

Identificación de las proteínas de 35 y 38 kDa específicas de *Brucella ovis*

Identification of *Brucella ovis*-specific proteins of 35 and 38 kDa

Pedro Mejía Sánchez^a, Efrén Díaz Aparicio^a, Enrique Salas Téllez^b, Víctor Rubén Tenorio Gutiérrez^a

RESUMEN

La técnica de inmunotransferencia se ha utilizado como prueba auxiliar para el diagnóstico de *Brucella ovis*, corroborando el diagnóstico con fijación de complemento (FC), inmunodifusión doble en agar (IDG) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA). El extracto salino caliente (HS) de *B. ovis*, es el antígeno que más se ha utilizado en estas pruebas; sin embargo, se ha observado gran similitud entre las bandas proteicas de *B. ovis* y *B. melitensis*, existiendo con esto una reacción cruzada con sueros contra *B. melitensis*, lo que interfiere con el diagnóstico. Por ello, el objetivo fue identificar proteínas específicas de *B. ovis*, y evaluar el patrón de antigenicidad por inmunotransferencia. Se utilizaron cepas de *B. ovis*, *B. melitensis*, *M. haemolytica*, *A. seminis* y *H. somnus*. De las cepas de *B. ovis* Reo 198 y de *B. melitensis* 16M, se obtuvieron las fracciones celulares (membrana externa, interna y citosol). Se cuantificaron proteínas y se realizó la electroforesis PAGE-SDS de las fracciones celulares y de los extractos totales de todos los microorganismos. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, y tratadas con suero hiperinmune contra *B. ovis*. Se identificaron tres bandas de reconocimiento, de 35, 38 y 81 kDa específicas de *B. ovis*, que no aparecieron en *B. melitensis*, ni en los demás microorganismos. Estas proteínas podrían ser utilizadas en el diagnóstico de la epididimitis por *B. ovis*, y debidamente estandarizada, presentar una sensibilidad y especificidad superior a inmunodifusión doble en agar o a fijación de complemento.

PALABRAS CLAVE: *Brucella ovis*, *Brucella melitensis*, Proteínas, Diagnóstico.

ABSTRACT

The immunoblotting technique has been used as an ancillary test in the diagnosis of *Brucella ovis*. The diagnosis is corroborated with complement fixation (CF), double agar gel immunodiffusion (DAGID), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *B. ovis* hot saline (HS) extract has become the most popular antigen for these tests. Nevertheless, high degree of similarity has been observed between the protein bands from *B. ovis* and *B. melitensis*, resulting in serological cross reactions. This interferes with the diagnosis. The objective of this research was, therefore, identifying *B. ovis*-specific proteins and evaluating their antigenicity pattern by immunoblotting. *B. ovis*, *B. melitensis*, *M. haemolytica*, *A. seminis*, and *H. somnus* strains were used. Cellular fractions (outer membrane, inner membrane, and cytosol) from *B. ovis* Reo 198 strain, and *B. melitensis* 16M strain were obtained. Proteins were quantified, and then PAGE-SDS electrophoresis of both cellular fractions and whole extracts from all organisms was performed. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes, and then treated with *B. ovis* hyperimmune serum. Three *B. ovis*-specific recognition bands (35, 38, and 81 kDa) –that were not found in *B. melitensis* or any of the other organisms– were identified. These proteins could be used in the diagnosis of *B. ovis*-caused epididymitis and, once properly standardized; they could have higher sensitivity/specificity for both DAGID and CF.

KEY WORDS: *Brucella ovis*, *Brucella melitensis*, Proteins, Diagnosis.

Brucella melitensis es el agente etiológico de la brucelosis, enfermedad que afecta principalmente al ganado caprino y bovino⁽¹⁾, mientras que *Brucella*

melitensis is the etiology of brucellosis, a disease that affects mainly goats and sheep⁽¹⁾. *Brucella ovis* causes ram contagious epididymitis,

Recibido el 6 de febrero de 2003 y aceptado para su publicación el 12 de noviembre de 2003.

a CENID-Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Km 15.5 carretera México-Toluca, Palo alto, Delegación Cuajimalpa, 05110 Distrito Federal. pmejia_s@yahoo.com. Tel. (01 55) 55700616. Correspondencia al primer autor.

b FES-Cuautitlán, UNAM

ovis es el causante de la epididimitis contagiosa del carnero, una enfermedad infectocontagiosa que afecta de forma natural a la especie ovina, y se caracteriza por una inflamación del epidídimo, con la consecuente disminución de la fertilidad; además, aunque no muy frecuentemente, puede producir abortos tardíos en las hembras y un aumento de la mortalidad perinatal⁽²⁾.

El género *Brucella* se caracteriza por tener una envoltura celular compuesta por una membrana interna, una externa y un espacio periplásmico; la membrana externa contiene distribuidos asimétricamente, fosfolípidos, proteínas y lipopolisacárido (LPS)⁽³⁾.

Mediante análisis por electroforesis y tinción de proteínas, o bien mediante técnicas autorradiográficas o inmunoenzimáticas, se han detectado dentro de *B. ovis* los siguientes antígenos: lipopolisacárido rugoso (LPS-R); proteínas de membrana externa (Omp, grupos 1, 2 y 3 que van desde 25 hasta 94 kilodaltones (kDa)^(4,5) y una proteína de 67 kDa); proteínas periplásmicas y proteínas citoplasmáticas⁽⁶⁾.

El extracto salino caliente (HS), compuesto por LPS-R y proteínas del grupo 3, es el antígeno utilizado en pruebas como inmunodifusión doble en agar (IDG) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA); presenta la ventaja de tener buena sensibilidad y especificidad, las que pueden variar según la prueba serológica que se utilice. Su principal desventaja es que presenta reacciones cruzadas con anticuerpos contra brucelas lisas, lo que interfiere en el diagnóstico⁽⁶⁾, sobre todo en países como México donde la brucelosis causada por brucelas lisas es un problema endémico.

Para mejorar la sensibilidad y sobre todo la especificidad en el diagnóstico de *B. ovis*, es necesario contar con un antígeno proteico con alta especificidad, y que pueda producirse fácilmente. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue identificar proteínas específicas de *B. ovis* y evaluar el patrón de antigenicidad por inmunotransferencia.

an naturally occurring infectious/contagious disease of ovine, characterized by epididymis inflammation resulting in decreased fertility. In addition (yet not very frequent) late abortion, and increased perinatal mortality⁽²⁾ can also occur.

The genus *Brucella* is characterized by its cellular envelope consisting of one inner membrane, one outer membrane, and a periplasmic space. The outer membrane contains unevenly-distributed phospholipids, proteins, and lipopolysaccharide (LPS)⁽³⁾.

Using electrophoresis and protein dyeing, autoradiographic or immunoenzymatic techniques, the following antigens have been identified inside *B. ovis*: a rough lipopolysaccharide (LPS-R), outer membrane proteins (Omp, groups 1, 2 and 3, that vary from 25 to 94 kilodaltons (kDa)^(4,5), and a 67 kDa protein), periplasmic proteins, and cytoplasmic proteins⁽⁶⁾.

The hot saline (HS) extract, consisting of LPS-R and group-3 proteins, is the antigen used in tests such as double agar gel immunodiffusion (DAGID), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). HS has the advantage of exhibiting good sensitivity and good specificity, which can vary depending on the serological test used. The main disadvantage of HS is that it causes cross reactions with smooth brucella antibodies, thus interfering with diagnosis⁽⁶⁾, mainly in countries like Mexico, where smooth brucella-caused brucellosis is endemic.

In order to improve sensitivity, and mainly specificity of *B. ovis* diagnosis, a highly specific protein antigen that can be readily produced is needed. Therefore, the purpose of this research was identifying *B. ovis*-specific proteins, and evaluating their antigenic pattern by immunoblotting.

For this research the following strains were used: *B. ovis* Reo 198, *B. melitensis* 16 M, *Mannheimia haemolytica* OV20, *Actinobacillus seminis* ATCC 15768, and *Haemophilus somnus* ATCC 2336. Field strains of these organisms were also used. Strains were initially maintained in sterile skim milk at -70 °C. For bacterial propagation *B. ovis* and *B.*

Se utilizaron las cepas de *B. ovis* Reo 198, de *B. melitensis* 16 M, *Mannheimia haemolytica* cepa OV20, *Actinobacillus seminis* ATCC 15768 y *Haemophilus somnus* ATCC 2336; así como cepas de campo de estos micro-organismos, manteniéndolas inicialmente en leche descremada estéril a -70°C . Para la propagación bacteriana de *B. ovis* y *B. melitensis* se inocularon placas de agar brucela, incubándose éstas durante siete días, aproximadamente a 37°C ; posteriormente se corroboró la identidad del crecimiento bacteriano con tinción de gram y pruebas bioquímicas^(7,8). Las cepas de *M. haemolytica*, *H. somnus* y *A. seminis*, fueron inoculadas en placas de agar sangre al 10%, incubándose de 48 a 72 h a 37°C , y de igual manera se realizaron pruebas bioquímicas y tinción de gram.

Las cepas de *B. ovis* Reo 198 y de *B. melitensis* 16 M, se cosecharon con HEPES (ácido-H-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico) 10 mM a pH 7.5, hasta obtener una absorbancia de 0.4 a 600 nm, se centrifugaron a 29,000 xg por 15 min a 4°C ; al término de ésta, se resuspendió con HEPES e inhibidores de proteasas PMSF y EDTA (phenylmethyl sulfonyl fluoride y ácido etilendiaminotetraacético) a una concentración de 0.1M y 1 mM respectivamente. El paquete celular se sonicó y centrifugó a 150,000 xg por una hora, correspondiendo el sedimento a las fracciones de las membranas externa e interna, y el sobrenadante al citosol. El paquete se resuspendió con Sarcocyl al 1% durante 30 min a 37°C y se centrifugó nuevamente a 150,000 xg por una hora, obteniendo en el paquete las proteínas de membrana externa, y en el sobrenadante las de membrana interna⁽⁹⁾.

Las fracciones celulares (membrana interna, membrana externa y citosol), fueron tratadas con solventes para la separación de compuestos orgánicos, lo cual consistió en agregar a 100 μl de cada fracción celular de *B. ovis* y *B. melitensis*, 400 μl de metanol y 100 μl de cloroformo entre cada una de las fases; se centrifugó a 14,000 xg, separando la fase orgánica con 300 μl de agua destilada y centrifugando nuevamente⁽⁹⁾. Por último, se cuantificaron las proteínas por medio de microtitulación de Bradford⁽¹⁰⁾.

melitensis were seeded on brucella agar plates, then incubated at 37°C for 7 d. Bacterial growth identity was further corroborated by Gram stain, and biochemical tests^(7,8). *M. haemolytica*, *H. somnus*, and *A. seminis* strains were inoculated on 10% blood agar, incubated at 37°C for 48 to 72 h, then subjected to biochemical tests and Gram stain.

B. ovis Reo 198, and *B. melitensis* 16 M strains were harvested with 10 mM HEPES (H-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulphonic acid), pH 7.5, until a 0.4 to 600 nm absorbance was obtained. Strains were centrifuged at 29,000 xg for 15 min at 4°C . After centrifugation, strains were re-suspended with HEPES, and protease inhibitors 0.1M PMSF (phenyl-ethyl-sulfonyl-fluoride) and 1mM EDTA (ethylenediamine-tetra-acetic acid). The cell pack was sonicated, and then centrifuged at 150,000 xg for one hour. The sediment consisted of outer/inner membrane fractions, and the supernatant contained the cytosol. The pack was re-suspended in 1% Sarcocyl for 30 min at 37°C , and then further centrifuged at 150,000 xg for one hour, now yielding outer membrane proteins in the pack, and inner membrane proteins in the supernatant⁽⁹⁾.

Cell fractions (inner membrane, outer membrane, and cytosol) were treated with solvents in order to separate the organic compounds. For this purpose, 400 μl de methanol and 100 μl de chloroform were added to 100 μl of each *B. ovis* and *B. melitensis* cellular fractions, between each phase. This was centrifuged at 14,000 xg, the organic phase was separated using 300 μl distilled water, then further centrifuged⁽⁹⁾. Lastly, proteins were quantified using Bradford's microtitration⁽¹⁰⁾.

B. ovis and *B. melitensis* were re-suspended in phosphate buffer solution (PBS), pH 7.2, and then adjusted in a spectrophotometer to a wavelength of 610 nm, and a concentration of 108 colony forming units (cfu)/ml. One and a half (1.5) ml bacterial suspension was centrifuged at 6,000 xg. The supernatant was discarded, and the bacterial pack was re-suspended in 62.5 μl Laemmli's buffer, and 62.5 μl protease inhibitors. This was later used for immunoelectrophoresis.

B. ovis y *B. melitensis* fueron resuspendidas en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2 y ajustadas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 610 nm y una concentración de 108 unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc). Una cantidad de 1.5 ml de la suspensión bacteriana fue centrifugada a 6,000 xg. Se desechó el sobrenadante y el paquete bacteriano fue resuspendido en 62.5 µl de amortiguador de Laemmli y 62.5 µl de inhibidores de proteasas, para posteriormente ser utilizada en la inmunoelectroforesis.

La separación de las proteínas se llevó a cabo en geles de poli(acrilamida)-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) en condiciones no reductoras, por el método de Laemmli⁽¹¹⁾, utilizando 10 µg/ml; esto se realizó tanto para los extractos totales y las fracciones celulares de *B. ovis* y *B. melitensis*, como para *M. haemolytica*, *A. seminis* y *H.* de *M. haemolytica*, *A. seminis* y *H. somnus*. Se estableció el patrón electroforético repitiendo varias veces la prueba. De cada corrimiento que se realizó, se hicieron dos geles, uno para ser teñido con azul de Coomassie y otro para ser transferido a membranas de nitrocelulosa; el corrimiento fue a 80 volts en el gel concentrador y posteriormente a 120 volts, hasta verificar que la muestra completara el recorrido en el gel.

Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, en un proceso de una hora a 400 mA, utilizando como metodología el sistema de emparedado^(12,13). Terminado el tiempo de transferencia, la membrana fue tratada con leche descremada al 5% por 24 h; se retiró la leche descremada y se lavó la membrana con PBS-Tween 20 por tres ocasiones, estos lavados se realizaron en cada paso de la técnica. Posteriormente, se incubó toda la noche a 4 °C con suero hiperinmune contra *B. ovis*⁽⁹⁾, (el cual fue preparado, inoculando conejos Nueva Zelanda con dosis de 0.5, 0.5, 1.0 y 1.0 ml respectivamente, a intervalos de cuatro días, vía intravenosa con 9 x 10⁸ ufc/ml de células completas de *B. ovis* y titulado por IDG). Después, la membrana fue incubada con Proteína A conjugada con peroxidasa, y por último, se

Protein separation was performed in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide (PAGE-SDS) gels, under non-reducing conditions, using Laemmli's method⁽¹¹⁾, with 10 µg/ml. This was performed for whole extracts, *B. ovis*/*B. melitensis* cell fractions, and *M. haemolytica*, *A. seminis*, and *H.* of *M. haemolytica*, *A. seminis* y *H. somnus*. The electrophoretic pattern was established by repeating the test several times. From every run, two gels were prepared: one to be stained with Coomassie's blue, and the other to be transferred onto nitrocellulose membranes. The run was performed at 80 volts in the concentrating gel, then at 120 volts until assuring sample completion of a full gel run.

Proteins were transferred to nitrocellulose membranes through a 1-hour process at 400 mA, using the sandwich methodology^(12,13). Once transference time was over, the membrane was treated with 5% skim milk for 24 h. Skim milk was removed and the membrane was washed with PBS-Tween 20 three times. These washings were performed in every step of the technique. Incubation was performed overnight at 4 °C with *B. ovis* hyperimmune serum⁽⁹⁾. Hyperimmune serum had been prepared using New Zealand rabbits intravenously inoculated with 0.5, 0.5, 1.0, and 1.0 ml respectively, at 4-d intervals, using 9 x 10⁸ cfu whole *B. ovis* cells/ml, and then titrated by DAGID. The membrane was then incubated with peroxidase-conjugated protein A. Finally, proteins were developed with 3,3-Diaminobenzidine and hydrogen peroxide.

Immunoblotting with both whole extracts and *B. ovis* and *B. melitensis* cell fractions were also performed. Nitrocellulose membranes were treated with *B. melitensis*, *A. seminis*, *H. somnus* or *M. haemolytica* positive antisera.

The calculation of protein concentration estimate of cell fractions and whole extracts (Table 1) allowed us to obtain the necessary protein volume for electrophoresis at a concentration of 10 µg/ml protein. The protein concentration obtained with *A. seminis* was reflected in both electrophoresis

Cuadro 1. Concentración de proteína de las fracciones celulares y extractos totales de los diferentes microorganismos

Table 1. Protein concentration in cell fractions and whole cell extracts from the different organisms

	Protein concentration (mg/ml)
Cell Fractions	
<i>Brucella ovis</i> Reo 198:	
outer membrane	2.5
inner membrane	2.3
cytosol	1.7
<i>Brucella melitensis</i> :	
outer membrane	2.4
inner membrane	1.9
cytosol	1.2
Whole extracts	
<i>Brucella ovis</i> field strain	2.3
<i>Brucella ovis</i> HS antigen	1.5
<i>Brucella melitensis</i> Rev 1	1.6
<i>Brucella melitensis</i> field strain	1.7
<i>Mannheimia haemolytica</i>	2.0
<i>Actinobacillus seminis</i>	0.80
<i>Haemophilus somnus</i>	0.75

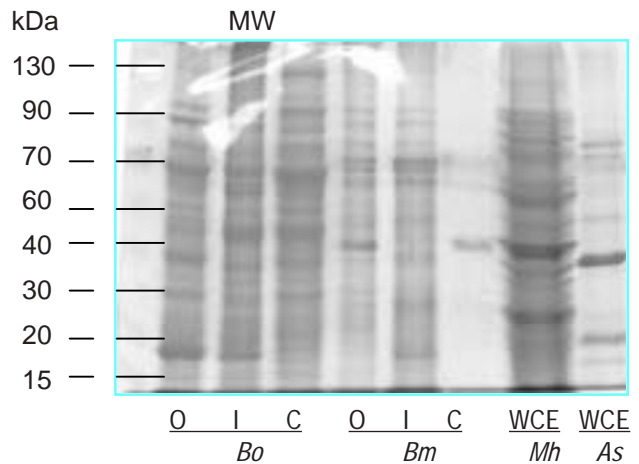
revelaron las proteínas con 3,3-Diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno.

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

El cálculo de la concentración de proteína de las fracciones celulares y los extractos totales (Cuadro 1), permitió obtener el volumen necesario de proteína para la realización de las electroforesis a una concentración de 10 µg/ml de proteína. La concentración de proteína que se obtuvo con *A. seminis*, se reflejó en la electroforesis e inmunotransferencia, presentando una menor cantidad de bandas en algunos casos.

Figura 1. Corrimiento electroforético de fracciones celulares y extractos totales de diferentes microorganismos

Figure 1. Electrophoresis run of cell fractions and whole cell extracts from different organisms



Molecular weight (MW) marker; *B. ovis* (Bo) and *B. melitensis* (Bm) outer membrane (O), inner membrane (I) and cytosol (C); *M. haemolytica* (Mh) and *A. seminis* (As) whole cell extracts (WCE).

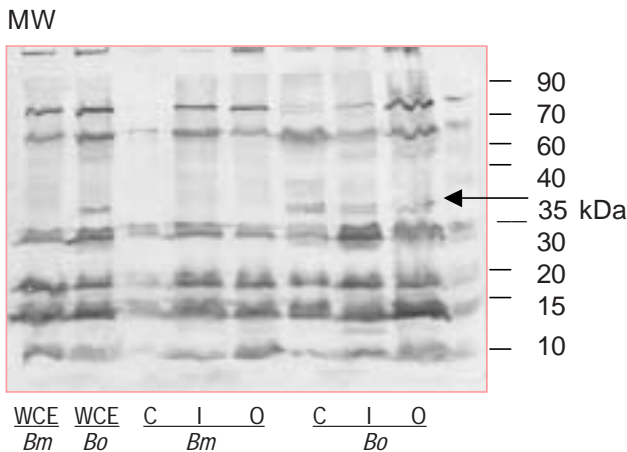
and immunoblotting, showing a smaller amount of bands in some cases.

The electrophoretic runs of *B. ovis* and *B. melitensis* outer membrane, inner membrane, and cytosol, as well as those performed with whole *M. haemolytica* and *A. seminis* extracts are shown in Figure 1. In the case of *B. ovis*, the presence of all three documented outer membrane protein groups^(2,9) is observed. In the inner membrane and cytosol, 40-90 kDa proteins prevailed. In the *B. melitensis* outer membrane extract, 38 and 68-90 kDa proteins prevailed. In *M. haemolytica* characteristic proteins of 15-30, 40-60, and 70-90 kDa proteins are observed. Lastly, in *A. seminis* all six (12, 15, 38, 50, 70, 76 kDa) protein bands outstand.

Immunoblotting results are shown in Figures 2 and 3. Two bands (see arrow) with molecular weights of 35 and 38 kDa in the outer membrane, inner membrane, cytosol, and whole *B. ovis* extracts are

Figura 2. Inmunotransferencia de un gel al 12.5%, utilizando suero anti-*B. ovis* obtenido en conejo

Figure 2. Immunoblotting of a 12.5% gel using rabbit *B. ovis* antiserum



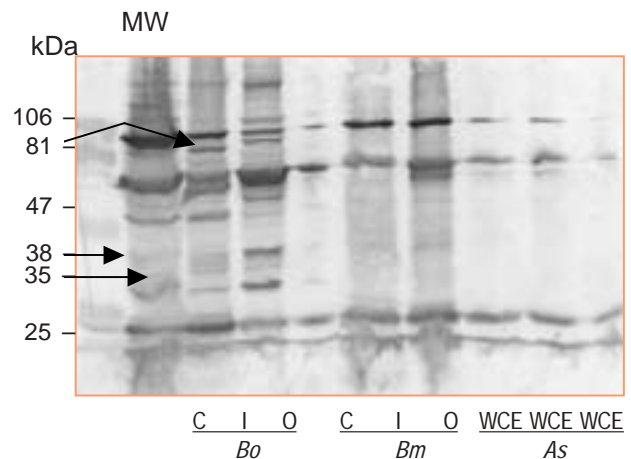
B. melitensis (Bm) and *B. ovis* (Bo) whole cell extracts (WCE); outer membrane (O), inner membrane (I) and cytosol (C) from both bacteria, and molecular weight marker (MW). The arrow shows the 35 kDa identity band, that is recognized in the fractions and whole cell extracts from *B. ovis*, but not in those from *B. melitensis*.

El corrimiento electroforético de los extractos de membrana externa, membrana interna y citosol de *B. ovis* y *B. melitensis* y de los extractos totales de *M. haemolytica*, y *A. seminis*, se presentan en la Figura 1. En *B. ovis*, se observa la presencia de los tres grupos de proteínas de la membrana externa que han sido reportadas^(2,9) y de membrana interna y citosol predominan proteínas de 40 a 90 kDa. Del extracto de membrana externa de *B. melitensis*, resaltan las proteínas de 38 y 68 a 90 kDa. En *M. haemolytica* se observan proteínas características de 15 a 30, 40 a 60 y 70 a 90 kDa. Por último, en *A. seminis* resaltan seis bandas proteicas, de 12, 15, 38, 50, 70 y 76 kDa.

Los resultados de las inmunotransferencias se presentan en las Figuras 2 y 3. Se observa el reconocimiento de dos bandas (se indican con una flecha), con un peso molecular de 35 y 38 kDa en membrana externa, interna, citosol y extracto total

Figura 3. Inmunotransferencia de un gel al 15% de fracciones celulares y extractos totales

Figure 3. Immunoblotting of a 15% gel of cell fractions and whole extracts using rabbit *B. ovis* antiserum



B. melitensis (Bm) and *B. ovis* (Bo) outer membrane (O), inner membrane (I) and cytosol (C); *A. seminis* (As) whole cell extracts (WCE). Molecular weight marker (MW). The arrows show three identity bands (35, 38, and 81 kDa) in *B. ovis* fractions that do not appear in *B. melitensis* or *A. seminis* whole cell extracts.

recognized. These do not appear in *B. melitensis* cell fractions. Figure 3 shows a 15% gel: arrows show the presence of a 81 kDa recognition band. It is important to point out that in the *M. haemolytica*, *H. somnus*, *A. seminis* and *B. ovis* HS antigen extracts, the serum did not recognize these bands.

In the immunoblotting of all proteins from cell fractions and whole from all strains used in this research, *B. melitensis*, *M. haemolytica*, *A. seminis* and *H. somnus* antisera were used making crosses of these antisera in all cases. In these immunoblottings, serum reactions occurred with proteins from *B. ovis*/*B. melitensis* fractions, and from whole *M. haemolytica*, *A. seminis* and *H. somnus* extracts. Nevertheless no reaction was observed with 35 and 38 kDa proteins that were identified in the immunoblottings performed with *B. ovis* antisera (Figure 4).

de *B. ovis*. las cuales no aparecen en las fracciones celulares de *B. melitensis*. En la Figura 3 se presenta un gel al 15%, señalándose con flechas, la presencia de una banda de reconocimiento de 81 kDa. Hay que destacar que en las inmunotransferencias con los extractos de *M. haemolytica*, *H. somnus*, *A. seminis* y el antígeno HS de *B. ovis*, el suero no reconoció estas bandas.

En las inmunotransferencias de las proteínas de las fracciones celulares y los extractos totales de todas las cepas utilizadas en el trabajo, se utilizaron antisueros contra *B. melitensis*, *M. haemolytica*, *A. seminis* y *H. somnus*, haciendo cruces de estos antisueros en todos los casos. En estas inmunotransferencias hubo reacción de los sueros con proteínas de las fracciones de *B. ovis*, *B. melitensis* y de los extractos totales de *M. haemolytica*, *A. seminis* y *H. somnus*. Sin embargo, no hubo reacción con las proteínas de 35 y 38 kDa que se identificaron en las inmunotransferencias con los antisueros contra *B. ovis* (Figura 4).

La composición y la expresión de las proteínas de membrana externa de las bacterias gram negativas están reguladas entre otros factores por las condiciones de cultivo⁽¹⁵⁾. Por tal motivo, para evitar variaciones en los cultivos, se emplearon las mismas condiciones de mantenimiento y desarrollo para las cepas bacterianas utilizadas, corroborando las características fenotípicas con resultados satisfactorios.

El método de obtención de las fracciones celulares⁽⁷⁾ permitió obtener la membrana externa, interna y citosol de *B. ovis* Reo 198 y *B. melitensis* 16 M, con una concentración adecuada de proteínas; así como también fue adecuada para los extractos totales de *B. ovis*, *B. melitensis* y los demás microorganismos.

Las fracciones celulares de *B. ovis* Reo 198 y *B. melitensis* 16M, presentaron reacción con el suero hiperinmune contra *B. ovis* y con el suero contra *B. melitensis*, teniéndose por lo tanto, una reacción cruzada entre ambas cepas, principalmente de proteínas de membrana externa del grupo 2⁽¹⁷⁾,

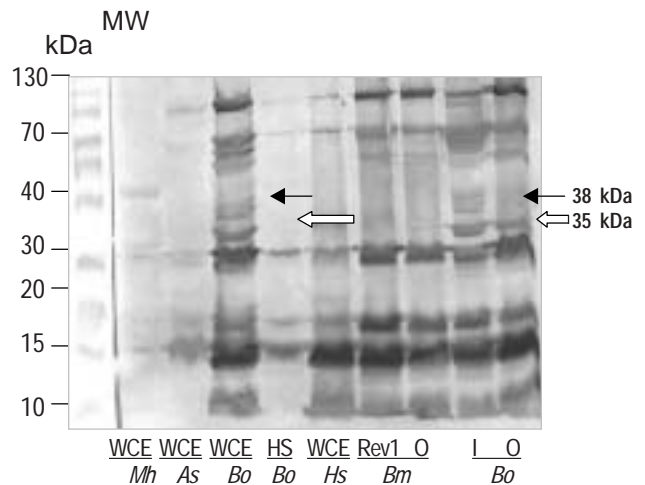
Composition and expression of Gram negative bacteria outer membrane proteins are regulated - among other factors- by culture conditions⁽¹⁵⁾. This is why, in order to prevent culture variations, the same maintenance and development conditions were used for all bacterial strains, thus corroborating the phenotypic traits with satisfactory results.

The method used for obtaining cell fractions⁽⁷⁾ allowed to obtain *B. ovis* Reo 198 and *B. melitensis* 16 M outer membrane, inner membrane, and cytosol with adequate protein concentrations. It was also adequate for whole *B. ovis* and *B. melitensis* extracts, as well as for all other organisms tested.

B. ovis Reo 198 and *B. melitensis* 16M cell fractions reacted with both *B. ovis* and *B. melitensis* hyperimmune sera. Therefore, a cross reaction

Figura 4. Inmunotransferencia de las fracciones celulares y extractos totales utilizando suero anti-*B. ovis* obtenido en conejo

Figure 4. Immunoblotting of both cell fractions and whole extracts using rabbit *B. ovis* antiserum



B. ovis (Bo) outer membrane (O), inner membrane (I) and saline extract (HS); *B. melitensis* (Bm) outer membrane (O) and Rev 1; *A. seminis* (As), *M. haemolytica* (Mh), and *H. somnus* (Hs) whole cell extracts (WCE); molecular weight marker (MW). The arrows show two identity bands (35 kDa, clear arrow) and 38 kDa, (solid arrow) from *B. ovis* fractions and whole extracts.

aunque también se observa, una reacción con las proteínas de los grupos 1 y 3 de ambas cepas no descritas anteriormente. También se observó reacción con algunas proteínas de *A. seminis*, *M. haemolytica*, *H. somnus* y el antígeno HS de *B. ovis*. Estas reacciones cruzadas, son las que no permiten obtener un diagnóstico preciso diferencial entre *B. ovis*, *B. melitensis* y las demás bacterias, principalmente por ELISA. En el caso del HS, que es el antígeno utilizado para el diagnóstico de *B. ovis* en pruebas serológicas como IDG y ELISA⁽¹⁷⁾, presentó reacción con el suero contra *B. ovis*, principalmente de proteínas del grupo 3, y con el suero contra *B. melitensis* con proteínas del grupo 2 de membrana externa⁽¹⁸⁾. Las proteínas de 35 y 38 kDa también fueron identificadas en inmunotransferencias por otros autores^(18,19) para el diagnóstico de *B. ovis*, usando como antígeno HS de *B. ovis* y un suero de carnero infectado experimentalmente contra *B. ovis*; sin embargo, en estos trabajos las proteínas obtenidas no fueron utilizadas con el fin de implementar un diagnóstico serológico, ni tampoco se realizó una diferenciación con proteínas de *B. melitensis*, por lo que se desconocía su especificidad y su valor diagnóstico.

La metodología utilizada para la extracción de las fracciones celulares de *B. ovis* y *B. melitensis*, así como su concentración de proteínas, fue adecuada para la realización del PAGE-SDS y la inmunotransferencia, observándose en esta última, la reacción cruzada que existe entre el suero contra *B. melitensis* y las proteínas de *B. ovis*; así, como la reacción entre el suero de *B. ovis* y las proteínas de *B. melitensis* y los demás microorganismos utilizados. Sin embargo, se identificaron tres proteínas específicas de *B. ovis* que no reaccionaron con sueros contra *B. melitensis* y los demás microorganismos, de 35, 38 y 81 kDa, las cuales, posteriormente se purificarán para ser utilizadas en el ELISA para el diagnóstico preciso de *B. ovis*.

between both strains was obtained, mainly attributable to group 2 outer membrane proteins⁽¹⁷⁾. Even though, a reaction with group 1 and group 3 proteins from both strains (non previously described) are also observed in this research. Some *A. seminis*, *M. haemolytica*, *H. somnus*, and *B. ovis* HS antigen proteins, also reacted. These cross reactions are the ones that prevent labs from obtaining precise differential diagnosis between *B. ovis*, *B. melitensis*, and the other bacteria, mainly when the ELISA technique is used. HS –which is the antigen used for the diagnosis of *B. ovis* in serological tests like DAGID and ELISA⁽¹⁷⁾– reacted with *B. ovis* antiserum (mainly group 3 proteins), as well as with *B. melitensis* antiserum (group 2 outer membrane proteins)⁽¹⁸⁾. The 35 and 38 kDa proteins have been also identified by other workers^(18,19) using immunoblotting for the diagnosis of *B. ovis*, using *B. ovis* HS as an antigen, with serum from a *B. ovis* experimentally-infected ram. Nevertheless, in such papers the proteins obtained were not used to implement a serological diagnosis, and differentiation with *B. melitensis* proteins was not performed, so that their specificity and diagnostic value were unknown.

The methodology used for the extraction of *B. ovis* and *B. melitensis* cell fractions and for protein concentration, was adequate for both PAGE-SDS and immunoblotting. The latter showed the typical cross reaction between *B. melitensis* antiserum and *B. ovis* proteins, as well as that between *B. ovis* antiserum and *B. melitensis* proteins, and the other organisms used. Nevertheless, three *B. ovis*-specific proteins were identified that did not react with the antisera against *B. melitensis* or the remaining organisms. These proteins have molecular weights of 35, 38, and 81 kDa. They will be further purified for ELISA purposes in the precise diagnosis of *B. ovis*.

End of english version

LITERATURA CITADA

1. Alton GG, Jones LM, Pietz DE. Las técnicas de laboratorio en la brucelosis. FAO/OMS. Serie monografías 55. Edición 1976. Ginebra, Suiza. 1988.
2. Cleon VK, Schweitzer D. *Brucella ovis*, Infection and its management in ovine reproduction. *Agri-Practice* 1989;4:36-39.

3. Freer E, Pizarro-Cerdá J, Weintraub A, Bengoechea JA, Moriyón I, Hultenby K, Gorvel JP, Moreno E. The outer membrane of *Brucella ovis* shows increased permeability to hydrophobic probes and is more susceptible to cationic peptides than are the outer membranes of mutant rough *Brucella abortus* strains. *Infect Immun* 1999;67(11):6181-6186.
4. Riezu-Boj JI, Moriyon I, Blasco JM, Gamazo C, Díaz R, Winter AJ. Analysis by immunoblot of the antibody response of sheep infected by smooth and rough brucellae to outer membrane proteins extracted with hot saline. *Infect Immun* 1990;58:489-494.
5. Cloeckeaert AJ, Verger M, Grayon M, Vizcaíno N. Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiology Letters* 1996;145:1-8.
6. Cloeckeaert A. Antigens of *Brucella*. Meeting of brucellosis research conference. Baltimore, USA. November 8-9. 1997.
7. Texeira G, Cloeckeaert A, Bezard G, Bowden RA, Dubray G, Zygmunt MS. Identification and characterization of *Brucella ovis* immunogenic proteins using two dimensional electrophoresis and immunoblotting. *Electrophoresis* 1997;18:1491-1497.
8. Zygmunt SM, Martín CJ, Dubray G. Analysis of immune response: comparison of immunoblots after isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-poliacrylamide gel electrophoresis using cytoplasmic protein extract from *Brucella*. *FEMS Microbiol Letters* 1990;70:263-268.
9. Riezu-Boj JI, Moriyon I, Blasco JM, Gamazo C, Díaz R. Antibody response to *Brucella ovis* outer membrane proteins in ovine brucellosis. *Infect Immun* 1990;58:489-494.
10. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Annal Biochem* 1976;72:248-254.
11. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of bacteriophage T4. de *M. haemolytica*, *A. seminis* y *H. somnus* *Nature* (London) 1970;227:680-685.
12. Chin J, Turner B. Extraction of membrane antigens from *Brucella ovis* and an assessment of their serological activity by immunoblotting. *J Microbiol* 1990;136:1615-1622.
13. Chin JC, Pang B, Carring M. Comparison of seroreactivity of rams with brucellosis in a complement fixation test, whole cell ELISA and by immunoblotting. *Vet Microbiol* 1991;26:291-299.
14. Gamazo C, Winter AJ, Moriyon I, Riezu-Boj JI, Blasco JM, Díaz R. Comparative analysis of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 1989;57:1419-1426.
15. Osborn MJ, Wu HCP. Proteins of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Ann Rev Microbiol* 1980;34:369-422.
16. Afzal M, Scott JB, Tengerdy RP, Squire PG. Isolation and antigenic reactivity of *Brucella ovis* outer membrane proteins. *J Clin Microbiol* 1987;25(11):2132-2135.
17. Marín CM, Alonso-Urmeneta B, Moriyón I, Pérez-Gómez S, Blasco JM. Comparison of polyclonal, monoclonal and protein G peroxidase conjugates in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Vet Record* 1998;143:390-394.
18. Ebani VV, Cerri D, Bey RF, Andreani E, Farina R. An immunoblotting for the serodiagnosis of brucellosis by *Brucella ovis*. *New Microbiol* 2000;23(1):55-62.
19. Cerri D, Ebani VV, Pedrini A, Bassi S, Bey RF, Andreani E, Farina R. Evaluation of test employed in serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella ovis*. *New Microbiol* 2000;23(3):282-288.

