



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**Sobrevivencia de *Brucella abortus aqpX::lacZ-Km* en quesos.**

**TESIS**

**Que para optar por el grado de**

**DOCTORA EN CIENCIAS  
PRESENTA:**

**MARÍA DEL ROSARIO SANTIAGO RODRÍGUEZ**

Tutor principal: Dr. Rigoberto Hernández Castro.

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Salud y de la Producción Animal

Comité Tutorial: Dra. Beatriz Arellano Reynoso

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM

Dr. Efrén Díaz Aparicio

Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia UNAM



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.

## AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a mi tutor **Dr. Rigoberto Hernández Castro** por aceptarme en su proyecto y por sus valiosos consejos tanto en el ámbito académico como en el personal.

A la **Dra. Beatriz Arellano Reynoso** por la invaluable ayuda brindada en todos los momentos y por el interés que demuestra en cada uno de sus alumnos, gracias Doctora.

Al **Dr. Efrén Díaz Aparicio** por el apoyo brindado, por sus aportaciones al trabajo y por creer en mí, ello me permitió recuperar la confianza para continuar en el doctorado. Muchas gracias Doctor.

A mi comité tutorial, gracias por brindarme la oportunidad de corregir mis pasos.

A los miembros del jurado:

**Dr. Francisco Suárez Güemes** por las sugerencias realizadas, gracias Doctor.

**Dra. Ahidé López Merino** gracias por contribuir a mejorar este trabajo.

**Dr. Miguel Gimeno Seco** por revisar y comentar este documento y por la confianza otorgada para poder trabajar en su laboratorio.

Al **Dr. Carlos Gerardo García Tovar** por sus aportaciones y por su amable disponibilidad, muchas gracias Doctor

A la **Dra Alma Virginia Lara Sahagon** por su valiosa colaboración en el análisis estadístico.

Al Dr. **Arturo Trejo González** por el apoyo que siempre he recibido de usted, gracias Doctor

A la **M. en C. Lucía Favila Humura** por su constante apoyo y cordial disposición, gracias Lucy.

Al **M. en C. Luis Gámez** por ser un gran compañero, siempre dispuesto a ayudar.

A los compañeros del laboratorio de bacteriología del **INFAP**, quienes departieron conmigo esta importante etapa y con quienes formamos un grupo de ayuda desinteresada: Ivonne, Monse, Víctor, Ime, Alma, Juan, Alfonso, Rosa Isela. Gracias por su amistad.

A mi querida Alma Mater. **“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**

A la **UAEM** por las facilidades otorgadas para la superación profesional de sus académicos

*Dedicado a:*

Juan Francisco Nava Santiago

Gracias por todo

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I INTRODUCCIÓN	3
1.1 Generalidades de la brucelosis	3
1.2 Características del género <i>Brucella</i>	4
1.3 Situación epidemiológica de la brucelosis bovina	4
1.4 Transmisión y patogenia de la brucelosis bovina	6
1.5 Internalización de <i>Brucella</i> en el hospedero	8
1.6 Tránsito intracelular de <i>Brucella abortus</i>	9
1.7 Supervivencia de <i>Brucella abortus</i> en el medio ambiente	11
1.8 Supervivencia de <i>Brucella abortus</i> en el lácteos	12
1.9 Factores de virulencia de <i>B. abortus</i>	13
1.10 Sistema Sensor-Regulador y Proteínas de Membrana Externa (OMPs)	14
1.11 Sistema de Secreción Tipo IV	16
1.12 Quorum-Sensing	18
1.13 Biopelícula	19
1.14 Acuaporinas	21
2. JUSTIFICACIÓN	26
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVO GENERAL	27
4.1 Objetivos específicos	27
5. MATERIAL Y MÉTODOS	28
5.1 Cepas bacterianas	28
5.2 Construcción de la mutante <i>B. abortus aqpX::lacZ-Km</i>	28
5.3 Preparación de inóculos de <i>B. abortus</i> 2308 y <i>B. abortus aqpX::lacZ-km</i>	29

5.4 Preparación de quesos frescos elaborados con leche cruda de vaca y obtención de suero lácteo	29
5.5 Preparación de quesos madurados a 4 y 24°C elaborados con leche cruda y pasteurizada	30
5.6 Determinación de pH y $a_w$ en quesos	31
6.RESULTADOS	33
6.1 Sobrevivencia de <i>B. abortus</i> 2308 y <i>B. abortus aqpX::lacZ-km</i> en quesos frescos	33
6.2 Sobrevivencia de <i>B. abortus</i> 2308 y <i>B. abortus aqpX</i> en quesos elaborados con leche cruda y madurados a 4°C y 24 °C	35
6.3 Efecto del pH y $a_w$ en la sobrevivencia de <i>B. abortus</i> 2308 y <i>B. abortus aqpX</i> en quesos madurados a 4°C y 24 °C elaborados con leche cruda	36
6.4 Sobrevivencia <i>B. abortus</i> 2308 y <i>B. abortusaqpX</i> en quesos elaborados con leche pasteurizada y madurados a 4°C y 24 °C	39
6.5 Efecto del pH y $a_w$ en la sobrevivencia de <i>B. abortus</i> 2308 y <i>B. abortus aqpX::lacZ-km</i> en quesos madurados a 4°C y 24°C elaborados con leche pasteurizada.	40
6.6 Sobrevivencia de <i>B. abortus</i> 2308 y <i>B. abortus aqpX::lacZ-km</i> en suero de quesos	42
7. DISCUSIÓN	43
8. CONCLUSIONES	47
9. REFERENCIAS	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	página
<b>Figura 1.</b> Proceso de elaboración del queso fresco y madurado a 4 °Cy 24°C manufacturados con leche cruda y pasteurizada.	32
<b>Figura 2.</b> Determinaciones de sobrevivencia de <i>B. abortus</i> y <i>B. abortus aqpX::lacZ</i> -Km durante la elaboración de quesos frescos usando leche cruda y conservados a 4°C.	34

**Figura 3.** Sobrevivencia de *B. abortus* y *B. abortusaqpX::lacZ-Km* durante la elaboración y maduración de quesos a 4°C y 24°C elaborados con leche cruda..

38

**Figura 4.** Sobrevivencia de *B. abortus* y *B. abortusaqpX::lacZ-Km* durante la elaboración y maduración de quesos a 4°C y 24°C elaborados con leche cruda.

41



## RESUMEN

Aunque los mecanismos de sobrevivencia intracelular de *Brucella* han sido bien estudiados, se desconoce cuáles son las vías que la bacteria utiliza para su sobrevivencia extracelular. El objetivo del trabajo fue evaluar la sobrevivencia de la mutante nula del gen *aqpX* de *B. abortus*, durante la elaboración y conservación de quesos frescos y madurados a 4°C y 24°C, determinando en cada etapa del proceso de elaboración y conservación o maduración de cada tipo de queso, los valores de pH y actividad del agua ( $a_w$ ). Para elaborar los quesos se utilizó leche procedente de un hato bovino libre de brucelosis, los quesos frescos fueron preparados con leche cruda inoculada con  $6 \times 10^8$  UFC/mL de *B. abortus* 2308 o de *B. abortus aqpX* mutante nula. Los quesos madurados a 4°C o 24°C fueron elaborados con leche cruda y pasteurizada e inoculados con  $12 \times 10^8$  UFC/mL de *B. abortus* 2308 o de *B. abortus aqpX* mutante nula durante la etapa de templado de la leche. En el queso fresco, se observó sobrevivencia de ambas cepas durante la elaboración y la conservación durante 7 días a 4°C, destacando que la sobrevivencia de la cepa mutante fue diez veces menor comparada con la cepa parental con un valor de pH 5.0 y  $a_w$  0.930. En el queso elaborado con leche cruda y madurada a 24°C, ambas cepas sobrevivieron hasta el día 17 de maduración, con pH 4.0 y  $a_w$  de 0.89. Sin embargo, cuando los quesos fueron elaborados con leche pasteurizada la cepa parental sobrevivió hasta el día 31 de maduración y la cepa mutante únicamente 24 días a pH 4 y  $a_w$  de 0.886. La sobrevivencia de la cepa mutante mostró una disminución de un  $\log_{10}$  durante la elaboración y maduración de quesos en comparación con la cepa parental. Cuando los quesos fueron elaborados con leche cruda y madurados a 4°C, la sobrevivencia de la cepa parental fue de 24 días, mientras que la cepa mutante sobrevivió solo 17 días (pH 5 y  $a_w$  0.90). Respecto al queso elaborado con leche pasteurizada y madurado a 4°C ambas cepas sobrevivieron durante 31 días de maduración (pH 5 y  $a_w$  final de 0.90), con una disminución de UFC/mL durante los procesos de elaboración y maduración, similar a la observada cuando se utilizó leche cruda. Nuestros resultados muestran que en ambos tipos de queso la mutante *aqpX* sobrevivió un  $\log_{10}$  menos que la cepa parental, lo cual evidencia que el gen *aqpX*

puede estar relacionado con la sobrevivencia de *B. abortus* en este tipo de quesos.

Palabras clave: *Brucella abortus*, gen *aqpX*, leche cruda, queso madurado, queso fresco.

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the survival of a *Brucella abortus aqpX* null mutant during the elaboration and conservation of fresh and ripened cheeses at 4°C and 24°C. The pH values and water activity ( $a_w$ ) in each stage of the process were monitored for each type of cheese. The fresh cheese was elaborated with raw milk inoculated with  $6 \times 10^8$  CFU/mL each of *B. abortus* 2308 and *B. abortus aqpX* null mutant. Cheeses ripened at 4°C and 24°C were elaborated with both raw and pasteurized milk and inoculated with  $12 \times 10^8$  CFU/mL for each strain during tempering stage. In the fresh cheese, survival was observed during elaboration and conservation for up to 7 days at 4°C for both mutant and wild type strain. The number of UFC/ mL of the mutant strain was ten times lower compared with the parental strain at pH 5 and  $a_w$  of 0.930. In the cheese elaborated with raw milk and ripened at 24°C both strains survived until day 17 at pH 4.0 and  $a_w$  of 0.89. However, when the cheese was elaborated with pasteurized milk, the parental strain survived until day 31 of ripening, whereas the mutant strain survived 24 days at pH 4 and  $a_w$  of 0.886. The survival of mutant strain showed a diminution of one  $\log_{10}$  during elaboration and ripening of cheese as compared with parental strain. When the cheese was elaborated with raw milk and ripened at 4°C, the survival of the parental strain was measured up to 24 days, whereas the mutant strain survived only 17 days (pH 5 and  $a_w$  0.90). Regarding the cheese elaborated with pasteurized milk and matured at 4°C, both strains survived 31 days (pH 5 and  $a_w$  0.90) with the same survival diminution during elaboration and ripening. Our results show that the mutated *aqpX* strain survived in both types of cheese one  $\log_{10}$  less than the parental strain which evidences that *aqpX* gene might be related to the survival of *B. abortus* in this type of cheeses.

**Key words:** *Brucella abortus*, *aqpX* gene, aquaporin, fresh cheese, raw milk, ripened cheese.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Generalidades de la brucelosis

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa de distribución mundial que afecta al humano y a diferentes especies animales domésticas y silvestres. Esta enfermedad es importante desde el punto de vista económico y de salud pública. En algunos países de Europa ha sido erradicada y en México se considera endémica (FAO, 2006). La principal especie causante de brucelosis en el humano es *Brucella melitensis* y en menor medida *Brucella abortus* y *Brucella suis* (López-Goñi, 2002). En humanos la infección es adquirida principalmente por el consumo de productos lácteos contaminados y por el riesgo ocupacional, la enfermedad se presenta en forma aguda, subaguda, crónica o bien puede ser asintomática. Los principales signos son: episodios recurrentes de fiebre, escalofríos, sudoración nocturna (Dornand *et al.*, 2002) pérdida de peso, cefalea, artralgias, endocarditis, epididimitis, esplenomegalia y linfadenopatías (Martirosyan *et al.*, 2011).

En bovinos esta enfermedad produce diferentes trastornos aunque el signo preponderante de la enfermedad es el aborto de las hembras. En los machos pueden presentarse signos como orquitis, epididimitis y en ocasiones infertilidad (Zinsstag, *et al.*, 2011).

El género *Brucella* está compuesto por 10 especies relacionadas filogenéticamente, las cuales se han diferenciado con base en sus características antigénicas y su hospedador animal preferencial: *B. abortus* (bovinos), *B. canis* (caninos), *B. ceti* (delfines, marsopas, ballenas), *B. melitensis* (ovejas, cabras), *B. microti* (zorros rojos, roedores de campo), *B. neotomae* (roedores), *B. ovis* (ovejas), *B. pinnipedialis* (focas), *B. suis* (porcinos), y *B. inopinata*, aislada de un implante mamario de mujer y descrita en 2009 (SCAH, 2006; Billard, 2007; Foster *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2010). De acuerdo a la naturaleza de su lipopolisacárido (LPS) las especies de *Brucella* pueden ser lisas o rugosas. *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. neotomae*, *B. suis*, *B. ceti* y *B. pinnipedialis* son especies lisas, cuyo LPS se encuentra completo, *B. canis* y *B. ovis* son especies rugosas, cuyo LPS no contiene la cadena O (Scholz *et al.*, 2010; Godfroid, 2011).

## **1.2 Características del género *Brucella***

Las especies del género *Brucella* son bacterias gram negativas, inmóviles, cocobacilos cortos de 0.5 a 1.5  $\mu$  de largo y de 0.5 a 0.7  $\mu$  de diámetro. No se han descrito plásmidos para este género. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C en un pH de 6.6 a 7.4. Son anaeróbicas facultativas (Clarridge, 1994). *Brucella spp.*, pertenece al grupo  $\alpha$ , subgrupo 2, de las proteobacterias de la familia *Rhizobiaceae* y guarda una estrecha relación filogenética con los miembros de este grupo. Los miembros de este género forman en agar colonias pequeñas y translúcidas con moderada turbidez, su crecimiento es lento y se estimula por la adición de proteína animal, extracto de levaduras y sangre (Moreno *et al.*, 1990; López-Goñi, 2002).

### **1.3 Situación epidemiológica de la brucelosis bovina**

La brucelosis es la zoonosis mas común a nivel mundial (Mugaby, 2012). *Brucella abortus* afecta principalmente a bovinos pero otros animales son susceptibles a padecer la enfermedad y tienen un papel importante en la persistencia y transmisión; se han reconocido siete biovars, siendo el biovar 1 el en los países mediterráneos de Europa y África, el Oriente Medio, América Central, América del Sur, y México (Lucero *et.al.*,2008, Boschioli *et al.*, 2001).

La Brucelosis bovina se ha reportado en todos los países donde existen bovinos, aunque ha sido erradicada en el norte y centro de Europa, Australia, Canadá, Japón y Nueva Zelanda. En humanos, la enfermedad es considerada ocupacional, sin embargo se presenta principalmente en consumidores de leche cruda y productos lácteos de vaca, oveja y cabra; especialmente de quesos blandos elaborados con leche no pasteurizada (Memish y Balkhy, 2004). En México la brucelosis es un padecimiento sujeto a vigilancia epidemiológica, de notificación semanal obligatoria de acuerdo a lo establecido en los artículos 3o. fracción XV, 133 fracción I y II, 134 fracción V, 135, 136 fracción II, 137 y 138 de la Ley General de Salud; art. 32 bis 2 del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud y lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-1994, para la vigilancia epidemiológica. En los últimos cinco años se han registrado 12,214 casos de brucelosis con un promedio anual de 2,443 casos anuales en este periodo; en el año 2007 se registraron 1,874 casos, con una incidencia de 1.7 por 100 000 habitantes y en el año 2011 se registraron 3,436 casos, con una incidencia de 3.1, lo anterior representa un incremento en la incidencia del 77% para el 2011 con

respecto a 2007. Los estados que presentaron la mayor incidencia de casos en 2011 fueron: Sinaloa con una incidencia de 21.0 casos por 100 000 habitantes, seguido por Tlaxcala con 14.3, San Luis Potosí 12.6, Guanajuato 8.2, Zacatecas 7.0, Nuevo León 5.5, Michoacán 5.1, Puebla 4.6, Chihuahua 4.5 y Coahuila 4.4 casos por 100 000 habitantes. En México, existen dos campañas nacionales contra importantes zoonosis de transmisión alimentaria a través de productos lácteos: tuberculosis bovina y brucelosis, y aunque el impacto de las campañas no ha sido el deseado, se considera que un alto porcentaje de la población bovina lechera está vacunada contra brucelosis (SSA, 2012). En 1949, la Food and Drug Administration (FDA, 2006) estableció que los quesos elaborados con leche cruda deben someterse a una maduración mínima de 60 días previos a su comercialización para asegurar la ausencia de microorganismos patógenos.

#### **1.4 Transmisión y patogenia de la brucelosis bovina**

En bovinos la vía de transmisión puede ser por contacto directo con animales enfermos o de manera indirecta a través del consumo de agua o forraje contaminados con la bacteria (Jiao *et. al.*, 2009).

En humano el ingreso de la bacteria al hospedero puede darse a través de cortes y/o abrasiones de la piel o por las mucosas: conjuntival y respiratoria; sin embargo la principal vía de transmisión es la digestiva (Moreno y Moriyón 2006). En animales y en humanos los principales órganos blanco son el epitelio respiratorio y los órganos sexuales, en la actualidad se desconocen las células diana por las cuales el patógeno entra al hospedador, sin embargo se conoce que *Brucella* es

internalizada por los fagocitos periféricos, los cuales conducen a la bacteria hacia los ganglios linfáticos regionales, lo que puede constituir una barrera para la difusión sistémica del microorganismo. *Brucella* es capaz de colonizar macrófagos, monocitos y células dendríticas, estas células conducen a la bacteria a los linfonódulos para así contribuir a la diseminación del patógeno. Un factor clave en la patogenia de *Brucella* consiste en invadir células fagocíticas y no fagocíticas del hospedador y establecer una infección crónica, además es capaz de evadir la respuesta inmune del hospedero y así evitar su destrucción, otro factor importante es que la bacteria evade al sistema de complemento y a moléculas bactericidas catiónicas como las defensinas microbicidas, las fosfolipasas, la lactoferrina, la lisozima (Martirosyan *et al.*, 2011). Las células dendríticas (DC) desempeñan un papel clave, en la iniciación, en el control de la magnitud y en la calidad de la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, *Brucella* spp. ha desarrollado componentes que interfieren en la respuesta innata con el fin de evadir la respuesta inmune del hospedero. Se ha descubierto que este patógeno prolifera de manera eficiente dentro de las DC tanto *in vitro* como *in vivo* esto conduce a la inhibición de la maduración funcional, caracterizada por la ausencia de secreción de citoquinas proinflamatorias tales como TNF alfa e IL-12, por lo consiguiente la presentación del antígeno a las células T vírgenes por parte de esta célula será ineficaz (Martirosyan-Gorvel, 2013).

Los anticuerpos y el complemento contribuyen a que la bacteria sea opsonizada para después ser fagocitada sobreviviendo y replicándose dentro de los macrófagos, aunque también puede entrar en ausencia de opsoninas, entonces la

vía de entrada es mediada por las balsas lipídicas, mediante un mecanismo dependiente de TLR4 y PI3-K (quinasa) (Martín *et al.*, 2010).

### **1.5 Internalización de *Brucella* en el hospedero**

La internalización, evento inducido por la bacteria, requiere de la reorganización del citoesqueleto en sus filamentos de actina y la activación de los microtúbulos mediante el proceso conocido como cremallera, esto se ha observado tanto en células epiteliales como en macrófagos y están involucrados el LPS, y GTPasas de la sub familias Rho (principalmente Cdc42), que funcionan como reguladores del arreglo de las proteínas del citoesqueleto (Gorvel y Moreno, 2002). Recientemente se ha demostrado que las proteínas Clatrina y Rb5 juega un papel fundamental en la entrada y sobrevivencia de *B. abortus* a través de la interacción con las balsas lipídicas y el reordenamiento de actina, este proceso facilita el tránsito intracelular de la bacteria (Lee *et al.*, 2013). Se han reportado dos receptores que funcionan como mediadores en la internalización de *Brucella* a través de las balsas lipídicas: el receptor *scavenger* de clase A (SR-A) y la proteína priónica celular PrPc (Von Bargen *et al.*, 2012)

Una vez que *Brucella* hace contacto con la membrana plasmática de la célula eucariótica se desplaza sobre la superficie de la misma, la entrada de *Brucella* spp. en células dendríticas de humanos (DCs) es parcialmente dependiente de las balsas lipídicas, en cambio la vía de entrada en otras células del huésped es dependiente del sistema sensor-regulador de dos componentes BvrR/BvrS, el cual



controla la expresión de numerosos genes, incluyendo incluyendo los de proteínas de membrana externa (Von Bargen *et al*, 2012).

La vía de ingreso condiciona el destino posterior de las bacterias, la internalización de las bacterias opsonizadas ocurre a través de los receptores Fc y en presencia del complemento y son más susceptibles a la muerte intracelular, en tanto que la fagocitosis de bacterias no opsonizadas se da a través de receptores de lectina, fibronectina y de zonas abundantes en balsas lipídicas que conducen a la formación de vesículas que retardan la fusión de la bacteria con los lisosomas (Pizarro-Cerdá *et al.*, 2000). Se ha demostrado que algunas bacterias patógenas han evolucionado y desarrollado estrategias para colonizar a la célula hospedera basadas en el reconocimiento y orientación de las balsas lipídicas (Ciesielski *et al.*, 2013), sin embargo las cepas de tipo liso son menos susceptibles a la muerte celular que las de tipo rugoso (Roset, 2006; Alcina, 2010).

### **1.6 Tránsito intracelular de *Brucella abortus***

En los primeros minutos después de la invasión de los fagocitos, *Brucella* interactúa con compartimientos endosomales tempranos. Esto se ha comprobado mediante la detección de marcadores endosomales tempranos en el BCV, tales como el receptor de transferrina, el guanósín trifosfato (GTP) unido a proteína Rab5, o el antígeno endosomal temprano (EEA1) y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). La asociación inicial con los endosomas tempranos es un evento transitorio y disminuye a los 10 min después de la infección. Sin embargo, al parecer, en estos primeros minutos, la acidificación del

compartimento BCV es un requisito para su posterior maduración (Martirosyan *et al.*, 2011). Simultáneamente los BCVs adquieren progresivamente una proteína lisosomal asociada a membrana-1 (LAMP-1) y siguen siendo positivos para este marcador hasta 4 h después de la infección. En contraste, la bacteria interactúa transitoriamente con compartimentos endocíticos finales, que se caracterizan por la presencia de una pequeña proteína de unión (GTP) a Rab7 y a receptores 6-fosfato de manosa. Con la disminución de la proteína de LAMP-1, las BCVs adquieren marcadores del retículo endoplasmático (RE) tales como calreticulina o calnexina. En el espacio luminal del RE el marcador de glucosa-6-fosfatasa detectado por microscopía electrónica confirma la fusión entre el BCV y ER. En esta etapa *Brucella* spp., ha alcanzado un nicho seguro que garantiza su replicación y su virulencia (Martirosyan *et al.*, 2011). Se ha observado que Rab2 media el transporte del RE-Aparato de Golgi, el compartimento intermedio del RE (ERGIC) y se considera necesario para que se lleve a cabo la replicación intracelular (Santos-La Cerda *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que *Brucella* modula su tránsito Intracelular a través de un sistema secretor de múltiples proteínas T4SS para promover su patogénesis (Sebenzile *et al.*, 2013). Simultáneamente los BCVs adquieren progresivamente una proteína lisosomal asociada a membrana-1 (LAMP-1) y siguen siendo positivos para este marcador hasta 4 h después de la infección. En contraste, la bacteria interactúa transitoriamente con compartimentos endocíticos finales, que se caracterizan por la presencia de una pequeña proteína de unión (GTP) a Rab7 y a receptores 6-fosfato de manosa. Con la disminución de la proteína de LAMP-1,

las BCVs adquieren marcadores del retículo endoplasmático (RE) tales como calreticulina o calnexina. En el espacio luminal del RE el marcador de glucosa-6-fosfatasa detectada por microscopia de electrones confirma la fusión entre el BCV y ER. En esta etapa *Brucella* spp., ha alcanzado un nicho seguro que garantiza su replicación y su virulencia (Martirosyan *et al.*, 2011). Recientemente, se ha encontrado que Rab2 media el transporte del RE-Aparato de Golgi, el compartimento intermedio del RE (ERGIC) el cual se considera necesario para que se lleve a cabo la replicación intracelular (Santos-LaCerdea *et al.*, 2013).

Estudios de tránsito intracelular de en *Brucella* han demostrado que más del 90% de las bacterias mueren en las primeras horas post-infección, por lo que solo un 10% establecerá con éxito un nicho replicativo (Von Bargen *et al.*, 2012).

### **1.7 Sobrevivencia de *Brucella* en el medio ambiente**

Una vez establecida en el hospedero, la bacteria puede ser excretada al medio ambientea través de secreciones vaginales post-parto, semen, orina y leche; se sabe que *Brucella* puede sobrevivir en el suelo, en heces y en diversos fomites por períodos hasta por cuatro meses (López-Goñi, 2002) y en condiciones de baja temperatura (Tanghe *et al.*, 2006).

La capacidad de *Brucella* para persistir fuera del hospedador es relativamente alta comparada con otras bacterias patógenas que no forman esporas. Algunos estudios han medido la persistencia de *Brucella* bajo diferentes condiciones medio ambientales y han demostrado que cuando se combinan algunos factores tales como un pH mayor a 4.0, la temperatura entre 4 a 6°C y las condiciones de luz

favorables, *Brucella* puede conservar su capacidad de infectividad durante meses en agua, fetos abortados, membranas fetales, excrementos, heno y en el suelo. Se ha observado que la sobrevivencia se prolonga a bajas temperaturas especialmente a 0°C (Alton, 1985; Tanghe *et al.*, 2006), así mismo se ha estudiado el tiempo de sobrevivencia de *Brucella* en leche y productos lácteos, observándose que la persistencia de la bacteria está relacionada con factores como tipo y tiempo de elaboración del producto, disponibilidad de agua ( $a_w$ ), temperatura, cambios de pH, presencia de otras bacterias y condiciones de almacenamiento. Aunque se ha reportado que *Brucella* no sobrevive durante mucho tiempo en queso madurado, se desconoce el tiempo de maduración que permita la sobrevivencia del microorganismo (Plommet *et al.*, 1988).

Si bien los procesos de vida intracelular de *Brucella* han sido caracterizados, los mecanismos de sobrevivencia extracelular son desconocidos, por lo que se ha propuesto que la expresión de genes bajo condiciones de estrés sea el factor que desencadena los mecanismos que permiten la sobrevivencia extracelular de la bacteria (Almiron *et al.*, 2013).

### **1.8 Sobrevivencia de *Brucella* en lácteos**

Se ha demostrado la persistencia de *Brucella* en diferentes alimentos, especialmente lácteos elaborados con leche no pasteurizada, tal es el caso de helados en donde se ha observado que a temperatura de cero grados, la bacteria es capaz de sobrevivir durante un mes (Kuplulu *et al.*, 2003), en yogurth almacenado a 4°C se ha demostrado la presencia de la bacteria diez días

posteriores a la inoculación del producto, aun a pH ácido (Zúñiga *et al.*, 2005). *Brucella* también es capaz de sobrevivir en quesos madurados a temperatura ambiente durante 18 días (Plommet *et al.*,1988), en mantequilla y crema conservadas a 8°C durante 32 días y 10 días respectivamente (SCAH, 2006).En la leche, los factores asociados a la sobrevivencia de microorganismos nativos o patógenos en los alimentos son la temperatura, la  $a_w$ , el pH y la microbiota presente en el alimento; de tal manera que modificaciones en estos factores pueden generar estrés en la flora microbiota presente en los alimentos (Chawla *et al.*, 2004).Falenski *et al.*,(2011) han determinado la sobrevivencia de *Brucella* spp.,observando que en leche ultra pasteurizada persiste durante 87 días, 60 días en agua y menos de una semana en yogurt.

Por otro lado, en los alimentos el pH y la  $a_w$  tienen un papel determinante en la sobrevivencia los microorganismos. La  $a_w$  representa la cantidad de agua libre, que está disponible en los alimentos y es aprovechada por los microorganismos para desarrollarse o sobrevivir en el alimento causando su deterioro, se mide en una escala de cero a uno, así cuando el alimento tiene un valor de  $a_w$  cercano a uno, es más perecedero (Snider *et al.*,2007). En términos termodinámicos la actividad de agua se define como la relación de la presión de vapor de agua sobre la superficie del alimento y la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura.La actividad de agua es una medida del estado de energía del agua en un sistema. La una combinación de estos factores en un alimento es lo que reduce la energía del agua y por lo tanto reduce la humedad relativa en comparación con agua pura (Doyle, 2012).

## **1.9 Factores de virulencia de *Brucella abortus***

Para cualquier patógeno es imprescindible evadir los mecanismos de defensa del hospedero, para ello utilizan sus factores de virulencia. Las especies de *Brucella*, que son patógenos intracelulares facultativos, se han adaptado a lo largo de la evolución a sobrevivir bajo diferentes condiciones, evadiendo los diferentes mecanismos de defensa del organismo hospedador (Moreno *et al.*, 2002; Maarten, 2012).

*Brucella* carece de factores clásicos de virulencia, tales como plásmidos o bacteriófagos lisogénicos, producción de exotoxinas, variación antigénica o presencia de cápsula o fimbrias, ésta bacteria posee todo un sistema de factores coordinado para poder sobrevivir y replicarse dentro de la célula, la presencia de más de un sistema o factor de virulencia asegura una infección exitosa, estos factores parecen superponerse uno al otro, como un efecto de redundancia lo cual es el resultado de la evolución de la bacteria y de las diferentes estrategias que ha adoptado para evitar ser destruida (Peiy Fitch, 2004; Lapaque, 2005; Maarten, 2012). Es entonces que la principal estrategia de este género bacteriano constituye en pasar desapercibida por el hospedador y beneficiarse del mismo (Barquero-Calvo *et al.*, 2007).

## **1.10 Sistema sensor-regulador BvrR-BvrS proteínas de membrana externa (OMP)**

El sistema regulatorio BvrR/BvrS es necesario para la activación de GTPasa y reclutamiento de filamentos de actina, este sistema regula la expresión de

proteínas de membrana externa involucradas con la integridad de la envoltura bacteriana y en la invasión de células del hospedador y proporciona resistencia a péptidos catiónicos (López-Goñi, 2002; Guzmán-Verri, 2002; Xavier *et al.*, 2010) peróxido de hidrógeno, metabolitos reactivos de oxígeno y nitrógeno (Barbier *et al.*, 2011).

BvrS es un sensor de proteínas miembro de la superfamilia histidin-quinasa, localizado en la membrana celular, mientras que el sistema regulador se localiza en el citoplasma (Santos-La Cerdá *et al.*, 2013).

Mutantes de *bvrS-bvrR* muestran un fenotipo rugoso en las cepas de fenotipo liso (Lamontagney Butler, 2007), así mismo la mutación de cualquiera de las proteínas Omp produce cambios en la virulencia (Paulley *et al.*, 2007), debido a que no alcanzan el nicho de replicación final en el retículo endoplásmico, son susceptibles a péptidos catiónicos, presentan una menor invasión y las cepas lisas desarrollan un fenotipo rugoso (Sola-Landa 1998, Manterola *et al.*, 2007). El papel de *virB* es trasladar proteínas efectoras a través de la membrana de la BCVs al citoplasma de la célula del hospedero o en el dominio citoplasmático de la membrana vacuolar y así modular las funciones celulares del hospedero para la biogénesis del organelo replicativo (Martirosyan *et al.*, 2011). Este complejo está codificado por el operón *virB*, el cual está constituido por 12 genes *virB1-virB12*, que están localizados en el cromosoma II. El operón *virB* está conservado en todas las especies secuenciadas de *Brucella* (Santos-La Cerda 2013). Los genes de este sistema codifican para múltiples miembros de la familia de proteínas Omp3, especialmente Omp22 y Omp25, así como productos de genes que codifican la

composición de ácidos grasos del lípido A del LPS (Boigegrain, 2004). Las proteínas OMP participan en el establecimiento de una adecuada respuesta inmune (Cha *et al.*, 2010)

*Brucella* posee un sistema conocido como nitrógeno PTS que asocia el metabolismo del carbono y el nitrógeno y se relaciona con el sistema BvrS-BvrR el cual regula la transcripción de VirB (Barbier *et al.*, 2011) y la expresión de componentes de la envoltura celular, se ha sugerido que podría ser un “regulador maestro” que censa el medio ambiente y permite a *Brucella* adaptarse a diversas condiciones (Santos-La Cerda *et al.*, 2013).

#### **1.11 Sistema de Secreción Tipo IV (SSTIV)**

De acuerdo con Franco *et al.*, (2007), el sistema de secreción tipo IV es el responsable del transporte de proteínas y otras macromoléculas a través de la membrana. El SSTIV bacteriano está especializado en la secreción de macromoléculas en el citosol de las células eucariotas, está conformado por 12 proteínas reguladas por el operón *virB* y está involucrado en la multiplicación, tránsito y sobrevivencia intracelular, en la fusión del endosoma/fagosoma, en la maduración de las vesículas que contiene a *Brucella* en el mantenimiento y establecimiento de la infección (Boschiroli *et al.*, 2002; Celli y Gorvel, 2004; Roset, 2006; Pei *et al.*, 2008). Las mutaciones que se han realizado en el operón *virB* de *Brucella* han dado por resultado cepas imposibilitadas para sobrevivir en el nicho final de replicación, por lo que este factor de virulencia es determinante en la



localización final de la bacteria (Celli y Gorvel, 2004; Patey *et al.*, 2006; Rajashekara *et al.*, 2006).

Por otro lado, la acidificación del fagosoma que contiene a *Brucella* spp., es necesaria para la expresión del SSTIV y para la replicación intracelular (Celli y Gorvel 2004; Boschirolì *et al.*, 2002; Porte *et al.*, 1999). Se ha demostrado que el SSTIV es importante después de 5 días post-inoculación de la cepa, esto es, que no es determinante en el establecimiento de la infección, sino en evadir la inmunidad adaptativa (Rajashekara *et al.*, 2006). En *B. abortus* existe un factor de transcripción denominado HutC que se une directamente al promotor del operón *virB* para activar su expresión y se ha comprobado que este factor actúa también como un represor de los genes implicados en la ruta de la utilización de histidina, por lo que se ha postulado que mediante esta proteína, probablemente *Brucella* sea capaz de coordinar su propio metabolismo bajo condiciones de estrés nutricional con el desarrollo de respuestas adaptativas involucradas en su capacidad de sobrevivencia (Sieira *et al.*, 2010).

El estrés oxidativo es la estrategia mayormente usada por los macrófagos para el control intracelular de la bacteria y aunque muchas células bacterianas mueren, las que sobreviven cambian la transcripción génica con el objetivo de sobrevivir en este ambiente hostil, principalmente debido al pH ácido, tal es el caso de la expresión de genes del SSTIV (Gorvel *et al.*, 2002; Köhler *et al.*, 2002). Las especies de *Brucella* requieren el sistema de secreción tipo IV para sobrevivir en las células del hospedero y mantener una infección crónica. Por una vía que aún no es conocida, T4SS también provoca respuesta inflamatoria en la célula

infectada, donde probablemente esté involucrada la proteína VceC perteneciente al sistema SST4 la cual causa estrés y expresión de citosinas, probablemente esta vía sea la que permita la detección de patógenos (Jong et. al., 2013). VceA y VCEC son los primeros efectores en ser identificados y son conservados en todas las especies de *Brucella* (Von Bargen et al, 2012).

### **1.12 Quorum-sensing**

El sistema “quorum sensing”, permite establecer una regulación génica intraespecie, se instaura a través de la síntesis, detección y respuesta de moléculas difusoras, autoinductoras, N-acil homoserin lactonas (AHL o A-HSLs). Una de estas A-HSLs, denominada N-dodecanoilhomoserina-lactona (C12-HSL), se ha logrado purificar en sobrenadantes de cultivos de *B. melitensis*, esta molécula es una molécula señalizadora implicada en el mecanismo de formación de quórum (Kapper, 2005). La secuencia del genoma de *Brucella* demostró la existencia de un regulador transcripcional tipo Lux-R (VjbR) para el gen flagelar *fliF* y el operón *virB*, dicho regulador modifica la transcripción de genes de virulencia (Camilli y Bassler, 2006; Weeks et al., 2010; Uzureau, 2010).

Las concentraciones de C12-HSL que se han logrado obtener *in vitro*, en los sobrenadantes de *Brucella* son muy bajas en comparación con la producción de esta molécula por otras bacterias; se ha sugerido, que este hecho podría tratarse de una estrategia de la bacteria para favorecer su supervivencia intracelular. Por otra parte se han identificado en *B. melitensis* 16M, dos factores de transcripción que intervienen en el proceso “quorum sensing”: VjbR y BlxR (también llamado

BabR) (Delrue *et al.*, 2005; Rambow-Larsen *et al.*, 2008), ambos forman parte de dos circuitos de regulación transcripcional independientes, implicados en la adaptación de *Brucella* spp., a diferentes ambientes durante el periodo de infección (Rambow-Larsen *et al.*, 2008; Uzureau *et al.*, 2010; Weeks *et al.*, 2010). Estos factores de transcripción también se les ha relacionado con la regulación de proteínas de membrana externa, incluyendo al sistema BvrS-BvrR y con la probable formación de biopelículas (Uzureau *et al.*, 2007; Barbier *et al.*, 2011).

El factor VjbR es activado por el sistema BvrS-BvrR (Santos-La Cerda *et al.*, 2013) y está involucrado en la expresión de un gran número de genes que codifican desde proteínas de membrana externa, lipoproteínas, adhesinas, hasta genes implicados en el metabolismo de la bacteria y en la biosíntesis del flagelo (Delrue *et al.*, 2005; Uzureau *et al.*, 2007; Uzureau *et al.*, 2010; Weeks *et al.*, 2010). Se conoce que existe una interacción entre la región del promotor del operón VirB y VjbR, el regulador de utilización de histidina (*HufC*), el factor de integración del hospedador (IHF), BvrR, BabR y el gen *bacA* y que ésta interacción se establece bajo condiciones de estrés, ocasionado por cambios en el pH o la disponibilidad de nutrientes (Santos-La Cerda *et al.*, 2013).

### **1.13 Biopelícula**

En la naturaleza, la persistencia bacteriana se asocia con la formación de biopelícula, la cual contribuye a la resistencia a antibióticos y desinfectantes. Se estima que el 99% de las bacterias son capaces de formar biopelículas y aproximadamente el 65% de las infecciones en humano involucran formación de

las mismas (Hall *et al.*,2004).La formación de biopelícula es una estrategia adaptativa de los microorganismos, ya que el crecimiento en biopelícula ofrece cuatro ventajas importantes: (I) protege a los microorganismos de la acción de los agentes adversos, (II) incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, (III) facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación y (IV) posibilita la transferencia de material genético (ADN). Todo esto contribuye a aumentar la capacidad de supervivencia (Fuster, 2008).

La formación de la biopelícula es un proceso que conlleva a la adherencia, colonización y crecimiento de los microorganismos. La presencia de biopelícula en la industria alimentaria representa un importante problema de salud pública,cuya formación temprana implica cambios en el pH, en la concentración de oxígeno, en la osmolaridad, temperatura y nutrición de las bacterias que participan, el Acetil CoA y el acetil fosfato provenientes del metabolismo de los carbohidratos contribuyen a la formación del biopelícula (Navia *et al.*, 2010).

Las bacterias que colonizan superficies e invaden huéspedes causando infecciones crónicas crecen predominantemente en biopelícula (Burmolle *et al.*, 2010) produciendo una matriz extracelular compuesta principalmente de exopolisacáridos, que rodea y es clave para mantener hidratados a los microorganismos ayudando a que se adhieran a superficies inertes o biológicas. Específicamente en *Brucella* se ha demostrado que la formación de biopelículas contribuye al desarrollo de la enfermedad (Uzureau *et al.*, 2007).

Se ha postulado que Omp31 está implicada en la producción y/o secreción de los exopolisacáridos formadores de la matriz, para apoyar esta hipótesis Uzureau *et al.*, en 2010, demostraron que *B. abortus* es capaz de formar una matriz extracelular, autoagregación y adherencia a superficies abióticas en condiciones de microaerobiosis (menos de 1% de O<sub>2</sub>) sin la participación de la proteína VjbR, ni el lipopolisacárido O, ni el glucano cíclico B (1,2), además la biopelícula formada por *B. abortus* no solo es resistente a la desecación, sino también a antibióticos y desinfectantes (Almiron *et al.*, 2013). Estos hallazgos son importantes para reconsiderar la epidemiología de la enfermedad y el estudio de los mecanismos que permiten la formación de la biopelícula.

#### **1.14 Acuaporinas**

La difusión simple no justifica completamente los grandes movimientos de agua en todas células; se ha postulado que la membrana celular posee vías específicas, llamadas acuaporinas, que constituyen canales para el paso de agua, se trata de moléculas ampliamente difundidas en los seres vivos y pertenecen a la familia de las proteínas Integrales de Membrana (PIM) (Agree *et al.*, 2003). Estos canales no sólo explican los rápidos cambios del volumen celular causados por la entrada o salida del agua sino también las respuestas de este proceso a cambios fisiológicos o a alteraciones patológicas. La relación que tienen las acuaporinas con diversas enfermedades ha incrementado el interés por entender su función en las diferentes células, ya que esto implicaría la mejor comprensión de los mecanismos fisiopatológicos de enfermedades cuyo origen molecular se desconoce (Akai *et al.*, 2012). La proteína acuaporina contiene entre 250 a 300

aminoácidos, está constituida por seis hélices transmembranales unidas por 5 lazos o bucles, denominados A, B, C, D y E de los cuales uno es intra y otro extracelular, los 5 lazos o bucles, se pliegan para formar el poro, este plegamiento permite que se pongan en contacto tripletes de NPA (asparagina, prolina, alanina) localizados en los bucles A y E, así las acuaporinas se organizan en tetrámeros para formar el sitio más estrecho y selectivo del poro (Jiang *et al.*, 2009; Ishibashi, 2011). Estas proteínas están presentes en todos los reinos de la vida y su papel central es mantener la fisiología de los organismos. Las acuaporinas son abundantes en mamíferos, en los que diferentes isoformas tienen un papel en la regulación de la homeostasis del agua (Agree, 2000; Agree y Kosono, 2003). Las acuaporinas de mamíferos se expresan en diversos tipos de células principalmente en las células involucradas en el transporte de fluidos a través de la membrana celular, como las renales, de pulmón, ojo, intestino, estómago y glándulas salivales; sin embargo también se han encontrado en células que no se relacionan con el transporte de líquidos como eritrocitos, leucocitos, adipocitos, músculo esquelético y astrocitos (Verckman, 2013). En humanos se han reportado 13 acuaporinas con localización específica (Magni *et al.*, 2006) y el número de acuaporinas en cada membrana celular parece estar relacionado con el flujo de agua de cada célula, de tal manera que el riñón probablemente sea el órgano de mayor expresión; en los túbulos renales se han observado AQP1, AQP7 y AQP8, mientras que en los conductos colectores se expresan AQP2, AQP3, AQP4, AQP6 y AQP8, también se ha observado que la pérdida de la función de las acuaporinas se asocia a enfermedades: en ojo con glaucoma, en riñón con insuficiencia renal, la reducción de expresión AQP2 se

asocia con diabetes insípida e hipopotasemia e hipercalcemia (Pavlovick-Djuranivic *et al.*, 2003; Beitz, 2009).

En los géneros de protozoarios *Plasmodium* spp, *Toxoplasma gondii* e *Eimeria* spp se ha observado la presencia de un gen que codifica para acuaporinas, sin embargo en el género *Trypanosoma* han sido caracterizados seis genes de acuaporina, cuya sobre-expresión se ha establecido principalmente cuando la célula hospedadora muere y el parásito debe cambiar de hábitat (Beitz, 2006). Como parte del tratamiento contra parásitos que poseen acuaporinas, se ha propuesto que la hidroxí-urea y el hidróxido de antimonio tetravalente pueden inhibir la función de las acuaporinas en el parásito evitando que los protozoarios puedan compensar el estrés (Gourbal *et al.*, 2004). En plantas, las acuaporinas regulan la permeabilidad y el transporte del agua en respuesta a variaciones externas en el suministro de agua (Ikeda *et al.*, 1997; Maurel *et al.*, 2002). Sin embargo, su función no ha sido claramente definida en bacterias (Calamita *et al.*, 1995), se ha reportado que el gen *aqp* codifica para proteínas de membrana que participan en el flujo de agua en algunos microorganismos, entre ellos *B. abortus*, esta función ha permitido explicar cambios en el volumen celular y sobrevivencia de la bacteria a cambios osmóticos (Rodríguez *et al.*, 2000).

Por otra parte, se ha encontrado una clara relación entre las acuaporinas y la tolerancia a la congelación rápida, debido a que a bajas temperaturas la estructura de los lípidos en la membrana es menos fluída, lo cual reduce la permeabilidad del agua (Meyrial *et al.*, 2001; King *et al.*, 2004), en este caso las acuaporinas permiten una rápida movilización de agua facilitando el flujo a temperaturas por

debajo de los 10°C, esto sugiere que la función de estas proteínas es importante para la sobrevivencia de bacterias a bajas temperaturas (Tanghe *et al.*, 2006). Se han desarrollado y estudiado acuaporinas mutadas por delección en *E. coli* (Calamita *et al.*, 1998; Soupene *et al.*, 2002), *S. cerevisiae* (Meyrial, 2001; Laizé *et al.*, 2000) y *Dictyostelium discoideum* (Bonhiver, 1998; Mitra *et al.*, 2000; Tanghe *et al.*, 2006).

La presencia de genes que codifican para acuaporinas en muchos microorganismos y extrañamente su ausencia en otros (Tanghe *et al.*, 2006), indica que estas proteínas no son necesarias en procesos básicos universalmente importantes para la sobrevivencia de los microorganismos y que existen otros sistemas que tienen la misma función de las acuaporinas (Bonhiverset *et al.*, 1998). La secuencia de una acuaporina de *B. melitensis* (Genbank No. de acceso AF226624), muy parecida a la acuaporina de *B. abortus aqpX*, sugiere que estas proteínas están presentes en todas las especies del género *Brucella*. El gen *aqpX* de *B. abortus* ha sido clonado y su secuencia revela estrecha homología con el gen *aqpZ* de *E. coli* (Rodríguez *et al.*, 2000). El papel de AqpX en *B. abortus* está relacionado específicamente con el transporte de agua, como un mecanismo de adaptación a variaciones en el pH o en la osmolaridad intracelular, por lo que se ha sugerido que la construcción de mutantes de *aqpX* ayudaría a determinar la función de la acuaporina en *B. abortus* (Rodríguez *et al.*, 2000).

Un grupo de investigadores desarrolló una mutante *aqpX* mediante la fusión de un cassette *LacZ-Km*, con el promotor del gen *aqpX*, y demostró que el gen no es esencial para el crecimiento de *B. abortus* en medios isotónicos; sin embargo la



mutante presenta decremento en la viabilidad bajo condiciones prolongadas de incubación en un medio hipo-osmolar y que la expresión del gen se incrementa en condiciones hiper-osmolares (Hernández-Castro *et al.*, 2003); lo cual es contrario a lo que se ha observado en el gen *aqpZ* de *E.coli* (Calamita *et al.*, 1998); aunque en otros estudios se ha observado que no hay afectación en el crecimiento de *E. colial* cambiar la osmolaridad del medio (Soupene *et al.*, 2002). A pesar de que el gen *aqp* no es esencial para la sobrevivencia de ninguno de los dos microorganismos, se ha sugerido que las acuaporinas puedan tener también funciones relacionadas a estilos de vida o estados de desarrollo específicos bacterianos (Tanghe *et al.*, 2006).

Actualmente se conoce el inicio de la transcripción del gen *aqpX* de *B. abortus*, el cual está alejado 169 pb del inicio, esta larga región de mRNA no traducida sugiere la existencia de un mecanismo post-transcripcional que regula la expresión de la proteína AqpX. Aunque muchas bacterias no poseen genes de acuaporina son capaces de adaptarse a cambios osmolares; lo que indica que las bacterias poseen mecanismos, diferentes de las acuaporinas, que les permiten responder a dichos cambios. Algunas bacterias han adquirido el gen y desarrollado mecanismos para regular su expresión, lo que podría interpretarse como resultado de un proceso evolutivo conferido por la presencia de acuaporinas (Hernández-Castro *et al.*, 2003). No se han encontrado condiciones constantes en las que la expresión de las acuaporinas sea inducida o reprimida, por lo que actualmente se realizan estudios que contribuyen a dilucidar la función del gen. La presión osmótica de una solución acuosa es proporcional a su actividad del agua y

varían en relación a la cantidad de solutos presentes. En la célula existen osmosensores que detectan cambios osmóticos, dichos cambios alteran propiedades de la célula como volumen celular, turgencia y tensión de membrana; en *E. coli* estos cambios son detectados por un sistema Sensor-Regulador constituido por la proteína Sensor-Quinasa intramembranal (KdpD), cuya función es iniciar la cascada de transducción de señales para la expresión de genes involucrados en la osmo-regulación, y por la proteína (KdpE), reguladora de respuesta y localizada en el citoplasma, participan también las proteínas osmo-transportadoras PropP, BetP y OpuA al activarse la histidin-quinasa y el sistema regulador de fosforilación se desencadena la cascada que permite la activación de un péptido capaz de formar un canal de flujo para agua (Calamita *et al.*, 1998).

Las acuaporinas son consideradas osmosensores indirectos, canales mecanosensibles que se abren para permitir el flujo de agua y mantener la homeostasis celular y que son controlados genética y bioquímicamente (Wood, 2006).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

En *Brucella*, los mecanismos de sobrevivencia intracelular han sido caracterizados, sin embargo, los implicados en la sobrevivencia extracelular son desconocidos. *Brucella* es capaz de sobrevivir en lácteos, por lo que, el consumo de estos productos en muchos casos de procedencia casera y en consecuencia no sometidos a control sanitario constituye el principal vehículo de transmisión del microorganismo (FDA, 2006). Específicamente en los quesos, son varios los factores que influyen en la presencia y sobrevivencia de patógenos, entre ellos el

proceso de elaboración o la temperatura de almacenamiento, la producción de ácido por los cultivos iniciadores, disponibilidad de agua ( $a_w$ ), salinidad del producto, competencia entre microorganismos (ICMSF, 1998), algunos de ellos implican cambios osmóticos que afectan la sobrevivencia de los microorganismos presentes en el queso. Nuestra propuesta es que estos cambios pueden ser compensados por las acuaporinas, cuyo papel en el mantenimiento de la fisiología celular ha sido ampliamente estudiado en mamíferos (Agree, 2000) y en plantas (Ikeda *et al.*, 1997); sin embargo, en bacterias su función no ha sido claramente definida; se ha reportado que el gen *aqp* codifica para proteínas de membrana participantes en el flujo de agua en algunos microorganismos, entre ellos *B. abortus*, lo que ha permitido explicar cambios en el volumen celular y sobrevivencia de la bacteria a cambios osmóticos (Rodríguez *et al.*, 2000), por lo que probablemente la expresión del gen *aqpX* sea un factor que favorezca la sobrevivencia de *Brucella abortus* en quesos y por lo tanto un factor de riesgo eventual al consumirlos.

### **3. HIPOTESIS**

La inactivación del gen *aqpX* disminuye la sobrevivencia de *Brucella abortus* en quesos.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la sobrevivencia de *B. abortus aqpX::lacZ-km* en quesos elaborados con leche de vaca.

## 4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Construir la mutante nula de *B. abortus aqpX::lacZ-km* a partir de la cepa *B. abortus* 2308 mediante recombinación homóloga.
- 2) Determinar, pH,  $a_w$  y sobrevivencia en quesos frescos y madurados elaborados con leche inoculada con la cepa parental *B. abortus* 2308 y la mutante *B. abortus aqpX::lacZ-km*.

## 5. MATERIAL Y METODOS

### 5.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

*Brucella abortus* 2308 y *B. abortus aqpX::lacZ-Km* (Hernández-Castro *et al.*, 2003) fueron crecidas en caldo brucella (Oxoid, Hampshire, England) a 37°C con agitación orbital. Cuando fue necesario se adicionaron kanamicina (Km) a 50 µg/ml y ácido nalidíxico (Nx) a 10 µg/ml. El conteo bacteriano fue realizado en agar brucella suplementado con medio Farrell (Oxoid) para determinar el número de unidades formadoras de colonia (UFC's). La elaboración e inoculación de los quesos fue realizada en un laboratorio de bioseguridad tipo III.

### 5.2 Construcción de la mutante *B. abortus aqpX::lacZ-Km*

La interrupción del gen *aqpX* de *B. abortus* 2308  $Nx^r$  se realizó por intercambio alélico. *E. coli* S17.1 fue transformada con el plásmido pAQPX/*lacZ-Km* y las transformantes se seleccionaron en placas de agar con kanamicina. El plásmido pAQPX/*lacZ-Km* se transformó a *B. abortus* 2308  $Nx^r$  por conjugación utilizando a *E. coli* S17.1, las colonias transconjugantes fueron seleccionadas en agar

suplementado con Km (50 µg/ml) y Nx (10 µg/ml). Posteriormente se realizó una co-selección y las colonias Km<sup>r</sup> que resultaron susceptibles a cloranfenicol (Cm) fueron seleccionadas como candidatas a mutantes por intercambio alélico. La interrupción del gen *aqpX* se confirmó por hibridación tipo Southern blot con dos sondas: una sonda de 3.6 kb-*EcoRI* que contiene el gen *aqpX* de *B. abortus* y una sonda de 5.3 kb-*HindIII* que contiene el cassette *lacZ*-Km.

### **5.3 Preparación de inóculos de *B. abortus* 2308 y *B. abortus aqpX::lacZ-km***

Se sembraron e incubaron las cepas *B. abortus* 2308 y la mutante *aqpX* de *B. abortus* en agar brucella a 37°C por 48 h, después se transfirieron de 3 a 5 colonias en 10 ml de caldo brucella y fueron crecidas a 175 rpm a 37°C en agitación orbital hasta llegar a una OD<sub>600</sub> de 0.8. De ese crecimiento se tomó 1.0 mL de cultivo y se transfirió en 49 ml de caldo brucella para obtener una dilución 1:50. Se incubó a 37°C a 174 rpm durante 24 h hasta llegar a un crecimiento de 1.0 a una OD<sub>600</sub>.

De este medio se hicieron diluciones decimales 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-9</sup> con PBS y se plaqueó por triplicado en agar brucella, las placas se incubaron a 37°C durante tres días para cuantificar la concentración (UFC) del inóculo. El resto del cultivo se centrifugó a 4,500 Xg durante 10 min y se lavó 2 veces con PBS a pH 7.2 con las mismas condiciones de centrifugación. Posteriormente se resuspendió la pastilla en 25 ml de medio infusión cerebro corazón y se realizaron inóculos para su criopreservación.

#### **5.4 Preparación de quesos frescos elaborados con leche cruda de vaca y obtención de suero lácteo**

La leche fue obtenida de un hato bovino libre de *Brucella* y transportada en hielera en botellas de cristal de boca ancha con tapas de rosca, limpias y esterilizadas en autoclave a 121°C durante 15 min. Los quesos se elaboraron de acuerdo con la metodología propuesta por Scholz, (1997) en las instalaciones del laboratorio de bacteriología del INIFAP, en campana de flujo laminar tipo 2 y teniendo las medidas sanitarias necesarias. Para la elaboración de los quesos frescos se utilizaron dos muestras de 250 mL de leche cruda inoculadas en la etapa de templado, una con  $6.0 \times 10^8$  UFC/mL de *B. abortus* 2308 y otra con  $6 \times 10^8$  de *B. abortus aqpX::lacZ*-km. Las muestra inoculadas se incubaron por 2h a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron las enzimas coagulantes. Se realizó el corte de queso y se dejó reposar por 10 min. Las muestras cortadas se colocaron en moldes de aluminio perforados para el desuerado durante 18 h a temperatura ambiente. Los quesos terminados se conservaron a 4°C durante siete días. En cada una de las etapas de elaboración y días en refrigeración se realizó la cuantificación del inóculo mediante el método de dilución y plaqueo en medio Farrell de acuerdo con la NOM-110-SSA1-1994. Se preparó y diluyó cada muestra de alimentos para su análisis y durante todas las etapas se determinó la sobrevivencia, el pH y  $a_w$  (Fig.1).

### **5.5 Preparación de quesos madurados a 4 y 24°C elaborados con leche cruda y pasteurizada**

La elaboración del queso madurado se realizó utilizando 500mL de leche pasteurizada o leche cruda, obtenida y transportada en las mismas condiciones de la leche usada para elaborar quesos frescos y fue inoculada en la etapa de templado con  $12 \times 10^8$  UFC/mL de la cepa *B. abortus* 2308 o de la mutante *B. abortus aqpX::lacZ-Km*.

Los quesos se elaboraron en seis etapas: a) templado a 24°C por 30 min, adición de *B. abortus* 2308y *B. abortus aqpX::lacZ-Km*, b) adición de cultivos iniciadores comerciales *Lactococcus lactis lactis* y *Lactococcus cremoris*, por 24 h a temperatura ambiente, c) corte de cuajada por 30 min, d) desuerado por 18 h, e) inmersión en salmuera por 30 min, f) maduración durante 10, 17, 24 y 31 días post-inoculación. Los quesos fueron madurados a 4°C y a 24°C. Durante estas etapas se determinó la sobrevivencia, el pH y  $a_w$ . (Fig.1).

### **5.6 Determinación de pH y $a_w$ en quesos**

El pH fue determinado en cada etapa de la elaboración, conservación o maduración de los diferentes tipos de quesos, utilizando el equipo Orion Benchtop pH/temp meter 410<sup>a</sup> (Thermo, Beverly, MA, USA). Para medir la cantidad disponible de agua en leche y en cada etapa de elaboración, conservación y/o maduración de los quesos se utilizó el equipo Rotronic  $a_w$  Quick (Rotronic AG, Bassersdorf, Ch).

## Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados por ANOVA y sometidos a la prueba de correlación de Pearson utilizando el programa SPS versión 12. Los valores de  $P < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. Los datos fueron graficados utilizando el programa Graph Pad Prism5.

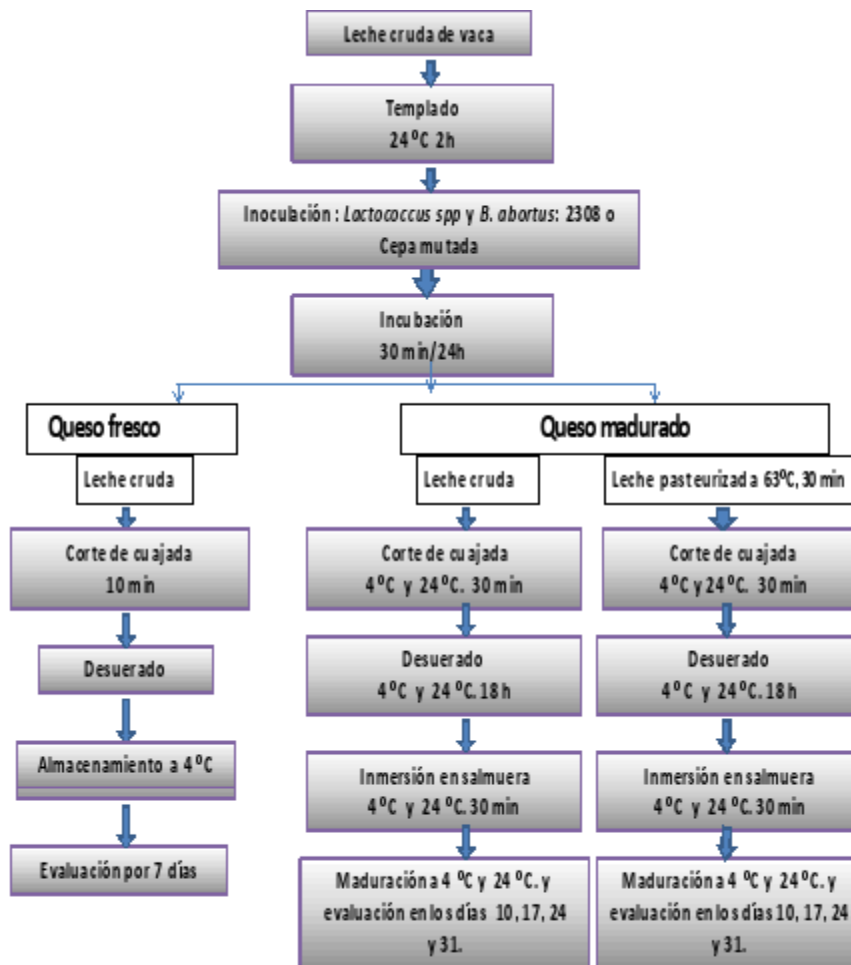


Fig.1 Proceso de elaboración del queso fresco y madurado a 4 °C y 24 °C, manufacturado con leche cruda y pasteurizada.



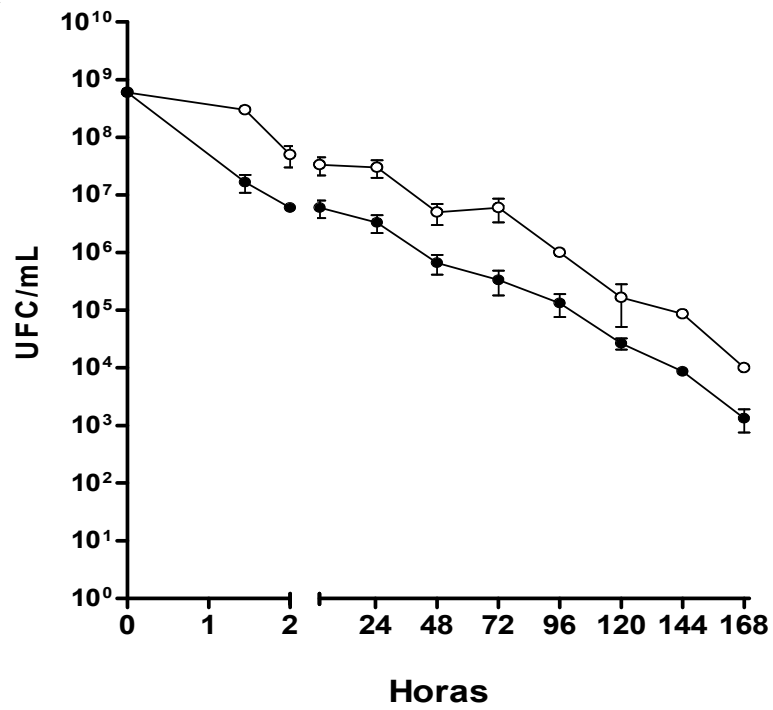
## 6. Resultados

### 6.1 Sobrevivencia de *B. abortus* 2308 y *B. abortusaqpX::lacZ-kmen* quesos frescos

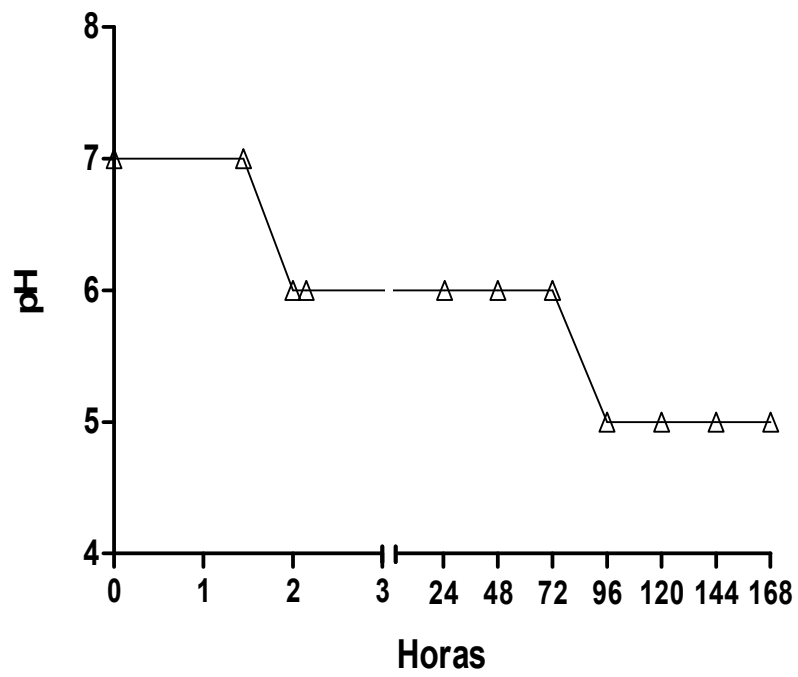
Después de 2h de incubación en la leche, la cepa *B. abortus* 2308 tuvo una sobrevivencia de  $3 \times 10^7$  UFC/mL y la cepa mutante de  $6 \times 10^6$  UFC/mL, la sobrevivencia de ambas cepas se mantuvo con un  $\log_{10}$  de diferencia durante todo el proceso de elaboración. Los resultados muestran que ambas cepas se mantuvieron por más de 7 días a 4°C con una carga bacteriana de  $3 \times 10^4$  UFC/mL para *B. abortus* 2308 y  $2 \times 10^3$  UFC/mL para la mutante *B. abortusaqpX::lacZ-Km* (Fig. 2A).

El pH tuvo dos descensos en los quesos a lo largo del experimento, primero en la etapa de cuajado y después a los 4 días de conservación (Fig. 2B). En tanto que la  $a_w$  cuyo valor inicial fue de 0.98, mostró valores de 0.959 en la etapa de queso terminado (24 h) y 0.930 al día 7 de conservación (Fig. 2C). El análisis estadístico mostró diferencias significativas en la sobrevivencia de las cepas de *Brucella*, durante las etapas de elaboración y conservación de los quesos frescos, atribuibles a la mutación nula del gen *aqpX* ( $P < 0.05$ ). El pH y  $a_w$  no tuvieron influencia en la sobrevivencia en ninguna de las cepas, a pesar de los cambios observados debidos al proceso de elaboración y conservación de los quesos frescos ( $P > 0.05$ ) (Figs. 2B y 2C).

2A



2B



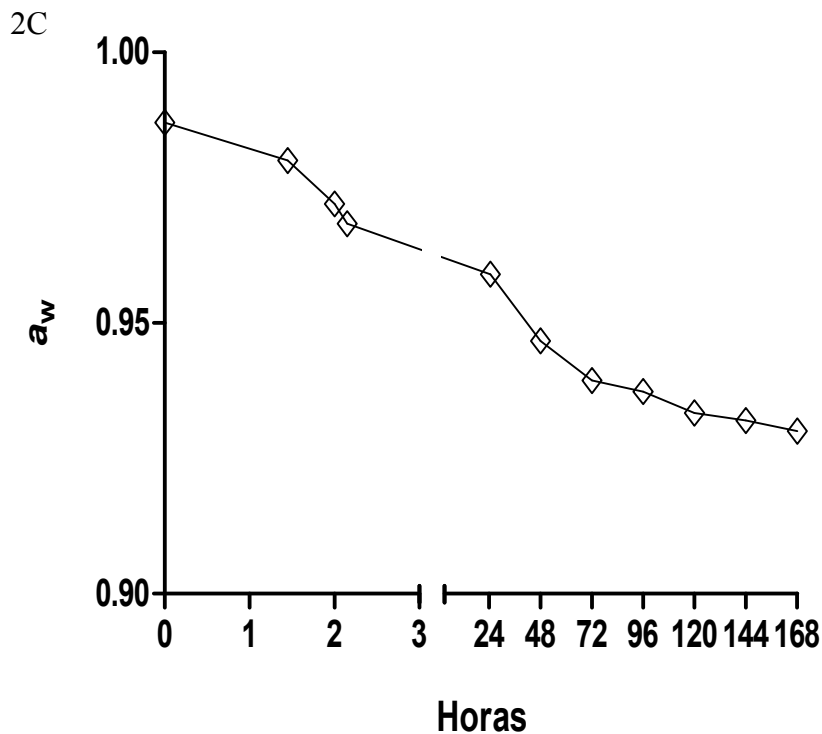


Fig.2. Determinaciones de sobrevivencia de *B. abortus* y *B. abortus aqpX::lacZ-Km* durante la elaboración de quesos frescos usando leche cruda y conservados a 4°C. **A)** Sobrevivencia de *B. abortus* 2308 (○) y *B. abortus aqpX::lacZ* (●); **B)** Determinación de pH (Δ); **C)** Determinación de la actividad de agua  $a_w$  (◇). Cada punto representa los pasos del proceso de elaboración y el tiempo de conservación. Los datos representan el promedio(±) desviación standard (DS) de tres experimentos independientes.

## 6.2 Sobrevivencia de *B. abortus* 2308 y *B. abortus aqpX::lacZ-km* en quesos elaborados con leche cruda y madurados a 4°C y 24°C

El patrón de sobrevivencia de ambas cepas mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), de más de un  $\log_{10}$  durante el proceso de elaboración y maduración del queso a 24°C, *B. abortus* 2308 con un conteo de  $7 \times 10^3$  UFC/mL al día 17 de maduración y *B. abortus aqpX::lacZ-Km* con  $3 \times 10^2$  UFC/mL al mismo periodo (Fig. 3A). Igualmente, el queso madurado a 4°C las cepas mostraron una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) de diez veces en la sobrevivencia, a esta temperatura *B.*

*abortus* 2308 sobrevivió por 24 días de maduración con un conteo de  $6 \times 10^2$  UFC/mL; mientras que *B. abortus aqpX::lacZ-Km* sobrevivió hasta 17 días con un conteo de  $4 \times 10^2$  UFC/mL (Fig.3A). Estas diferencias en la sobrevivencia de ambas cepas podrían ser atribuidas al efecto de la mutación. Adicionalmente la temperatura de maduración (4°C y 24°C) tuvo una correlación estadísticamente significativa en la sobrevivencia para ambas cepas ( $P < 0.01$ ).

### **6.3 Efecto del pH y $a_w$ en la sobrevivencia de *B. abortus* 2308 y *B. abortus aqpX::lacZ-kmen* quesos madurados a 4°C y 24°C elaborados con leche cruda.**

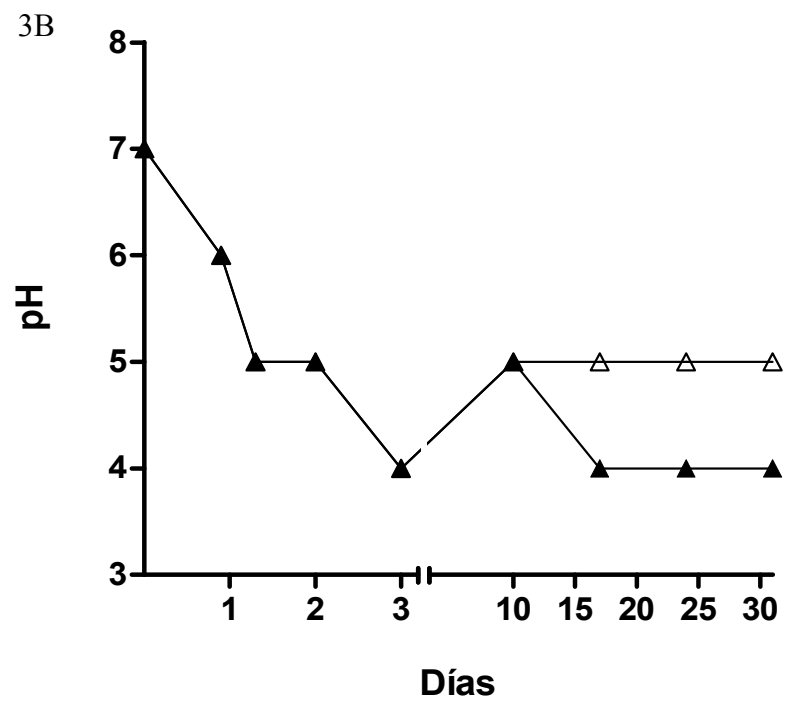
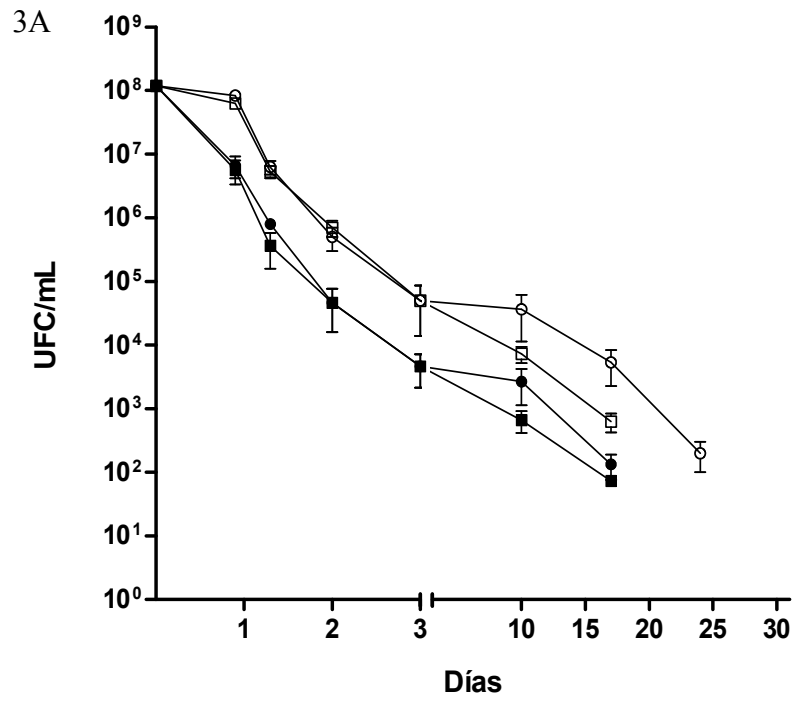
Los valores de pH observados en los quesos madurados a 4° y 24°C fueron iguales hasta los 10 días de maduración, sin embargo se observaron variaciones en las etapas de maduración. El pH de la leche utilizada para la elaboración de los quesos fue de 7.0 y en ambas temperaturas el valor fue disminuyendo hasta encontrar en la etapa de salmuera un pH de 4.0 en ambas cepas, posteriormente se observó un incremento a pH 5 en el día 10 de la maduración a 4°C, mientras que en la maduración a 24°C el pH se mantuvo en un valor de 4.0 al día 17 (Fig. 3B). Los valores de pH observados en los quesos madurados a 4° y 24°C fueron iguales hasta los 10 días de maduración, sin embargo, se observaron variaciones en las etapas de maduración.

En ambas temperaturas de almacenamiento del queso, el pH de la leche utilizada para la elaboración fue de 7.0 y el valor de pH fue disminuyendo hasta llegar a 4 en la etapa de salmuera, en la maduración a 24°C el pH se mantuvo en un valor

de 4 hasta el día 17, a diferencia de la maduración a 4°C donde el pH se elevó a 5 en el día 10 (Fig. 3B). Se observó una correlación positiva entre sobrevivencia y pH ( $P=0.01$ ), pero no existió diferencia significativa al comparar los valores del pH sin embargo se observó una correlación positiva entre sobrevivencia y pH ( $P=0.01$ ).

En ambas temperaturas de almacenamiento del queso, el pH de la leche utilizada para la elaboración fue de 7.0 y el valor de pH fue disminuyendo hasta llegar a 4 en la etapa de salmuera, en la maduración a 24°C el pH se mantuvo en un valor de 4 hasta el día 17, a diferencia de la maduración a 4°C donde el pH se elevó a 5 en el día 10 (Fig. 3B). Se observó una correlación positiva entre sobrevivencia y pH ( $P=0.01$ ), pero no existió una diferencia significativa al comparar los valores del pH

La actividad del agua se evaluó en cada etapa de elaboración y maduración del queso en ambas temperaturas. El valor inicial del  $a_w$  en la leche fue de 0.987. A 4°C y 24°C los valores de  $a_w$  decrecieron ligeramente en las primeras etapas de elaboración, pero en la etapa de salmuera el  $a_w$  disminuyó a 0.920 en ambas temperaturas. En quesos madurados a 4°C se encontró a los 17 días de maduración un  $a_w$  0.906 y a los 24 días un  $a_w$  0.903. En quesos madurados a 24°C se observó una disminución del  $a_w$  a los 17 días de 0.89 (Fig. 3C). Al final de la maduración el valor de  $a_w$  en los quesos madurados a 4°C fue de 0.89 y 0.87 para los quesos madurados a 24°C (Fig. 3C). Se observaron diferencias significativas entre el  $a_w$  y la sobrevivencia de las cepas expuestas a diferentes temperaturas de maduración ( $P < 0.04$ ).



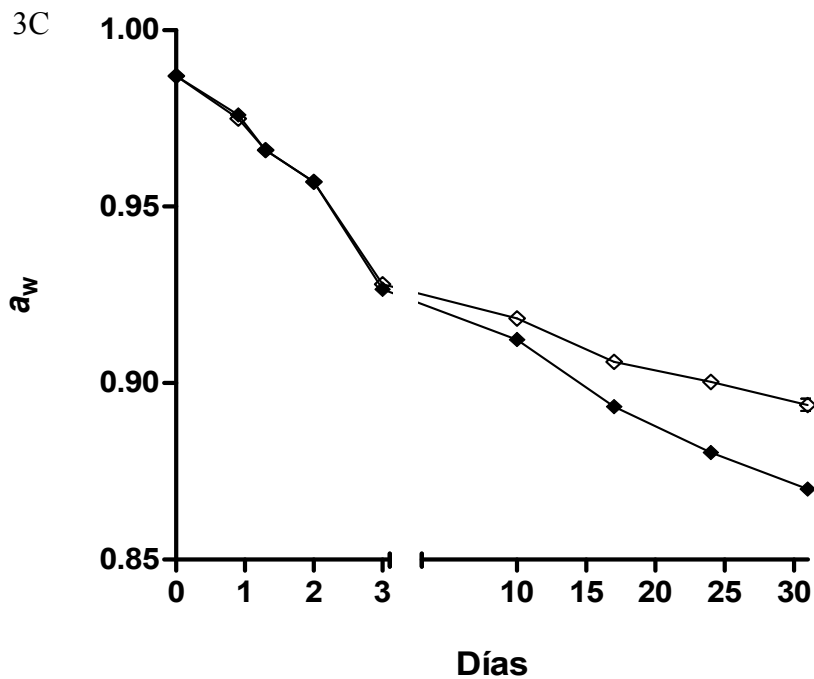


Fig.3. Sobrevivencia de *B. abortus* y *B. abortus aqpX::lacZ-Km* durante la elaboración y maduración de quesos a 4°C y 24°C elaborados con leche cruda. **A)** *B. abortus* 2308 a 4°C (○), *B. abortus aqpX::lacZ* a 4°C (●), *B. abortus* 2308 a 24°C (□), *B. abortus aqpX::lacZ* a 24°C (■); **B)** Determinaciones de pH a 4°C (Δ), pH a 24°C (▲); **C)** Determinaciones de actividad de agua  $a_w$  a 4°C (◇),  $a_w$  a 24°C (◆). Cada punto representa los pasos del proceso de elaboración y el tiempo de maduración. Los datos representan el promedio (±) DS de tres experimentos independientes.

#### 6.4 Sobrevivencia de *B. abortus* 2308 y *B. abortus aqpX::lacZ-km* en quesos elaborados con leche pasteurizada y madurados a 4°C y 24°C

Durante el proceso de elaboración del queso madurado a 24°C se observaron diferencias de un  $\log_{10}$  (10 veces) entre ambas cepas, sin embargo, en la etapa de maduración, la cepa de *B. abortus* 2308 sobrevivió hasta 31 días a una concentración de  $2 \times 10^2$  UFC/mL, en tanto que, la cepa mutante sobrevivió hasta el día 24 de maduración en una concentración de  $3 \times 10^2$  UFC/mL (Fig. 4A). Por otra parte, en los quesos madurados a 4°C, la dos cepas sobrevivieron hasta el día 31 de maduración con conteos de  $2 \times 10^4$  UFC/mL y de  $5 \times 10^3$  UFC/mL para *B. abortus*

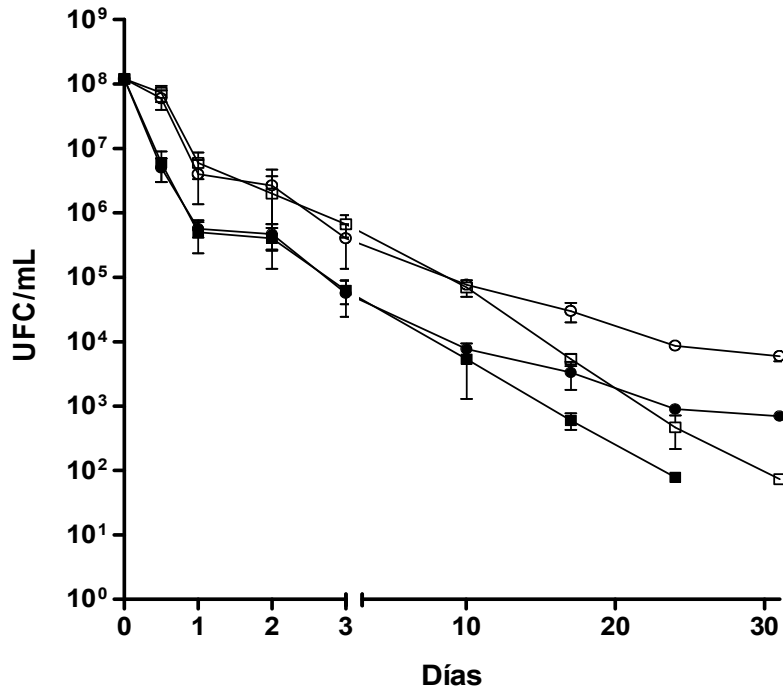
2308 y la cepa mutada, respectivamente (Fig. 4A). La temperatura de maduración a (4°C y 24°C) tuvo una correlación positiva en ambas cepas ( $P < 0.02$ ).

### **6.5 Efecto del pH y $a_w$ en la sobrevivencia de *B. abortus* 2308 y *B. abortus* *aqpX::lacZ-km* en quesos madurados a 4°C y 24°C elaborados con leche pasteurizada.**

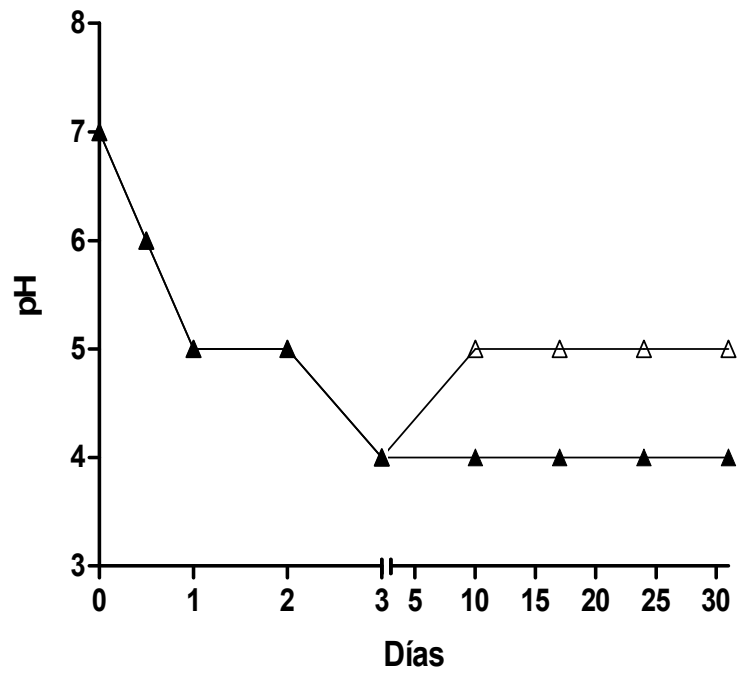
Los valores de pH encontrados en los quesos madurados a 4°C y 24°C fueron idénticos para ambas cepas hasta la etapa de salmuera. El pH inicial de 7.0 disminuyó paulatinamente obteniendo en la salmuera un pH de 4.0, que en los quesos madurados a 24°C se mantuvo hasta los 31 días, mientras que a 4°C, el pH incrementó a un valor de 5.0 a los 10 días de maduración y se mantuvo hasta los 31 días (Fig. 4B). El efecto del pH no fue estadísticamente significativo a 4°C y 24°C. En ambas temperaturas el  $a_w$  disminuyó ligeramente en las primeras etapas de elaboración. Los valores de  $a_w$  encontrados en los quesos madurados a 4°C y 24°C fueron similares hasta la etapa de salmuera (0.94/4°C y 0.93/24°C). En quesos madurados a 4°C se observó un  $a_w$  de 0.901 en ambas cepas a los 31 días. Sin embargo, en los quesos madurados a 24°C el valor del  $a_w$  disminuyó a 0.886 hasta los 31 días (Fig. 4C). El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre  $a_w$  y sobrevivencia de las cepas en la maduración a 4°C y 24°C ( $P < 0.03$ ).



4A



4B



4C

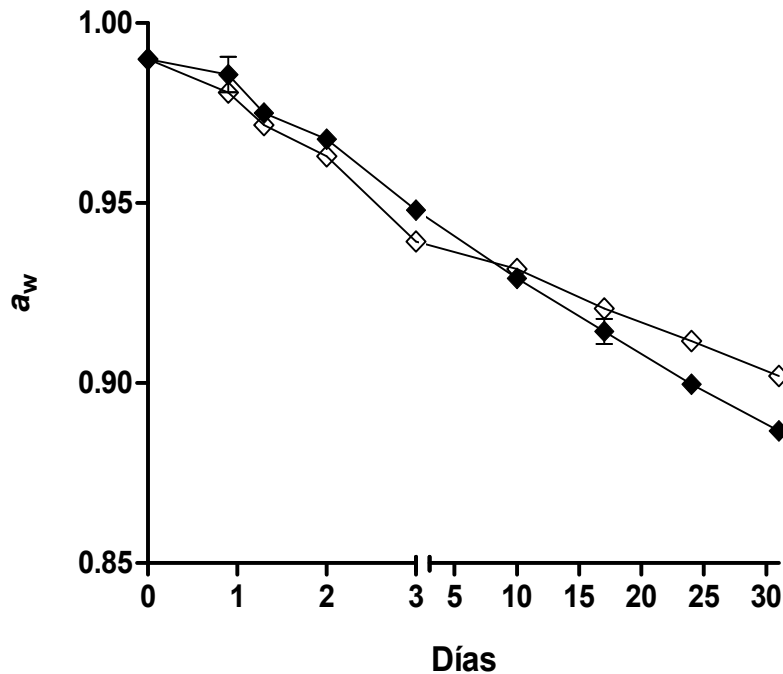


Fig. 4. Sobrevivencia de *B. abortus* y *B. abortus aqpX::lacZ-Km* durante la elaboración y maduración de quesos a 4°C y 24°C elaborados con leche pasteurizada. **A)** *B. abortus* 2308 a 4°C (○), *B. abortus aqpX::lacZ* a 4°C (●), *B. abortus* 2308 a 24°C (□), *B. abortus aqpX::lacZ* a 24°C (■); **B)** Determinaciones de pH a 4°C (Δ), pH a 24°C (▲); **C)** Determinaciones de actividad de agua  $a_w$  a 4°C (◇),  $a_w$  a 24°C (◆). Cada punto representa los pasos del proceso de elaboración y el tiempo de maduración. Los datos representan el promedio ( $\pm$ ) DS de tres experimentos independientes.

### 6.6 Sobrevivencia de *B. abortus* 2308 y *B. AbortusaqpX::lacZ-km* en suero de quesos

En la determinación de sobrevivencia en el suero de quesos frescos se detectaron  $3 \times 10^7$  UFC/mL de la cepa *B. abortus* 2308 y  $4 \times 10^6$  UFC/mL de la cepa mutante *B. abortus aqpX::lacZ-Km*, el suero en ambas cepas tuvo valores de pH 6.0 y  $a_w$  de 0.97.

En el suero de quesos madurados elaborados con leche cruda, *B. abortus* 2308 presentó una sobrevivencia de  $3 \times 10^5$  UFC/mL y en la cepa mutante *B. abortus*

*aqpX::lacZ*-Km la sobrevivencia fue de  $2 \times 10^4$  UFC/ml, el suero alcanzó un valor de pH de 5.0 y  $a_w$  de 0.90 mientras que en el suero de los quesos elaborados con leche pasteurizada se detectaron  $4 \times 10^6$  UFC/mL de la cepa parental, mientras que de la mutante se cuantificaron  $7 \times 10^5$  UFC/mL, en este caso el pH fue de 5.0 y el  $a_w$  de 0.93. Se observaron diferencias significativas entre el  $a_w$  y la sobrevivencia de las cepas en los desuerados de los quesos madurados provenientes de leche cruda y pasteurizada ( $P < 0.05$ ).

## 7. Discusión

*Brucella* spp., puede sobrevivir por largos periodos en estiércol, agua y productos lácteos, el periodo de sobrevivencia depende de variables como temperatura, luz del sol, número de bacterias, pH y presencia de microbiota (WHO, 2006).

En este estudio, hemos demostrado que la mutación del gen *aqpX* en *B. abortus*, que codifica para la acuaporina AqpX, causó disminución de la capacidad de sobrevivencia de la bacteria en quesos frescos y madurados. La presencia de acuaporinas se ha reportado en un reducido número de bacterias, lo que ha limitado el estudio sobre su función, además no se han encontrado condiciones constantes bajo las cuales la expresión de estas proteínas sea inducida o reprimida (Akai *et al.*, 2012). Sin embargo, en *Brucella* la acuaporina se ha encontrado expresada en condiciones de hiperosmolaridad (Hernández-Castro, 2003). En la leche inoculada con la cepa mutante y utilizada para elaborar los quesos frescos, la ausencia del gen causó la disminución en un  $\log_{10}$  en el recuento de UFC/mL con respecto a la cepa parental, lo cual fue atribuido a la

mutación del gen y no debido al efecto del  $a_w$  o pH, ya que los quesos inoculados con ambas cepas tuvieron los mismos valores de  $a_w$  (0.930) y pH (5.0) durante los 7 días de evaluación (Fig.2A y 2B); se ha reportado que *Brucella* y *E. coli* son capaces de sobrevivir en alimentos con valores de  $a_w$  superiores a 0.89 (Montville, 2011).

*Brucella* puede adaptarse a variaciones en el pH durante la elaboración de productos lácteos (Zuñiga, 2005) probablemente por medio de mecanismos osmo-protectivos proceso que podría explicar lo que sucede al bajar la actividad del agua pero no lo que pasa con el pH (El-Daher, 1990) evento en el que las acuaporinas podrían estar involucradas. La sobrevivencia de *B. abortus* detectada en este trabajo es similar a trabajos donde reportan que en queso “blanco suave” elaborado con leche cruda de vaca inoculada con *B. abortus* o con *B. melitensis* y almacenado a 5°C, la bacteria sobrevive hasta 21 días (Díaz-Cinco *et al.*, 1998; Díaz-Cinco *et al.*, 2000). *B. melitensis* incluso ha sido recuperada en quesos frescos conservados a 4°C después de 8 semanas de elaboración (Abdallah *et al.*, 2007). El proceso de maduración del queso parece reducir la sobrevivencia de *Brucella* spp., sin embargo, se ha reportado que *B. abortus* es detectada durante 30 días en quesos madurados elaborados con leche cruda de vacas con *Brucella* conservados a 8°C (Plommet *et al.*, 1988). Otro estudio demostró que *B. melitensis* es capaz de sobrevivir en quesos elaborados con leche de cabra madurados a 4°C durante 50 días con un pH de 5.0 y  $a_w$  de 0.90 y que durante el proceso de maduración a 24°C la bacteria sobrevive 20 días en condiciones de  $a_w$  de 0.89 y pH de 4.0 (Méndez *et al.*, 2011).

El pH es un factor importante en la preservación de los alimentos debido a que afecta la conformación de las proteínas, el crecimiento y supervivencia de los microorganismos, los cuales necesitan mantener su pH intracelular, cuya alteración provoca un flujo de protones que causa oxidación de lípidos y desnaturalización de proteínas del alimento (Solomon, 2014; Chongde Wu, 2012).

En nuestro estudio, observamos que en quesos elaborados con leche cruda de vaca y madurados a 4°C, *B. abortus* 2308 sobrevivió durante 24 días en condiciones de  $a_w$  de 0.90 y pH 5.0, y la cepa mutante sólo se detectó al día 17 con el mismo pH y  $a_w$  de 0.907, mientras que la maduración a 24°C con un pH ácido de 4.0 y un valor de  $a_w$  de 0.895 inhibieron la supervivencia de ambas cepas a los 17 días de maduración (Figs.3B y 3C). Debido a esto la influencia de la  $a_w$  en la supervivencia parece ser más evidente a 24°C y periodos largos de maduración que a bajas temperaturas, por otro lado, la mayor supervivencia observada a 4°C coincide con valores más altos de pH y  $a_w$ . En este sentido se ha propuesto que a 4°C la persistencia de las bacterias no es afectada cuando el  $a_w$  tiene un valor de al menos 0.90 (Shadbolt *et al.*, 2001). No todos los agentes infecciosos son igualmente sensibles a las condiciones de maduración y no todas las variedades de quesos presentan los mismos valores de pH o  $a_w$ , factores que afectan la supervivencia de microorganismos en los alimentos (Montville, 2011). Respecto a la supervivencia del microorganismo, algunos autores han reportado diferencias en el tiempo de supervivencia de *Brucella* en quesos lo que ha sido atribuido al tiempo y temperatura de maduración, así como a la cepa estudiada (Plommet *et al.*, 1988). En cuanto al manejo de la leche, en México se debe cumplir con lo

establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, debiendo someterse a un tratamiento térmico que garantice su inocuidad, independientemente del uso que se le dé posteriormente. Sin embargo, la ingestión de leche cruda es una costumbre popular, lo cual facilita la transmisión de microorganismos tales como: *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia*, *Coxiella*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus anthracis*, *Brucella*, levaduras y hongos. Por su composición y su alto contenido en agua la leche, resulta un medio propicio para el desarrollo de microorganismos por lo que éstos compiten por desarrollarse en éste medio, lo que implica cambios en las características de alimentos. Sin embargo, es importante considerar que la microbiota presente en la leche es variable en diferentes países y cada uno tiene una normatividad específica al respecto (González y Rojas, 2005). El agua presente en la leche es fundamental para la homeostasis celular, la cual es controlada en parte por procesos como la difusión simple; sin embargo a partir del descubrimiento de las proteínas acuaporinas (AQP), y su papel en la regulación de la permeabilidad del agua (Carbrey, 2001).

En los quesos madurados identificamos una disminución de un  $\log_{10}$  en el conteo de UFC/mL entre la cepa mutante y la cepa parental durante todas las etapas de elaboración y maduración del queso. Esto puede ser atribuible a que la cepa mutada no fue capaz de compensar y adaptarse de la misma manera que la cepa parental a las condiciones que implicaron estrés osmótico, debido a la ausencia del gen *aqpX*, cuya expresión permite a las bacterias que lo poseen, el adaptarse a cambios osmóticos y de pH; por lo que las mutantes que carecen de estas

proteínas pueden ver afectada su sobrevivencia en productos lácteos (Rodríguez *et al.*, 2000; Hernández-Castro *et al.*, 2003). La exposición de las bacterias a condiciones medioambientales desfavorables provoca una respuesta adaptativa determinada por proteínas de estrés las cuales permiten la regulación de la expresión de genes de resistencia (Privat y Thonart, 2011).

La pasteurización contribuyó como un factor de sobrevivencia, especialmente en las condiciones de maduración a 4°C, pH 5.0 y  $a_w$  de 0.90, ya que permitió una mayor recuperación de bacterias en ambas cepas atribuible a la disminución de la competencia que ejercen otros microorganismos presentes en este tipo de leche (Montville, 2011).

Aunque estos resultados son similares a estudios que reportan sobrevivencia de *B. abortus* hasta por 45 días en queso madurado elaborado con leche pasteurizada y conservado a 4°C (Gilman *et al.*, 1946), habría que considerar que existe diferencia en cuanto a la procedencia de la leche, ya que es distinta la microbiota que hay en la leche de las vacas de diferentes lugares del mundo (González y Rojas, 2005). En nuestro trabajo detectamos en el suero de quesos, al igual que durante la elaboración de los mismos, la presencia de ambas cepas de *Brucella*, resaltando la menor sobrevivencia de la cepa mutante, con una diferencia de un  $\log_{10}$  (diez veces). Méndez *et al.*, (2011), también reportaron la sobrevivencia de *B. melitensis* en suero de quesos de cabra, lo cual constituye un riesgo para quienes laboran en queserías y para el ganado que es alimentado con este subproducto.

## 8. CONCLUSIONES

La mutación nula del gen *aqpX* afectó la capacidad de sobrevivencia de *Brucella abortus* puesto que la cepa mutante sobrevivió diez veces menos durante la elaboración, conservación y maduración de quesos frescos y madurados a dos diferentes temperaturas, así como en el desuerado de los quesos, por lo que se demuestra que el gen *aqpX* es importante para la sobrevivencia.

La persistencia de ambas cepas se vió afectada por la temperatura de maduración; a menor temperatura las cepas sobrevivieron más días.

La pasteurización fue un factor adicional de sobrevivencia ya que en los quesos elaborados con leches pasteurizadas y maduras a 4 °C la persistencia de la bacteria fue mayor. La  $a_w$  afectó la sobrevivencia de las cepas en los quesos madurados y suero de quesos. Destacando que a menor temperatura de maduración y a un valor de  $a_w$  alto es posible alargar la vida de anaquel de los quesos a pesar de la presencia de las cepas.



## 9. REFERENCIAS

- Abdallah M, Dawoud A, Bazalou M.** 2007. Occurrence of *Brucella* in some unheattreated dairy products in Damietta Governatore regarding its health importance. *Research of food Inspection*. 1-9.
- Ackermann R, Cheville F, Deyoe L.** 1988. Bovinelymphoethelial cell: endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. *Veterinary Pathology*. 25, 28-35.
- Agree P.** 2000. Homer W Smith award lecture. Acuaporin water channel kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*. 11. 764-777.
- Agre P, Kozono D.** 2003. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Lett*. 555, 72-78. *The Veterinary Journal* 184:146-155.
- Alcina V, Carvalho Neta, Juliana PS, Mol M, Xavier N, Tatiane A, Paixao J, Andrey P, Lage P, Santos R.** 2010. Pathogenesis of bovine brucellosis. *The Veterinary Journal*. 184. 146-155.
- Akai M, Onai K, Morishita M, Mino H, Shijuku T, Maruyama H, Funihito A, Itoh S, Hazama A, Checcheto V, Szabó I, Yukutake Y, Suematzu M, Yasui tress M, Ishiura M, Uozumi N.** 2012. Aquaporin *AqpZ* is involved in cell volume regulation and sensitivity to osmotic stress in *Synechosistis* spp. Strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*. 24. 6828-6836.
- Almiron AM, Roset SM, San Juan N.** 2013. The Aggregation of *Brucella abortus* Occurs Under Microaerobic Conditions and Promotes Desiccation Tolerance and Biofilm Formation. *The Open Microbiology Journal*. 7. 87-91.
- Alton G, Jones LM, Pites DE.** 1975. Laboratory Techniques in Brucellosis, 2nd edition. Geneva, Switzerland: World Health Organization, Monograph No.55.
- Barbier T, Nicholas C, Letteson J.** 2011. *Brucella* adaptation and survival at the crossroad of metabolism and virulence. *Journal Homepage*: www.FEBSLetters.org. 585.2929-2934.
- Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Weiss DS, Guzmán-Verri C, Chacón-Díaz C, Rucavado A, Moriyón I, Moreno E.** 2007. *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS ONE*. Org. ISSUE 7. 1-14.
- Beitz E.** 2006. Acuaporins from pathogenic protozoan parasites: structure, function and potential for chemotherapy. *Biol. Cel*. 97.373-383.
- Beitz E.** 2009. Acuaporins, Handbook of Experimental Pharmacology 190. Germany 463p.
- Billard E, Dornand J, Gross A.** 2007. Interaction of *Brucella suis* and *Brucella abortus* rough strains with human dendritic cells. *Infection and Immunity*. 75, 5916-5923.

**Boigegrain R A, Salhi M, Alvarez-Martinez J, Machold Y, Fedon M, Arpagaus C, Weise M, Rittig B.** 2004. Release of periplasmic proteins of *Brucella suis* upon acidic shock involves the outer membrane protein Omp25. *Infection and Immunity*. 72. 5693-5703.

**Bonhivers M.**1998. Aquaporins in *Saccharomyces*. Genetic and functional distinctions between laboratory and wild-type strains. *The Journal of Biological Chemistry*. 273. 27565-27572.

**Boschioli ML, Foulongne V, O'Callaghan D.** 2001. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Current Opinion in Microbiology*. 4. 58–64

**Boschioli ML, Ouahrani-Bettache, Foulongne V, Michaux-Charachon S. Bourg G, Allardet-Servent A, Casevieille Ch, Liautard JP, Ramuz M, O'Callahan D.** 2002. *Brucella suis* the virB operon is induced intracellularly in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99. 1544-9.

**Burmolle M, Thomsen TR, Fazli M.** 2010. Los biofilms en infecciones crónicas, una cuestión de oportunidad. *Microbiology Immunology Medical*. 59:324-36.

**Calamita G, Bishai WR, Preston GM, Guggino WB, Agree P.** 1995. Molecular cloning and characterization of AqpZ a water channel from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. 270. 29063-29066.

**Calamita G, Kempf B, Bonhivers M, Bishai WR, Bremer E, Agree P.** 1998 Regulations of the *Escherichia coli* water channel gen *aqpZ*. *Proceedings of the National Academy of Science*. 95. 3627-3631.

**Camilli S, Bassler L.** 2006. Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. *Science*. 24. 311(5764). 1113–1116. doi:10.1126/science.1121357

**Carbrey JM, Bonhivers M, Boeke JD, Agree P.** 2001. Aquaporins in *Saccharomyces*: Characterization of a second functional water channel protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 30;98(3):1000-5.

**Clarridge JE.** 1994. Miscellaneous gram-negative coccobacilli: Pasteurella, Francisella, Bordetella and Brucella. En: Howard BJ, Smith TF et al. (editores). *Clinical and Pathogenic Microbiology 2nd. Ed. Mosby-Year Book Inc*.

**Celli and Gorvel J.** 2004. Organelle Robbery *Brucella* Interactions with the Endoplasmic Reticulum. *Current Opinion Microbiology*. 7:93-97.

**Cha SB, Rayamajhi N, Kang K, Min-Kyoung Shin, and Yoo HS.** 2010 Comparative Study of Gamma Interferon Production in Mice Immunized with Outer Membrane Proteins and Whole Bacteria of *Brucella abortus*. *J. Infect. Dis.*, 63, 49-51,

**Chawla S, Chander R.** 2004. Microbiological safety of shelf-stable meat products prepared by employing hurdle technology. *Food Control*, 15, 559-563.

**Chongde Wu, Zhang J, Wang Miao, Du Guocheng, Chen J.** 2012. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 39:1031–1039.

**Ciesielski A, David C. Griffin A, Michael Rittig A, Ignacio Moriyón B, Boyan B. Bonev B.** 2013. Interactions of lipopolysaccharide e with lipid membranes, raft models. A solid state NMR study. *Biochimica et Biophysics Acta*.1828.doi:10.1016/j.bbamen.12313.03.029.1731-1742.

**Diaz-Cinco ME, Acedo-Félix E, León D.** 1998. Survival of *Brucella abortus* in the Mexican White Soft Cheese Processing. *Recent Research Development in Nutrition*.2 46-57.

**Díaz-Cinco ME, Acedo-Félix E, Silveira-Agramont MI.** 2000. Survival and Recovery of *Brucella melitensis* in Mexican White Soft Cheese Processing. *Recent Research Development Microbiology*. 4:529–535.

**Delrue M, Lestrade P, Tibor A, Letesson J, De Bolle J.** 2004. *Brucella* pathogenesis, genes identified from random large-scale screens. *FEMS Microbiology Letters*. (231); 1-12.

**Doyle A.** 2012. Application Note. AqualabDecagon Devices, Inc.13391-01

**Dornand, J., Gross, A., Lafont, V., Liautard, J., Oliaro, J., and Liautard, J.P.** 2002. The innate immune response against *Brucella* in humans. *Vet Microbiol* 90, 383-394

**El-Daher N, Nawas T, Al-Qaderi S.** 1990. The effect of the pH of various dairy products on the survival and growth of *Brucella melitensis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*.84: 523–528.

**Falensky A, Mayer-Scholl A, Filter M, Göllner, Appel B, Karsten N.** 2011. Survival of *Brucella spp.* in mineral water, milk and yogurt. *International Journal of Food Microbiology*. 145. 326-330.

**Foster G. Osterman J. Jaques I. Cloeckaert A.** 2007. *Brucella ceti* sp. Nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. Nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred host. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 11. 2688-2693.

**Franco M, Mulder M, Gilman R, Smits H.** 2007. Human brucellosis. *Lancet Infectious Diseases*. 7: 775–786.

**Fuster-Valls N.** 2008. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Control*. 19. 308-314

**Food and Agriculture Organization of the United Nations.FAO.** 2006. Available at <http://www.fao.org>. (On line).

**Food and Drug Administration. FDA.Food Code.**2006. Available at [www.cfsan.fda.gov/dms/fc05-toc.html](http://www.cfsan.fda.gov/dms/fc05-toc.html), accessed September 15, 2006. (On line).

**García-Roldán H, Solis RM.** 2007.Mice lacking components of adaptive immunity show increased *Brucella abortus* virB mutant colonization. *Infection and Immunity*. 75; (6): 2965-2973.

**Gilman L, Dahlberg C, MarquardtC.**1946. The occurrence and survival of *Brucella abortus* in limburger Cheese. *Journal of Dairy Science*. 2.71-85.

**Godfroid M, Svensson V, Cambier P, Uzureau S, Mirabella A, De Boile X,Cutsem P, Widmalm G, Ltteson J.** 2011. *Brucella melitensis* 16M produces a mannan and other extracellular matrix components typical of a biofilm. *Immunology and Medical Microbiology*. 59. 364-367.

**Gonzalez T., Rojas R.H.A.** 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos.PCR: prevención y diagnóstico. *Rev. Salud Pública de Méx.*, 47 (5): 388-390.

**Gorvel JP, Moreno E.** 2002. Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology*. 90. 281-297.

**Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee H, Legare D, Sundar S, Ouellette M, Rosen B, Mukhopadhyay R.** 2004Drug uptake and modulation of drug resistance in Leishmania by anaquaglyceroporin. *J. Biol. Chem*. 279, 31010–31017

**Guzmán-Verri D, Manterola L, Sola-Landa A, Parra A, Cloeckart A,Garin J.** 2002.The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression or outer membrane proteins with counterparts in members of the Rhizobiaceae.*Infetcion and Immunology*. 99:123750-112380.

**Hall L, Stoodley J, Costerton E, Stoodley M.**2004. Bacterial biofilm: from the natural enviroment to infectious disease, *Nature Reviews Microbiology*. 95–108.

**Hernández-Castro, Rodríguez C, Soane A, García-Lobo JM.** 2003. The acuaporin gene *aqpX* of *Brucella abortus* is induced in hyperosmotic conditions. *Microbiology*.149. 3185-3192.

**ICMSF.** International Commission on Microbiological Specifications for Foods 1998. *Microorganisms in Foods*. Characteristics of Microbial Pathogens (Food Safety). London, Great Britain: Blackie Academic & Professional,

**Ikeda S, Nasrallah JB, Dixit R, Preiss S, Nasrallah M.** 1997. An aquaporin-like gene required for theBrassika self incompatibility response. *Science*.276. 1564-1566.

**Ishibashi K, Kondo S, Hara S, Morishita.** 2011. The evolutionary aspects of aquaporin family. *American Journal of Physiology. Regul Integr Comp Physiol.* 300:R576. Doi:10.1152/ajpregu.90464.2008.

**Jiang J,** 2009. Expression and functional characterization of NPA motif null Aquaporin-1 mutations. *Life.* 61 (6): 651-657.

**Jiao JB, Yang JW, Yang XS** (2009) The dairy cattle brucellosis and prevention and control (Nainiu bulujunbing jiqi fangkong). *Animal Husbandry and Feed Science* 30(3): 170-17.

**Jong M, Starr T, Winter G, Hartigh B, Child R, Knodler L, Diji M, Celli J Tsolis M.** 2013 Sensing of bacterial Type IV secretion via the unfolded protein response. doi: [10.1128/mBio.00418-12](https://doi.org/10.1128/mBio.00418-12).

**Kapper J, Sperandio V.** 2005. Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. Minireview. *Infection and Immunity.* 73; (6): 3197-3209.

**King S.** 2004 From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 5, 687-698.

**Köhler S, Porte F, Jubier-Maurin V, Ouahrani-Bettache S, Teyssier J, Liautard JP.** 2002. The intramacrophagic environment of *Brucella suis* and bacterial response. *Veterinary Microbiology.* 90.299-309.

**Kuplulu O, Sarimehmetoglu B.** 2003. Isolation and identification of *Brucella spp* in ice cream. *Food Control.* 15. 511-514.

**Lapaque N, Moriyón I, Moreno E, Gorvel J.** 2005. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Current Opinion Microbiology.* 8:60-66.

**Laizé V.** 2000. Aquaporin water channels in *Saccharomyces cerevisiae*. Function and expression studies. In *Molecular Biology and Physiology of water and solute Transport.* pp. 415-421. *Kluwer Academic/Plenum Publishers.*

**Lamontagne J, Butler H.** 2007. Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. *Journal Proteome Research.* 6. 1519-1529.

**Lee L, Kim G, Kim S.** 2013. Interplay between clathrin and Rab5 controls the early phagocytic trafficking and intracellular survival of *Brucella abortus* within HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry.* 288(39):20049-28057

**López Goñi.** 2002. *Haemophilus, Bordetella and Brucella.* En Brooks GF, Butel S., Morse SA. (editors). *Microbiología médica de Jawetz, y Adelberg Capítulo 19.* El manual moderno.

**Lucero NE, Ayala S M, Escobar G I, Jacob N R.**2008. Brucella isolated in *Infection*. 136, 496–503.

**Magni F, Sarto C, Ticozzi D, Soldi M, Bosso N.** 2006. Proteomic knowledge of human aquaporins. *Proteomics*. 6:5637-5649.

**Maurel C.**2002. Molecular physiology of aquaporins in plants. *International Review of Cytology*.215, 105-148.

**Manterola L, Guzmán-Verri C, Chaves-Olarte E, Barquero-Calvo E, De Miguel M J, Moriyón I, Grilló MJ, López-Goñi I, Moreno E.**2007. The BvrR-BvrS outer membrane proteins Omp3a are not essential for *Brucella abortus* virulence. *Infection and Immunity*.175. 10. 4867-4874.

**Martín MAI, Vizcaíno N, Fernández LL.**2010. Cholesterol, ganglioside GM1 and class A scavenger receptor contribute to infection by *Brucella ovis* and *Brucella canis* in murine macrophages. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 12(3):246-51.

**Maarten F, Renee M.** 2012. Brucellosis and type IV secretion. *Future Microbiology*. 7, 47-58 (doi: 10.2217/fmb.11.136).

**Martirosyan A, Moreno E, Gorvel JP.** An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunol Rev* 2011; 240:211 - 34; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00982.x>; PMID: 21349096.

**Martirosyan A, Gorvel JP.**2013. *Brucella* evasion of adaptive immunity. *Future Microbiology*. 8.2; p147.

**Memish B, Balkhy H.** 2004. Brucellosis and International Travel. *Journal Travel Medicine*.11:49-55.

**Méndez-González K, Hernández-Castro R, Carrillo-Casas K, Monroy, JF, López-Merino A, Suárez-Güemes F.** 2011. *Brucella melitensis* Survival During Manufacture of Ripened Goat Cheese at Two Temperatures. *Food Borne Pathogens and disease*. 8. 12. 1257-1261.

**Meyrial V.**2001. Existence of a tightly regulated water channel in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*. 268. 334-343.

**Mitra B N.**2000. Loss of a member of the aquaporin gene family, *aqpA*, affects spore dormancy in *Dictyostelium*. *Gene*. 251. 131-139.

**Moreno, Berman, D, Boettcher, L.** 1981. Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infection and Immunity*. 31:100-110.

**Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Walters J, Busch M, Mayer H.** 1990. *Brucella abortus* 16s rRNA and lipid A reveal phylogenetic relationship with

members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *Bacteriology*. 172. 3569-3576.

**Moreno E, Cloeckaert A, Moriyón I.** 2002. *Brucella* evolution and taxonomy. *Veterinary Microbiology*. 90. 209–227.

**Moreno, E., Moriyón, I.** 2006. “The genus *Brucella*,” in *The Prokaryotes*, Vol.5, Part 1, Section 31, eds M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt (New York: Springer-Verlag), 315–456

**Mugaby R.** 2012. *Brucellosis Epidemiology, Virulence Factors, Control and Molecular Targets to Prevent Bacterial Infectious Diseases. Veterinary and Microbiological Science*. North Dakota State University. 44pp.

**Montville J, Mathews R.** 2011. *Food Microbiology*. Third Edition. American Society for Microbiology Press. Washington, DC.

**Navia D P, Villada HS, Mosquera SA.** 2010. Biofilms in the Food Industry. *Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de Colombia*. Vol. 8. No.2.

**Pavlovick-Djuranovic S, Schultz J, Beitz E.** 2003. A single aquaporin gene encodes a water/glycerol/urea facilitator in *Toxoplasma gondii* with similarity to plant tonoplast intrinsic proteins. *FEBS Lett*. 555. 500–504.

**Patey G, Qi Z, Bourg G, Baron C, O’Callaghan D.** 2006. Swapping of periplasmic domains between *Brucella suis virB8* and *Psb102 virB8* homologue allows heterologous complementation. *Infection and Immunity*. 74. 4945-4949.

**Paulley JT, Anderson E, Roop M.** 2007. *Brucella abortus* requires the heme transporter BhuA for maintenance for chronic infection in BALB/c mice. *Infection and Immunity*. 75. 5248-5254

**Pei J, Ficht TA.** 2004. *Brucella abortus* rough mutants are cytopathic for macrophages in culture. *Infection and Immunity*. 72. 440-450.

**Pei J, Turse J, Wu Q, Ficht T.** 2006. *Brucella abortus* rough mutants induce macrophage oncosis that requires bacterial protein synthesis and direct interaction with the macrophage, *Infection and Immunity*. 74, 2667-2675.

**Pei JWu, Kahl-Mc Donagh M, Ficht T.** 2008. Cytotoxicity in macrophages infected with rough *Brucella* mutants is type IV secretion system dependent. *Infection and Immunity*. 76. 130-137.

**Pizarro-Cerdá JE, Moreno E, Gorvel JP.** 2000. Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in non-phagocytic cells. *Microbes Infection*. 2:829-835.

**Porte F, Liautard JP, Kohler S.** 1999. Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infection and Immunity*. 67. 4041-4047.

**Plommet M, Fensterbank, Vassal L, Auclair J, G. Mocquot.** 1988. Survival of *Brucella abortus* in ripened soft cheesemade from naturally infected cow's milk. *Le Lait*. 68. 115-120.

**Privat K, Thonart P.** 2011. Action des cultures protectrices: cas des germes lactiques sur la flore alimentaire indésirable. *Biotechnology Agronomy Society Environment*. 15. 339-348.

**Rambow Larsen, Rajashekara G. Petersen E, Splitte G.** 2008. Putative Quorum Sensing Regulator BlxR of *Brucella melitensis*. Regulated Virulence Factors Including the Type IV Secretion System and Flagella. *Journal of Bacteriology*. 190. 3274-3282.

**Rajashekara G. Glover DA. Banai M. O'Callaghan D, Splitter G.** 2006. Attenuated bioluminescent *Brucella melitensis* mutants GR019 (virB4), GR024 (gale), and GR026 (BME11090-BME11091) confer protection in mice. *Infection and Immunity*. 74 (5): 2925-2936.

**Rodríguez MC, Froger A, Rolland JP, Thomas D, Aguero J, Dela Marche C, García-Lobo JM.** 2000. A functional water channel protein in the pathogenic bacterium *Brucella abortus*. *Microbiology*. 146.3251-3257.

**Roset M.** 2006. Factores de virulencia en *Brucella abortus*: Los glucanos 1-2 cíclicos y su participación en la virulencia y en la adaptación hipo-osmótica. 2006. *Tesis Doctoral. Universidad Nacional De General San Martín. Argentina*. 118pp.

**Sebenzile M, Child R, Ng T, Kupko J, Wehrly D, Porcella F, Knodler L, Celli J.** 2013. *Brucella Modulation of Secretory Trafficking*. PLOS Pathogens | www.plospatho . Vol 9 Issue 8

**Santos-LaCerdá L, Salcedo P, and Gorvel JP.** 2013. *Brucella* T4SS: The VIP pass inside host cells. *Current Opinion in Microbiology*. 16.45-51.

**Sola-Landa A, Pizarro-Cerdá J, Grilló M, Moreno E, Blasco JM, Gorvel JP, Lopez-Goñi I.** 1998. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbiosis is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Molecular Microbiology*. 29, 125-138.

**Shadbolt C, Ross T, Mc Meekin A.** 2001. Differentiation of the effects of lethal pH and water activity. *Letters in Applied Microbiology*. 32. 99-102.

**Scholz W.** 1997. *Elaboración de quesos de oveja y cabra*. Zaragoza. España: Acribia. 154pp.



**Scholz H, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahkouk S, Kämpfer P, Cloeckert A, Maquart M, Zygmunt S, Whatmore M, Pfeffer M, Huber B, Busse H, Kumar B.** 2010. *Brucella innopinata* sp.nov, isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60, 801-808.

**SCAH Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare.** 2006. *Brucellosis in sheep and goats*. European Commission. SANCO.C.2/AH/R23. 89pp.

**Sierra R, Arocena GM, Bukata L, Comerci J, Ugalde RA.** 2010. Metabolic control of virulence genes in *Brucella abortus*: HutC coordinates virB expression and the histidine utilization pathway by direct binding to both promoters. *Journal of Bacteriology*. 192: 217–224.

**Snider B, Liang P, Pearson N.** 2007. Implementation of water activity testing to replace Fischer water testing. *Pharmaceutical Technology*. For solid oral-dosage forms. 56-66.

**Solomon H.** 2014. Identification and survival studies of *Mycobacterium tuberculosis* within Laboratory- Fermented bovine milk. *BMC. Research Notes*. 7:175. 2-5.

**SSA.** Secretaría de Salud. SubSecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. Dirección general de Epidemiología. 2012. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Brucelosis. [www.salud.gob.mx](http://www.salud.gob.mx).

**Soupe E.** 2002. Aquaporin Z of *Escherichia coli*: reassessment of its regulation and physiological role. *Journal of Bacteriology*. 184, 4304-4307.

**Suárez Güemes F.** 2000Capítulo de introducción. En diagnóstico de brucelosis animal. Díaz E. Hernández L. Valero G. Arellano B. *et al.* (editores). Instituto Nacional de investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), México. *Secretaría de Salud. Rendición de cuentas en salud*.

**Tanghe A, Van Dijck, Patrick, Thevelein, M.** 2006. Why do microorganisms have aquaporins? *Trends in Microbiology*. 14. 63-69

**Uzureau S. Godfroid M. Deschamps C. Lemaire. De Bolle X. Letesson J.** 2007. Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead drastic surface modifications in *Brucella melitensis*. *Journal of Bacteriology*. 189; 16: 6035-6047.

**Uzureau S, Lemaire J, Delaive E.** 2010. Global analysis of quorum sensing targets in the intracellular pathogen *Brucella melitensis* 16 M. *Journal Proteome Research*. 9: 3200-17.

**Verckman S.** 2013. *Curr Biol*. 21; 23(2): R52–R55. doi:10.1016/j.cub.2012.11.025

**Von Bargen K, Gorvel JP, Salcedo SP.**2012 Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiology Reviews* , 36(3): 533-62

**Weeks JN, Galindo CL, Drake KL, Adams GL, Garner HR, Ficht TA.**2010.*Brucella melitensis* VjbR and C12-HSL regulons: contributions of the N-dodecanoyl homoserine lactone signaling molecule and LuxR homologue VjbR to gene expression. *BMC Microbiology*. 10: 167

**World Health Organization (WHO).** 2006. Brucellosis in humans and animals. Corbel MJ. WHO Press, Geneva, Switzerland.

**Wood MJ.** 2006. Osmosensing by Bacteria. *Sci.Signaling STKE*. (357). DOI:10.1126/stke.3572006pe43

**XavierN, PaixaoA, Hartigh D, Tsolis M, Santos L.** 2010. Pathogenesis of Brucellosis. The open *Veterinary Science Journal*. 4:109-118

**Zinsstag J, Schelling E, Solera X, Blasco J, Moriyon I.** Brucellosis. Oxford Textbook of Zoonoses.2011. pp. 54–64.

**Zúñiga-Estrada A, Mota de la Garza L, Sánchez-Mendoza M, Filardo S, López MerinoA.** 2005. Survival of *Brucella abortus* in milk fermented with a yogurt starter culture. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47:88–91.