

PROTEINAS INMUNODOMINANTES DE *Brucella melitensis* EVALUADAS POR WESTERN BLOT

Anaya Elizabeth¹, Montoya Ysabel¹ y Carrillo P. Carlos^{1,2}

RESUMEN

Se separaron extractos de proteínas totales de *Brucella melitensis* en gel 15% SDS-PAGE. Su seroreactividad fue analizada por Western Blot con resultados satisfactorios. Para éste propósito sueros controles negativos (n=03), sueros de pacientes con brucelosis (n=34), cólera (n=12), tifoidea (n=02) y tuberculosis (n=02) fueron usados. Esta prueba inmunodiagnóstica detectó bandas seroreactivas altamente específicas (100%) correspondientes a 8,14,18, un complejo de 25-48 y 58kDa. La sensibilidad del test fue del 90% usando los sueros antes mencionados.

Palabra clave: *Brucella*, Brucellosis, Western blot.

ABSTRACT

Brucella melitensis total proteins extracts were separated by 15% SDS-PAGE. Their seroreactivity was analysed by Western blot with satisfactory results. In order to do this 03 negative controls, 34 brucellosis, 12 cholerae, 02 typhoid fever and 02 tuberculosis sera were used. This immunodiagnostic test detected highly specific seroreactive bands (100%) corresponding to 8, 14, 18, 25-48 complex and 58kDa. The test sensitivity was 90% using these sera.

Key word : *Brucella*, brucellosis, Western blot

INTRODUCCION

La Brucelosis es una enfermedad conocida desde el siglo XIX, cuyo agente causal fue aislado por David Bruce en 1956¹ es una antropozoonosis originada por bacterias gramnegativas del género *Brucella* que constituye una causa importante de morbilidad en los seres humanos y animales. En el Perú, la forma principal de transmisión es la vía oral, y el contagio directo a través de piel y mucosa, constituyéndose una enfermedad endémica con focos episódicos donde *Brucella melitensis* biotipo 1 es responsable del 97% de los casos de Brucelosis humana².

El diagnóstico de esta enfermedad en el Perú se realiza mediante aislamiento de patógenos en cultivos *in vitro* y pruebas serológicas (i.e. Rosa de Bengala, test de aglutinación en placa, y test de aglutinación en tubo). Estas pruebas serológicas rápidas debido a su relativa sensibilidad y especificidad, presentan reacción cruzada y falsos positivos con anticuerpos homólogos

correspondientes a otros patógenos tales como: *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Yersinia enterocolitica* y *Mycobacterium tuberculosis*^{3,5}.

Se evaluó la inmunogenicidad de las proteínas totales de *B. melitensis* para usarlas como marcadores mediante la técnica de Western Blot a fin de disponer de un test de diagnóstico alternativo con mayor especificidad y sensibilidad.

La técnica denominada Western Blot o Immunoblotting⁶ combina la capacidad de resolución de la electroforesis en gel para separar a las proteínas, con la especificidad de la detección inmunológica con los anticuerpos. Asimismo, esta técnica, contribuye a determinar características importantes de los antígenos como su presencia, cantidad, peso molecular relativo de las cadenas polipeptídicas y grado de pureza⁷.

En la literatura científica aparecen algunos trabajos sobre la seroreactividad de una combinación de sueros humanos infectados con Brucelosis, los cuales fueron enfrentados a un extracto de proteínas de *B. abortus* 19-S, ubicando varias bandas antigénicas entre 30 y 60 kDa⁸. Asimismo, se identifica una proteína citoplasmática de 18 kDa obtenida de *B. ovis* considerada como un marcador serológico de infección activa de Brucelosis humana y bovina⁸.

1. División de Biología Molecular. Centro Nacional de Laboratorios de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, A.P. 451, Lima, Perú.

2. Departamento de Microbiología. Universidad Peruana Cayetano Heredia, A.P. 4314, Lima 100, Perú.

En el Perú, el diagnóstico de esta enfermedad mediante cultivos *in vitro* y pruebas serológicas ofrecen una buena sensibilidad cuando se aplica adecuadamente⁴. Este trabajo describe el desarrollo de una prueba diagnóstica alternativa con mayor sensibilidad y especificidad como es el Western Blot utilizando proteínas totales de *B. melitensis*.

MATERIALES Y METODOS

Bacteria: La cepa de *B. melitensis* proviene de un paciente peruano en fase aguda, aislada por hemocultivo en Medio modificado de Ruiz Castañeda, y tipificada mediante pruebas bioquímicas y serológicas, según los procedimientos recomendados por OMS y ASM. La cepa bacteriana se mantiene criopreservada en medio Skim Milk (Difco) a -70°C.

Preparación del Extracto de Proteínas Totales:

El extracto de *B. melitensis* fue preparado a partir de una suspensión de bacterias en solución salina tamponada (SSB, pH 6.4) con modificaciones del protocolo de la Guía de Práctica de Western Blot de la división de Biología Molecular⁹

Las bacterias previamente inactivadas a 96°C por una hora se rompen con shock térmico de -70°C y 37°C, con intervalos de 7 minutos cada uno. Posteriormente, las proteínas son cuantificadas por el método de Lowry¹⁰ y se almacenan en alícuotas a -70°C.

Western blot: Trescientos microgramos de las proteínas totales de *B. melitensis* son separadas en un gel preparativo de SDS-PAGE al 15% a 120 volt. (25 mAmp) por 2 horas.

La transferencia de las proteínas se realizó en papel de nitrocelulosa por una hora a 120 volt, (32 mAmp.) Las membranas de nitrocelulosa son incubadas con leche desgrasada, descremada y deshidratada al 2%, y los anticuerpos secundarios usados fueron IgG anti-humano conjugado con peroxidasa e IgG anti-humano conjugado con Fosfatasa Alcalina.

Se analizó por Western Blot la reactividad inmunológica de 34 sueros de pacientes de los que se cuenta con datos clínicos completos. Estos sueros fueron analizados previamente por Rosa de Bengala, Aglutinación en placa, Aglutinación en tubo y 2-Mercapto-Etanol, tres sueros de voluntarios sanos sin historia previa de Brucelosis (control negativo); dos sueros muy reactivos de pacientes con Brucelosis (control positivo); 26 sueros de otras enfermedades: Cólera (n=12), Tifoidea (n=2) y Tuberculosis (n=2).

RESULTADOS Y DISCUSION

La técnica de Western Blot utilizando proteínas totales de *B. melitensis* como antígeno, ofrece un test alternativo para el diagnóstico de brucelosis humana, logrando una sensibilidad del 90% (Figuras 1 y 2). Asimismo, es de resaltar que el sistema desarrollado no tiene reacción cruzada cuando es evaluada con sueros de pacientes de otras enfermedades como *V. cholerae*, *Salmonella typhi* y *Mycobacterium tuberculosis* obteniéndose por lo tanto una especificidad del 100%.

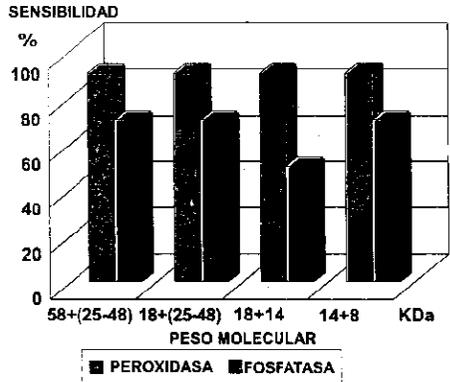


Fig. 1 : Seroactividad de las proteínas totales de *B. melitensis* Análisis por Western blot de un aislamiento de *B. melitensis*. Sensibilidad de cada una de las bandas obtenidas en el lisado de proteínas totales

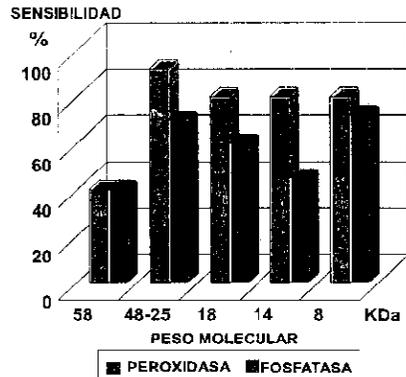


Fig. 2 : Seroactividad de proteínas totales de *B. melitensis* Análisis por Western blot de un aislamiento de *B. melitensis* determinando la sensibilidad de las bandas en forma combinada.

El test de inmunodiagnóstico desarrollado fue optimizado usando IgG anti-humano conjugado con peroxidasa como anticuerpo secundario al evaluar sueros de pacientes infectados con *Brucella sp.* y otras enfermedades (ver Material y Métodos). La prueba detectó bandas seroreactivas con un 100%

de especificidad y 90% de sensibilidad a diferencia de la IgG anti-humano conjugado con Fosfatasa Alcalina con el cual se obtuvo sólo 70% de sensibilidad (Fig. 1). Las principales proteínas inmunogénicas detectadas en *B. melitensis* correspondieron a proteínas de 8, 14, 18, un complejo de 25-48 y 58 kDa. (Fig. 1).

La reacción cruzada observada en las pruebas serológicas convencionales se debería a la presencia de una o varias moléculas de perosamina en el lipopolisacárido (LPS) y que constituye el principal antígeno de superficie de *Brucella sp*¹¹

Este LPS es evidenciado en pruebas de aglutinación convencionales dando reacción falsos positivas para *Brucella* en pacientes con diarrea por *V. cholerae*, sin embargo no presenta reacción en los ensayos de Western Blot¹²

Dos proteínas inmunogénicas presentes en nuestro sistema: el complejo proteico 25-48 kDa y la proteína 58 kDa, también han sido descritos por otros autores⁷, quienes utilizan como antígenos un extracto de proteínas citoplasmáticas libres de LPS de *B. abortus* 19-S, y obtienen bandas definidas entre 25 y 48 kDa. En el sistema de Western Blot desarrollado en este trabajo se utilizan proteínas totales de *B. melitensis* las cuales presentan LPS y glicoproteínas. Sin embargo, no se observan bandas definidas a nivel del complejo proteico 25-48 kDa. Se sugiere entonces que la interferencia en la resolución de las bandas del complejo 25-48 kDa de nuestro sistema se relacione con la presencia de LPS y/o glicoproteínas de la bacteria.

Otra proteína inmunodominante de *B. melitensis* hallada en este trabajo, es la proteína de 18kDa, la cual también ha sido reportada por otros autores en *B. ovis*³ y que constituye una proteína citoplasmática considerada a ser un fuerte marcador serológico.

Otras proteínas inmunodiagnósticas reportadas para *Brucella sp.* es la proteína de 20 kDa¹³ y 26 kDa¹⁴, las cuales reaccionan con algunos sueros de pacientes peruanos infectados con *Brucella sp.*, pero cuya reactividad no es constante.

Finalmente, las bandas seroreactivas reportadas en este artículo nos han permitido identificar la reactividad de los sueros individuales contra los antígenos totales de *B. melitensis* aislada en nuestro país. Es necesario validar el test incrementando el número de sueros de pacientes con Brucelosis y de otras enfermedades. En tal sentido, la División de Biología Molecular continúa analizando un mayor número de sueros.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Sra. Alida Navarro por su constante y valioso apoyo técnico en la producción de los antígenos de *Brucella melitensis*. Asimismo, al Laboratorio de Bacteriología Especial de la División de Bacteriología, CNLSP, INS por proporcionar los sueros de brucelosis.

BIBLIOGRAFIA

1. David Bruce U. Spink. WW. The nature of Brucellosis. Minneapolis, University of Minnesota Press. 1956.
2. Gotuzzo E, Carrillo C, Seas C, et al. Características epidemiológicas y Clínicas de la Brucelosis en 39 grupos familiares. Rev Esp Enferm Inf Microbiol Clin; 7, 1989;10: 519-524.
3. Gotuzzo E, Carrillo C, Brucella Arthritis. in Espinoza L, Goldberg D, Arnett F, Alarcon G (eds) Infection in the Rheumatic Diseases, Orlando, Fl. Grune & Stratton. 1988.
4. Gotuzzo E, Carrillo C, Brucella. in: Gorbach SL, Barlett JG, Blacklow NR, (eds) Infectious Diseases. New York, Saunders Co. 1992; 1513-1521.
5. Carrillo PC, Gotuzzo E, Brucellosis, in Current Therapy Infectious Disease, Inc. In Schlossberg D (ed). Philadelphia. Mosby Year book 1995.
6. Towbin H, et al. Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 1977;76: 4350-4354.
7. Berg G, Garlin D. Protein and nucleic acid blotting and immunobiochemical detection. Biotechniques 1985; 3(4).
8. Goldbaum F, Rubbi C, Walach J, Miguel S, Baldi P, & Fossati C. Differentiation between active and inactive human brucellosis by measuring anti-protein humoral immune responses. Journal of Clinical Microbiology, 1992; 30 (3): 604-607.
9. Montoya Y, Anaya E, Leon C, Nolasco O, Talledo M, y Padilla C. Guía de Práctica del Curso Teórico-Práctico Western Blot. Instituto Nacional de Salud. Lima-Perú 1996.
10. Lowry O, et al. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. Journal Biol. Chem. 1951;193: 265-275.
11. BRUCELOSIS: AVANCES Y PERSPECTIVAS. Publicación Técnica del Instituto Nacional de Diagnóstico y referencia Epidemiológico INDRE 1991;(6): 12-19 y 20-23.
12. Goycochea C, Gotuzzo, E & Carrillo C. Cholera-Brucella cross-reaction: A new potential diagnostic problem for travelers to Latin America. Journal Travel Medicine. 1996; (3):37-39.
13. Zygmunt MM, Gilbert F, & Dubray G. Purification, Characterization and Seroactivity of a 20-Kilodalton Brucella Protein Antigen. Journal of Clinical Microbiology. 1992; Vol. 30, N° 10: 2662-2667.
14. Rosetti O, et al. Cloning of Brucella abortus Gene and characterization of expressed 26-kilodalton Periplasmic Protein: Potential use for Diagnosis. Journal of Clinical Microbiology, 1996; 34 (1):165-169.