



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

BRUCELOSIS EN HUMANOS:
PANORAMA ACTUAL

TRABAJO MONOGRÁFICO DE
ACTUALIZACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
PRESENTA:
SILVIA LIVERA SABBAGH



MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Raúl Garza Velasco
Vocal	Profa. María Guadalupe Tsuzuki Reyes
Secretario	Profa. Patricia Elvira Berrón Ruiz
1er. Suplente	Prof. Gonzalo Castillo Rojas
2º. Suplente	Profa. Estrella Mirella Cervantes García

Sitios donde se desarrolló el tema:

Bibliotecas de la Facultad de Química y del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

QFB. Raúl Garza Velasco

Asesor

Silvia Livera Sabbagh

Sustentante

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, que han sido mis guías, por enseñarme con el ejemplo que la felicidad se logra a través de la dedicación, la honestidad, la inteligencia y el esfuerzo.

A Rosario y Alejandro, mis hermanos.

A Juan Pablo por el amor que compartimos.

A Armando por el cariño y apoyo que he tenido de su parte a lo largo de todos los años que nos conocemos.

A Natalia por su amistad y por supuesto, por su apoyo y consejo durante la realización de este trabajo.

A mis amigos Israel, Katy, Diana, Edna, Zaida, María Fernanda, Karina, Vero y Yebel.

Al profesor Raúl Garza por haber aceptado dirigir este trabajo.

A mis maestros de la Facultad de Química por el conocimiento que me compartieron.

A mi tía Maricruz Sabbagh, por enseñarme muchos de los fundamentos de química que me ayudaron a llegar a esta Facultad.

A Erandi, mi tía Rosa, mi abuelita Cande y la familia Sabbagh Estrada por estar siempre pendientes de mi.

DEDICATORIA

A mis padres por el amor incondicional que me han regalado siempre.

A mi hermana Rosario. No podría haber pedido mejor amiga, compañera o ejemplo a seguir.

INDICE

	Página
Introducción.....	1
Objetivos.....	2
I. Carcterísticas microbiológicas	
A. Microscopía.....	4
B. Propiedades culturales y macroscopía.....	8
C. Sustancias de superficie.....	10
D. Pruebas de identificación.....	12
1. Principales pruebas bioquímicas.....	13
2. Pruebas de susceptibilidad a los colorantes.....	15
3. Prueba de susceptibilidad a la lisis por fagos.....	17
4. Pruebas de aglutinación con sueros inmunes específicos	20
II. Patología y patogenia asociadas a la brucelosis	
A. Patología.....	23
B. Patogenia.....	32
1. Interacción directa brucela-macrófago.....	33
2. Interacción mediada por anticuerpos IgG específicos.....	36
3. Formación del fagosoma de replicación en fagocitos no profesionales.....	37

III. Principales factores de virulencia del género *Brucella*

A. El lipopolisacárido de la membrana externa	42
B. El sistema de dos componentes <i>bvrR-bvrS</i>	49
C. El operón <i>virB</i>	55
D. El gen <i>bacA</i>	57
E. El gen <i>hfq</i>	58
F. La enzima superóxido dismutasa.....	60
G. β -1,2-cicloglucanos.....	63
H. El operón <i>cydAB</i>	67
I. <i>purE</i> y <i>aroC</i>	68

IV. Prevención y tratamiento

A. Prevención de la infección con <i>Brucella</i> en humanos.....	69
1. Prevención de la brucelosis en animales.....	70
2. Control de alimentos de origen animal.....	76
3. Vacunas contra la brucelosis humana.....	77
4. Manejo de <i>Brucella</i> en el laboratorio.....	80

	Página
B. Tratamiento de la brucelosis humana.....	84
V. Diagnóstico de laboratorio	
A. Cultivo bacteriológico.....	88
1. Muestras.....	89
2. Observación de extensiones teñidas al Gram.....	93
3. Pruebas bioquímicas.....	94
4. Interpretación del cultivo bacteriológico.....	95
B. Diagnóstico mediante serología.....	96
C. Métodos moleculares.....	98
1. PCR.....	99
2. PCR en tiempo real.....	104
3. Secuenciación del gen 16S rRNA.....	106
Conclusiones.....	107
Bibliografía.....	110

INTRODUCCION

La brucelosis, también conocida como fiebre de Malta, fiebre ondulante, enfermedad de Bang o fiebre del Mediterráneo, corresponde a una zoonosis presente en casi todos los países del mundo, evidenciando índices mayores en los que aún se encuentran en vías de desarrollo. Si bien su tasa de mortalidad en los seres humanos es relativamente baja, los signos y síntomas implicados generalmente impiden a la persona realizar sus actividades cotidianas, e inclusive, los casos crónicos y las complicaciones con frecuencia resultan discapacitantes.

Durante 2006 se reportaron 1,339 casos de brucelosis humana en la República Mexicana, encontrándoseles distribuidos en todas las entidades federativas del país. (46, 74)

Cabe señalar que aún no se conocen del todo las interacciones de la bacteria con las células del hospedero ni los mecanismos de acción de ciertos factores de virulencia, por lo que las investigaciones sobre estas temáticas continúan en proceso.

El diagnóstico de la brucelosis sigue considerándose complicado, debido a que las manifestaciones clínicas del padecimiento son poco específicas y la presencia de anticuerpos contra *Brucella* entre la población saludable de los lugares en donde la enfermedad es común dificulta la interpretación correcta de las técnicas basadas en pruebas serológicas.

El presente trabajo pretende dar a conocer los hallazgos recientes en diversos aspectos de la brucelosis humana, incluidos los factores de virulencia de la bacteria, la patogenia asociada al padecimiento, las medidas de prevención y el tratamiento, así como lo referente al desarrollo de vacunas razonadas y los métodos de diagnóstico desarrollados hasta el momento.

OBJETIVOS

- Describir las características del género *Brucella* y las manifestaciones de la brucelosis subclínica, aguda, subaguda y crónica en los seres humanos.
- Mencionar los principales factores de virulencia de *Brucella*, subrayando su posible papel en la patogenia relacionada con la enfermedad.
- Señalar los métodos de prevención de la brucelosis y analizar los estudios destinados a desarrollar vacunas contra la brucelosis para su aplicación en los seres humanos.

- Describir el tratamiento de la infección así como los métodos de diagnóstico utilizados actualmente para detectar los casos de brucelosis humana.

I. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

A. Microscopía

El género *Brucella* está conformado por cocobacilos, cocos y bacilos cortos, Gram negativos, de 0.5 a 0.7 μm de ancho por 0.6 a 1.5 μm de largo. Son microorganismos inmóviles, no esporulados y no capsulados que generalmente no se encuentran agrupados, aunque ocasionalmente forman acúmulos o cadenas cortas. Crecen en condiciones de aerobiosis, siendo favorecidos por atmósferas de 5-10% de CO_2 y no pueden desarrollar bajo condiciones anaeróbicas. Se reproducen en un rango de temperatura de 20 a 40°C, siendo su temperatura óptima de 37°C y su pH óptimo de 6.6 a 7.4. Estas bacterias son consideradas parásitas intracelulares facultativas, tanto de fagocitos profesionales como de numerosas células somáticas. (74, 105)

Se han clasificado seis especies de acuerdo con su variación antigénica, diferencias fenotípicas y su huésped primario: *Brucella melitensis* (ganado caprino y bovino), *Brucella abortus* (ganado vacuno), *Brucella suis* (ganado porcino), *Brucella canis* (perros), *Brucella neotomae* (ratas de la madera del desierto) y *Brucella ovis* (ganado ovino). *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* y *B.*

canis pueden infectar al ser humano, siendo la primera de ellas la más peligrosa. (40, 57, 89)

Existen reportes de infecciones con *Brucella* en una gran variedad de mamíferos marinos como focas, delfines y ballenas, sin embargo las características generales de las bacterias aisladas son distintas a las de las seis especies reconocidas, por lo que se ha propuesto la inclusión de dos nuevas especies con los nombres *Brucella pinnipediae* (foca) y *Brucella cetaceae* (ballena). Se han reportado algunos casos de infecciones con estas bacterias en humanos. (19, 34, 39, 86)

Por otro lado, existe controversia sobre la división de este género en seis o más especies. Se ha propuesto que el género *Brucella* esté conformado por una sola especie, *B. melitensis*, de la cual se derivarán biovariedades; esto, tomando como base los resultados de experimentos de hibridación ADN-ADN donde se ha descubierto una homología notable en el material genético de estas bacterias y la secuenciación del gen *16S RNA*, cuyos resultados indican que es imposible realizar la diferenciación de las especies a través de este método. Adicionalmente, en estudios de tipificación de la secuencia de inserción *IS711* y sobre el gen *omp2* se ha demostrado poca o ninguna diferencia entre *B. suis* y *B. canis*. Sin embargo, con el método de amplificación selectiva de fragmentos de ADN (AFLP por *Amplified Fragment Length Polymorphism*), se ha demostrado un polimorfismo significativo del ADN que permite la diferenciación de las especies y que justifica la

clasificación actual. De cualquier forma, en los terrenos prácticos se continúa utilizando la clasificación de seis especies. (19, 24, 40, 96)

Brucella melitensis causa una enfermedad altamente contagiosa en el ganado caprino y bovino pero también puede infectar al ganado vacuno y se le reconocen tres biovariedades. *Brucella suis* tiene cinco biovariedades y un rango de hospederos mayor al de otras especies del género, las biovariedades 1 y 3 infectan primordialmente al ganado porcino, la 2 causa infección en liebres salvajes europeas, la 4 es responsable de infecciones en renos y caribúes y la 5 fue aislada de roedores en la URSS; todas sus biovariedades pueden ser transmitidas al hombre con la posible excepción de la 2. (23, 89)

Brucella abortus infecta primordialmente al ganado vacuno, pero puede ser transmitido a búfalos, camellos, venados, perros, caballos, borregos y a los humanos; actualmente, se le reconocen ocho biovariedades. *B. canis* infecta a los perros y hasta el momento no se han reportado infecciones en otras especies animales, aunque sí en el ser humano; no se le han reconocido biovariedades y la cepa de referencia es la RM6/66. (23, 89)

B. ovis es responsable de infecciones en carneros y ovejas pero no infecta a otros animales ni al ser humano, las cabras son susceptibles a la enfermedad por infección experimental, y tampoco se le han reconocido biovariedades.

Tabla 1. Biovariedades y cepas de referencia de *Brucella sp* (23, 89)

Especie	Biovariedad	Cepa de referencia	Huésped	Origen Geográfico	Año de aislamiento
<i>B. melitensis</i>	1	16M	caprino	E. U. A.	Década de los 50s
	2	63/9	caprino	Turquía	Década de los 60s
	3	Ether	caprino	Italia	Década de los 60s
<i>B. abortus</i>	1	544	bovino	Reino Unido	1950-1960
	2	86/8/59	bovino	Reino Unido	1950-1960
	3	Tulya	humano	Uganda	1950-1960
	4	292	bovino	Reino Unido	1950-1960
	5	B3196	bovino	Reino Unido	1950-1960
	6	870	bovino	Africa	1950-1960
	7	63/75	bovino	Polonia	1950-1960
	9	C68	bovino	Reino Unido	1950-1960
	<i>B. suis</i>	1	1330	porcino	E. U. A.
2		Thomsen	sin dato	sin dato	sin dato
3		686	porcino	E. U. A.	1963
4		40/67	venado	Antigua U.R.S.S.	1967
5		513	sin dato	sin dato	sin dato
<i>B. canis</i>		RM6/66	canino	E. U. A.	1968
<i>B. ovis</i>		63/290	ovino	Australia	1963
<i>B. Neotomae</i>		5K33	rata de madera del desierto	E. U. A.	1968

La cepa de referencia de *B. ovis* es la cepa 63/290. *B. neotomae* infecta a la rata de la madera del desierto en condiciones naturales y no se han reconocido casos de infección de otras especies animales, ni se conocen biovariedades; la cepa de referencia es la 5K33. (23, 89)

B. Propiedades culturales y macroscopía

Los medios más utilizados para lograr el aislamiento primario de *Brucella* son el agar suero dextrosa y el agar triptosa con suero bovino al 5%. Cuando hay la posibilidad de que existan microorganismos contaminantes en la muestra, se recomienda usar medios selectivos tales como el BCYE selectivo, o los medios agar chocolate y agar suero dextrosa con antibióticos. La incubación correspondiente debe realizarse en un ambiente de 5 a 10% de CO₂ a 37°C. Los miembros de este género son microorganismos de crecimiento lento y en el aislamiento primario raramente se observan colonias antes de que transcurran 48 horas de incubación. (22)

Las colonias de *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. neotomae* presentan una superficie de aspecto liso y en cultivos subsecuentes pueden adquirir una morfología rugosa, mientras que a *B. ovis* y *B. canis* se les encuentra únicamente en forma rugosa. En el primocultivo, en agar suero dextrosa después de 48 h aparecen colonias con un diámetro aproximado de 0.5 a 1.0 mm, elevadas, convexas, con contorno circular y orillas enteras. Las colonias de cepas lisas presentan superficie brillante y un color amarillo pálido. En luz reflejada, estas colonias evidencian superficie lisa y brillante, son ligeramente opalescentes y de color azul grisáceo. (22)

Las colonias de cepas no lisas son de tamaño y forma similares a las de las lisas pero varían en color, consistencia y textura superficial. Las colonias rugosas son considerablemente menos transparentes que las lisas, con una superficie más granular y opaca, y su color puede ser blanco, blanco amarillento o café. Pueden presentarse también colonias con morfología intermedia entre la lisa y la rugosa y variantes mucoides que son similares a las colonias rugosas en color y opacidad. (22)

Los medios de cultivo más recomendados para la propagación de estas bacterias son: agar triptosa con suero bovino al 5%, agar suero dextrosa, agar suero infusión de papa, agar *Brucella* suero, agar chocolate, agar sangre de carnero al 5%, medio BCYE o BCYE selectivo. Los miembros de este género usualmente no desarrollan en agar MacConkey y EMB. (22, 65, 70, 82)

Es importante señalar que todos los cultivos que contengan alguna especie de *Brucella* deben manejarse en un gabinete de seguridad biológica, puesto que se recomienda trabajar con ellas bajo las especificaciones del nivel de bioseguridad III. (65, 70, 82)

C. Sustancias de superficie

La composición y estructura completa del lipopolisacárido de la membrana externa de *Brucella* aún no se han determinado completamente. En el caso de *B. abortus* se ha reportado que el lípido A está compuesto por glucosamina, ácido *n*-tetradecanoico, ácido *n*-hexadecanoico, ácido 3-hidroxitetradecanoico y ácido 3-hidroxihexadecanoico. El centro del lipopolisacárido de *B. abortus* está formado por ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-2-octulosónico, glucosamina y glucosa, pero las proporciones de estos azúcares aún no se establecen. (93)

Las determinantes antigénicas principales de los lipopolisacáridos de la membrana externa de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* se han designado con las letras A (por *abortus*) y M (por *melitensis*) y corresponden al antígeno O. Mediante el estudio del polisacárido O del lipopolisacárido de la membrana externa de *B. abortus* 1119-3 se comprobó que el antígeno A es un homopolímero lineal, sin ramificaciones, de unidades de 4-formamido-4,6-dideoximanosa (perosamina) unidas por enlaces α -1,2. El grado de polimerización promedia las 96 y las 100 subunidades. Estudiando al lipopolisacárido de la membrana externa de *B. melitensis* 16M se reveló que el antígeno M es también un polímero lineal sin ramificaciones de unidades de perosamina pero, a diferencia del antígeno A, está compuesto por una unidad pentasacárida que contiene una secuencia de unidades aminoglicosilo unidas por un enlace α -1,3 y cuatro enlaces α -1,2. (13, 14, 23)

Los antígenos A y M juegan un papel central en el diagnóstico de la brucelosis, ya que son antígenos inmunodominantes que pueden inducir respuestas con anticuerpos en la mayoría de los animales expuestos a cepas lisas de *Brucella*; la mayoría de las pruebas serológicas de diagnóstico están basadas en la detección de anticuerpos contra estos antígenos. Es importante señalar que dichas determinantes antigénicas pueden expresarse en grados diversos en la misma bacteria, por lo que es posible observar un alto grado de reactividad serológica cruzada entre algunas especies. El antígeno M predomina en proporción 20/1 en *B. melitensis* y el A predomina en proporción 20/1 en *B. abortus*, *B. neotomae* y *B. suis*. (13, 60, 82, 89)

El aspecto liso o rugoso de las colonias está asociado a los antígenos A y M: las colonias lisas presentan uno o ambos de estos antígenos, mientras que las rugosas no. En general, las cepas lisas pueden experimentar variaciones hacia el aspecto rugoso conforme se subcultivan, lo que se debe a una disminución de la expresión de genes codificadores de la glucosilación adicional de las fracciones polisacáridas del lipopolisacárido; ello trae como consecuencia la disminución en la virulencia y la menor reactividad con anticuerpos específicos dirigidos contra cepas lisas de *Brucella*. Se propone que las cepas rugosas son menos virulentas debido a dos causas: una mayor sensibilidad a la lisis mediada por complemento y su incapacidad para replicarse intracelularmente. (68)

B. canis y *B. ovis* no contienen antígenos A y M en su lipopolisacárido, existen únicamente en la forma rugosa y, a pesar de ello, son virulentos. Se ha confirmado la presencia de determinantes antigénicas únicas en el lipopolisacárido de *B. ovis*, pero en realidad aún no se conoce su estructura; tal es el caso del antígeno R que se utiliza en las pruebas de aglutinación con sueros inmunes específicos. En comparación con los lipopolisacáridos de membrana externa de las bacterias lisas, los de los microorganismos rugosos carecen de quinovosamina, tienen una concentración menor de manosa y glucosa, y una mayor proporción de 2-ceto, 3-dioxioctonato. Se ha comprobado que los sueros inmunes preparados contra lipopolisacáridos rugosos no reaccionan con los lisos ni con el lípido A de las bacterias lisas. También se ha demostrado la ausencia de reacciones cruzadas entre los lipopolisacáridos rugosos de *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, y *B. canis* en pruebas de identidad serológica. (68)

D. Pruebas de identificación

La identificación de *Brucella* en el laboratorio suele realizarse por medio de: pruebas bioquímicas, sensibilidad a los colorantes, susceptibilidad a la lisis por fagos y aglutinación con sueros inmunes específicos. Las biovariedades dentro de las especies se diferencian con base en combinaciones específicas de estas características. (22, 40, 65, 89)

En principio se debe verificar que las características microscópicas de las bacterias a identificar concuerden con las de este género bacteriano: cocobacilos, cocos o bacilos cortos, Gram negativos, de 0.5 a 0.7 μm por 0.6 a

1.5 μm , sin agrupación o formando acúmulos o cadenas cortas. Deben ser inmóviles, sin cápsula ni esporas. (89)

1. Principales pruebas bioquímicas

- a. Requerimiento de CO_2 : El cultivo se inocula por duplicado en agar suero dextrosa o agar triptosa, un tubo se incuba en condiciones de aerobiosis y el otro en atmósfera de 5 a 10 % de CO_2 . Un buen desarrollo en presencia y ausencia de CO_2 indica que no hay mayor dependencia a este gas, mientras que un buen crecimiento en presencia de CO_2 y poco o ningún desarrollo en condiciones de aerobiosis indican requerimiento de CO_2 . *B. abortus* generalmente requiere de CO_2 para desarrollar. (22, 65, 70)

- b. Producción de H_2S : La producción de ácido sulfhídrico se detecta al suspender una tira impregnada con acetato de plomo sobre un tubo con agar soya tripticasa (TSA) o agar suero dextrosa inoculado con el cultivo. La tira no debe entrar en contacto con el medio ni con las paredes del tubo de ensayo. El cultivo se incuba durante 4 ó 5 días y la tira se examina y se reemplaza diariamente. El ennegrecimiento de la tira por la formación de sulfuro de plomo indica la producción de H_2S . Con *B. abortus* y *B. canis* la prueba es positiva. (22, 65, 70)

Tabla 2. Diferenciación de *Brucella* mediante pruebas bioquímicas (22, 70, 89)

Especie	Biovariedad	Requerimiento de CO ₂	Producción de H ₂ S	Evidencia de hidrólisis de la urea
<i>B. abortus</i>	1	(+)	+	1-2 horas
	2	(+)	+	1-2 horas
	3	(+)	+	1-2 horas
	4	(+)	+	1-2 horas
	5	-	-	1-2 horas
	6	-	(-)	1-2 horas
	9	-	+	1-2 horas
<i>B. suis</i>	1	-	+	0-30 minutos
	2	-	-	0-30 minutos
	3	-	-	0-30 minutos
	4	-	-	0-30 minutos
	5	-	-	0-30 minutos
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	Variable
	2	-	-	Variable
	3	-	-	Variable
<i>B. ovis</i>		+	-	-
<i>B. canis</i>		-	-	0-30 minutos
<i>B. neotomae</i>		-	+	0-30 minutos

(+) = La prueba es positiva para la mayoría de las cepas.

(-) = La prueba es negativa para la mayoría de las cepas.

c. Hidrólisis de urea: Se utiliza un tubo con agar urea de Christensen, el cual se inocula con una suspensión densa de bacterias; la hidrólisis de la urea produce carbonato de amonio el cual confiere al medio un pH alcalino que vira el indicador del medio de amarillo a rosa. *B. suis* y *B. canis* generalmente producen pruebas positivas a los 5 minutos de incubación y *B. abortus* después de una o dos horas, mientras que el tiempo requerido por *B. melitensis* es variable. (70)

2. Pruebas de susceptibilidad a los colorantes

Se utilizan la fucsina básica y la tionina, generalmente a una concentración de 20 a 40 µg de colorante por mililitro de medio. Se debe probar que la concentración utilizada pueda diferenciar entre cultivos control de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*. El medio se prepara calentando una solución al 1% del colorante en baño María durante 20 minutos, se agrega después la cantidad necesaria de medio de cultivo (agar triptosa o TSA), se mezcla y se vierte en cajas Petri. (22, 70)

Por otro lado, se preparan suspensiones de cada cultivo a probar, así como del control, tomando una asada del cultivo y suspendiéndolo en 0.1 mL de solución salina estéril, procurando que la densidad sea similar en todos los casos. Las cajas se dividen en cuatro cuadrantes, se aplica una asada en cada uno y los cultivos se incuban con 10% de CO₂ a 37°C durante tres o cuatro días, antes

Tabla 3. Diferenciación de *Brucella* por susceptibilidad a la acción de colorantes (22, 70, 89)

Especie	Biovariedad	Crecimiento en presencia de tionina, 20 µg/mL	Crecimiento en presencia de tionina, 40 µg/mL	Crecimiento en presencia de fucsina básica 20 µg/mL
<i>B. abortus</i>	1	-	-	+
	2	-	-	-
	3	+	+	+
	4	-	-	(+)
	5	+	-	+
	6	+	-	+
	9	+	-	+
<i>B. suis</i>	1	+	+	(-)
	2	+	-	-
	3	+	+	+
	4	+	+	(-)
	5	+	+	-
<i>B. melitensis</i>	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	+	+
<i>B. ovis</i>		+	+	(-)
<i>B. canis</i>		+	+	-
<i>B. neotomae</i>		-	-	-

(+) = La prueba es positiva para la mayoría de las cepas.

(-) = La prueba es negativa para la mayoría de las cepas.

de examinarlos para ver si ocurre el desarrollo. La sensibilidad a estos colorantes se utiliza no solamente para efectuar la identificación de la especie, sino también resulta muy útil para determinar la biovariedad. (22, 70)

3. Prueba de susceptibilidad a la lisis por fagos

Un gran número de bacteriófagos puede replicarse dentro de la célula bacteriana del género *Brucella* causando su lisis posterior; en virtud de que dichos fagos no afectan a bacterias de otros géneros y la respuesta es variable entre cepas del género *Brucella*, el fenómeno resulta útil para identificar la especie a la que pertenece un cultivo, así como para distinguir entre las diversas biovariedades. Los bacteriófagos usados en estas pruebas pertenecen a la misma familia, *Pedoviridae*, morfotipo C1, y presentan una cabeza hexagonal con 55 a 80 nm de ancho y una cola no contráctil tubular de 14 a 33 nm de largo. (22, 47, 57, 89)

Los bacteriófagos de *Brucella* se dividen en cinco grupos con base en los hospederos que los alojan. El grupo uno, tipificado por la cepa Tbilisi (Tb), es capaz de replicarse únicamente en las células de *Brucella abortus* en fases lisas o intermedias y podrían lograr una replicación limitada en *B. neotomae* en cultivos lisos o intermedios; a altas concentraciones, puede producir la lisis de cultivos lisos o intermedios de *B. suis*. (22, 43)

El grupo dos comprende a los fagos tipificados por la cepa Firenze (Fi) 75/13, que se replican en cultivos de *B. abortus*, *B. neotomae* y *B. suis* en sus fases lisas e intermedias. El grupo tres incluye a los fagos tipificados por la cepa Weybridge (Wb) que se replican en los cultivos de *B. abortus*, *B. neotomae* y *B. suis* en sus fases lisas e intermedias. (22, 43)

El grupo cuatro comprende a los fagos Berkeley (Bk_0 , Bk_1 y Bk_2). Bk_2 , es el más útil, y puede replicarse en cultivos lisos de *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. neotomae* y *B. suis*. El grupo cinco está integrado por los fagos que causan lisis en cultivos rugosos y todos son derivados del fago R que actúa sobre los cultivos no lisos de *B. abortus*. El fago R/O lisa a *B. ovis* y algunas cepas de *B. abortus* y *B. suis* en fases lisas, pero no a *B. melitensis* ni a cultivos no lisos de *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. neotomae*, *B. suis* o *B. canis*. El fago R/M puede causar lisis en algunos cultivos rugosos de *B. melitensis* y el R/C actúa sobre *B. ovis*, *B. canis* y cepas no lisas de *B. abortus*. (22, 43)

El bacteriófago Izatnagar (Iz) se replica en cultivos lisos de *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus*, así como en algunos cultivos rugosos. (43)

Para llevar a cabo las pruebas de identificación se utilizan preparaciones de fagos estandarizados a la dilución rutinaria de prueba (RTD por *routine test dilution*), que se define como la concentración mínima que produce lisis total en la cepa de propagación; adicionalmente se puede efectuar la prueba con una concentración de 10,000 x RTD. Se toma un cultivo obtenido sobre agar suero dextrosa incubado durante 48 h y se suspende en 0.5 mL de solución salina estéril; la suspensión resultante debe tener una turbidez equivalente a 10^{10} células por mL. (22)

Tabla 4. Diferenciación de *Brucella* por sensibilidad a fagos (22, 70, 89)

Especie	Biovariedad	Lisis por fagos en RTD					
		Tb	Wb	Bk ₂	Fi	R/O	R/C
<i>B. abortus</i>	1	L	L	L	L	LP	NL
	2	L	L	L	L	LP	NL
	3	L	L	L	L	LP	NL
	4	L	L	L	L	LP	NL
	5	L	L	L	L	LP	NL
	6	L	L	L	L	LP	NL
	7	L	L	L	L	LP	NL
	9	L	L	L	L	LP	NL
<i>B. suis</i>	1	NL	L	L	LP	NL	NL
	2	NL	L	L	LP	NL	NL
	3	NL	L	L	LP	NL	NL
	4	NL	L	L	LP	NL	NL
	5	NL	L	L	LP	NL	NL
<i>B. melitensis</i>	1	NL	NL	L	NL	NL	NL
	2	NL	NL	L	NL	NL	NL
	3	NL	NL	L	NL	NL	NL
<i>B. ovis</i>		NL	NL	NL	NL	L	L
<i>B. canis</i>		NL	NL	NL	NL	NL	L
<i>B. neotomae</i>		NL o LP	L	L	L	NL	NL

L = Lisis

LP = Lisis Parcial

NL = No lisis

Con esta suspensión se inoculan cajas de Petri con medio TSA o agar suero dextrosa para obtener un desarrollo masivo en toda la superficie. Posteriormente, se aplican alrededor de 25 μ L de la preparación del fago al medio ya inoculado, permitiendo que sean absorbidos y las placas se incuban a 37°C revisándose a las 24 h de incubación y a intervalos posteriores, observando si se ha producido lisis de las bacterias. (22)

4. Pruebas de aglutinación con sueros inmunes específicos

Con esta prueba se detecta si las bacterias presentan los antígenos de superficie A o M, en el caso de colonias lisas, o el antígeno R en el caso de colonias rugosas. (22)

En primer lugar debe realizarse una prueba para determinar si se trata de cultivo de colonias lisas o rugosas. El crecimiento de 48 h obtenido sobre agar suero dextrosa se suspende en 0.5 mL de solución salina estéril; la suspensión resultante debe tener una turbidez equivalente a 10^{10} células por mL. Se coloca una gota de esta suspensión sobre un portaobjetos y se mezcla con una gota de solución acuosa de acriflavina al 0.1%. La ausencia de aglutinación indica que se trata de un cultivo liso. (22)

En el caso de los cultivos lisos, se realizan pruebas de aglutinación por separado -sobre portaobjetos-, mezclando durante un minuto una gota de la suspensión de bacterias y una gota de los sueros inmunes monoespecíficos para el antígeno A y el antígeno M, así como un suero usado como control negativo. Si el cultivo pertenece a una cepa lisa de *Brucella* se observará

aglutinación con alguno de los sueros A o M, pero no con el control negativo.

(22)

Tabla 4. Diferenciación de *Brucella* por aglutinación con sueros monoespecíficos (22, 70, 89)

Especie	Biovariedad	Aglutinación con antisuero monoespecífico		
		A	M	R
<i>B. abortus</i>	1	+	-	-
	2	+	-	-
	3	+	-	-
	4	-	+	-
	5	-	-	-
	6	+	-	-
	7	+	+	-
	9	-	+	-
<i>B. suis</i>	1	+	-	-
	2	+	-	-
	3	+	-	-
	4	+	+	-
	5	-	+	-
<i>B. melitensis</i>	1	-	+	-
	2	+	-	-
	3	+	+	-
<i>B. ovis</i>		-	-	+
<i>B. canis</i>		-	-	+
<i>B. neotomae</i>		+	-	-

Si se trata de un cultivo no liso, se realizan pruebas de aglutinación sobre portaobjetos, mezclando una gota de la suspensión de bacterias con una gota de suero anti-R; también se utiliza un suero como control negativo. Si el cultivo

pertenece a una cepa no lisa de *Brucella* se observará aglutinación con el suero anti-R. (22)

II. PATOLOGÍA Y PATOGENIA ASOCIADAS A LA BRUCELOSIS

A. Patología

La patología asociada a la brucelosis difiere de manera importante entre los humanos y los animales, ya que en estos últimos se trata primordialmente de una enfermedad abortiva resultante de una infección larga que muchas veces cursa sin sintomatología alguna; cabe señalar que los ratones representan una excepción, ya que no experimentan abortos y el proceso está caracterizado por la presencia de bacterias en bazo e hígado durante tiempos prolongados. (26)

Por su parte, la brucelosis humana tiene un periodo de incubación que fluctúa entre algunos días hasta varios meses y se trata de una enfermedad compleja que empieza con una infección sistémica a la que sigue el establecimiento bacteriano en sitios específicos (principalmente bazo, hígado, corazón, huesos y cerebro) en donde ocurren efectos deletéreos. (26)

Brucella se ubica en todo el mundo, pero la incidencia de enfermedad clínica en los seres humanos varía notablemente: mientras en algunos países está cercana su erradicación, en otros continúa siendo una afección endémica; por ejemplo, en Perú, Kuwait y Arabia Saudita se presentan más de 200 casos por cada 100,000 habitantes. (28)

Los seres humanos pueden infectarse con *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Brucella abortus* y, en casos raros, con *Brucella canis* y brucelas asociadas a mamíferos marinos. Sin embargo, la especie más frecuente y agresiva es *B. melitensis*; en general, la brucelosis deriva del contacto directo con animales infectados o con sus tejidos, aunque también destacan por su frecuencia la ingestión de productos contaminados (leche, quesos frescos, mantequilla, etc.) y la inhalación. (28, 56, 83, 86, 89, 104)

Al parecer, no existe predisposición en individuos con afecciones subyacentes ni se transmite de persona a persona. Así mismo, se han observado infecciones por *B. suis*. en esquimales y lapones que se alimentan de médula ósea cruda de renos y caribúes. (104)

La brucelosis está considerada como una enfermedad ocupacional importante, ya que afecta a ganaderos, granjeros, veterinarios y trabajadores de la industria del procesamiento de carne y de lácteos, e inclusive, es de las que más ocurren en el personal de laboratorio que trabaja con microorganismos, por lo que se recomienda que su manejo se lleve a cabo en condiciones de bioseguridad de nivel tres. El grado del riesgo varía con la especie y el número de bacterias que contiene el material contaminado; adicionalmente, la patología puede aparecer por exposición a las cepas atenuadas de las vacunas utilizadas para el ganado. (28, 56, 83, 89, 104)

Debido a su potencial para originar epidemias, la carencia de una vacuna para humanos y la capacidad de *Brucella* para transmitirse por vía aérea, se considera a este microorganismo como una potencial arma biológica. De hecho, en 1954 el ejército americano desarrolló investigaciones para utilizar a *Brucella suis* como arma biológica, pero los cambios políticos a nivel mundial, así como la Convención de Armas Biológicas y Tóxicas de 1972 dieron como resultado el abandono de este objetivo. (24, 57, 69)

La mayoría de las investigaciones referentes a la forma en que *Brucella* interactúa con las células del hospedero humano se enfocan a establecer la sobrevivencia de estas bacterias en el interior de los macrófagos, donde pueden persistir y replicarse durante periodos prolongados. Sin embargo, debe recordarse que las brucelas tienen la capacidad de infectar células fagocíticas profesionales y no profesionales, células epiteliales, tejido respiratorio, neuronas, tejidos reproductivos masculinos y femeninos, entre otros. La diseminación y multiplicación de *Brucella* en los nódulos linfáticos, bazo, hígado, hueso, glándulas mamarias y órganos sexuales suele ocurrir a través de macrófagos. (24, 57)

En los seres humanos la bacteria no muestra una preferencia por el sistema reproductivo femenino ni las glándulas mamarias, tal como sucede en los animales; se cree que esto puede estar relacionado con la baja concentración de eritrol en las secreciones genitales humanas. (28)

Clasificación de la brucelosis

La brucelosis se divide generalmente en subclínica, aguda, subaguda y crónica. La enfermedad subclínica es asintomática y sólo se llega a detectar en forma incidental; la brucelosis aguda tiene una duración de hasta tres meses y la subaguda de tres a doce meses, ambas pueden presentarse de forma leve y autolimitada o ser fulminantes con complicaciones severas. La brucelosis crónica se caracteriza por una permanencia de un año o más. Las infecciones localizadas se observan tanto en pacientes con enfermedad aguda como en los que padecen la crónica. (94)

La brucelosis crónica ocurre en dos formas: la específica y la inespecífica; en la primera se presentan síntomas y signos fácilmente atribuibles a los efectos tardíos de la brucelosis, mientras que en la inespecífica no existen signos distintivos sino varios malestares generales semejantes a los que se presentan durante la infección aguda (insomnio, anorexia, náuseas, nerviosismo, depresión, taquicardia, palpitaciones, síncope, disnea, debilidad, indigestión, dolor de cabeza, etc.). (102)

En las recaídas los síntomas semejan a los de la enfermedad inicial pero de forma más severa y se presentan generalmente a los dos o tres meses de haberse completado el tratamiento con antibióticos. Dichas recaídas son difíciles de distinguir de la reinfección. (94)

Síntomas y signos de la brucelosis

El periodo de incubación del padecimiento fluctúa entre cinco días y varios meses y el inicio de los síntomas puede ser brusco o gradual. Es importante hacer notar que ninguno de los síntomas de la brucelosis es lo suficientemente específico para sustentar el diagnóstico y que la fiebre es el síntoma y signo más común, si bien puede presentarse de forma constante o ser intermitente, de tal forma que la temperatura desciende casi hasta la normal en la mañana y se eleva durante la tarde (fenómeno que determinó su nombre de fiebre ondulante). La fiebre puede presentarse en pacientes con enfermedad aguda o crónica y generalmente se acompaña de escalofríos. (94,104)

Los individuos infectados pueden presentar síntomas muy diversos que involucran a distintas partes del organismo, destacando los siguientes (24, 26, 56, 74, 94, 102):

- Síntomas constitucionales como anorexia, astenia, fatiga, debilidad, malestar, dolores generalizados y sudoración profusa. En ocasiones la enfermedad es severamente debilitante y provoca incapacidad para realizar las actividades normales.
- Síntomas que involucran articulaciones y huesos, como artralgias, dorsalgia, dolor en los huesos, en la baja espalda o en la espina

dorsal e inflamación de las articulaciones. Este tipo de afectaciones son muy frecuentes.

- Síntomas neuropsiquiátricos, tales como depresión, fatiga, insomnio, cefalea, irritación y nerviosismo, así como manifestaciones neurológicas entre las que destacan debilidad, mareo, inestabilidad al caminar y retención urinaria. Aún cuando la afectación directa del sistema nervioso es poco común estos síntomas son bastante frecuentes.
- Síntomas gastrointestinales como dolor abdominal, constipación, diarrea y vómito.
- Síntomas respiratorios, ya que ocasionalmente se presentan tos y disnea los cuales raramente se asocian a una infección activa en pulmones.
- Impotencia sexual.

Las lesiones localizadas también pueden encontrarse en distintas partes del organismo, figurando las regiones señaladas a continuación (1, 24, 28, 57, 78, 85, 86, 104):

- Articulaciones, siendo las más afectadas las de rodillas, cadera y hueso sacro-ilíaco.
- Hígado (hepatomegalia, abscesos, hepatitis granulomatosa).
- Bazo (esplenomegalia, abscesos).
- Sistema respiratorio (efusión pleural).
- Sistema nervioso central (paraparesia, radiculopatía, meningitis, pérdida del oído).
- Sistema genitourinario masculino (prostatitis, epididimitis, orquitis, epididimoorquitis, que pueden tener como consecuencia oligospermia o aspermia).
- Sistema reproductivo femenino (salpingitis, abscesos en ovarios, abscesos en la glándula de Bartholin y aborto).

Existen varios casos documentados en cuanto a que los signos asociados a la enfermedad llegan a prolongarse por más de treinta años. En gente con tendencia a la neurosis, la brucelosis puede repercutir en la personalidad, incrementando la irritabilidad, el nerviosismo y la inestabilidad emocional o provocando depresión severa. (102)

Las tablas 5 y 6 resumen los síntomas y signos encontrados en estudios a gran escala llevados a cabo en regiones donde la brucelosis es endémica (Arabia Saudita, Turquía, Iran, Líbano y Grecia).

Tabla 5. Principales síntomas encontrados en pacientes con brucelosis (32, 59, 90).

Síntomas	Porcentaje	Pacientes estudiados
Fiebre	95.4%	166
	78.3%	138
	79.2%	159
Malestar	96.3%	166
Sudoración	91.7%	166
	72.5%	138
Vómito	5.7%	159
Anorexia	3.8%	159
Artralgia	70.4%	159
	77.5%	138
Dolor en huesos	48.4%	159
Dolor abdominal	11.3%	159

Tabla 6. Principales alteraciones detectadas en pacientes con brucelosis (4, 32, 42, 59, 79, 90, 92).

Signos	Porcentaje	Pacientes estudiados
Efusión pleural	2.8%	251
Complicaciones pulmonares	2.1%	138
Aumento de tamaño de los nódulos linfáticos periportales	9.2%	251
Linfadenopatía	1.3%	159
Esplenomegalia	8.4%	251
	3.8%	159
	51%	144
	36.2%	138
	59.6 %	166
Hepatomegalia	6%	251
	1.3%	159
	26.8%	138
	25%	144
	37.6%	166
Hepatitis	0.7%	138
Abscesos en el bazo	1.6%	251
Quistes en el bazo	0.8%	251
Apendicitis aguda	0.8%	251
Colecistitis acalculosa aguda	0.4%	251
Colecistitis	2%	144
Artritis periférica	9.2%	469
Complicaciones osteoarticulares	42%	144
	28%	88
	25%	63
	46.4%	138
Sacroilitis	6%	469
Espondilitis	6.8%	469
	44%	88
Endocarditis	0.6%	469
	1.5%	138
Complicaciones neurológicas	0.6%	469
Meningitis	3.6%	138
Epididimoorquitis	10.9%	267
	7.5%	138
	2%	101

B. Patogenia

Las bacterias del género *Brucella* son capaces de infectar a los seres humanos durante periodos prolongados, ya que pueden alojarse en el interior de los macrófagos, evitando los mecanismos de destrucción de estos fagocitos y replicándose en su interior. Las bacterias penetran a los macrófagos al interactuar directamente con la superficie celular o con anticuerpos específicos y, una vez en su interior, se localizan en vesículas de la vía endocítica que interactúan con los componentes tempranos y tardíos del proceso, hasta fusionarse con los lisosomas, lo cual suele dar lugar a la destrucción de las bacterias. Sin embargo, la vía endocítica se interrumpe en algunas vesículas, ya que la fusión fagolisosomal no se lleva a cabo, lo que permite que la bacteria sobreviva. Estas vesículas o fagosomas modificados se conocen como fagosomas de replicación o brucelomas; en ellos la sobrevivencia y reproducción de estas bacterias tienen lugar, aún cuando deben soportar la escasez de nutrientes, microaerobiosis y la interacción con especies reactivas de oxígeno. Lógicamente, al no formarse el fagolisosoma la bacteria está a salvo de la exposición a hidrolasas, lipasas y defensinas. (10, 17, 24, 28, 53, 58, 67, 81, 83)

Es importante mencionar que, en los macrófagos, las vesículas que contienen a las bacterias no interactúan en ningún momento con los compartimentos de la vía autofágica como sucede en otros tipos celulares tales como las células epiteliales.

(17)

El modo en que se forma el brucelosoma en los macrófagos aún no se conoce en su totalidad, aunque hasta el momento se han sugerido dos propuestas que parecen depender de la vía de entrada de la bacteria. (10, 67)

1. Interacción directa brucela-macrófago

Se ha propuesto que *Brucella* interactúa de manera directa con la membrana celular del macrófago a través de microdominios conocidos como balsas lipídicas. Éstas presentan cantidades significativas de proteínas, glicosilfosfolípidos y colesterol anclados a glicosilfosfatidilinositol y al parecer cumplen alguna función en la transducción de señales y participan en la internalización y la replicación intracelular de la bacteria. (10, 24, 57, 67, 95)

Se ha observado que *B. abortus* entra en contacto con la superficie del macrófago y navega durante varios minutos sobre la superficie celular siguiendo la agitación generalizada debida a la repetida re-estructuración de la membrana, hasta que resulta englobada por macropinosomas que contienen componentes asociados a las balsas lipídicas. Dicho proceso es denominado “internalización por nado” (*swimming internalization*). (55, 95)

Aparentemente, la formación del brucelosoma ocurre de la siguiente manera: una vez en el interior del macrófago, la bacteria se encuentra en una vesícula con pH ácido que interacciona con los componentes tempranos de la vía endosomal y se encamina hacia el retículo endoplásmico como parte de un proceso celular normal.

En ese momento la bacteria actuaría para efectuar modificaciones que interrumpen la vía endosomal. La vesícula interacciona y se fusiona con el retículo endoplásmico, adquiriendo en su membrana ciertos componentes originados en dicho compartimento, inclusive, en ocasiones tiene adosados algunos ribosomas. El pH del interior de la vesícula se eleva, tornándose menos agresivo para la bacteria y generando por ello condiciones para la replicación bacteriana. Los fagosomas de replicación no interaccionan con los componentes tardíos de la vía endocítica ni se fusionan con los lisosomas. (10, 17, 24, 57, 67, 83) (Véase la figura 1)

El pH ácido de la vesícula estimula la expresión de los genes bacterianos que conforman al operón *virB*, el cual codifica para un sistema de secreción tipo IV que transloca a una o varias moléculas efectoras hacia la célula hospedera o la membrana vesicular, mismas que podrían tener alguna influencia sobre el retículo endoplásmico. Las interacciones de fusión entre la vesícula y el retículo endoplásmico dan como resultado una acreción membranosa que permite la replicación de las bacterias en vacuolas individuales. (17, 67)

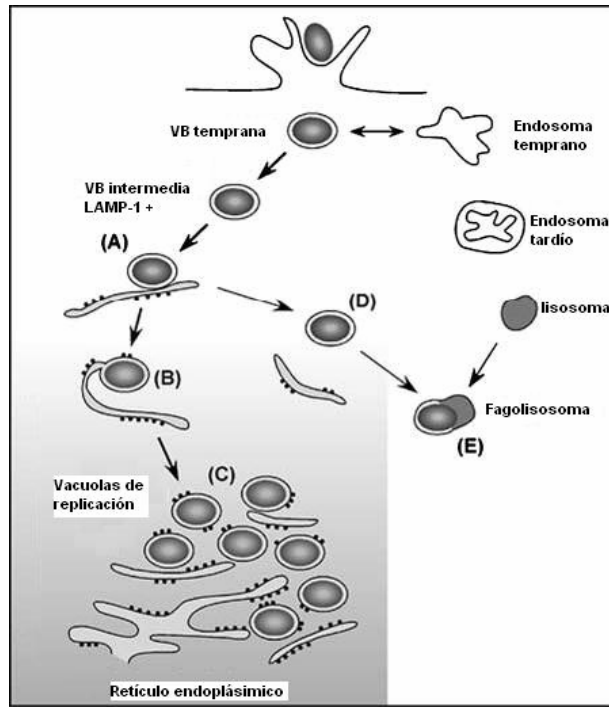


Figura 1. Modelo de la evasión de *Brucella* a los mecanismos de destrucción del macrófago. Al entrar las bacterias se encuentran en vacuolas (VB) que interactúan con los endosomas tempranos. Estas vacuolas tempranas evitan interacciones posteriores con la vía endocítica, sin embargo adquieren LAMP-1 y se encuentran rodeadas por o en contacto cercano con el retículo endoplásmico (A); estas interacciones persisten a través del tiempo y conduce a eventos limitados de fusión (B), generando finalmente un organelo derivado del retículo endoplásmico que permite la replicación de las bacterias (C). En este estudio una bacteria mutante con defecto en el operón *virB* no puede sostener interacciones con el retículo endoplásmico (D) y se fusiona con los lisosomas (E). (17)¹

En los fagosomas de replicación se ha detectado al marcador LAMP-1, que corresponde a la fracción tardía de la vía endocítica; sin embargo, se ha excluido la naturaleza endosomal tardía del compartimento de replicación, ya que se ha demostrado la ausencia de reclutamiento de Rab7 (molécula que contribuye en el control de la fusión de los organelos); se cree que los brucelomas adquieren al marcador LAMP-1 debido a la interacción de la vesícula con algunos

¹ En las figuras que incluyen elementos textuales, estos han sido traducidos.

compartimentos que contienen a este marcador pero que son distintos a los organelos endocíticos tardíos. (17)

2. Interacción mediada por anticuerpos IgG específicos

Los niveles de IgG anti-*Brucella* se elevan durante las primeras etapas de la infección, aunque no existe correlación entre la aparición de esta respuesta y la resolución de la infección, ya que el microorganismo puede mantener infecciones persistentes a pesar de la producción de altos niveles de anticuerpos contra él; de hecho, las concentraciones elevadas de IgG son consideradas como indicador de infecciones activas por *Brucella* tanto en animales como en humanos. Las IgGs parecen promover la infección, aportando a las bacterias un medio rápido para ingresar a los macrófagos. (10, 83)

A partir de experimentos realizados con *B. abortus* 2308 en monocitos humanos THP-1 se ha propuesto el siguiente mecanismo de formación de los fagosomas de replicación: las bacterias opsonizadas son fagocitadas rápidamente y, una vez englobadas, los componentes de la membrana plasmática son removidos de los fagosomas nacientes. Éstos adquieren de forma temporal algunos componentes de membrana asociados a los endosomas tempranos, tales como EEA1, Rab5 y TfR. Posteriormente, estos componentes dejan de formar parte de la membrana del fagosoma y éste adquiere al marcador LAMP-1 asociado a los endosomas tardíos y simultáneamente se acidifica gracias a la activación de una ATPasa. Después, el pH interno del fagosoma se eleva hasta valores de alrededor de 6,

aunque aún se desconoce el mecanismo que desencadena este hecho. El aumento del pH corresponde en tiempo al inicio de la replicación de la bacteria, lo que es consistente con las observaciones de que estas bacterias únicamente son capaces de replicarse cuando se cultivan en pHs mayores de 5. La fusión con el lisosoma no se lleva a cabo, por lo que las bacterias pueden vivir y replicarse en el interior de los fagosomas. Se ha encontrado que estos fagosomas no contienen marcadores específicos del retículo endoplásmico y que se encuentran próximos a algunas estructuras del retículo endoplásmico pero físicamente separados de ellas. Si al ser opsonizada *B. abortus* 2308 su nicho principal consiste en un fagosoma carente de componentes del retículo endoplásmico –como se plantea en este estudio–, el alojamiento bacteriano en un compartimento rico en componentes del retículo endoplásmico no representaría un requerimiento absoluto para la sobrevivencia y replicación de *Brucella*. (10, 55) (Véase la figura 2)

3. Formación del fagosoma de replicación en fagocitos no profesionales

Estudios realizados en fagocitos no profesionales muestran que *B. abortus* sobrevive en fagosomas de replicación que se forman merced a interacciones con componentes de la vía autofágica: las bacterias invaden a las células hospederas y son contenidas en vacuolas que parecen endosomas tempranos, las cuales se fusionan rápidamente con autofagosomas tempranos derivados del retículo endoplásmico rugoso. Posteriormente, las vesículas adquieren una ATPasa vacuolar y a la proteína de membrana asociada a los lisosomas LAMP-1,

maduran a autofagosomas tardíos, inhiben su fusión a los lisosomas y, finalmente, se convierten en vacuolas de replicación. (25, 55, 67)

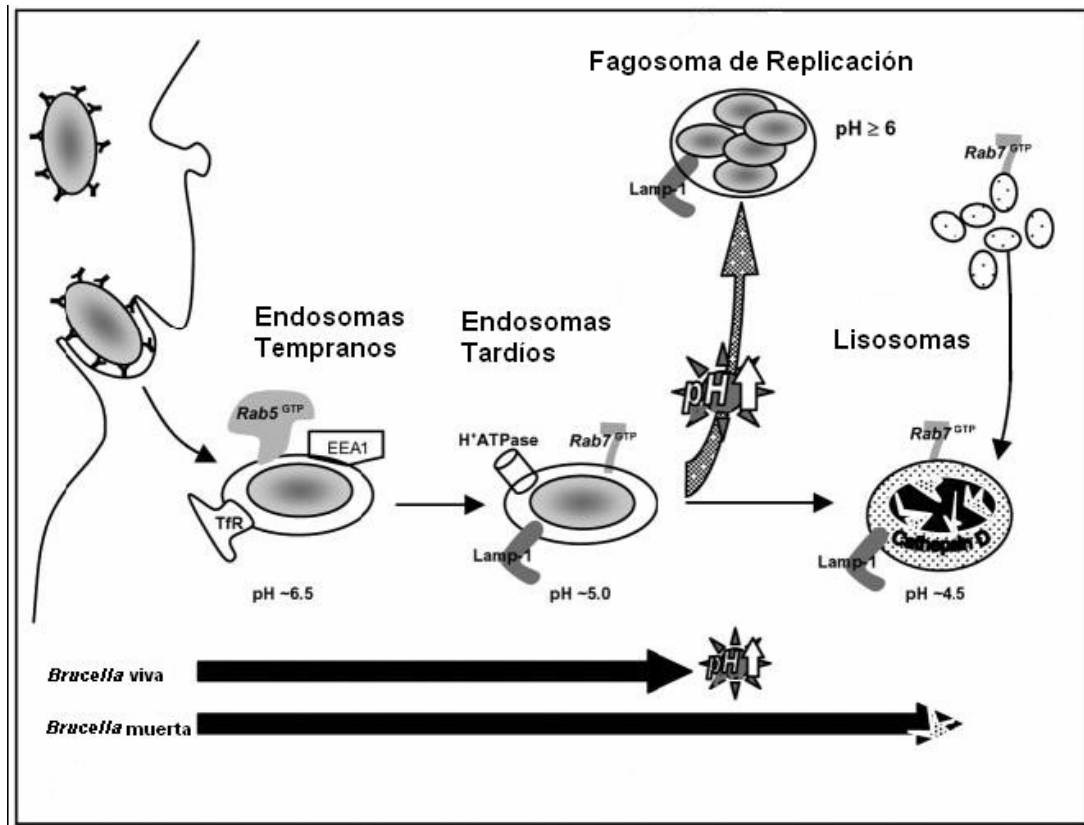


Figura 2. Tráfico intracelular de *B. abortus* 2308 opsonizada con IgG en la línea celular humana de monocitos THP-1. Las flechas negras en la parte baja denotan hasta qué punto de la vía endolisosomal progresan los fagosomas que contienen a la bacteria, viva o muerta. Todas las bacterias, tanto viables como no viables fueron transportadas a través de compartimentos endosomales tempranos y tardíos, pero mientras las bacterias viables y virulentas se replicaron en fagosomas con pH de alrededor de 6, positivos para LAMP-1 y negativos para cathepsina D, los fagosomas que contenían bacterias no viables (muertas por calor) se fusionaron con los lisosomas. (10)

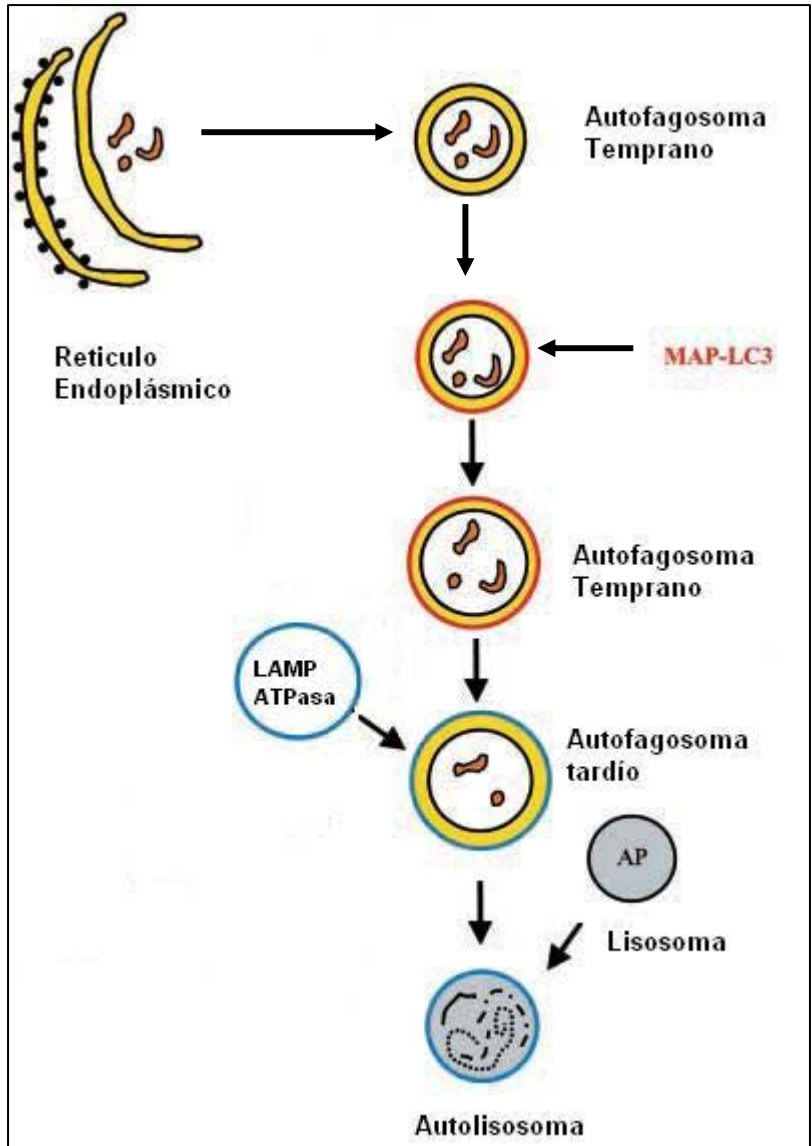


Figura 3. Eventos de la autofagocitosis. Respondiendo a una señal endógena o ambiental se forma un autofagosoma a partir del retículo endoplásmico rugoso. Este autofagosoma temprano adquiere MAPLC3 y proteínas de membrana lisosomales incluyendo la ATPasa vacuolar y LAMP-1 convirtiéndose en un autofagosoma tardío que no contiene enzimas hidrolíticas. El autofagosoma tardío se fusiona con el lisosoma que contiene proteinasas ácidas.

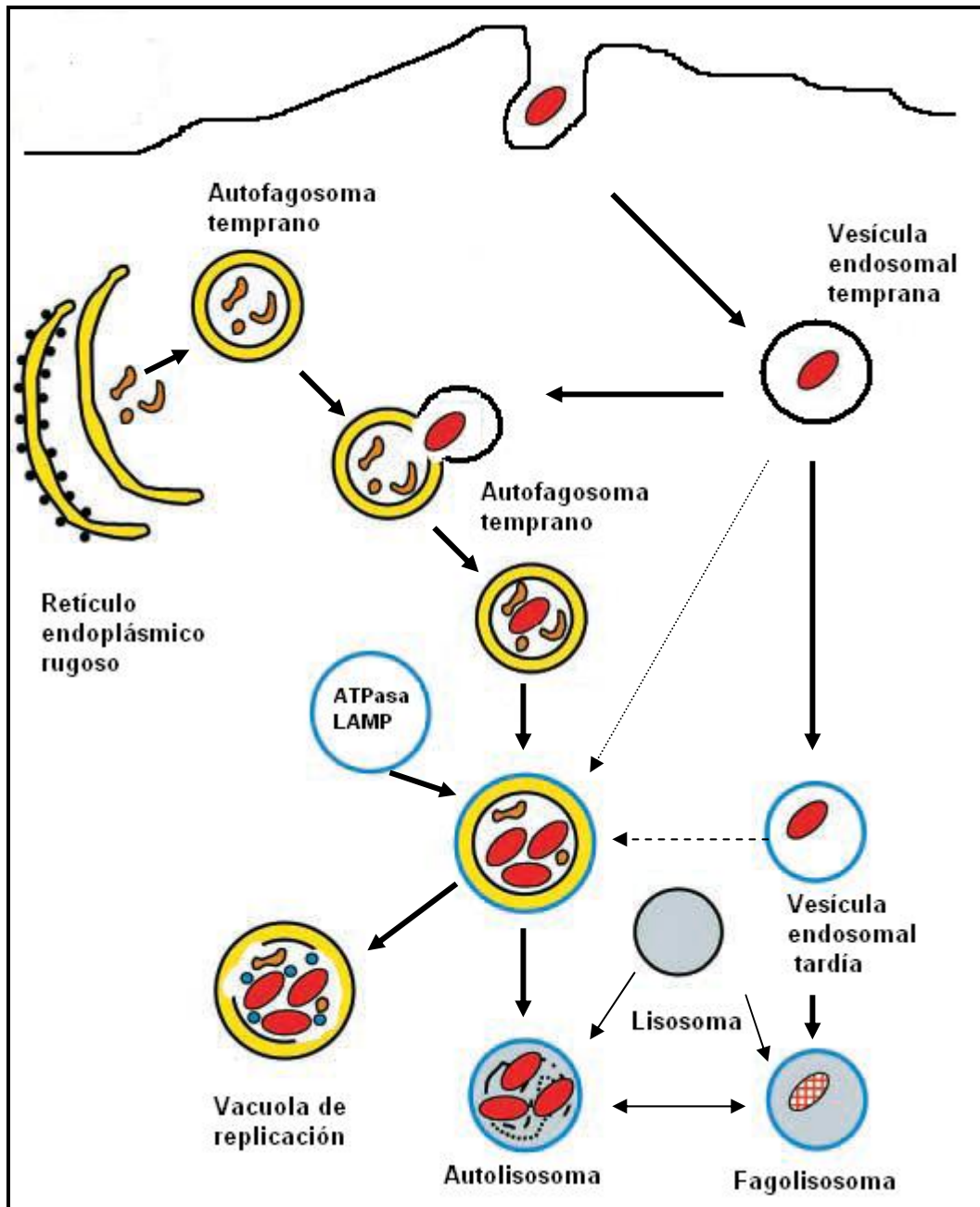


Figura 4. Modelo propuesto de la infiltración bacteriana en la vía autofágica. Después de la invasión las bacterias se encuentran en el interior de vacuolas parecidas a los endosomas tempranos; estas vacuolas se fusionan con autofagosomas tempranos. El autofagosoma temprano adquiere la ATPasa vacuolar y proteínas de membrana asociadas al lisosoma (LAMP) pero no proteinasas ácidas, madurando a autofagosomas tardíos. Se sugiere que *B. abortus* se replica en una vacuola parecida a un autofagosoma tardío que ha perdido la ATPasa vacuolar y LAMP-1.

III. PRINCIPALES FACTORES DE VIRULENCIA DEL GÉNERO *Brucella*

A partir del análisis de los genomas de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* se ha logrado confirmar la ausencia de secuencias funcionales para la mayoría de los factores de virulencia “clásicos”, de islas de patogenicidad, e inclusive, de los grupos de genes que codifican para sistemas de secreción de los tipos I, II y III.

(51, 55, 69)

Adicionalmente, se han identificado segmentos del ADN en los que reside la expresión de componentes putativos de la flagelina, pero su respectiva funcionalidad se ha puesto en duda, ya que estos microorganismos son inmóviles. De hecho, las bacterias del género *Brucella* no muestran factores de virulencia clásicos tales como cápsulas, fimbrias, flagelos, exotoxinas, exoproteasas u otras exoenzimas, citolisinas, formas de resistencia, variación antigénica, plásmidos o fagos lisogénicos, por lo que se acepta que su patogenicidad se relaciona directamente con su capacidad para proliferar en el interior de las células fagocíticas profesionales y no profesionales; lógicamente, su capacidad para evadir los mecanismos de defensa del hospedero al establecerse en el interior de los macrófagos le permite ocasionar infecciones crónicas.(51, 55, 69)

En resumen, hasta el momento no se ha logrado comprender del todo a los factores de virulencia de este género bacteriano, pero entre los más conocidos destacan: el lipopolisacárido de la membrana externa, el sistema de dos componentes *bvrS/bvrR*, el operón *virB*, el gen *bacA*, el gen *hfq*, la enzima superóxido dismutasa, los β -1,2-cicloglucanos, el operón *cydAB* y los genes *purE* y *aroC*. (24, 51, 55, 69)

A. El lipopolisacárido de la membrana externa

La estructura de este factor aún no se ha determinado completamente. En las cepas lisas, se compone de un lípido A, un centro y un polisacárido O; a su vez, el esqueleto del lípido A está formado por un disacárido de diaminoglucosa (2,3-diamino, 2-3-dideoxiglucosa), unido por un enlace β -1,6, que puede presentarse fosforilado en la posición 1, o bien, bifosforilado, en las posiciones 1 y 4'. El disacárido tiene cuatro ácidos grasos unidos por enlaces amida, los cuales tienen un hidroxilo en la posición 3. El lípido A puede contener hasta tres ácidos grasos adicionales con enlaces aciloxiacil. (23, 38, 40, 52)

Por su parte, el centro del lipopolisacárido de la membrana externa de *B. abortus* contiene glucosa, manosa y quinovosamina y parece contener ácido 2-ceto-3-deoxi-D-mano-2-octulosónico (Kdo) como único azúcar ácido. (23, 40, 52)

Finalmente, el polisacárido O corresponde a una cadena compuesta por un homopolímero de aproximadamente 100 residuos de N-formil-perosamina (4-

formamido-4,6-dideoximanosa) enlazados predominantemente α -1,2 en cepas cuyo epítipo dominante es A y con secuencias de cuatro enlaces α -1,2 y un enlace α -1,3 en cepas con epítipo dominante M. La diferencia en el enlace influye sobre la forma de los epítipos: el A es de forma cilíndrica y el M es enroscado; las cepas que reaccionan con sueros dirigidos contra los dos epítipos producen lipopolisacáridos de ambos tipos en proporciones similares. La presencia de N-formil-perosamina en el lipopolisacárido es responsable de la reacción antigénica cruzada con los lipopolisacáridos de *Escherichia hermanni* y *Escherichia coli* O:157, *Salmonella* O:30, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio cholerae* O:1, y *Yersinia enterocolitica* O:9. (23, 38, 40, 52)

La estructura del lipopolisacárido de las cepas rugosas es básicamente igual a la del lipopolisacárido liso, excepto que la cadena O está ausente o reducida a unos pocos residuos. Por lo tanto, la especificidad del lipopolisacárido rugoso es determinado en gran medida por los azúcares del centro. (23, 52)

Comparado con el lipopolisacárido enterobacteriano, el lipopolisacárido liso de *Brucella* muestra una actividad biológica baja y propiedades poco usuales: resistencia a péptidos catiónicos bactericidas, baja activación del complemento, baja estimulación de las células que disparan la red de citocinas y baja pirogenicidad. (51, 52, 67)

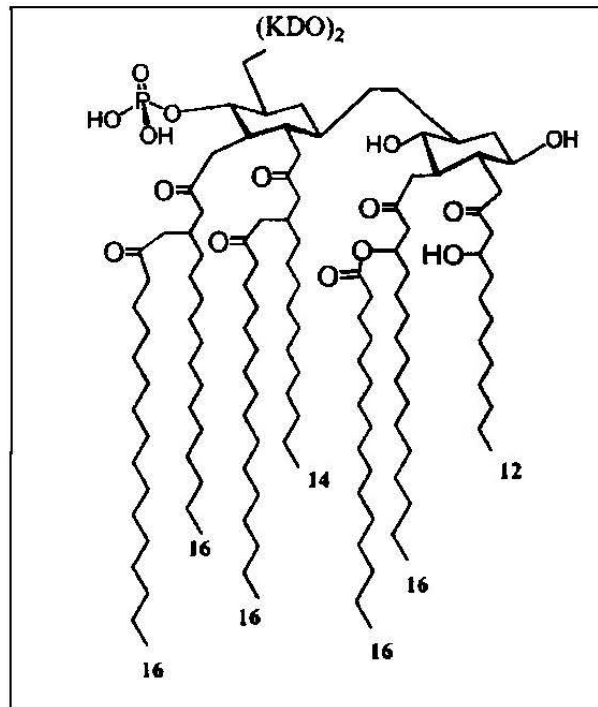


Figura 5. Una forma del Lípido A de *Brucella abortus* 2308. (52)

Además, es un inductor pobre de interferón gamma y de factor de necrosis tumoral, características que reflejan un alterado patrón molecular asociado al patógeno (PAMP por *pathogen-associated molecular pattern*) y propiedades de la membrana externa distintas a las de numerosas bacterias Gram negativas. Este PAMP alterado no es fácilmente reconocido por el sistema de inmunidad innata y se trata de una característica constitutiva del lipopolisacárido de *Brucella*, no una propiedad adaptativa modulada por el ambiente. (51, 52, 67)

Si bien aún se desconoce con exactitud la función del lipopolisacárido liso en la patogénesis, hasta el momento se han sugerido seis mecanismos en que podría participar como factor de virulencia:

1. Mediación del transporte bacteriano hacia el interior de los macrófagos y participación en la formación del brucelosoma. En este sentido, parece ser que el lipopolisacárido liso modula el transporte intracelular interactuando con las balsas lipídicas de la superficie del fagocito, cuando la internalización se lleva a cabo por interacción directa entre éste y el bacilo. Cabe subrayar que las mutantes rugosas de *B. suis* no entran a las células hospederas utilizando balsas lipídicas, tal como se ha observado que sí lo hacen las cepas lisas. (7, 51, 53, 83)

Por otro lado, el polisacárido O modula de manera importante la conducta temprana de *B. suis* en el interior de los macrófagos: se ha demostrado que esta cadena está involucrada en la inhibición de la fusión temprana entre los fagosomas que contienen a la bacteria y los lisosomas; en contraparte, los fagosomas que incluyen mutantes rugosas (las cuales no expresan dicho polisacárido O) se fusionan rápidamente con los lisosomas. (7, 51, 53, 83)

2. Protección contra la lisis mediada por el complemento y actividad biológica reducida. Tal como se ha mencionado anteriormente, las cepas rugosas de *Brucella*, las cuales no presentan polisacárido O, o bien, lo contienen en escasas cantidades, son notablemente menos virulentas que las clonas lisas, menos resistentes al ataque del sistema complemento y sensibles a la polimixina B. El lipopolisacárido de *Brucella* es poco inmunogénico en comparación con el de otras bacterias y no activa el sistema complemento por la vía alterna. Es importante agregar que, para inducir la producción de interferón, se requiere una cantidad

diez veces mayor de lipopolisacárido de *Brucella* que de endotoxina enterobacteriana, lo que implica una baja actividad biológica que podría contribuir a la sobrevivencia del bacilo en el interior de las células fagocíticas. (33, 38, 51, 57, 77, 83)

Las mutantes rugosas de *B. abortus* no sintetizan antígeno O y su virulencia es pobre. Sin embargo, es preciso señalar que *B. ovis* y *B. canis* son rugosas de manera natural y resultan muy virulentas para sus hospederos naturales, lo cual sugiere que el lipopolisacárido liso de *Brucella* no es el único factor necesario para la virulencia. (33, 51, 57, 77, 83)

3. Regulación negativa de la respuesta inmunológica de tipo celular en el hospedero. A este respecto, se ha demostrado recientemente que el lipopolisacárido liso de *B. abortus* 2308 tiene actividad inmunomoduladora: aunque no es degradado por los fagocitos, sí resulta transportado hacia la superficie celular, en donde forma macrodominios con las moléculas de MHC clase II. Este complejo LPS-MHC II interfiere la presentación de antígenos y se traduce en una menor capacidad para activar células T CD4⁺ con especificidad para antígenos de *Brucella*. Se ha comprobado ampliamente que la inmunidad celular es necesaria para controlar y resolver las infecciones por *Brucella*, por lo que es fácil inferir que la capacidad de esta bacteria para disminuir o abatir la respuesta inmunológica celular podría beneficiarla en sus esfuerzos por mantener residencias prolongadas en el nicho intracelular. (67, 83)

4. Modificaciones del lípido A. Ciertas bacterias Gram negativas tienen la capacidad de modificar su lípido A como parte de las estrategias asociadas a la patogénesis; el caso mejor estudiado es el de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, cuyo lípido A se modifica en respuesta a señales provenientes del hospedero, proceso modulado por un sistema regulador de dos componentes que controla a más de cuarenta genes. (63, 83)

En *Brucella*, así como en el patógeno intracelular *Legionella*, el lípido A es altamente hidrofóbico, debido principalmente a la presencia de ácidos grasos de cadena muy larga que es probable que confieran mayor estabilidad a la membrana externa, lo cual aparenta representar una ventaja adaptativa para el parasitismo intracelular. Los efectos fenotípicos de los cambios en el lípido A en bacterias con mutaciones en *bacA* o *bvrS/bvrR* respaldan esta hipótesis, ya que dichos microorganismos presentan sensibilidad a los péptidos catiónicos. De ello se infiere que sufren alteraciones en la estructura de la membrana externa. (63, 83)

Por otro lado, el lípido A de *Brucella* también presenta una actividad biológica reducida, lo que contribuye a la virulencia por la pobre respuesta inflamatoria que desencadena durante las primeras etapas de la infección. (63, 83)

5. Resistencia a los péptidos catiónicos. La información genética disponible evidencia que *Brucella* es única entre las α -proteobacterias: el centro de su lipopolisacárido carece de todos los grupos cargados negativamente -con

excepción del Kdo-; es decir, en este aspecto se diferencia notablemente de otras bacterias Gram negativas, las cuales suelen presentar una alta densidad de grupos con carga negativa en el centro. Ello en parte explica su resistencia a los péptidos bactericidas, ya que también gravita el hecho de que la estructura del centro crea un impedimento estérico que previene que los péptidos policatiónicos lleguen hasta el Kdo y otros grupos cargados negativamente en el lípido A. (38, 52)

6. Prevención de la muerte de los macrófagos infectados. Se sabe que *Brucella* inhibe la muerte celular programada de los macrófagos infectados, pero aún no se ha dilucidado cómo lo consigue; existe un estudio que sugiere que el polisacárido O podría contribuir en ello, puesto que al cultivar macrófagos infectados con *Brucella melitensis* en condiciones que favorecen el desencadenamiento de la apoptosis, se observó la muerte de la mayoría de los macrófagos infectados con una mutante rugosa, mientras que de los infectados con una cepa lisa solo una cantidad menor resultó afectada. (33, 67)

B. El sistema de dos componentes *bvrR-bvrS*

Para lograr sobrevivir en diversos nichos, las bacterias deben enfrentar una multitud de condiciones ambientales y adaptarse a ellas, para lo cual es necesaria la modulación de la expresión de sus genes como respuesta a los estímulos que reciben del exterior. En numerosos casos, la regulación de la expresión génica se lleva a cabo vía sistemas de transducción de dos componentes conformados por sensores y reguladores. (62)

En tal sentido, el análisis genómico de las especies *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis* ha redituado en la localización del sistema de dos componentes *bvrS/bvrR*, cuyos genes se han detectado mediante PCR en todas las biovares de las especies clásicas de *Brucella*, así como en diversas cepas aisladas de mamíferos marinos. (57, 62, 63)

A través del análisis genómico comparativo se ha demostrado que el sistema BvrS/BvrR de *Brucella* es homólogo al aparato regulador de dos componentes ChvG/ChvI de *Agrobacterium tumefaciens* (esencial para la formación de tumores en plantas) y al ExoS/ChvI de *Sinorhizobium meliloti* (necesario para el establecimiento y mantenimiento del estado simbiótico); ambos sistemas están involucrados en la modulación de las propiedades de la superficie celular, específicamente en la composición proteínica de la membrana externa y en las modificaciones del lípido A. (24, 83, 84, 87)

BvrS/BvrR es un sistema regulador clásico que consiste de una proteína histidina cinasa: BvrS (por *Brucella virulence related sensor*), y la proteína reguladora de respuesta: BvrR (por *Brucella virulence related regulator*). BvrS es una molécula homodimérica unida a la membrana, con tres dominios: i) un dominio sensor que se encuentra en el periplasma, con segmentos transmembranales, y que corresponde al extremo amino terminal de la proteína; ii) un dominio de dimerización que se ubica en el citoplasma; y iii) el dominio con actividad de histidina cinasa que se localiza en el extremo carboxilo terminal y que también se sitúa en el citoplasma. Por su parte, BvrR es una proteína citoplásmica con un dominio regulador y otro efector que tiene como función el enlace al DNA. (62)

El mecanismo de acción del sistema se resume de la siguiente manera: un estímulo ambiental aún no identificado es detectado por el dominio sensor de BvrS e induce la actividad del dominio histidina cinasa, de forma que se cataliza la autofosforilación (dependiente de ATP) de un residuo específico de histidina que se encuentra en el dominio de dimerización. A continuación, BvrR cataliza la transferencia del grupo fosfato desde la fosfo-histidina de BvrS hacia un residuo de aspartato del dominio regulador, fosforilación que a su vez activa al dominio efector que produce la respuesta específica de salida. (62)

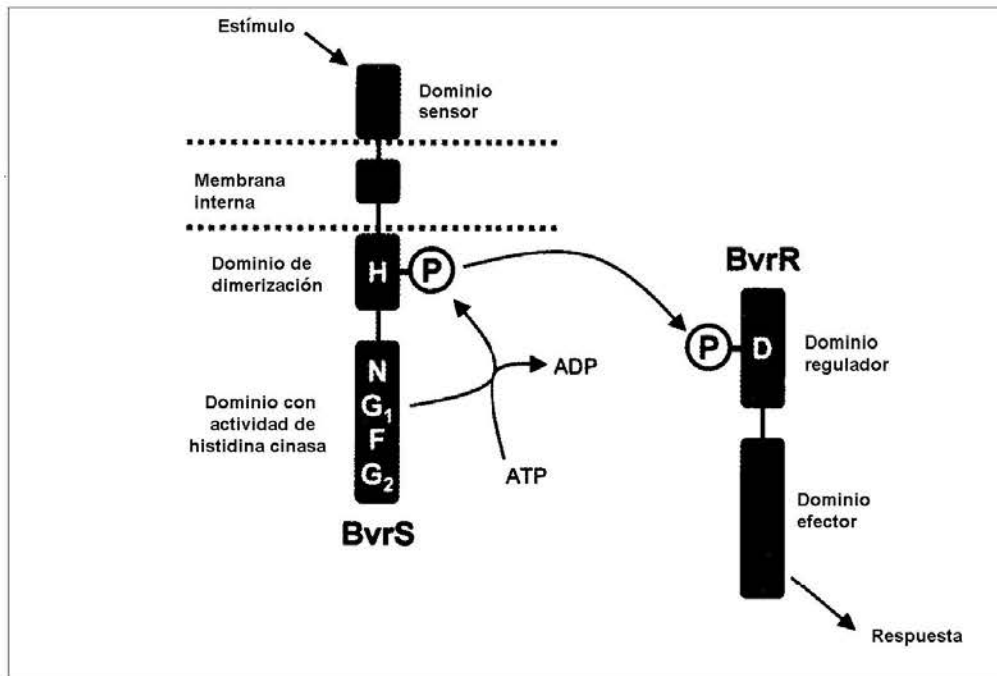


Figura 6. El sistema de dos componentes BvrS/BvrR. Se muestra un monómero de BvrS. N, G₁, F y G₂ corresponden a secuencias homólogas a los sistemas de dos componentes de otros géneros bacterianos. BvrS es activado por un estímulo ambiental no identificado y cataliza la autofosforilación de un residuo de histidina (H). El grupo fosfato se transfiere a un residuo de aspartato (D) localizado en el dominio regulador de BvrR. La fosforilación del dominio regulador activa al dominio efector que produce una respuesta celular específica. (62)

Una de las consecuencias de la activación del sistema BvrS/BvrR de *B. abortus* consiste en la regulación de la transcripción de al menos dos proteínas principales de la membrana externa (Omp, por *outer membrane protein*): Omp22, también denominada Omp3b; y Omp25, también conocida como Omp3a. Sin embargo, este rasgo no ha logrado asociarse a la resistencia a los péptidos catiónicos bactericidas; de hecho, se ha observado que las cepas de *B. abortus* con mutaciones en *omp25* y *omp22* no muestran sensibilidad a dichos péptidos, ni la atenuación que caracteriza a las bacterias con mutaciones en *bvrS* o *bvrR*. De

ello se deduce que son otros los factores de virulencia regulados por este sistema.
(28, 63, 67, 83)

Los experimentos efectuados con cepas de *B. abortus* que presentan mutaciones en *bvrS* o *bvrR* han logrado demostrar que el lípido A del lipopolisacárido de estas bacterias muestra un patrón de acilación alterado: en comparación con la cepa original *B. abortus* 2308, se distingue una mayor cantidad de especies de lípido A con pocas acilaciones y una mayor fluidez de las cadenas acilo. Si bien parece poco probable que el sistema BvrS/BvrR regule la transcripción de la acilación del lípido A, ya que las bacterias mutantes no presentan alteraciones en los productos de los genes que codifican para aciltransferasas involucradas en la biosíntesis del lípido A ni en las proteínas acarreadoras de acilo, al parecer el sistema BvrS/BvrR podría modular la actividad de alguna proteína de la membrana interna o externa que fuera necesaria para incorporar los ácidos grasos de cadena muy larga al periplasma. Otra posibilidad es que la hidrofobicidad de la superficie de las bacterias mutantes haya aumentado por la ausencia de importantes proteínas de membrana externa y que el incremento de especies de lípido A con pocas acilaciones fuera un mecanismo de compensación para lograr el equilibrio hidrofílico-hidrofóbico necesario para la estabilidad de la membrana externa y no el resultado de una regulación directa de BvrS/BvrR. (63)

Al margen de lo anterior, la disfuncionalidad de BvrS y BvrR disminuye la resistencia de *Brucella* a los péptidos catiónicos bactericidas e incrementa la permeabilidad a los agentes surfactantes. Actualmente, se considera que

numerosos péptidos policatiónicos bactericidas actúan en las membranas vía un mecanismo autopromovido en el cual una interacción iónica inicial en la superficie es seguida por la inserción de la sección o secciones hidrofóbicas del péptido. En concordancia, el aumento de formas de lípido A con pocas acilaciones, es decir, menos hidrofóbico, así como el incremento de la fluidez de las cadenas acilo, deberían facilitar la inserción y penetración de estos péptidos con un aumento aún mayor en la fluidez. (57, 63, 83)

Además, se ha observado que mientras *B. abortus* 2308 es resistente a la acción del suero no inmune, las cepas con mutación en *bvrS/bvrR* son reconocidas por el sistema complemento en ausencia de anticuerpos. De hecho, la sensibilidad de estas mutantes al suero no inmune es aún más alta que la de las mutantes con lipopolisacárido rugoso y lípidos A con pocas acilaciones. El lipopolisacárido purificado de las mutantes *bvrS/bvrR* no muestra un mayor nivel de activación del complemento que el mostrado por el lipopolisacárido de *B. abortus* 2308. En conjunto, esto sugiere que los cambios en el lípido A no están directamente relacionados con la sensibilidad al complemento de las mutantes. (63)

Por otro lado, las cepas de *B. abortus* con mutación en *bvrS-bvrR* manifiestan una invasividad reducida en células epiteliales, células HeLa y macrófagos murinos y son incapaces de inhibir la fusión fagolisosomal y de replicarse intracelularmente. En tal contexto, es muy probable que las propiedades alteradas en su superficie afecten lo relativo a la ruta de entrada en las células hospederas así como su transporte en el interior de ellas, e inclusive, podrían provocar su menor

resistencia a las condiciones de pH bajo que se encuentran dentro de los fagosomas de los macrófagos. (87)

Adicionalmente, dichas mutantes no muestran virulencia significativa en ratones infectados de manera experimental. Su incapacidad para modificar la composición de los ácidos grasos del lípido A, lo cual depende de las proteínas BvrS/BvrR, podría afectar las interacciones de estas mutantes con los receptores de los macrófagos, lo que promovería una respuesta inflamatoria mas intensa que la usual, lo que propiciaría una eliminación acelerada de la mutante. Esto resulta consistente con la tesis que propone que la baja actividad biológica del lípido A de *Brucella* contribuye a la virulencia a través de su capacidad para inducir una pobre respuesta inflamatoria durante las primeras etapas de la infección. (28, 57, 63, 83, 84, 87)

En resumen, la afectación de BvrS/BvrR debilita la estabilidad general de la membrana externa, las mutantes en *bvrS/bvrR* muestran una acilación alterada del lípido A, sensibilidad a los péptidos bactericidas y a los detergentes y una mayor sensibilidad al complemento; también ocurren deficiencias en la internalización y el tráfico intracelular, así como la menor virulencia para ratones. La homeostasis de la membrana externa no es el único rubro modulado por BvrS/BvrR, ya que este sistema también está implicado en otros aspectos celulares, incluida la regulación de algunas vías metabólicas. (62, 63)

C. El operón *virB*

Las bacterias Gram negativas pueden secretar macromoléculas a través de su doble membrana, vía el ensamble a proteínas transportadoras. El sistema de secreción tipo IV representa uno de los cinco sistemas de secreción capaces de exportar factores de virulencia a través de la membranas bacterianas y se ha detectado en diversos microorganismos patógenos, destacando *A. tumefaciens*, *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori* y el patógeno intracelular *Legionella pneumophila*. (15, 17, 21, 53, 101)

El cromosoma II de *Brucella* incluye un sistema de secreción de tipo IV que es esencial para la sobrevivencia intracelular del bacilo; el análisis genómico comparativo indica que está compuesto por 13 marcos de lectura abiertos y que es homólogo al operón *virB* de *A. tumefaciens* que codifica para una estructura indispensable en la secreción del DNA de transferencia; también es similar a los genes *ptI* de *B. pertussis* que codifican para un aparato que permite la secreción de la toxina pertussis. Este operón se ha encontrado en *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus*. (24, 57, 83, 84)

Cuando *Brucella* ingresa a macrófagos murinos, células HeLa o la línea celular de monocitos humanos THP-1, ello sin mediación de anticuerpos, VirB regula la translocación de una o varias moléculas efectoras que controlan la maduración de los fagosomas de replicación dentro de los cuales se aloja. La naturaleza de las moléculas efectoras transportadas por el sistema de secreción no se conoce, pero

la evidencia experimental indica que la expresión de los genes del operón *virB* es esencial para el mantenimiento de las interacciones constantes entre el fagosoma que contiene a la bacteria y el retículo endoplásmico; dichas interacciones son necesarias para promover la formación del fagosoma de replicación y evitar la fusión del lisosoma con el fagosoma implicado. Cabe subrayar que el operón *virB* es activado rápidamente en los fagosomas acidificados y que las mutantes isogénicas *virB* son incapaces de llegar al retículo endoplásmico, ya que son degradadas en los fagolisosomas. (10, 17, 28, 57, 61, 67, 83)

El operón *virB* es un determinante principal de virulencia en *Brucella*, necesario para el establecimiento y mantenimiento de las infecciones persistentes. Las mutaciones polares introducidas en el primer gen del operón, *virB1*, eliminan la capacidad de *Brucella* para replicarse intracelularmente. Así mismo, los fagosomas que contienen bacterias con mutaciones polares en *virB10* son incapaces de generar fagosomas de replicación y estos organelos se fusionan con los lisosomas. Las mutantes *virB10* de *B. abortus* y las *virB10* de *Brucella suis* no se reproducen en macrófagos y células HeLa, ni provocan infecciones en ratones BALB/c. (17, 21, 51, 67, 84)

Es posible que *virB* excrete moléculas que afectan la vía cAMP/PKA, aumentando la cantidad de AMP cíclico y la actividad de la proteína cinasa A, moléculas ambas que son importantes para que la bacteria sobreviva y se multiplique dentro de los macrófagos. (41)

D. El gen *bacA*

Este gen codifica para una proteína de transporte de la membrana citoplásmica, de la cual se identificó un homólogo altamente conservado en *S. meliloti*, especie en la cual es requerida para establecer interacciones de simbiosis. (12, 84)

Recientemente, se ha encontrado que la proteína BacA afecta la composición de los ácidos grasos del lípido A del lipopolisacárido y que una mutación en *bacA* conduce al predominio de formas de lípido A con escasas acilaciones las cuales carecen principalmente de ácidos grasos de cadena muy larga. BacA muestra similitud en cuanto a secuencia con una familia de proteínas de la membrana de los peroxisomas que afectan el transporte de los ácidos grasos de cadena muy larga hacia fuera del citoplasma. De esta manera, se ha propuesto que BacA podría exportar ácidos grasos de cadena muy larga (y posiblemente a otros ácidos grasos) fuera del citoplasma, en donde una proteína parecida a una Omp (PagP) de *Salmonella* los acoplaría al lípido A. Otra hipótesis establece que BacA podría ser necesaria en la membrana interna para efectuar el movimiento de volteo de los precursores del lipopolisacárido que acarrean a los ácidos grasos de cadena muy larga; la ausencia de BacA favorecería la translocación de formas poco aciladas que carecerían de ácidos grasos de cadenas muy largas. (63)

Las cepas de *B. abortus* con mutación por delección de *bacA* muestran una reducción de la sobrevivencia en el interior de los macrófagos y una virulencia reducida en ratones BALB/c. La mutante KL7 de *B. abortus* con mutación en

bacA se localiza en un fagosoma ácido, LAMP-1 positivo y Catepsina D negativa en células THP-1 cuando ingresa por opsonización (como ocurre en la cepa de origen *B. abortus* 2308), pero es incapaz de replicarse. La envoltura celular alterada de esta mutante la hace más susceptible al estrés ambiental por pH ácido y ciertos agentes que dañan las membranas, como el dodecil sulfato de sodio. Consecuentemente, las modificaciones en el lípido A ocasionadas por BacA podrían tener un papel crítico en la resistencia a las condiciones ambientales imperantes en el interior de los fagosomas de replicación. (10, 57)

E. El gen *hfq*

Este se encuentra en numerosas bacterias y su producto, conocido como HF-I o HF-1, corresponde a una proteína que se une al RNA y juega un papel crítico en la expresión de diversos genes durante la fase estacionaria. En *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, HF-1 participa en la traducción del RNA mensajero que codifica para el factor alternativo sigma RpoS (se une al RNA y facilita la traducción eficiente del transcrito de *rpo*), proceso coincidente con la entrada a la fase estacionaria. Los niveles elevados de RpoS conducen al incremento en la expresión de varios genes involucrados en la resistencia a estreses ambientales de diversas índoles. El gen *hfq* ha sido identificado en secuencias genómicas de *B. melitensis* y *B. suis* aunque aún no se ha identificado un homólogo de *rpoS*. (10, 35, 53, 57, 83)

El incremento generalizado en la resistencia a los estreses ambientales que acompañan la transición a la fase estacionaria parece ser clave para que *Brucella* se adapte apropiadamente a las condiciones ambientales encontradas en los compartimentos fagosomales de los macrófagos. Las mutantes Hfq3 (con mutación en *hfq*) derivadas de *B. abortus* 2308 muestran varios fenotipos defectuosos en la fase estacionaria, los cuales incluyen un incremento dramático en la sensibilidad a pHs ácidos y a la destrucción debida a las especies reactivas de oxígeno. Además, muestran deficiencias en la sobrevivencia y la replicación en macrófagos bajo condiciones *in vitro* y son incapaces de mantener infecciones crónicas en ratones inoculados experimentalmente. Por otro lado, en las células THP-1, las mutantes de *B. abortus* Hfq3 son transportadas a los compartimentos intracelulares ácidos, LAMP-1 positivos, catepsina D negativas, al igual que la cepa de origen *B. abortus* 2308, pero no es capaz de replicarse en estos fagosomas. (10, 35, 57, 83)

Es importante señalar que ciertos experimentos sugieren que más de 40 genes de *B. abortus* 2308 requieren de *hfq* para su efectiva expresión durante la fase estacionaria, por lo que la atenuación y los fenotipos defectuosos de Hfq3 son el resultado de numerosos genes afectados. (35)

Entre los genes regulados por *hfq* durante la fase estacionaria, los más conocidos son *sodC* y el operón *cydAB*, ambos importantes para la supervivencia y virulencia de *Brucella*. La búsqueda de otros genes que requieren de HF-1 para expresarse

eficientemente continúa llevándose a cabo, tal como ocurre con la evaluación de dicha proteína en cuanto a su contribución a la virulencia de *Brucella*. (83)

F. La enzima superóxido dismutasa

La enzima superóxido dismutasa (SOD) está codificada por *sodC*, se localiza en el periplasma bacteriano, requiere de cobre y zinc como cofactores y forma parte del sistema de defensa de la bacteria, ya que neutraliza los efectos tóxicos de las especies reactivas de oxígeno catalizando la dismutación del radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual posteriormente es inactivado por catalasas o peroxidasas. (35, 57)

Existen claras evidencias de que homólogos de SodC desempeñan papeles importantes en la protección de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Neisseria meningitidis*, y *Mycobacterium tuberculosis*, en relación con el papel antibacteriano de la explosión respiratoria de los macrófagos durante la fase estacionaria. Hasta el momento, los datos indican que esta enzima protege a *Brucella* del O_2^- exógeno, es decir, del producido por la explosión oxidativa del macrófago y no del O_2^- endógeno que se genera como subproducto del metabolismo de la bacteria, ya que: a) el superóxido es una especie aniónica débil que no atraviesa la membrana citoplásmica; y b) SodC se localiza en el periplasma. (35, 57)

Durante sus interacciones con macrófagos murinos, el fenotipo asociado a la mutante MEK2 de *B. abortus* con mutación en *sodC* apoya la hipótesis de que SodC protege a la cepa de origen *B. abortus* 2308 del O_2^- originado por la explosión respiratoria de los macrófagos. Se observó que la destrucción de cepas mutantes era mayor, por parte de macrófagos activados con interferón gamma, en los que ocurre un aumento en la producción de radicales libres de oxígeno. Adicionalmente, se demostró que la mutante MEK2 es menos virulenta para ratones C57BL6J, en comparación con la cepa de origen, y que la atenuación resultante parece darse en dos fases:

1) A una semana de aparecer la infección, la cantidad de mutantes recuperadas del bazo es considerablemente menor al inóculo inicial; contrastando con ello y en el mismo lapso, la cantidad de células de la cepa original se incrementa hasta cinco veces, comparada con el inóculo inicial, lo cual indica una mayor susceptibilidad de la mutante MEK2 a los radicales libres de oxígeno, durante la internalización bacteriana en macrófagos no activados en las primeras etapas de la infección. Dos a cuatro semanas después de la infección, el número de células MEK2 recuperadas del bazo parece estabilizarse, lo que indica que una vez internalizadas en los macrófagos, los bacilos pueden sobrevivir y replicarse. (35)

2) La segunda fase de atenuación empieza a 4 semanas de la fecha de infección: la mutante MEK2 evidencia una eliminación acelerada de los bazos de ratones C57BL6J, comparada con la cepa de origen, ya que en ese tiempo se induce la inmunidad celular en los ratones infectados, misma que conduce a un incremento

en el número de macrófagos activados por interferón gamma. En consecuencia, la acelerada eliminación de MEK2 de los bazos sería consistente con la susceptibilidad incrementada de *B. abortus* con mutación en *sodC* a la destrucción en los macrófagos activados por interferón gamma en comparación con la cepa de origen *B. abortus* 2308 demostrada in vitro. (35)

Los análisis electroforéticos de los lisados celulares de *B. abortus* 2308 y de la mutante isogénica Hfq3 cultivados en fase estacionaria GMM muestran que la producción de SodC en *B. abortus* 2308 es dependiente de la presencia de Hfq, tal como se muestra en la figura 7. Se infiere que una expresión ineficiente de *sodC* podría contribuir significativamente a la sensibilidad de la mutante Hfq3 hacia los reactivos intermediarios de oxígeno, e inclusive, a la atenuación de la mutante en los ratones infectados experimentalmente. La naturaleza de la relación existente entre Hfq y la expresión de *sodC* durante la fase estacionaria continúa bajo investigación. (35)

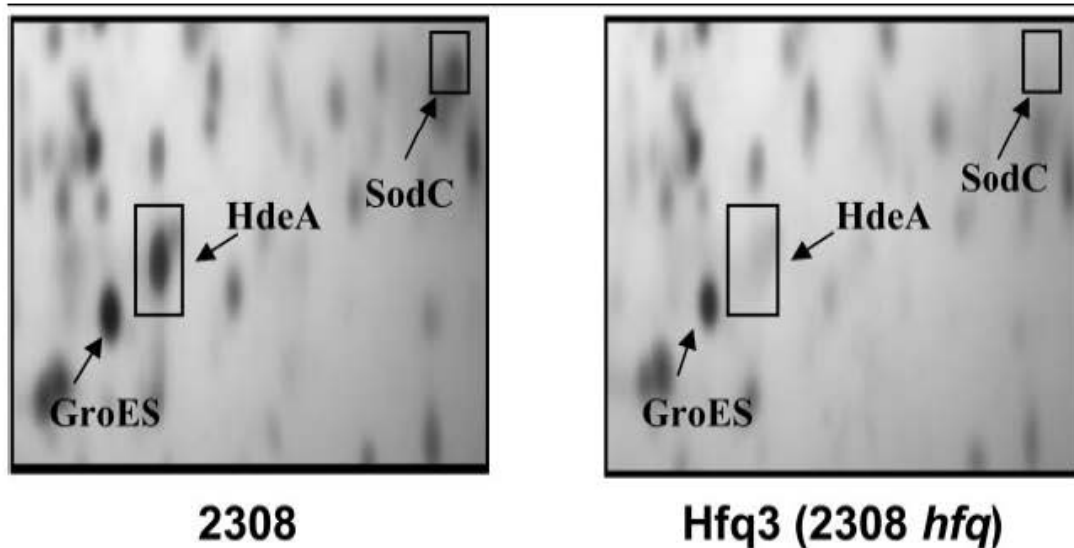


Figura 7. Hfq es necesario para la expresión de *sodC* en *B. abortus* 2308. Los paneles representan los segmentos correspondientes a geles de poliacrilamida con tinción de plata después de un análisis electroforético de lisados celulares de cultivos de *B. abortus* 2308 y la mutante isogénica Hfq3 cultivada durante 96 horas en medio mínimo de Gerhardt. Las manchas de proteínas correspondientes a GroES (que es producida en niveles equivalentes en *B. abortus* 2308 y Hfq3 en estas condiciones de cultivo) y HdeA (el producto de otro gen que requiere de Hfq para su expresión eficiente en *B. abortus* 2308 durante la fase estacionaria) se muestran como base de comparación. (35)

G. β -1,2-cicloglucanos

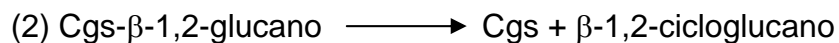
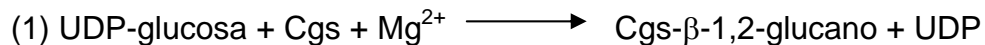
Brucella produce β -1,2-cicloglucanos, al igual que *Agrobacterium* y *Sinorhizobium*.

En *S. meliloti*, el cicloglucano es requerido para que ocurra una efectiva invasión para la formación de nódulos y la fijación de nitrógeno simbiótica y, en *A. tumefaciens*, es necesario para la inducción de tumores. (84)

Los β -1,2-cicloglucanos son oligosacáridos que pertenecen a la familia II, considerando la organización de su esqueleto; se trata de homopolímeros que contienen únicamente enlaces β -1,2 con un grado de polimerización que varía entre los 17 y 25 residuos de glucosa, sustituidos con una amplia variedad de

grupos no glucosídicos. Son sintetizados por una glicosil transferasa, la cicloglucano sintetasa (Cgs), enzima que utiliza UDP-glucosa como donador de ese carbohidrato. La Cgs corresponde a una proteína de la membrana interna que regula todas las actividades necesarias para la síntesis de dichos compuestos, esto es, iniciación, elongación y ciclización. (51, 84)

Tomando como base la esteroquímica del sustrato donador y del producto, se ha determinado que la Cgs pertenece a la clase de las glicosil transferasas invertoras y que efectúa al menos tres funciones enzimáticas bien definidas: 1) iniciación, transfiriendo a la glucosa desde el UDP-glucosa hasta un residuo aminoácido aún no identificado de la Cgs; 2) elongación de la cadena, actuando como UDP-glucosa β -1,2-glicosil transferasa, lo que resulta en la formación de un polímero lineal con enlaces β -1,2 unido covalentemente por su extremo reductor a un residuo aminoácido desconocido de la Cgs (proteína intermedia o intermediaria); y 3) ciclización, formando un enlace β -1,2 entre los extremos reductor y no reductor del oligosacárido, para liberar la proteína intermediaria. (51, 84)



Los cicloglucanos son sintetizados en el lado citoplasmático de la membrana interna, en donde está disponible la UDP-glucosa, y que son secretados al espacio periplásmico por un transportador ABC unido a la membrana, mismo que está

codificado en el gen *cgt* (por *cyclic glucan transporter*). Los glucanos cíclicos no sustituidos son neutros y, una vez que son transportados al periplasma, se modifican con sustituyentes no glucosídicos tales como fosfato de glicerol, metil malonato y succinato, lo que ocurre por acción de enzimas periplásmicas. Dicho proceso resulta en una acumulación de β -1,2-cicloglucanos aniónicos. (51, 84)

Las cepas de *B. abortus* con mutaciones en *cgs* muestran una sobrevivencia reducida en tejidos de bazo de ratones BALB/c, así como una escasa multiplicación intracelular en células HeLa y una mayor sensibilidad a los compuestos surfactantes. Las mutantes que carecen de la proteína Cgt pero que contienen una Cgs intacta acumulan en el citoplasma β -1,2-cicloglucano neutro y sin sustituyentes; además, evidencian una virulencia reducida en ratones y poca multiplicación intracelular en células HeLa y J774, fenotipo que es idéntico al descrito para las mutantes carentes de *cgs*. Estas observaciones sugieren que se requiere de la presencia del cicloglucano en el espacio periplásmico para que tenga lugar una interacción apropiada con el hospedero y la expresión completa de la virulencia. (12, 84)

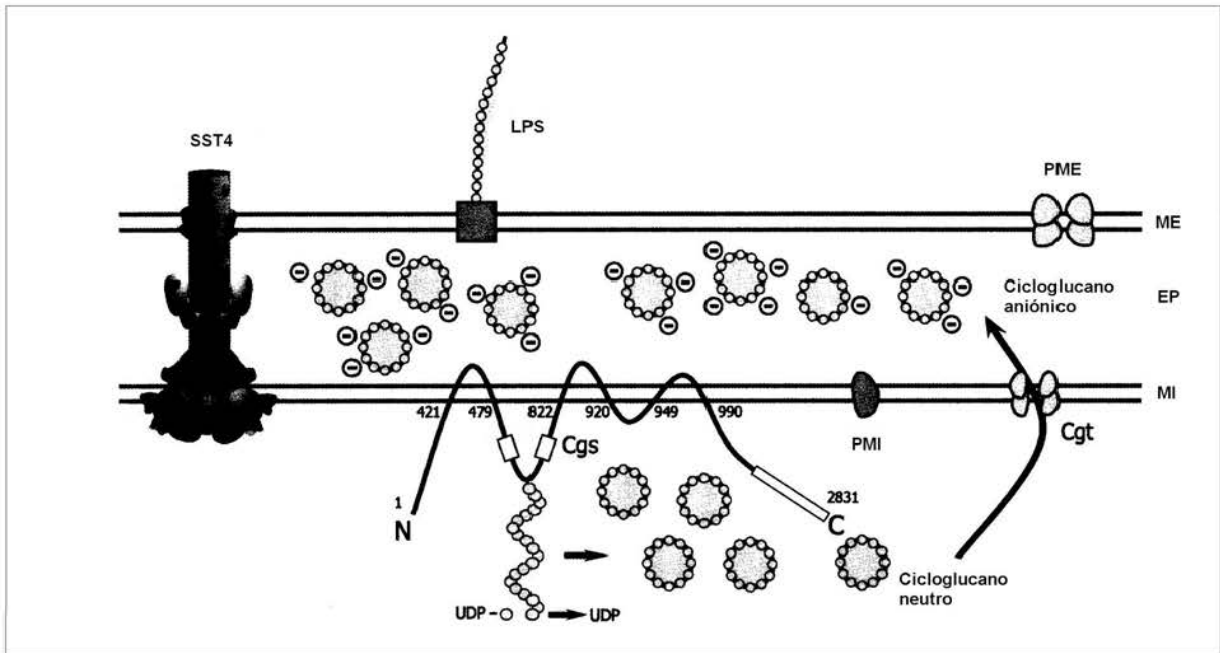


Figura 8. Representación esquemática de la superficie celular de *Brucella*. Cgs: cicloglucano sintetasa (los números indican posiciones de residuos de aminoácidos). Cgt: transportador de cicloglucano. MI: membrana interna. EP: espacio periplásmico. ME: membrana externa. PMI: proteínas de la membrana interna. PME: proteínas de la membrana externa. SST4: sistema de secreción de tipo IV VirB. LPS: lipopolisacárido. UDP-O: UDP-glucosa. (51)

Si bien la función del cicloglucano aún se desconoce, se han demostrado varios fenotipos pleiotrópicos en bacterias con mutaciones en *cgs*, destacando una mayor sensibilidad a los surfactantes (dodecil sulfato de sodio y Zwittergent), lo cual sugiere alteraciones en la superficie celular; sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que el cicloglucano desempeñe algún papel en la estabilización y/o el ensamblaje de sistemas macromoleculares como las proteínas de la membrana externa y el sistema de secreción VirB, los cuales a su vez son requeridos para una interacción efectiva entre *Brucella* y la célula

hospedera. Los análisis detallados de la estructura membranosa de las brucelas que presentan mutaciones en *cgs* podrían aclarar esta cuestión. (12, 51, 84)

Otros autores han propuesto que el β -1,2-cicloglucano podría estar asociado a la protección de las células bajo condiciones de estrés, como sería una baja osmolaridad ya que, en *Rhizobium*, la acumulación de tal compuesto cambia al variar ese parámetro en el medio; sin embargo, esta respuesta aún no se ha observado en *Brucella*. (12, 51, 84)

H. El operón *cydAB*

El operón *cydAB* de *B. abortus* 2308 es dependiente de HF-1 y codifica para una citocromo *bd* oxidasa, enzima respiratoria que tiene una alta afinidad por el oxígeno y que podría contribuir a la adaptación de la bacteria a las condiciones de microaerobiosis que se encuentran en los fagosomas de replicación. Además, puesto que dicha molécula enzimática “secuestra” O₂, también podría proteger a la bacteria del estrés oxidativo que enfrenta en el compartimiento fagosómico de los macrófagos. (83)

Las cepas de *Brucella abortus* con mutaciones en *cydB* muestran carencia de citocromo *bd* oxidasa y son sensibles al peróxido de hidrógeno. Lógicamente, una sobreexpresión de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa revierten esa situación, lo que comprueba que estas mutantes son susceptibles a las especies reactivas de oxígeno presentes en los macrófagos. (53, 57)

I. *purE* y *aroC*

Los fagosomas de los macrófagos contienen muy limitados nutrientes para las bacterias intracelulares, por lo que las mutaciones ocurridas en vías metabólicas esenciales suelen dar lugar a clonas con virulencia reducida. Las mutantes de *B. melitensis* con delección en *purE* son auxótrofas para las purinas y se asocian a un fenotipo atenuado *in vitro* e *in vivo*. (23, 27, 53, 57)

Por su parte, las mutantes de *B. suis aroC* :: Tn5 son auxótrofas para compuestos aromáticos y también muestran atenuación *in vivo*. En este sentido, el gen *aroC* codifica para la corismato sintasa que cataliza la producción de ácido corísmico. Ello es trascendental, ya que el corismato es el punto de partida para vías separadas de síntesis de aminoácidos aromáticos tales como los ácidos *para*-aminobenzoico y dihidroxibenzoico; el primero es fundamental para la producción de ácido fólico, vitamina K, ubiquinona y diversos sistemas de transporte de electrones mientras que, el segundo, es un compuesto inicial en la biosíntesis del sideróforo enteroquelina. En resumen, una mutación de *aroC* se traduce en problemas metabólicos serios para la bacteria. (53, 57)

IV. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO

A. Prevención de la infección con *Brucella* en humanos

Los seres humanos se infectan con *Brucella* por varias vías: ingestión de productos no pasteurizados, por vía aérea con compromiso de la conjuntiva y del tracto respiratorio y, en general, a través del contacto directo con los animales o sus productos. La brucelosis es una enfermedad ocupacional de los trabajadores de rastros y veterinarios que trabajan con animales y de quienes en los laboratorios clínicos se exponen a diversos tipos de accidentes laborales, ya sea que realicen pruebas de diagnóstico o produzcan vacunas. Además, en virtud de que estas bacterias pueden sobrevivir durante meses en el suelo, se considera que la aspiración de polvo contaminado también representa una vía de infección para la gente que acampa en zonas en donde se encuentra ganado infectado. (44, 74)

Dado a que, hasta el momento, aún no existen vacunas contra la brucelosis destinadas a seres humanos, la prevención de esta enfermedad depende del cocimiento efectivo de los productos lácteos y de otros alimentos que pudieran estar contaminados, así como del control de la enfermedad en los animales y de la limitación a la exposición por actividades ocupacionales. (23)

1. Prevención de la brucelosis en animales

Como ya se mencionó anteriormente, las especies virulentas de *Brucella* tienen algún hospedero natural: *B. melitensis* infecta al ganado caprino y bovino, *B. abortus* al vacuno, *B. suis* al porcino, *B. canis* a los perros, *B. neotomae* a las ratas de la madera y *B. ovis* a los ovinos; sin embargo, los animales pueden infectarse con otras especies si entran en contacto con ellas. Frecuentemente, los animales no muestran síntomas de la infección, de manera que se convierten en portadores crónicos que pasan inadvertidos y representan un peligro para la especie humana. A diferencia de lo que sucede en los seres humanos, en los animales ocurre un notable viscerotropismo: las bacterias se alojan en el sistema reproductivo de las hembras, así como en las glándulas mamarias, en la leche y en los fetos. La infección de la placenta ocasiona aborto o el nacimiento de productos débiles e infectados. La enfermedad se puede transmitir por contacto sexual, ya que el bacilo se encuentra en el semen y en las secreciones vaginales de los animales infectados. (18, 24, 78, 91, 104)

En los animales, las bacterias se alojan en los macrófagos y en los trofoblastos de la placenta. La evidencia experimental con la que se cuenta hasta el momento indica que el microorganismo depende de los productos de distintos genes para adaptarse a las condiciones ambientales que enfrenta en el interior de estos dos tipos de células. Si bien se conoce poco sobre las interacciones entre las brucelas y los trofoblastos de la placenta, se piensa que el invasor utiliza un sistema de

adquisición de hierro que le permite mantener una reproducción extensa en el interior de dichas células, el cual parece no requerirse para la sobrevivencia y crecimiento en el interior de los macrófagos. (83)

Los trofoblastos son componentes de las capas epiteliales de la placenta y representan una interfase importante entre la circulación materna y la fetal; en hospederos naturales, estas células juegan un papel crítico en la patobiología de las infecciones por *Brucella*. Las condiciones ambientales encontradas por el bacilo en el interior de los trofoblastos placentarios no se han logrado determinar más allá del hecho de que, en los rumiantes, estas células producen cantidades importantes de eritrol ($\text{OHCH}_2\text{-CHOH-CHOH-CH}_2\text{OH}$), sobre todo durante el último trimestre de la gestación, periodo en el que este compuesto podría actuar como un estimulante del crecimiento de *Brucella* en el tracto reproductivo. Esta idea se respalda con información que indica que el eritrol es la fuente de carbono preferida por *B. abortus* y que el último trimestre de gestación es el periodo en el que los rumiantes grávidos son más susceptibles a las infecciones por *Brucella*. Al parecer, la capacidad de esta bacteria para metabolizar eficientemente al eritrol está muy relacionada con su característica de proliferar en el tracto reproductivo de los rumiantes. (24, 69, 83)

La evidencia experimental sugiere que estas bacterias que metabolizan eritrol tienen un alto requerimiento de hierro, el cual es obtenido a través de sideróforos tales como el ácido 2,3-dihidroxibenzoico o brucebactina (un sideróforo más

complejo producido por *B. abortus* 2308 a partir de ácido 2,3-dihidroxibenzoico).
(83)

Aunque los animales pueden recuperarse espontáneamente de la infección excretan bacterias por periodos variables junto con las secreciones vaginales, la orina y la leche. Es importante señalar que *Brucella* permanece viable durante varias semanas en los restos de fetos abortados, que pueden contaminar el suelo, el agua y los pastizales. Por otro lado, se ha demostrado que *B. melitensis* sobrevive en suelos húmedos hasta por 72 días, en la leche durante 17 días y en el agua de mar por 25 días. (91, 104)

Dado que la prevención de la brucelosis humana depende en gran medida del control de la enfermedad en los animales, en numerosos países industrializados la brucelosis de los animales domésticos utilizados para la alimentación de los seres humanos se ha limitado vía la implementación de programas de vacunación, vigilancia y cuarentena; sin embargo, aún se debe tomar en cuenta que la bacteria puede ser reintroducida por el movimiento del ganado y el contacto con animales de vida silvestre. En diversos países del tercer mundo todavía se está en las primeras fases de la implementación de un plan para controlar la infección del ganado y el problema se clasifica como re-emergente en Israel, Kuwait, Arabia Saudita, Brasil y Colombia, en donde se registra un aumento en la incidencia de *B. melitensis* o *B. suis* biovar 1 infectando al ganado vacuno. (23, 24, 30, 83)

La cepa lisa *B. melitensis* Rev1 se utiliza para inmunizar al ganado caprino y a pequeños rumiantes y corresponde a una mutante no virulenta que aparece naturalmente, dependiendo de la presencia de estreptomycinina para su crecimiento. La naturaleza de la mutación o mutaciones de Rev1 aún no se conoce y la vacuna tiene las siguientes desventajas: puede ocasionar abortos en las hembras gestantes e infertilidad por infección genital; induce la producción de anticuerpos que interfieren en las pruebas serológicas de rutina impidiendo la diferenciación entre animales infectados y vacunados; y puede derivar hacia variantes indeseables, sea en razón de una disociación hacia el fenotipo rugoso, o hacia formas lisas de mayor virulencia. La vacuna Rev1 está ligada a falta de estandarización en los métodos de producción, lo que reditúa en preparaciones con eficiencia variable; originalmente, esta cepa era candidata para la inmunización de seres humanos, pero estudios realizados en *Macaccus rhesus* demostraron que, aunque confiere buena protección, puede persistir en los nódulos linfáticos. Además, análisis realizados en voluntarios demostraron que era aún más virulenta que la vacuna atenuada utilizada en alguna época por los soviéticos. Por último, presenta el inconveniente de ser resistente a la estreptomycinina, un antibiótico que es útil terapéuticamente en el humano para el tratamiento de la brucelosis (24, 30, 44)

La cepa lisa atenuada *B. abortus* S19 proviene espontáneamente de la cepa virulenta *B. abortus* 2308 y se utiliza para inmunizar bovinos. Esta vacuna se utilizó durante muchos años para prevenir la brucelosis en el ganado vacuno, pero conserva algún grado de virulencia y produce abortos e infecciones persistentes

en los animales adultos vacunados, por lo que únicamente se utiliza en animales sexualmente inmaduros; evidentemente, el producto también induce la formación de anticuerpos que interfieren en las pruebas serológicas de rutina. (12, 30)

Las cepas Rev1 y S19 tienen varios inconvenientes: son virulentas para los seres humanos, pueden ocasionar abortos en animales preñados e interfieren en los estudios serológicos convencionales; por esta razón, continúa la búsqueda de vacunas mejoradas. Aunque la respuesta protectora generada por la vacuna viva es eficaz y sostenida, su desventaja en cuanto a la persistencia de la bacteria en el interior del hospedero y su potencial de transmisión no intencional a otros organismos (como hembras preñadas u otros hospederos para los que las cepas de las vacunas continúan siendo virulentas), así como su posible reversión a la virulencia, limitan sus alcances y aplicaciones. (24, 27, 30, 57)

La cepa RB51 corresponde a una mutante rugosa atenuada de *B. abortus* que ha resultado útil para la vacunación del ganado vacuno; recientemente, ha reemplazado a la cepa S19 en EUA y también es empleada en Chile, Colombia, Costa Rica, México y Uruguay para el control de la brucelosis bovina. La RB51 es resistente a la rifampina y tiene una mutación en *wboA*, gen que codifica para una glicosil transferasa requerida en la síntesis del polisacárido O; ello implica que tiene una expresión limitada de esta cadena, por lo que generalmente no induce suficientes anticuerpos que interfieran las pruebas diagnósticas veterinarias para brucelosis. De hecho, podría ser muy útil como vacuna de refuerzo en el ganado inmunizado durante sus primeros meses de vida con la cepa lisa S19, puesto que

proveería de estimulación inmunológica pero sin la elevación concomitante de anticuerpos específicos para el antígeno del lipopolisacárido utilizado en el diagnóstico. Esta cepa no es útil para proteger ovinos, caprinos, pequeños rumiantes, bisontes, renos o alces. (24, 30, 44, 64)

Las vacunas disponibles son eficaces únicamente en hospederos específicos, ya que no se logra la protección cruzada. Actualmente, no existe vacuna disponible alguna para la protección del ganado porcino contra la brucelosis. (24)

Se han preparado bacterias atenuadas que presentan mutaciones en genes asociados al metabolismo o a la expresión de factores de virulencia, para tratar de obtener vacunas más efectivas. Otra estrategia consiste en eliminar de las cepas vacunales algún antígeno inmunodominante, lo que pretendería distinguir a los animales infectados de los vacunados, diseñando de manera complementaria una prueba serológica específica que detecte anticuerpos contra el antígeno en cuestión. (30)

Las vacunas basadas en preparaciones de bacterias muertas confieren cierta protección, pero una sola inmunización es a menudo insuficiente para generar inmunidad protectora duradera. Además, estos productos provocan reacciones locales en el sitio de inoculación e involucran la elevación de anticuerpos que complican el serodiagnóstico. (24, 30)

Adicionalmente, se han probado vacunas confeccionadas con fracciones antigénicas compuestas por lipopolisacáridos liso o rugoso y algunas proteínas de membrana interna, e inclusive, se han realizado pruebas con la fracción SDS-I (que contiene las proteínas de membrana externa mayores, peptidoglucano y lipopolisacárido liso) y con el extracto HS compuesto por proteínas de la membrana externa del grupo 3 y por lipopolisacárido rugoso. Así mismo, se llevan a cabo estudios con vacunas de subunidades, como la P39 (proteína periplásmica de enlace de *B. melitensis*), bacterioferritina (proteína de unión al hierro en *B. melitensis*) y las proteínas L7/L12 (proteínas ribosomales de *B. abortus*), así como con las vacunas vectorizadas en virus o vectores bacterianos. (24, 30, 57)

2. Control de alimentos de origen animal

Los seres humanos pueden infectarse al consumir productos lácteos, carne contaminada cocinada de manera insuficiente o vegetales crudos que entraron en contacto con excremento u orina de animales infectados. *Brucella* tiene la capacidad de sobrevivir por periodos prolongados en los productos animales: permanece viable hasta por 180 días en el queso contaminado de cabra, muere en la leche acidificada y en los quesos fermentados y es destruida por la pasteurización de los productos lácteos a 62.7°C durante 30 minutos o a 71.6°C por 15 minutos; es resistente a la salmuera y el ahumado. En los países desarrollados, se ha reducido de forma importante la incidencia de la brucelosis, merced al empleo de tecnologías para el procesamiento de los alimentos provenientes de animales; sin embargo, en diversas regiones de los países en

vías de desarrollo estos procedimientos no son llevados a cabo de manera regular. (18, 91)

3. Vacunas contra la brucelosis humana

El desarrollo de alguna vacuna segura y eficaz contra la brucelosis humana aportaría varios beneficios, pues además de proteger a la gente de las infecciones naturales, también lo haría del uso de *Brucella* como arma biológica. (44)

En el pasado se han probado algunas vacunas para la inmunización de los seres humanos, aunque sus resultados han sido poco satisfactorios, con una eficiencia limitada y, en el caso de productos con bacterias vivas, con una reactogenicidad potencial seria. La vacunación de humanos con brucelas viables confiere inmunidad protectora pero las cepas probadas hasta ahora no han alcanzado una atenuación suficiente. (23, 44)

Un derivado de la cepa *B. abortus* 19, llamado 19-BA, se desarrolló y utilizó extensamente en la ex Unión Soviética, empleándose como polvo seco en aerosol y asociada a efectos colaterales locales (laringitis, traqueitis, bronquitis) y sistémicos (fiebre, linfadenopatía ligera, hiperemia facial y de la membrana mucosa, defectos en la ventilación y la oxigenación de la sangre). No obstante, se le validó por haber reducido en cinco años la incidencia de brucelosis, de 12.3% en personas no vacunadas a 0.5% en personas vacunadas. En 1962, se

realizaron estudios en EUA con voluntarios, observándose que la cepa no estaba lo suficientemente atenuada para ser utilizada en toda la población. En China, la cepa *B. abortus* 104M se administraba de forma subcutánea y estaba aún menos atenuada que la 19-BA. Tanto la 19-BA como la 104M provocaban efectos colaterales más fuertes en individuos sensibilizados previamente con *Brucella*. También se probó una variante de *B. abortus* dependiente de estreptomycin que inducía anticuerpos en los voluntarios pero cuyos efectos colaterales también eran importantes. (23, 44)

La vacuna Rev1 utilizada actualmente en ganado caprino fue pensada inicialmente para uso en humanos, pero se dejó de probar en voluntarios cuando se demostró que el rango entre la dosis tóxica y la efectiva era muy estrecho. Otros productos analizados fueron uno de peptidoglucano insoluble en fenol (anteriormente utilizado en Francia) y uno de proteína y polisacárido (utilizado en Rusia). (23, 44)

Durante los últimos años se ha trabajado para obtener bacterias con mutaciones en genes que codifican para determinadas vías biosintéticas, con la esperanza de obtener vacunas atenuadas confiables. La primera mutante desarrollada tenía como blanco la biosíntesis de *nov*o de los nucleótidos de la purina. *B. melitensis* WR201 se desarrolló a partir de *B. melitensis* 16M, al reemplazar la mayor parte de *purE* y los primeros 7 pares de bases de *purK* con un cassette de resistencia a la kanamicina. Al ser cultivada en medio mínimo, WR201 mostró auxotrofia para la adenina y la guanina y en contraste con su cepa de origen no creció en macrófagos humanos derivados de monocitos, mientras que la cepa 16M

incrementó su cantidad aproximadamente 100 veces en el transcurso de 72 h. Esta vacuna se probó en ratones, encontrándose que los animales desarrollan anticuerpos anti-lipopolisacárido y producen IL-2 e IFN- γ . Al ser desafiados con la cepa 16M por vía intranasal en dosis de 10^4 UFC, los ratones vacunados mostraron una reducción en la diseminación de 16M de 50 al 70%, así como una eliminación acelerada de los pulmones. En estudios realizados con *Macaccus rhesus* se demostró que la vacuna proporciona inmunidad y protección contra la enfermedad, cuando los monos son desafiados con 16M por aerosol con 10^5 veces la dosis de infección 50. En la necropsia efectuada ocho semanas después del desafío, 16M se recuperó de los nódulos linfáticos y de otros tejidos de los animales no inmunizados, pero no fue recuperada de los animales inmunizados. Sin embargo, se obtuvo una colonia de WR201 de un testículo de un animal y otra de un nódulo linfático perteneciente a otro. Estos datos indican que la cepa WR201, está suficientemente atenuada para monos, a los cuales también brinda protección; sin embargo, su grado de atenuación no permite ser administrada en humanos. Lógicamente, es factible que su prolongada persistencia en los tejidos se relacione a la aplicación de altas dosis de la vacuna y que la disminución de las mismas pudiera conducir al uso de WR201 en pruebas futuras. (27, 44)

La secuenciación completa del genoma de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* podrá ayudar a que pronto se produzcan vacunas efectivas para humanos y a que se mejoren las ya existentes para animales. Las nuevas técnicas moleculares de vacunación que incluyen el uso de ADN, el empleo de nuevos adyuvantes y la

selección de inmunógenos con base en exploraciones de corte genómico o proteómico pueden conducir a la preparación de productos con más ventajas en cuanto a seguridad y eficacia. (44)

4. Manejo de *Brucella* en el laboratorio

La brucelosis es una de las infecciones que más comúnmente se adquieren en el laboratorio clínico, destacando las patologías por *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus* o *B. canis*. Sin embargo, también se han reportado afecciones con las cepas vacunales de *B. abortus* S19 y *B. melitensis* Rev-1. A continuación se mencionan las posibles causas de estas infecciones (75, 97):

- a) Resultados erróneos en las extensiones teñidas al Gram. Se han reportado casos en donde la bacteria aislada resistió a la decoloración con alcohol-acetona y apareció como cocobacilo Gram positivo o Gram variable, siendo identificada como *Micrococcus sp* o un bacilo corineforme. Si la tinción de Gram se malinterpreta, el microorganismo puede ser mal identificado, dando lugar a diagnósticos erróneos e incrementando los riesgos de exposición del personal de laboratorio.
- b) Manejo inadecuado de las muestras o cultivos. La concentración de *Brucella* en algunas muestras puede ser baja, lo que por ende apoya el origen de las equivocaciones; sin embargo, el peligro se incrementa después de la incubación de los cultivos líquidos y sólidos, cuando éstos contienen cantidades bastante mayores. Diversos procedimientos de rutina

tales como la preparación, centrifugación y agitación vigorosa de las suspensiones de bacterias, así como la realización de subcultivos y pruebas bioquímicas, pueden traducirse en generadores de aerosoles peligrosos y suspensiones densas de riesgo elevado. La propia prueba de la catalasa representa un riesgo, ya que genera burbujas en las muestras positivas.

- c) Malas prácticas de laboratorio como aspirar el contenido de las cajas Petri, trabajar en una mesa abierta con muestras clínicas, no usar equipo protector como guantes, máscaras y goggles o ingerir accidentalmente suspensiones con brucelas vivas al pipetear con la boca. También se han presentado eventos inusitados como la autoinoculación con jeringas que contienen restos de suspensión del microorganismo o con líquido sinovial de un paciente infectado, etc.
- d) Accidentes de laboratorio tales como la ruptura de tubos de centrifuga o de viales para cultivo sanguíneo. En general, se estima que el 20% de los casos de infección en el laboratorio se deben a situaciones accidentales.

Numerosas exposiciones de los trabajadores de un laboratorio clínico pueden disminuir significativamente si el médico informa oportunamente sobre las sospechas de brucelosis en ciertos pacientes; de esta forma, el personal manejará las muestras de manera adecuada y más segura. Un inconveniente de la amplia gama de manifestaciones clínicas relacionadas con el padecimiento consiste en que los médicos no siempre consideran la posibilidad de esta enfermedad. (75, 97)

Prácticamente el personal está obligado a manejar los cultivos vivos de *Brucella* y los especímenes sospechosos en un gabinete de seguridad de tipo II. Sin embargo, esto varias veces es insuficiente para prevenir la exposición, ya que cuando se sospecha o se confirma que se trata de *Brucella* la transmisión ya pudo haber tenido lugar. (97)

Algunas recomendaciones para minimizar el riesgo de contagio en el laboratorio son (97):

- 1) Insistir en que los médicos informen al laboratorio cuando sospechen que un paciente tiene brucelosis.
- 2) Adoptar y seguir estrictamente las buenas prácticas de laboratorio, reforzándolas y monitoreándolas regularmente.
- 3) Educar periódicamente al personal del laboratorio para que esté familiarizado con las características del microorganismo y con el manejo seguro de los cultivos.
- 4) Emplear el gabinete de bioseguridad en todo trabajo que involucre bacilos cortos o cocobacilos Gram negativos o Gram-variables, aislados de tejidos, sangre, médula ósea, hueso o líquido sinovial.

- 5) Sellar las cajas con cultivo cuando no se estén empleando, y esterilizarlas y desecharlas adecuadamente en cuanto dejen de ser útiles.

- 6) Evitar la realización de pruebas innecesarias como las de susceptibilidad a los antibióticos, ya que *Brucella* generalmente no muestra resistencia a los mismos y el régimen terapéutico para tratar la brucelosis es estándar.

- 7) Privilegiar el uso de sistemas automatizados de monitoreo continuo para el cultivo sanguíneo de las muestras provenientes de pacientes con sospecha de brucelosis. Evitar el método de lisis por centrifugación, porque implica la centrifugación de las muestras y la inspección visual de las placas para detectar al microorganismo. Si bien los métodos basados en la lisis de la sangre incrementan la detección de *Brucella*, los modernos sistemas automatizados de cultivo sanguíneo son más rápidos y más sensibles.

- 8) Evacuar el laboratorio de inmediato si una suspensión viable de *Brucella* es derramada; las puertas deben cerrarse y se debe aplicar un germicida efectivo como fenol al 3% o cloro al 10%. La persona encargada de la aplicación debe estar entrenada y utilizar una máscara de seguridad, goggles, bata impermeable y guantes.

B. Tratamiento de la brucelosis humana

Aún no hay evidencia concluyente sobre el tratamiento óptimo de la brucelosis y la recurrencia de la enfermedad representa uno de los problemas terapéuticos más importantes. La recomendación de la Organización Mundial de la Salud para el tratamiento de la brucelosis aguda en adultos se publicó en 1986 y consiste en una combinación de rifampina (600 a 900 mg) y doxiciclina (200 mg), diariamente, por un mínimo de seis semanas. (23, 31, 57, 76, 85, 88)

Alternativamente, la OMS sugiere que la rifampina podría ser reemplazada por estreptomicina (15mg/kg), administrada intramuscularmente durante dos semanas. Algunos investigadores consideran que la combinación de estreptomicina intramuscular con una tetraciclina oral tiene menos probabilidades de recurrencia y que actualmente es la mejor opción terapéutica disponible, especialmente cuando se refiere a casos de formas localizadas de la enfermedad. (23, 76, 88)

De hecho, diversos estudios demuestran que el régimen basado en estreptomicina con tetraciclina oral se asocia a menores cantidades de recurrencias que la combinación doxiciclina con rifampina; sin embargo, el perfil toxicológico de la estreptomicina (que requiere del monitoreo de la función renal) y el hecho de que dicho aminoglucósido deba ser administrado por vía intramuscular o intravenosa representan dos grandes desventajas. (23, 88)

Por otro lado, la combinación tetraciclina con rifampina tiene la ventaja de que ambos medicamentos se administran oralmente, pero la recurrencia de la brucelosis es más común que con otras alternativas y su toxicidad no es despreciable. (23, 31)

Las pruebas clínicas controladas que se han llevado a cabo con otros antibióticos, incluyendo sulfametoxazol-trimetoprim, nuevos macrólidos y beta-lactaminas, han proporcionado resultados pobres, o bien, han involucrado a un muy bajo número de pacientes y ello no permite una evaluación representativa. Por ello, los regímenes más utilizados son los dos mencionados anteriormente, los cuales han sido recomendados por la OMS. (31)

Los tratamientos basados en quinolonas constituyen una alternativa en pacientes que presentan recurrencias después de haber recibido otros medicamentos, e inclusive, que han experimentado toxicidad con estos últimos. Las quinolonas pueden reemplazar a la tetraciclina o a la rifampina cuando alguno desencadene toxicidad. Además, hay reportes alentadores en cuanto a los resultados clínicos asociados a las quinolonas como un tercer agente terapéutico. (31)

La monoterapia con rifampina representa la opción principal para la brucelosis durante el embarazo y su combinación con sulfametoxazol-trimetoprim es el tratamiento recomendado para tratar la brucelosis en infantes, aunque también se ha utilizado la combinación sulfametoxazol-trimetoprim oral por tres semanas con

gentamicina intramuscular durante cinco días, en niños menores de ocho años.
(31, 78)

Algunas formas localizadas de brucelosis son difíciles de tratar y su recurrencia también representa un problema terapéutico serio. La cirugía constituye una opción a considerar para pacientes con endocarditis o abscesos en cerebro, bazo u otros órganos; evidentemente, el tratamiento médico en cuanto a antibióticos utilizados es esencialmente el mismo, pero suele requerirse que la terapia se prolongue hasta por seis meses o más, sobre todo en pacientes con formas osteoarticulares de la enfermedad y especialmente en casos de espondilitis. Las combinaciones con tres antimicrobianos resultan útiles en algunos casos de endocarditis, espondilitis y meningitis, y el modelo más aceptado incluye rifampina, una tetraciclina y un aminoglucósido. (23, 31)

V. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Las manifestaciones clínicas de la brucelosis humana son muy variables y poco específicas, por lo que el diagnóstico se establece fundamentalmente vía métodos de laboratorio, ya sea aislando e identificando al patógeno o demostrando la presencia de altos títulos de anticuerpos específicos en su contra. (20, 23, 66)

El hemocultivo continúa siendo el método microbiológico más utilizado y, aunque es efectivo durante la fase aguda, su sensibilidad se reduce considerablemente en pacientes con evoluciones clínicas de largo tiempo o complicaciones localizadas. Los cultivos bacteriológicos requieren de un prolongado periodo de incubación y el manejo de los microorganismos representa un riesgo para el personal del laboratorio. (20, 23, 29, 66, 80,103)

Por lo que se refiere al diagnóstico serológico, se han señalado diversas limitaciones, incluyendo su pobre sensibilidad en las primeras etapas de la infección, durante las cuales los niveles de anticuerpos pueden ser muy bajos, así como una especificidad reducida en áreas donde la enfermedad es endémica y en personas que están expuestas a *Brucella* por cuestiones laborales, e inclusive, algunas reacciones cruzadas con otras bacterias. (20, 24, 66)

En los últimos años se han desarrollado pruebas moleculares para el diagnóstico de brucelosis, buscando superar las desventajas y limitaciones de los métodos microbiológicos y serológicos. Las más frecuentes se han basado en la amplificación del ADN bacteriano vía la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por *polymerase chain reaction*). Recientemente se reportó que la PCR aplicada a muestras sanguíneas provee mejores resultados que las técnicas de cultivo tradicionales, se trate de infecciones agudas, recurrentes o complicaciones localizadas de la enfermedad. (20, 66, 80)

Es importante mencionar que la identificación de la especie no es esencial para instituir el tratamiento, ya que en todos los casos de brucelosis humana se emplean los mismos medicamentos, por lo que algunas pruebas moleculares únicamente conducen a la detección del género. (20)

Evidentemente, en virtud de su costo y los requerimientos de personal especializado, hasta el momento ninguno de los ensayos de diagnóstico molecular ha sido incorporado como de uso común en los laboratorios clínicos. (34)

A. Cultivo bacteriológico

La detección de *Brucella* mediante cultivos de laboratorio se fundamenta en la observación de las características morfológicas, coloniales y bioquímicas

específicas del género; la diferenciación de las especies se logra estudiando la sensibilidad a fucsina básica y tionina, la producción de H₂S, requerimiento de CO₂ y la susceptibilidad a fagos. (9, 29, 80, 104)

1. Muestras

Debido a la variación de las manifestaciones en la brucelosis humana, es preciso analizar una amplia gama de distintas muestras clínicas, las cuales pueden contener bacterias viables. El espécimen empleado con mayor frecuencia es la sangre venosa: en las formas agudas asociadas a *B. melitensis* la positividad de los cultivos sanguíneos es notablemente alta, ya que alcanza el 70-80% del total; sin embargo, esta cifra se reduce significativamente cuando se trata de infecciones crónicas, en pacientes con infecciones localizadas (meningitis, endocarditis, espondilitis, epidídimo-orquitis, etc.) y en los cuadros debidos a *B. suis* o *B. abortus*, donde el porcentaje de cultivos con resultados positivos pocas veces sobrepasa el 30-50%. (20, 37, 97, 98, 103)

El aislamiento de estas bacterias también puede obtenerse a partir de muestras de médula ósea, bazo, hígado y materiales provenientes de abscesos; además, se han reportado casos excepcionales en que las brucelas se aíslan de pus, líquido sinovial, fluido cerebroespinal, orina y exudados genitales. En general, el diagnóstico de las formas localizadas de brucelosis es complicado y el rendimiento

de los cultivos de muestras no sanguíneas fluctúa entre el 10 y 40%. (37, 97, 98, 103)

De acuerdo con la Guía de Laboratorio de la ASM (por *American Society for Microbiology*) las muestras clínicas más aceptables para el aislamiento de *Brucella* son la sangre venosa, suero, médula ósea, líquido sinovial, hígado, bazo y abscesos. (37)

1.1 Análisis de muestras sanguíneas, médula ósea o líquido sinovial

Los métodos más utilizados para llevar a cabo el cultivo de sangre, médula ósea o líquido sinovial son los siguientes:

a) Sistemas bifásicos. El más conocido es el de Ruiz Castañeda, en el cual se utiliza como fase sólida agar-soya-tripticosa, agar-triptosa o agar-brucela y, como fase líquida, el mismo medio pero carente de agar; también se ha empleado la combinación de agar infusión cerebro-corazón y caldo nutritivo. Las muestras se inoculan por duplicado y los sistemas se incuban durante dos o tres semanas y hasta por un mes, a 37°C, con y sin CO₂; el medio líquido se inclina sobre la fase sólida diariamente y se realizan subcultivos ciegos cada 7 días, en agar sangre de carnero (SBA), agar chocolate y MacConkey o EMB; las placas se incuban a 37°C en incubadoras con 5 a 10% de CO₂. (9, 36, 37,104)

En el caso de infecciones agudas producidas por *Brucella melitensis*, la proporción de hemocultivos positivos realizados por esta técnica es de 70 al 80%; sin embargo, la tasa de aislamiento asociada a muestras de pacientes con formas crónicas o subagudas de la enfermedad continúa siendo baja y pocas veces excede el 30 al 50%. (6, 54)

Evidentemente, existen sistemas comerciales bifásicos tales como el septi-check BBL o PML bifásico. (37, 89)

b) Sistemas de lisis por centrifugación. La técnica de lisis por centrifugación emplea equipo y reactivos disponibles en la mayoría de los laboratorios clínicos y permite confirmar el diagnóstico clínico en menos tiempo que la de Ruiz Castañeda; de hecho, detecta la mayoría de los casos agudos en un promedio de 2.4 días y los casos crónicos en 2.7 días, aunque tiene como desventaja la de ser un procedimiento manual y laborioso que implica grandes riesgos para las personas que la efectúan; también en este caso existen sistemas comerciales tales como el ISOLATOR y el Isostat. (9, 37, 71, 100)

c) Sistemas de monitoreo continuo. Estos sistemas detectan automáticamente el crecimiento, ya que generalmente se conforman por un indicador de crecimiento, un mecanismo de detección y un sistema de señalamiento. La ventaja más importante de los sistemas de monitoreo continuo consiste en la rápida detección de la bacteria, lo que a su vez disminuye el tiempo en que inicia el tratamiento.

Además, el uso de instrumentos automatizados minimiza el riesgo de contaminación y mejora la seguridad en el laboratorio. (71)

Los sistemas automatizados detectan más del 95% de los cultivos positivos de *B. melitensis* dentro de los primeros 7 días de incubación. A menos de que esta tecnología no estuviera al alcance del laboratorio, las incubaciones prolongadas, los subcultivos ciegos y los medios de cultivo especiales podrían no ser requeridos, aún cuando algunos autores recomiendan que, en casos negativos, se prolongue la incubación a un mínimo de 21 días, con subcultivos semanales que permanezcan a 35°C durante al menos 7 días. (29, 37, 56, 99, 100,103)

Uno de los principales sistemas de monitoreo para la detección de *Brucella* es el BACTEC 9120, que detecta y mide la concentración de CO₂ producido por los microorganismos, a través de un sensor localizado en la parte inferior de cada tubo. Se inoculan de 1 a 5 mL de la muestra de sangre en los tubos para hemocultivo BACTEC Peds Plus/F y 10 mL en los tubos Plus Aerobic/F, y posteriormente se incuban durante 7 días en el equipo. Según un estudio realizado, el tiempo promedio de detección de 20 aislamientos de *Brucella melitensis* fue de 63.87 horas. (29)

El sistema BACTEC 9240 se ha acoplado al medio pediátrico Peds Plus/F y al Plus Aerobic/F para muestras de adultos, lo que ha redituado importantes mejoras: la detección de *Brucella* ocurre en siete días, sin la necesidad de subcultivar los viales de los hemocultivos negativos. (8)

El sistema BACTEC 9240 también se ha acoplado con el medio MYCO/F LYTIC, el cual contiene saponina para lisar los leucocitos de las muestras sanguíneas; sin embargo, se observó que, comparado con el Peds Plus/F y el Plus Aerobic/F, tardaba 24 h más que los anteriores en proporcionar el resultado. (100)

1.2 Aislamiento a partir de tejido o lesiones

Las muestras de tejido o de lesiones se trituran asépticamente en un mortero y se inoculan en medios SBA, agar chocolate y MacConkey o EMB. Las placas se incuban a 35°C con 5-10% de CO₂ y se examinan diariamente por un mínimo de 7 días. (36, 37, 56, 70)

2. Observación de extensiones teñidas al Gram

Las bacterias del género *Brucella* aparecen como pequeños cocobacilos Gram negativos débilmente teñidos, de 0.5 µm a 0.7µm de ancho por 0.6µm a 1.5µm de largo. (36, 37, 104)

1. Pruebas bioquímicas

Prueba de las oxidasas

Esta prueba determina la presencia de enzimas oxidasas asociadas a los citocromos de la cadena respiratoria y se realiza sobre muestras de colonias en crecimiento activo (18-24 h) obtenidas en el medio SBA u otro equivalente. *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* son oxidasas positivas, mientras que *B. canis* se considera variable. (36, 37)

Prueba de la ureasa

Determina la capacidad de un microorganismo para hidrolizar la urea, formando amoníaco, como respuesta a la acción de la enzima ureasa. Todas las especies de *Brucella* son positivas, pero la velocidad de la actividad enzimática es útil para la diferenciación de las especies. En el medio de Christensen la hidrólisis de la urea puede ser observada en alrededor de 15 minutos con *B. suis* y *B. canis* y después de 24 h con la mayoría de las cepas de *B. abortus* y *B. melitensis*. Algunas cepas de esta última especie requieren de periodos aún más largos para evidenciar su positividad. (37, 104)

4. Interpretación del cultivo bacteriológico

Identificación presuntiva del género:

a) Extensiones teñidas al Gram: La observación de cocobacilos Gram negativos, débilmente teñidos, con las dimensiones antes señaladas, e inclusive, acompañados por elementos cocoides de la misma coloración. (36, 37, 104)

b) Morfología de las colonias. Las colonias en medio SBA son puntiformes (de 0.5 a 1.0 mm de diámetro), convexas, brillantes, no hemolíticas y sin pigmento; son visibles después de 48 o 72 h de incubación. Los aislados generalmente no crecen en EMB o MacConkey, aunque ocasionalmente se han observado en ellos colonias puntiformes después de 7 días o más. (14, 36, 104)

c) Pruebas bioquímicas. Suelen dar positivas para ureasa y oxidasa excepto *B. canis* que es variable para esta última. (36, 104)

La identificación de la especie se logra tomando en cuenta los resultados de la prueba de hidrólisis de la urea y realizando las pruebas adicionales descritas en el capítulo I (9, 22, 29, 40, 65, 89):

- a. Requerimiento de CO₂ para desarrollar.
- b. Acción inhibitoria de fucsina básica y tionina.
- c. Producción de H₂S.
- d. Fagotipificación.

B. Diagnóstico mediante serología

Si bien se han diseñado y probado diversas pruebas serológicas para el diagnóstico de brucelosis, lo cierto es que aún no se ha encontrado la técnica ideal. La sensibilidad de estas pruebas varía del 65 al 95% pero su especificidad en áreas endémicas es baja debido a la alta prevalencia de anticuerpos entre la población sana. Estas reacciones son difíciles de interpretar en personas con riesgo laboral, en pacientes con historia reciente de brucelosis y en pacientes con enfermedad recurrente (pues los anticuerpos contra *Brucella* permanecen durante lapsos prolongados). Además, la mayoría de las pruebas serológicas son sensibles a reacciones cruzadas. (2, 3, 20, 66, 103)

Los métodos de diagnóstico serológico para la brucelosis se han basado principalmente en la reactividad del lipopolisacárido de las cepas lisas y uno de los mayores problemas que el químico enfrenta reside en la similitud de la cadena lateral del polisacárido O de dicha molécula con el de *Yersinia enterocolítica* 0:9 y *Vibrio cholerae*. Dicha reactividad cruzada ha restringido la especificidad de numerosas propuestas diagnósticas. (14, 24, 104)

Entre las variantes que se han ensayado se cuentan las pruebas de fijación del complemento, el ensayo radioinmunológico, la prueba de aglutinación con 2-

mercaptoetanol, la prueba de inmunocaptura-aglutinación y ELISA. (20, 70, 103, 104)

Sin embargo, la más utilizada en la actualidad es la prueba de aglutinación en tubo. Los anticuerpos contra todas las especies de *Brucella*, exceptuando a *B. canis*, se detectan utilizando antígenos de *B. abortus* 1119-3; por su parte, para el diagnóstico de la enfermedad causada por *B. canis* se emplea un antígeno específico de esta especie o de *B. ovis*. El diagnóstico tiene lugar cuando ocurre un aumento de cuatro veces en el título o un título único mayor o igual a 1:160 con síntomas compatibles. Se han detectado falsos positivos en pacientes con salmonelosis, tularemia, cólera, lupus eritematoso y mieloma. Además, esta prueba tiene tasas elevadas de falsos negativos en casos complicados o crónicos. (3, 5, 16, 65, 70, 103, 104)

La mayoría de los laboratorios utilizan la prueba de Coombs como una extensión de la prueba de aglutinación en tubo para detectar anticuerpos no aglutinantes. Sin embargo también se ha reportado un alto número de falsos negativos con esta prueba. (5)

Se ha evaluado el sistema comercial PANBIO que es una prueba de ELISA para detectar anticuerpos IgG o IgM contra *Brucella* utilizando muestras de suero. En el estudio la sensibilidad de detección fue de 91% y 100% para IgG e IgM respectivamente y la especificidad fue de 100% para ambos. El reporte afirma que este método es la prueba de elección para el diagnóstico de casos complicados o

crónicos, especialmente cuando la prueba de aglutinación en tubo y la prueba de Coombs son negativas. Sin embargo no se recomienda para su uso en el diagnóstico de pacientes con brucelosis aguda ya que las pruebas de aglutinación tienen una confiabilidad similar para esta condición y son menos costosas. (5)

El diagnóstico serológico se realiza con una muestra de suero durante la fase aguda de la infección, seguida por otro espécimen igual obtenido durante la fase de convalecencia, 21 a 28 días después. (56)

C. Métodos moleculares

La metodología molecular ofrece una alternativa para el diagnóstico de la brucelosis y se fundamenta en el empleo de la PCR, a la cual se ha reconocido una alta sensibilidad y especificidad, así como la posibilidad de generar resultados confiables en poco tiempo, características que superan a las pruebas convencionales. Estos métodos han sido desarrollados durante la última década, por lo que los protocolos para la preparación de las muestras, las secuencias “blanco” y los métodos de detección aún no han sido estandarizados. (20, 24, 103)

Por otro lado, se está investigando si la secuenciación del gen 16S rRNA es útil para el diagnóstico de la brucelosis humana y animal. (34)

1. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa corresponde a un método de amplificación logarítmica de secuencias cortas de ADN (generalmente de 100 a 600 bases) que son específicas de la bacteria en turno. Los principales componentes de esta reacción son (45):

- a) La secuencia “blanco”, que es la secuencia de ácido nucleico que se quiere amplificar. Consiste en alrededor de 100 a 600 pares de bases.
- b) Un par de iniciadores o *primers*, cada uno de aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, que son complementarios a las secuencias de interés en cada una de las dos cadenas que constituyen el ADN.
- c) Una DNA polimerasa termoestable (*Taq* pol I). Que requiere de la presencia de cloruro de magnesio, ya que el magnesio actúa como cofactor.
- d) Desoxirribonucleótidos trifosfatados libres.

Por otra parte, un ciclo de amplificación consta de las siguientes etapas (45):

1. Desnaturalización de la doble cadena de ADN, lo cual ocurre a 94°C.
2. Hibridación de los iniciadores con la secuencia “blanco” de la cual son complementarios; esto sucede cuando la temperatura se reduce a 50 o 60°C.
3. Elongación de la cadena de ADN complementaria, a partir de cada uno de los iniciadores. La DNA polimerasa termoestable realiza la síntesis cuando la temperatura se eleva a 72°C.

Generalmente se realizan entre 30 y 40 ciclos de amplificación, cada uno de alrededor de un minuto, de forma que el DNA “blanco” se obtiene en cantidades considerables para ser detectado con relativa facilidad. Es importante señalar que la PCR es una herramienta cualitativa para detectar la presencia o ausencia de un ADN particular pero no es un método de análisis cuantitativo, excepto cuando se efectúa en equipos que permiten la realización “en tiempo real”. (45)

Muestras

Para buscar e identificar el ADN de *Brucella* pueden utilizarse muestras de sangre o suero del enfermo, si bien las primeras deben procesarse antes de su análisis para obtener el ADN bacteriano; ello requiere de la lisis de las células sanguíneas y la purificación del ADN a través de métodos como *salting out*, aunque hay estudios en que se ha realizado la PCR sin la purificación del ADN. (20, 103)

Algunos autores señalan que el suero es la muestra óptima para el diagnóstico, ya que se evita la inhibición por anticoagulantes, hemoglobina, DNA humano o cualquier otra sustancia presente en la sangre completa; además, el procedimiento se simplifica porque no se requieren los pasos de lisis de eritrocitos, lavados por centrifugación, y medición y ajuste de las concentraciones del ADN aislado. (103)

Iniciadores y secuencias “blanco”

Debido a que la identificación de *Brucella* a nivel de especie no es necesaria para iniciar el tratamiento, puede utilizarse una PCR específica para el género. En tal sentido, se han seleccionado numerosas secuencias de ácidos nucleicos como “blanco” para el desarrollo de ensayos PCR específicos para *Brucella*. Dichas secuencias así como los iniciadores que se han investigado se muestran en la tabla 7, aunque debe mencionarse que la experiencia clínica implicada aún resulta insuficiente. (20, 24)

El “blanco” de PCR más frecuente para el diagnóstico de brucelosis en humanos es el gen *bcs_p31* que codifica para un antígeno de 31-kDa el cual se conserva en todas las especies de *Brucella*. (73, 103)

Métodos de detección

Una vez llevada a cabo la amplificación del segmento “blanco” de ADN, es preciso efectuar una técnica complementaria que permita su identificación. Las siguientes metodologías son las más empleadas:

a) Electroforesis en gel de agarosa. Es un método de separación de las moléculas de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Los fragmentos de ADN se visualizan con bromuro de etidio, un colorante que se une a la doble cadena de ADN por intercalación entre los pares de bases y que es detectado por fluorescencia cuando es irradiado en la parte UV del espectro.

Tabla 7. Genes, iniciadores y secuencias utilizados para la detección de ADN de *Brucella* por PCR. (20, 72)

Gen	Iniciador	Secuencia	Tamaño del producto amplificado (pares de bases)
Proteína de 31 kDa de <i>B.abortus</i>	B4/B5	TGGCTCGGTTGCCAATATCAA/ CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG	223
Proteína externa de membrana (<i>omp2</i>) de <i>B. abortus</i>	JPF/JPR	GCGCTCAGGCTGCCGACGCAA/ ACCAGCCATTGCGGTCGGTA	193
<i>B. abortus</i> 16S RNAr	Ba148-167F/ Ba928-948R	TGCTAATACCGTATGTGCTT/ TAACCGCGACCGGGATGTCAA	800
<i>B. abortus</i> 16S RNAr	F4/R2	TCGAGCGCCCGCAAGGGG/ AACCATAGTGTCTCCACTAA	905
Proteína de membrana externa de 43 kDa de <i>B. abortus</i>	No publicado	No publicada	635

Cuando existen resultados inciertos, éstos se confirman o rectifican mediante las técnicas Dot blot o Southern Blot. (45, 66)

Dot blot

Las muestras de ADN se colocan en forma de puntos sobre membranas de nitrocelulosa o nylon, en plantillas circulares y, posteriormente, son desnaturalizadas e hibridadas a una sonda específica. (48)

Southern Blot

En este procedimiento se transfieren fragmentos de DNA separados electroforéticamente (en un gel de agarosa) a filtros de nitrocelulosa o a membranas de nylon, para su detección por hibridación con sondas marcadas complementarias a la secuencia de interés. (49, 50)

b) PCR-ELISA

Se ha desarrollado un ensayo PCR-ELISA que se realiza con muestras de sangre venosa. Primero se amplifica una secuencia de 223 pares de bases del gen *bacsp31*; el producto amplificado es marcado con digoxigenina y se hibrida con una sonda biotinilada complementaria a la parte interna del producto. El híbrido se captura en pocillos de microtitulación revestidos con estreptavidina y es detectado utilizando un conjugado antidigoxigenina Fab-peroxidasa. El límite de detección de este ensayo es de 10 fg (lo correspondiente a dos células bacterianas), su sensibilidad de 94.9% y su especificidad de 96.5%. La detección del producto se realiza en menos de 24 h, no requiere aparato de electroforesis, ni luz ultravioleta o de reactivos tóxicos; además, permite el

manejo de un gran número de muestras en forma simultánea y puede automatizarse, con lo que se limita el riesgo de infección de los trabajadores del laboratorio. (66)

2. PCR en tiempo real

Los métodos de PCR en tiempo real se han empezado a usar para detectar a *Brucella*, aportando mejoras en cuanto a especificidad y lapsos requeridos para la obtención de los resultados. En algunas pruebas se amplifica una secuencia “blanco” y, en otras, denominadas PCR múltiple en tiempo real, se pueden amplificar varios “blancos” a la vez. (24)

Los ensayos de PCR en tiempo real se han descrito para la detección de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* biovar 1, utilizando como secuencias “blanco” elementos de integración IS711 que se encuentran en sitios específicos del genoma de cada especie o biovar de *Brucella*. (80)

Así mismo, se ha probado una PCR en tiempo real para la amplificación de un fragmento de 322 pares de bases del gen *per*, que codifica para una perosamina sintetasa específica del género *Brucella* que es necesaria para la biosíntesis de polisacárido O. Se analizaron 23 cepas de *Brucella*, así como 174 cepas correspondientes a otros géneros bacterianos, confirmándose la especificidad del ensayo. El límite de detección varió de 200 fg para *B. neotomae* (cepa NCTC 10084) y *B. ovis* (cepa 2604 f.PCR) a 2 pg para *B. melitensis* (cepa 16 M), *B. abortus* biovar 1 (cepa 544) y biovar 5 (cepa B3196) y *B. suis* biovar 1 (cepa 1330) y biovar 2 (cepa Thomsen). Actualmente, la técnica está siendo adaptada para probarse en muestras clínicas. (11)

Por último, existe una PCR múltiple en tiempo real que permite la identificación rápida de *Brucella sp.*, *B. abortus* y *B. melitensis* en una sola corrida. El método utiliza tres secuencias “blanco”: una para identificar al género *Brucella*, otra para identificar a *B. abortus* y una más para identificar a *B. melitensis*. Para identificar a *Brucella sp.* los iniciadores y la sonda tienen como “blanco” el gen *bcbp31*. Los “blancos” para identificar las especies *B. abortus* y *B. melitensis* son elementos de inserción *IS711*. En *B. abortus*, *IS711* se encuentra corriente abajo del gen *alkB* y en *B. melitensis* se encuentra corriente abajo del gen *BMEI1162*. El iniciador inverso es complementario al propio *IS711* y es útil para la amplificación de la secuencia “blanco” correspondiente a cualquiera de las dos especies; los iniciadores directos son complementarios, respectivamente, al gen *alkB* (*B. abortus*) o *BMEI1162* (*B. melitensis*). Los resultados de esta prueba se obtienen al cabo de 2 o 3 h. El ensayo emplea calor para inactivar a los microorganismos, lo que reduce en gran medida el riesgo de infección en el laboratorio. La sensibilidad y especificidad del ensayo fluctuaron entre 92 y 100%, estimándose que la prueba tiene un límite de detección de 150 fg. (80)

3. Secuenciación del gen 16S rRNA

En general, la comunidad científica considera que la secuenciación del gen 16S rRNA podría conducir al desarrollo de una prueba de diagnóstico para *Brucella* a nivel de género. Un estudio empleó las cepas correspondientes a las biovars y especies de *Brucella* que se encuentran con más frecuencia en las infecciones de animales y humanos, demostrándose que la secuenciación diferencia al género *Brucella* de otras bacterias relacionadas (*Ochrobactrum*

anthropi, *Agrobacterium sp.*, *Oligella urethralis* y *Vibrio cholerae*); sin embargo, aún es necesario investigar su efectividad en muestras clínicas. (34)

CONCLUSIONES

1. Por motivos prácticos al género *Brucella* se le divide en seis especies, si bien se reconoce que existen otras aisladas de mamíferos marinos que presentan características distintas.
2. Las manifestaciones clínicas de la brucelosis, ya sea ésta aguda, subaguda o crónica, son muy diversas y variables; en general, ninguna es lo suficientemente específica para sustentar el diagnóstico médico y la situación del paciente suele agravarse debido a las complicaciones y a las infecciones recurrentes.
3. *Brucella* se aloja en el interior de los macrófagos, sus células hospederas preferidas, evadiendo los mecanismos antiparasitarios y reproduciéndose dentro del fagosoma involucrado, al cual por ello se le denomina brucelosoma. Para entender a fondo los eventos que derivan en la infección, aún es necesario identificar y analizar diversas moléculas y receptores en la superficie macrofágica, así como ciertos componentes bacterianos que intervienen en el proceso de invasión y en el tráfico intracelular.

4. Hasta el momento, los factores de virulencia más conocidos en *Brucella*, son: **a)** el lipopolisacárido de la membrana externa, involucrado en la internalización y el transporte intracelular de la bacteria, así como en la promoción de una respuesta inmunológica baja por parte del hospedero; **b)** el sistema de dos componentes *bvrS/bvrR*, que al parecer aporta estabilidad a la membrana externa bacteriana; **c)** el operón *virB*, que promueve la interacción del fagosoma con el retículo endoplásmico; **d)** el gen *bacA*, que codifica para una proteína de transporte que forma parte de la membrana externa y cuya función podría ser la de transportar ácidos grasos de cadena muy larga para que se integren posteriormente al lipopolisacárido de la membrana externa; **e)** los β -1,2-cicloglucanos que al parecer contribuyen a la estabilización y/o ensamble de sistemas macromoleculares de la membrana externa de las bacterias; y **f)** el gen *hfq*, la enzima superóxido-dismutasa, el operón *cydAB* y los genes *purE* y *aroC*, todos los cuales realizan funciones asociadas a la adaptación de la bacteria al ambiente del interior del brucelosoma.
5. Actualmente, la prevención de la brucelosis humana reside principalmente en el cuidado de los animales y en el control de la calidad de sus productos, por lo que resultan de suma importancia las campañas de regulación sanitaria en establos, rastros, camiones y expendios de carne y el aseguramiento de la calidad de los alimentos para consumo humano.

6. La brucelosis es una de las infecciones adquiridas con mayor frecuencia por trabajadores de los laboratorios clínicos; resulta necesario solicitar a los médicos que informen de los casos en que se sospecha de brucelosis, a fin de minimizar los riesgos de contagio, ello además de insistir en el seguimiento estricto de las medidas relacionadas con las buenas prácticas de laboratorio.
7. El tratamiento de la brucelosis es prolongado. El régimen terapéutico recomendado por la OMS continúa basándose en la combinación de rifampina (600 a 900 mg diarios) y doxiciclina (200 mg diarios), administrándose durante un mínimo de seis semanas.
8. Hasta el momento no se cuenta con una vacuna efectiva contra la brucelosis, que pudiera aplicarse al humano.
9. El diagnóstico de la brucelosis humana es muy complicado y aún no existe un método más efectivo que los demás. Numerosas técnicas basadas en la detección de anticuerpos son de poca utilidad en poblaciones donde la enfermedad es común. Lógicamente, los métodos basados en PCR y PCR en tiempo real son muy prometedores, pero aún no se han estandarizado ni se utilizan en los laboratorios clínicos convencionales.
10. La realización de investigaciones acerca de la brucelosis en humanos es muy relevante, habida cuenta que se trata de una enfermedad común en numerosos países, la cual fácilmente pasa inadvertida y, a falta de una

terapéutica apropiada, puede tornarse crónica inhabilitando en forma permanente al paciente. Adicionalmente, aún existen numerosas características de estas bacterias, incluidos algunos factores de virulencia y ciertos mecanismos que originan la enfermedad, que aún se desconocen y que podrían resultar determinantes para el desarrollo de mejores tratamientos, vacunas efectivas y métodos de diagnóstico más confiables. Finalmente, puesto que las personas resultan infectadas por entrar en contacto con animales o con productos provenientes de ellos, los hallazgos que se logren en torno a *Brucella* también beneficiarán a la industria ganadera, que a menudo registra pérdidas económicas relacionadas con dicho microorganismo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Akinci E, Bodur H, Cevik MA, Erbay A, Eren SS, Ziraman I, Balaban N, Atan A, Erqul G. A Complication of Brucellosis: Epididymoorchitis, *Int J Infect Dis*, 2006; 10(2):171-177.
2. Al Skait M A. Seroepidemiological Survey of Brucellosis Antibodies in Saudi Arabia, *Ann Saudi Med*, 1999; 19: 219-222.
3. Almuneef M, Memish Z A. Persistence of *Brucella* Antibodies after Successful Treatment of Acute Brucellosis in an Area of Endemicity, *J Clin Microbiol*, 2002; 40: 2313.
4. Andriopoulos P, Tsironi M, Deftereos S, Aessopos A, Assimakopoulos G. Acute Brucellosis: Presentation, Diagnosis, and Treatment of 144 Cases, *Int J Infect Dis*, 2007; 11 (1) 52-57.
5. Araj GF, Kattar MM, Fattouh LG, Bajakian, KO, Kobeissi SA. Evaluation of the PANBIO *Brucella* Immunoglobulin G (IgG) and IgM Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Diagnosis of Human Brucellosis, *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005; 12 (11) 1334–1335.
6. Ariza J, Corredoira J, Pallares R, Fernandez-Viladrich F, Rufi G, Pujol M, Gudinol F. Characteristics of and Risk Factors for Relapse of Brucellosis in Humans, *Clin Infect Dis*, 1995; 20:1241-1249.
7. Baldwin CL., Goenka R. "Host Cellular Immune Responses Against *Brucella* spp. Evaluated Using the Mouse Model" en *Brucella: Molecular and Cellular Biology*, Gran Bretaña, Horizon Bioscience, 2004; pp 341-367.
8. Bannatyne, RM, Jackson MC, Memish Z. Rapid Diagnosis of *Brucella* Bacteremia by Using the BACTEC 9240 System, *J. Clin. Microbiol*, 1997; 35: 2673-2674.

9. Basappa GM, Smita SM. Evaluation of Conventional Castaneda and Lysis Centrifugation Blood Culture Techniques for Diagnosis of Human Brucellosis, *J Clin Microbiol*, 2004; 42: 9: 4327-4328.
10. Bellaire BH, Roop II RM, Cardelli JA. Opsonized Virulent *Brucella abortus* Replicates within Nonacidic, Endoplasmic Reticulum-Negative, LAMP-1-Positive Phagosomes in Human Monocytes, *Infect Immun*, 2005; 73 (6) 3702-3713.
11. Bogdanovich T, Skurnik M, Lubeck PS, Ahrens P, Hoorfar J. Validated 5' nuclease PCR Assay for Rapid Identification of the Genus *Brucella*, *J Clin Microbiol*, 2004; 42:5, 2261-2263.
12. Briones G, Iñón de Iannino N, Roset M, Vigliocco A, Silva PP, Ugalde RA. *Brucella abortus* Cyclic β -1,2-Glucan Mutants Have Reduced Virulence in Mice and Are Defective in Intracellular Replication in HeLa Cells, *Infect Immun*, 2001; 69 (7) 4528-4535.
13. Bundle DR, Cherwonogrodzky JW, Perry MB. The Structure of the Lipopolysaccharide O-Chain (M Antigen) and Polysaccharide B Produced by *Brucella melitensis* 16M, *FEBS Lett*, 1987; 216 (2) 261-264.
14. Caroff M, Bundle DR, Perry MB, Cherwonogrodzky JW, Duncan JR. Antigenic S-Type Lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3t, *Infect Immun*, 1984; 46 (2) 384-388.
15. Cascales E, Christie PJ. The Versatile Bacterial Type IV Secretion Systems. *Nature Reviews. Microbiology*, 2003; 1: 137-149.
16. Cassataro J, Delpino MV, Velikovskiy CA, Bruno L, Fossati CA, Baldi, PC. Diagnostic Usefulness of Antibodies against Ribosome Recycling Factor from *Brucella melitensis* in Human or Canine Brucellosis, *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002; 9 (2) 366-369.
17. Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* Evades Macrophage Killing via VirB-dependent Sustained Interactions with the Endoplasmic Reticulum, *J Exp Med*, 2003; 198 (4) 545-556.

18. Cliver D. Foodborne diseases, EUA, Academic Press Inc, 1990; pp 260-266.
19. Cloeckaert A, Vizcaíno N. "DNA Polymorphism and Taxonomy of *Brucella* species" en *Brucella. Molecular and Cellular Biology*, Gran Bretaña, Horizon Bioscience, 2004; pp 1-24.
20. Colmenero JD, Quiapo-Ortuño MI, Morata P. "Polymerase Chain Reaction: a Powerful New Approach for the Diagnosis of Human Brucellosis" en *Brucella: Molecular and Cellular Biology*, Gran Bretaña, Horizon Bioscience, 2004; pp 53-68.
21. Comercí DJ, Martínez-Lorenzo MJ, Sieira R, Gorvel JP, Ugalde RA. Essential Role of the VirB Machinery in the Maturation of the *Brucella abortus*-Containing Vacuole, *Cellular Microbiology*, 2001; 3(3) 159-168.
22. Corbel MJ, Brinley-Morgan WJ. "Genus *Brucella*", en *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, EUA, Williams and Wilkins, 1984; pp. 377-388.
23. Corbel MJ. Brucellosis: an Overview. 1st International Conference on Emerging Zoonoses. Jerusalem, Israel. *Emerg Infect Dis*, 1997; 3 (2) 213-221.
24. Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ. Brucellosis – New Aspects of an Old Disease, *J Appl Microbiol*, 2005; 98: 1270-1281.
25. Dorn BR, Dunn Jr WA, Progulské-Fox A. Bacterial interactions with the autophagic pathway, *Cellular Microbiology*, 2002; 4(1), 1–10.
26. Dornand J, Lafont V, Oliaro J, Terraza A, Castaneda-Roldan E, Liautard JP. Impairment of intramacrophagic *Brucella suis* multiplication by human Natural Killer cells through a contact-dependent mechanism, *Infect Immun*, 2004; 72 (4) 2303-2311.
27. Drazek ES, Houg HSH, Crawford RM, Hadfield TL, Hoover DL, Warren RL. Deletion of *purE* Attenuates *Brucella melitensis* 16M for Growth in Human Monocyte-Derived Macrophages, *Infect Immun*, 1995; 63 (9) 3297–3301.

28. Drevets DA, Leenen PJM, Greenfield RA. Invasion of the Central Nervous System by Intracellular Bacteria, *Clin Microbiol Rev*, 2004; 17 (2) 323-347.
29. Durmaz G, Us T, Aydinli A, Kiremitci A, Kiraz N, Akgun Y. Optimum detection times for bacteria and yeasts species with the BACTEC 9120 aerobic blood culture system: Evaluation for a 5-year period in a Turkish University Hospital, *J Clin Microbiol*, 2003; 41: 2: 819-821.
30. Estein SM. Brucelosis: Inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica). *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*®, 2006; Vol.7, no. 5, <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050506.html>
31. Falagas ME, Bliziotis IA. Quinolones for Treatment of Human Brucellosis: Critical Review of the Evidence from Microbiological and Clinical Studies, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 2006; 50 (1) 22–33.
32. Fallatah SM, Oduloju A J, Al-Dusari SN, Fakunle YM. Human brucellosis in Northern Saudi Arabia, *Saudi Med J*, 2005; 26 (10) 1562-1566.
33. Fernandez-Prada CM, Zelazowska EB, Nikolich M, Hadfield TL., Roop II RM, Robertson GL, Hoover DL. Interactions between *Brucella melitensis* and Human Phagocytes: Bacterial Surface O-Polysaccharide Inhibits Phagocytosis, Bacterial Killing, and Subsequent Host Cell Apoptosis, *Infect Immun*, 2003; 71 (4) 2110–2119.
34. Gee JE, Levett PN, Whitney AM, Novak RT, Popovic T. Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid confirmatory identification of *Brucella* isolates, *J Clin Microbiol*, 2004; 42(8) 3649-3654.
35. Gee JM, Wright Valderas M, Kovach ME, Grippe VK, Robertson GT, Wai-Leung Ng, Richardson JM, Winkler ME, Roop II RM. The *Brucella abortus* Cu,Zn Superoxide Dismutase Is Required for Optimal Resistance to Oxidative Killing by Murine Macrophages and Wild-Type Virulence in Experimentally Infected Mice, *Infect Immun*, 2005; 73 (5) 2873-2880.

36. Gilligan PH, York MK. Red De Laboratorios De Respuesta. Procedimiento para la Identificación de *Brucella spp* en laboratorios de nivel A. American Society for Microbiology. 2004; <http://www.asm.org/index.asp>
37. Gilligan PH, York MK. Sentinel laboratory guidelines for suspected agents of bioterrorism. *Brucella* species. American Society for Microbiology. 2004, <http://www.asm.org/index.asp>
38. Godfroid F, Taminiau B, Danese I, Denoel P, Tibor A, Weynants V, Cloeckaert A, Godfroid J, Letesson JJ. Identification Of The Perosamine Synthetase Gene Of *Brucella Melitensis* 16M And Involvement Of Lipopolysaccharide O Side Chain In *Brucella* Survival In Mice And In Macrophages, *Infect Immun*, 1998; 66 (11) 5485–5493.
39. Godfroid, J. Brucellosis in wildlife, *Rev sci tech Off int Epiz*, 2002; (21) 2 277-286.
40. Gomes Cardoso P, Costa Macedo G, Azevedo V, Costa Oliveira S. *Brucella spp* noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system, *Microbial Cell Factories*, 2006; 5:13, <http://microbialcellfactories.com/content/5/1/13>
41. Gross, Antoine; Bouaboula, Monsif, Casellas, Pierre; Liautard, Jean-Pierre; Dornand, Jacques. 2003. Subversión and utilization of the host cell cyclic Adenosine 5'-Monophosphate/Protein Kinase A pathway by *Brucella* during macrophage infection. *J. Immunol.* 170 (11) 5607-5614.
42. Hasanjani Roushan, MR, Mohrez, M, Smailnejad Gangi SM, Soleimani Amiri MJ, Hajiahmadi M. Epidemiological features and clinical manifestations in 469 adult patients with brucellosis in Babol, Northern Iran, *Epidemiol Infect*, 2004; 132 (6) 1109-1114.
43. Hernández L, Díaz E, Suárez F. Variaciones en la lisis por bacteriófagos de la cepa Rev 1 de *B. melitensis*, *Téc Pecu Méx*, 2004; 42 (1) 71-78.
44. Hoover DL, Nikolich MP, Izadjoo MJ, Borschel RH, Bhattacharjee AK. "Development of new *Brucella* Vaccines by molecular methods" en *Brucella: Molecular and cellular biology*, Gran Bretaña, Horizon Bioscience, 2004; pp 369-402.

45. <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>
46. <http://www.cnog.com.mx/sanidad>
47. <http://www.mansfield.ohio-state.edu>.
48. <http://www.med.unc.edu>
49. <http://www.mlamutations.com/glossary/glossary.html>
50. <http://www.qdots.com/live/render/content.asp>

51. Iñón de Iannino N, Ugalde RA. "*Brucella* cyclic β -1,2-glucans: structure, biosíntesis, biological activities and role in virulence" en *Brucella: Molecular and Cellular Biology*, Gran Bretaña, Horizon Bioscience, 2004; pp 193-212.
52. Iriarte M, González D, Delrue RM, Monreal D, Conde R, López-Goñi I, Letesson JJ, Morrión I. "*Brucella* lipopolysaccharide: structure, biosynthesis and genetics" en *Brucella: Molecular and Cellular Biology*, Gran Bretaña, Horizon Bioscience, 2004; pp159-191.
53. Jubier-Maurin V, Loisel S, Liautard JP, Köhler S. "The intramacrophagic Environment of *Brucella* spp. And Their Replicative Niche" en *Brucella: Molecular and Cellular Biology*, Gran Bretaña, Horizon Bioscience, 2004; pp 313-340.
54. Kiel WK., Khan Y. Analysis of 506 consecutive positive serologic tests for brucellosis in Saudi Arabia, *J Clin Microbiol*, 1987; 25:1384-1387.
55. Kim S, Watanabe K, Suzuki H, Watarai M. Roles of *Brucella abortus* SpoT in morphological differentiation and intramacrophagic replication, *Microbiology* 2005; 151, 1607–1617.
56. Klietmann WF, Ruoff KL. Bioterrorism: Implications for the Clinical Microbiologist, *Clin Microbiol Rev*, 2001; 14 (2) 364-381.

57. Ko J, Splitter G. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans, *Clin Microbiol Rev*, 2003; 16: 65-78.
58. Köhler S, Porte F, Jubier-Maurin V, Ouahrani-Bettache S, Teyssier J, Liautard JP. The intramacrophage environment of *Brucella suis* and bacterial response, *Vet Microbiol*, 2002; 90 (1-4) 299-309.
59. Kokoglu OF, Hosoglu S, Geyik MF, Ayaz C, Akalin S, Buyukbese MA, Cetinkaya A. Clinical and laboratory features of brucellosis in two university hospitals in Southeast Turkey, *Trop Doct*, 2006; 36 (1) 49-51.
60. Koneman E. Diagnóstico Microbiológico, 5a edición, Argentina, Editorial Médica Panamericana, 2001; pp. 420-430.
61. Lavigne JP, Patey G, Sangari FJ, Bourg G, Ramuz M, O'Callaghan D, Michaux-Charachon S. Identification of a New Virulence Factor, *BvfA*, in *Brucella suis*, *Infect Immun*, 2005; 73 (9) 5524–5529.
62. López-Goñi I, Manterola L, Pan SQ. "The *Brucella BvrS/BvrR* and related two-component regulatory systems of the α -2 Proteobacteria: common regulatory strategies of animal and plant pathogens and endosymbionts" en *Brucella: Molecular and Cellular Biology*, Gran Bretaña, Horizon Bioscience, 2004; pp 213-230.
63. Manterola L, Moriyón I, Moreno E, Sola-Landa A, Weiss DS, Koch MHJ, Howe J, Brandenburg K, López-Goñi I. The Lipopolysaccharide of *Brucella abortus BvrS/BvrR* Mutants Contains Lipid A Modifications and Has Higher Affinity for Bactericidal Cationic Peptides, *J Bacteriol*, 2005; 187 (16) 5631–5639.
64. Marianelli C, Ciuchini F, Tarantino M, Pasquali P, Adone R. Genetic Bases of the Rifampin Resistance Phenotype in *Brucella spp.*, *J Clin Microbiol*, 2004; 42 (12) 5439–5443.
65. McClatchey K. Clinical Laboratory Medicine, 2a edición, EUA, Lippincott Williams and Wilkins, 2002; pp 1111-1114.
66. Morata P, Queipo-Ortuño MI, Reguera JM, García-Ordoñez MA, Cárdenas A, Colmenero JD. Development and Evaluation of a PCR–Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Human Brucellosis, *J Clin Microbiol*, 2003; 41(1) 144–148.

67. Moreno E, Gorvel JP. "Invasion, Intracellular Trafficking and Replication of *Brucella* Organisms in Professional and Non-Professional Phagocytes" en *Brucella: Molecular and Cellular Biology*, Gran Bretaña, Horizon Bioscience, 2004; pp 287-312.
68. Moreno E, Jones LM, Berman DT. Immunochemical Characterization of Rough *Brucella* Lipopolysaccharides, *Infect Immun*, 1984; 43 (3) 779-782.
69. Moreno E, Moriyón I. *Brucella melitensis*: A nasty bug with hidden credentials for virulence, *PNAS*, 2002; 99 (1) 1–3.
70. Moyer NP, Holcomb LA. "*Brucella*" en *Manual of Clinical Microbiology*. Sexta edición. EUA, American Society for Microbiology, 1995; pp 549-555.
71. Murphy O, Freeman R. "Bacteriology of normally sterile body fluids" en *Medical Bacteriology: a practical approach*, 2a ed., Reino Unido, Oxford University Press. 2004; pp 27-54.
72. Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR, *Expert Rev Mol Diagn*, 2004; 4 (1) 115-123.
73. Navarro E, Escribano J, Fernández JA, Solera J. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella spp.* in human blood samples, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2002; 34:147-151.
74. Norma Oficial Mexicana NOM-022-SSA2-1994. Para la prevención y control de la brucelosis en el hombre. Diario Oficial de la Nación. 2 de febrero de 2001. Segunda sección.
75. Noviello S, Gallo R, Kelly M, Limberger RJ, DeAngelis K, Cain L, Wallace B, Dumas N. Laboratory-acquired Brucellosis *Emerging Infectious Diseases* 2004; 10 (10) 1848-1850.
76. Orhan G, Bayram A, Zer Y, Balci I. Synergy Tests by E Test and Checkerboard Methods of Antimicrobial Combinations against *Brucella melitensis*, *J Clin Microbiol*, 2005; 43 (1) 140–143.

77. Pei J, Ficht TA. *Brucella abortus* rough mutants are cytopathic for macrophages in culture, *Infect Immun*, 2004; 72 (1) 440-450.
78. Peled N, David Y, Yagupsky P. Bartholin's Gland Abscess Caused by *Brucella melitensis*, *J Clin Microbiol*, 2004; 42 (2) 917-918.
79. Pourbagher MA, Pourbagher A, Savas L, Turunc T, Demiroglu YZ, Erol I, Yalcintas D. Clinical pattern and abdominal sonographic findings in 251 cases of brucellosis in southern Turkey, *Am J Roentgenol*, 2006; 187 (2) 191-194.
80. Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL., Graves MH. Real-Time Multiplex PCR Assay for Detection of *Brucella spp.*, *B. abortus*, and *B. melitensis*, *J Clin Microbiol*, 2004; 42 (3) 1290-1293.
81. Rittig MG, Alvarez-Martínez MT, Porte F, Liautard JP, Rouot B. Intracellular Survival of *Brucella spp.* in Human Monocytes Involves Conventional Uptake but Special Phagosomes, *Infect Immun*, 2001; 69 (6) 3995-4006.
82. Romero Raúl. Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas, México, Editorial Médica Panamericana, 1999; pp 348-351.
83. Roop II RM, Bellaire BH, Wright Valderas M, Cardelli JA. Adaptation of the brucellae to their intracellular niche, *Mol Microbiol*, 2004; 52 (3), 621-630.
84. Roset MS, Ciocchini AE, Ugalde RA., Iñón de Iannino N. Molecular Cloning and Characterization of *cgt*, the *Brucella abortus* Cyclic β -1,2-Glucan Transporter Gene, and Its Role in Virulence, *Infect Immun*, 2004; 72 (4) 2263-2271.
85. Rovey C, Rolain JM, Raoult D, Brouqui P. Shell Vial Culture as a Tool for Isolation of *Brucella melitensis* in Chronic Hepatic Abscess, *J Clin Microbiol*, 2003; 41 (9) 4460-4461.
86. Sohn AH, Probert WS, Glaser CA, Gupta N, Bollen AW, Wong JD, Grace EM, McDonald WC. Human Neurobrucellosis with Intracerebral Granuloma Caused by a Marine Mammal *Brucella spp.*, *Emerging Infect Dis* 2003; 9 (4) 485-488.

87. Sola-Landa A, Pizarro-Cerdá J, Grilló MJ, Moreno E, Moriyón I, Blasco JM, Gorvel JP, López-Goñi I. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence, *Mol Microbiol*, 1998; 29 (1) 125-138.
88. Solera J, Rodríguez-Zapata M, Geijo P, Largo J, Paulino J, Sáez L, Martínez-Alfaro E, Sánchez L, Sepulveda MA, Ruiz-Ribó MD y The GECMEI Group. Doxycycline-Rifampin versus Doxycycline-Streptomycin in Treatment of Human Brucellosis Due to *Brucella melitensis*, *Antimicrob Agents Chemother*, 1995; 39 (9) 2061–2067.
89. Stack JK, MacMillan AP. Identification and biotyping of *Brucella spp.* Brunet. http://www.moag.gov.il/brunet/public_sub8_p1.html
90. Tasbakan MI, Yamazhan T, Gokengin D, Arda B, Sertpolat M, Ulusoy S, Ertem E, Demir S. Brucellosis: a retrospective evaluation, *Trop Doct*, 2003; 33 (3) 151-153.
91. Tay J. *Microbiología y Parasitología médicas*. 2a edición. México, Méndez Editores S.A. de C.V., 1995; pp 1.260-1.262.
92. Tohme A, Zein E, El Rassi B, Koussa S, Nasnas R. Human brucellosis in Lebanon. Clinical features and therapeutic responses in 88 patients, *J Med Liban*, 2004; 52 (3) 149-155.
93. Ugalde JE, Czibener C, Feldman MF, Ugalde RA. Identification and Characterization of the *Brucella abortus* Phosphoglucosyltransferase Gene: Role of Lipopolysaccharide in Virulence and Intracellular Multiplication, *Infect. Immun*, 2000; 68 (10) 5716-5723.
94. Wafa AN. Brucellosis. www.emedicine.com/med/topic248.htm
95. Watari M. "Brucella Interaction with Membrane Lipids of the Host Cell" en *Brucella: Molecular and Cellular Biology*, Gran Bretaña, Horizon Bioscience, 2004; pp 263-286.
96. Whatmore AM, Murphy TJ, Shankster S, Young E, Cutler SJ, Macmillan AP. Use of Amplified Fragment Length Polymorphism To Identify and Type *Brucella* Isolates of Medical and Veterinary Interest, *J Clin Microbiol*, 2005; 43 (2) 761–769.

97. Yagupsky P, Baron EJ. Laboratory exposures to brucellae and implications for bioterrorism, *Emerg Infect Dis*, 2005; 11(8) 1180-1185.
98. Yagupsky P, Peled N, Press J, Abu-Rashid M, Abramson O. Rapid detection of *Brucella melitensis* from blood cultures by a commercial system, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1997; 16:605-607.
99. Yagupsky P, Peled N, Press J. Use of BACTEC 9240 blood culture system for detection of *Brucella melitensis* in synovial fluid, *J Clin Microbiol*, 2001; 39:738-739.
100. Yagupsky P. Use of the BACTEC MYCO/F LYTIC medium for detection of *Brucella melitensis* Bacteremia, *J Clin Microbiol*, 2004; 42:5: 2207-2208.
101. Yeo HJ, Waksman G. Unveiling molecular scaffolds of the type IV secretion system, *J Bacteriol*, 2004; 186 (7) 1919-1926.
102. Young DA. Florence Nightingale's fever, *Br Med J*, 1995; 311 (7021) 1697-1700.
103. Zerva L, Bourantas K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis NJ. Serum Is the Preferred Clinical Specimen for Diagnosis of Human Brucellosis by PCR, *J Clin Microbiol*, 2001; 39(4) 1661-1664.
104. Zinsser. *Microbiología*. 20a edición. Argentina, Editorial Médica Panamericana, 1994; pp 827-833.
105. "Group 4. Gram-negative aerobic/microaerophilic rods and cocci" en *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9a edición, EUA, Williams and Wilkins, 1994, pp. 79, 137,138.