fossati CA, Baldi PC. 2004. Antibody reactivity to Omp31 from *Brucella melitensis* in human and animal infections by smooth and rough *Brucellae*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 11 (1): 111-114.
- Castro HA, González SR, Prat MI. 2005. Brucelosis: una revisión práctica. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 39 (2): 203-16.
- Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Vizcaíno N. 1996. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. FEMS Microbiology Letters. 145 (1):1-8.

Cuéllar J. 2005. Diagnóstico y manejo para lograr un rebaño ovino libre de brucelosis. En: Armendáriz VR, Gutiérrez OE, Hernández AH, Galarza HL, Avalos RR, García HV. Memorias del 3er. Ciclo de Conferencias: La producción ovina en Nuevo León. Nuevo León, México. Mayo 4-6.

Cutler S, Whatmore N, Commander NJ. 2005. Brucellosis-new aspects of an old disease. *Journal of Applied Microbiology*. 98:1270-1281.

Díaz AE, Prado AF, Ontiveros CL, Batalla CD. 1984. Evaluación serológica de anticuerpos posvacunales en cabras adultas, vacunadas con una dosis reducida (5×10^{-4}) de Rev 1 en una zona enzoótica de brucelosis. *Técnica Pecuaria México*. (47); 157-164.

Díaz AE. 1998. Pruebas de diagnóstico en población animal. En: Luna MJE, Suárez GF (eds): Memorias del III Foro Nacional de Brucelosis, Acapulco, Guerrero, México. Julio 20-21.

Godfroid J, Cloekaert A, Liautar JP, Kohler S, Fretin D, Walraven K, Garin-Bastuji B, Letesson JJ. 2005. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Veterinary Research*. 36: 313–326.

Godfroid J. 2002. Brucellosis in wildlife. *Scientific and Technical Review of the OIE*. 21(2) 277-286.

Gomes-Costa G, Azevedo V, Costa S. 2006. *Brucella* spp. noncanonical LPS: Structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories*, 5: 5-13.

Gopaul K, Koylass MS, Smith CJ, Whatmore AM. 2007. Rapid identification of *Brucella* isolates to the species level by real time PCR based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis. *Biomed Central Microbiology*, 8:86.

Kim H, Jeong W, Kim J-S, Baek JH, Vinuselvi P, Lee SK, Kim JW, Kim JY, Jung SC, Her M, An DJ. 2011. National Center of Biotechnology. Disponible en:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/363399402?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=1FPSKCWF01N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/363399402?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=1FPSKCWF01N)

Kittelberger R, Diack DS, Vizcaino N., Zygmunt MS, and Cloeckert A. 1998. Characterization of an immuno-dominant antigen in *Brucella ovis* and evaluation of its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Microbiology*. 59:213–227

Mancera A, Díaz-Aparicio E, Vázquez J, Velázquez F, Suárez GF, Flores-Castro R. 1992. Vacunación de cabras con la cepa Rev 1 de *Brucella melitensis* en diferentes dosis: Evaluación serológica y desafío. *Veterinaria México*; (2):117-123.

Marín CM, Moreno E, Moriyón I, Díaz R, Blasco JM. 1999. Performance of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays, gel immunoprecipitation with native hapten polysaccharide, and standard serological tests in diagnosis of sheep brucellosis. *Clinical and Vaccine Immunology*. 6 (2): 269-272.

Martínez MO, Pérez RR, Díaz AE, Snyderlaar HA, Hernández AL, Suárez GF. 2005; Estudio de la eliminación en la leche de la cepa Rev 1 de *Brucella melitensis* en cabras vacunadas con dosis reducida. *Técnica Pecuaria México*. 43(3):399-404

Martin-Martin, AI, Caro-Hernández P, Sancho P, Tejedor C, Cloeckert A, Fernández-Lago L, Vizcaíno N. 2009. Analysis of the occurrence and distribution of the Omp25/Omp31 family of surface proteins in the six classical *Brucella* species. *Veterinary Microbiology*. 137 (1-2): 74-82.

Meeusen, E, Walker, J, Peters A, Pastoret PP, Jungersen G. 2007. Current status of veterinary vaccines. *Clinical Microbiology Reviews*. 20 (3):489-510.

Méndez NG; Díaz AE; Morales JF; Aguilar RF; Suárez GF .1999. Epididimitis ovina: estudios bacteriológicos y serológicos. *Veterinaria México*. 30:329-336.

Moreno E, Moriyón I. 2006. The Genus *Brucella*. *Procarotes*. 5: 315-456.

Moriyón I, López-Goñi I. 2001. Estructura, genética y fisiología del género *Brucella* en: Díaz E, Hernández, Valero G, Arellano B (eds). Diagnóstico de Brucelosis Animal. SAGARPA, INIFAP Produce: 17-23.

Mutolo JM, Jenny LL, Buskek AR, Fenton WT, Foran DR. 2011. Osteological and molecular identification of brucellosis in ancient Butrint, Albania. *American Journal of Physical Anthropology*. 147 (2): 254-263.

Myers D, Jones LM, Varela-Diaz VM. 1972. Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. *Applied and Environmental Microbiology*. 23 (5): 894-902.

Myers D, Siniuk A. 1970. Preliminary Report on the Development of a Diffusion-in-Gel Method for the Diagnosis of Ram Epididymitis. *Applied Microbiology*. 19: 335-337.

Myers D. 1973. Field Evaluation of the Gel Diffusion Test for the Diagnosis of Ram Epididymitis caused by *Brucella ovis*. *Applied Microbiology*, 26: 855-857.

Nielsen KH, Kelly, L, Gall D, Nicoletti P, Kelly W. 1994. Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 46 (3-4): 285-291.

OIE Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines, 2008. Caprine and ovine brucellosis, OIE, Paris. Disponible en: www.oie.org.

Rojas X. 2003. Diagnóstico de brucelosis ovina. En: Asociación Mexicana de Microbiología. 2º Simposium Internacional de Brucelosis. Tabasco, México. Noviembre 13-14.

SAGARPA. Consumo nacional aparente de carne de ovino. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Estadisticas/Lists/Estadsticas/Attachments/2/Estimación%20del%20Consumo%20Nacional%20Aparente%201990-005%20Carne%20de%20ovino.pdf> (Revisado en Julio de 2012).

Salas TE, Núñez AL, Mejía SP. 2001. Diagnóstico de *Brucella ovis* En: Díaz E, Hernández, Valero G, Arellano B (eds). Diagnóstico de Brucelosis Animal. SAGARPA, INIFAP Produce: 140-144.

Sambrook J, Russel WD. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Third Edition. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Tamez-Vielma LS. 2010. Amplificación, clonación y expresión del gen omp31 de *Brucella ovis* en el sistema *Escherichia coli*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Tsolis RM, Seshadri R, Santos RL, Sangari FJ, Lobo JMG, et al. 2009. Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. Plos One. 4: 1-9.

Vigliocco MA, Paulo PS, Mestre J, Briones GC, Draghi G, Tossi M, Nielsen K. 1997. Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. Veterinary Microbiology. 54 (3-4): 357-368.

Vizcaíno N, Cloeckeaert A, Zygmunt MS, Fernández-Lago L. 2001. Characterization of a *Brucella* species 25-Kilobase DNA fragment deleted from *Brucella abortus* reveals a large gene cluster related to the synthesis of a polysaccharide. Infection and Immunity. 69 (11): 6738-6748.

Vizcaíno N, Kittelberger R, Cloeckeaer, A, Marin, CM, Fernandez-Lago L. 2001 National Center of Biotechnology. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AF3660> 69.1 (Revisado en Agosto de 2012).

Vizcaíno N, Verger JM, Grayon M, Zygmunt MS, Cloeckeaert A. 1997. DNA polymorphism at the omp-31 locus of *Brucella* spp.: Evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers. Microbiology. 143: 2913-2921.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Magda Celina Navarro Soto

Candidata para el Grado de

Maestría en Ciencias con acentuación en Inmunobiología

Tesis: Expresión de la proteína Omp31 recombinante de *Brucella ovis* en el sistema de *Escherichia coli* para su uso como antígeno en el diagnóstico de epididimitis contagiosa del carnero.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en San Nicolás de los Garza, Nuevo León el 30 de Septiembre de 1976, hija de Gabriel Navarro Perales y María Bertila Soto García.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Médico Veterinario Zootecnista en el año 2000.

Experiencia Profesional: Ejercicio independiente en área clínica de pequeñas especies desde 2000.

Miembro del cuerpo docente de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL desde 2011 hasta la fecha, donde ha impartido las cátedras de Inmunología Veterinaria y Anatomía Veterinaria II.

