



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

Comportamiento de la cepa mutante *invA* de *Brucella melitensis* Rev 1
como inmunógeno en el modelo caprino

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

MVZ. Alberto López Herrera

TUTOR PRINCIPAL DE LA TESIS:

Dr. Francisco Suárez Güemes

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dra. Beatriz Arellano Reynoso

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM

Dr. Efrén Díaz Aparicio

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

MÉXICO, D.F. MAYO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

A los proyectos PAPIIT 2011. No. IT222511, Comportamiento *in vitro* e *in vivo* de dos cepas mutantes de *Brucella melitensis*, como inmunógenos en el modelo caprino. Y al Proyecto No. 48599, SAGARPA-CONACyT, Estudio Epidemiológico de Enfermedades que afectan la producción caprina en México.

Al Dr. Francisco Suárez Güemes por la darme la confianza y la oportunidad de participar en este proyecto, por su apertura, apoyo e interés durante mi formación como profesional y en esta etapa de posgrado.

A la Dra. Beatriz Arellano y al Dr. Efrén Díaz por enriquecer este trabajo con su experiencia y por compartir sus conocimientos que me ayudaron de forma personal y académicamente.

A la Dra. Mireya de la Garza y los Dres. Juan Antonio Montaraz, Alfredo Sahagún y Víctor Tenorio por su disposición y comentarios objetivos al revisar esta tesis.

A los Dres., colegas, amigos y compañeros del CENID-Microbiología Animal: Enrique Herrera, Gabriela Palomares, Francisco Aguilar, Atalo Martínez, Luis Gómez, Alfonso, Tomás, Isabel, José Luis, Monse, Magda, Ana, Agus, Cristina... Especialmente un agradecimiento para el Sr. Guadalupe de la Rosa y Christian de la Rosa.

A mis amigos de toda la vida: Salvador, Erick, Juan Luis, Víctor, Daniel, Jan, Claudia, Ileana, Guillermo, Lorena, Alejandro, Teresa, Raúl... por aguantar que siempre los bateaba para las fiestas por realizar esta maestría.

A mis amigos de la Facultad Ulises, Paola, Alhelí, Rosalía, y Rocío por acompañarme durante toda la carrera y hasta ahora.

Finalmente y más importante a mi familia. A mi mamá Rocío y mi papá Alberto por apoyarme incondicionalmente, a mis hermanas Arasai y Ariana por su cariño interminable, a Blanca por todo su amor, a mis hermosos sobrinos Carolina y Gonzalo por tanta alegría y a mi Pinko precioso al que recuerdo siempre.

ÍNDICE

	<i>Página</i>
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Definición y Aspectos Generales de la Brucelosis Humana	3
Brucelosis Humana en México	4
Brucelosis Caprina	4
Transmisión	4
Signos Clínicos	5
Diagnóstico	6
• <i>Diagnóstico directo: bacteriológico y molecular</i>	6
• <i>Diagnóstico indirecto: pruebas serológicas</i>	7
Tratamiento	7
Brucelosis Caprina en México	8
Prevención y Control de la Brucelosis	8
Programas de Erradicación de la Brucelosis Animal	9
Programas de Control de la Brucelosis Animal	9
Prevención de la Brucelosis en el Rebaño	9
Prevención de la Brucelosis en la Salud Pública	10
Prevención contra la Brucelosis Ocupacional	10
Taxonomía del Género <i>Brucella</i>	10
Especies de <i>Brucella</i>	11
Patogenia e Inmunidad contra <i>Brucella</i> spp.	12
Patogenia de <i>Brucella</i> spp.	12
Factores de Virulencia	13
• <i>Lipopolisacárido</i>	13
• <i>Adaptación Inicial al Ambiente Intracelular</i>	14
• <i>Reguladores de Quorum Sensing</i>	14
• <i>Sistema de Dos Componentes BvrS/BvrR</i>	15
• <i>Sistema de Secreción Tipo IV, VirB, de Brucella</i> spp.	15
• <i>β-1,2-Glucano Cíclico</i>	16
• <i>Enzimas y Proteínas</i>	16
Inmunidad contra <i>Brucella</i> spp	17
• <i>Receptores Involucrados en la Respuesta Inmune</i>	18
• <i>Citocinas en la Respuesta Inmune</i>	19
• <i>Respuesta Inmune contra Brucella</i> spp.	20
Problemática de la Vacunación con Rev1 Contra la Brucelosis	21
Virulencia Residual	21
Diferente Eficiencia de Rev1	22
Interferencia en el Diagnóstico Serológico	22
Dosis y Vías de Administración Alternativas a la Dosis Estándar	23

ÍNDICE

	<i>Página</i>
Cepa Vacunal Rev1 y Mutación en el Gen <i>invA</i> de <i>Brucella melitensis</i>	24
Origen y características de Rev1	24
Mutación en el Gen <i>invA</i> de <i>Brucella melitensis</i>	25
JUSTIFICACIÓN	27
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	27
Objetivo General	27
Objetivos Específicos	27
MATERIAL Y MÉTODOS	28
Animales	28
Sincronización de Estro y Diagnóstico de Gestación	28
Vacunación	29
Pruebas Serológicas	29
Toma de Muestras	29
Prueba de Tarjeta al 3% e Inmunodifusión Radial	30
Desafío Experimental con Cepa Virulenta de <i>Brucella melitensis</i> 16M	30
Aislamiento e Identificación Bacteriológica	30
Eutanasia de los Animales	30
Toma de Muestras y Cultivo en Medio Sólido	31
Identificación de las Cepas Aisladas	31
Extracción de RNA y síntesis de cDNA a partir de Células Mononucleares de Sangre Periférica	31
Toma de Muestras	31
Obtención de Células Mononucleares de Sangre Periférica	32
Extracción de RNA	32
Síntesis de cDNA	33
Diseño de Iniciadores y Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la Medición de la Expresión de Citocinas	33
Diseño de Iniciadores	33
Determinación de la Temperatura de Alineamiento en la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Punto Final	36
Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real	36
RESULTADOS	38
Pruebas Serológicas	38
Ocurrencia de Aborto o Parto	39
Aislamiento Bacteriológico e Identificación de la Cepa Aislada	41

ÍNDICE

	<i>Página</i>
Determinación de la Temperatura de Alineamiento en la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Punto Final	43
Medición de la Expresión de Citocinas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real	45
DISCUSIÓN	48
Respuesta Serológica	48
Protección Contra la Cepa Virulenta	50
Estandarización de PCR Tiempo Real	52
Utilización de la Mutante <i>invA</i> de <i>Brucella melitensis</i> Rev1 como Inmunógeno en el Modelo Caprino	53
CONCLUSIONES	55
REFERENCIAS	56

RESUMEN

ALBERTO LÓPEZ HERRERA. Comportamiento de la cepa mutante *invA* de *Brucella melitensis* Rev1 como inmunógeno en el modelo caprino. Bajo la dirección de: Dr. Francisco Suárez Güemes, Dra. Beatriz Arellano Reynoso y Dr. Efrén Díaz Aparicio.

Se evaluó en el modelo caprino la cepa mutante en el gen *invA* de *Brucella melitensis* Rev1 con el fin de medir la protección contra el desafío experimental, la duración de la respuesta inmune humoral y por lo tanto la interferencia con las pruebas serológicas de Tarjeta al 3% e Inmunodifusión Radial. Se diseñaron iniciadores para la estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real, para medir la expresión de secuencias de citocinas de perfil Th1 y Th2. Se utilizaron 3 grupos de 8 hembras caprinas (*Capra hircus*) cada uno, con edades de entre 1 y 3 años, sin antecedentes clínicos o serológicos de brucelosis. El primer grupo fue vacunado con la cepa mutante Rev1/*invA*, el segundo con Rev1 y el tercero fue el grupo control sin vacunar, para los grupos vacunados se utilizó la dosis reducida de 1×10^6 UFC/mL. Posteriormente se sincronizó el estro de las cabras y se gestaron por monta dirigida. Aproximadamente al día 110 de gestación se realizó el desafío experimental con la cepa virulenta 16M. Se realizó la necropsia y la colección de órganos para el aislamiento bacteriológico después de la ocurrencia de aborto o parto. Se colectaron muestras serológicas pos-vacunación y pos-desafío para la realización del diagnóstico serológico y muestras de sangre completa para la extracción de células mononucleares de sangre periférica para la extracción de RNA y realizar la medición de la expresión de citocinas. En los grupos vacunados hubo aislamiento de la cepa virulenta en 1 hembra de cada grupo y no hubo presencia de aborto, mientras que en el grupo control hubo aislamiento en 5 y aborto en 2 hembras. Ambas cepas vacunales se comportaron de manera similar; sin embargo por diferencia en la dosis de Rev1 (1×10^3 UFC/mL) y contaminación por la misma hacia los otros grupos, no se pudo concluir una diferencia con la cepa mutante Rev1/*invA*.

Palabras clave: brucelosis, vacunación, *B. melitensis* Rev1, PCR tiempo real

ABSTRACT

A mutant strain on the *invA* gene of *Brucella melitensis* Rev1 was evaluated in the caprine model to measure the protection conferred against experimental challenge, the duration of the humoral response and therefore the interference with the serological tests of 3% Card Test and Radial Immunodiffusion. Additionally, cytokine primers were designed for the standardization of real time Polymerase Chain Reaction to measure the expression of a Th1 and Th2 immune response. Groups of 8 does (*Capra hircus*) between 1 and 3 years old and without clinical or serological signs of brucellosis were separated into 3 groups. The first group was vaccinated with the mutant strain Rev1/*invA*, the second group with Rev1 and the third group was not vaccinated, for the vaccinated groups we administered the reduced dose. After vaccination the estrus were synchronized and then mated with a buck. The experimental challenge was carried out at approximately 110 days of gestation with the virulent strain 16M. Necropsy and organ collection were performed soon after the occurrence of abortion or parturition. Serologic samples were collected post-vaccination and post-challenge for serologic diagnosis and full blood samples for RNA extraction of peripheral blood mononuclear cells for measuring of the cytokine expression. In each vaccinated group, the isolation of the virulent strain was found in one doe and there was not occurrence of abortion, while in the control group there were isolation in 5 does and 2 abortions occurred. Both vaccinal strains behave similarly; however, due to a difference in dosage of Rev1 (1×10^3 UFC/mL) and contamination with the same strain to the other groups we could not conclude a difference with the mutant Rev1/*invA*.

Key words: brucellosis, vaccination, *B. melitensis* Rev1, real time PCR

INTRODUCCIÓN

Definición y Aspectos Generales de la Brucelosis Humana

La brucelosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial, conocida también por nombres como “*fiebre ondulante*”, “*fiebre del Mediterráneo*” o “*fiebre de Malta*”, entre otros. A pesar de que ha habido un enorme progreso en el control de la enfermedad en muchos países, aún existen regiones en donde la infección persiste en animales domésticos y en consecuencia tiene efecto en la salud pública y en la economía. La expansión de la industria ganadera y la urbanización, junto con la falta de medidas higiénicas en las unidades de producción animal y en la inocuidad de los alimentos, son parte importante del porqué la brucelosis continúa siendo un problema ^{1,2}. La brucelosis es causada por especies del género *Brucella*, la enfermedad que provoca es de importancia en países en vías de desarrollo, ya que en su mayoría, las zonas endémicas de la enfermedad son en donde los servicios de salud son insuficientes ^{1,3}. La brucelosis en humanos continúa siendo una de las zoonosis con mayor presencia a nivel mundial, con más de 500,000 casos anuales. La epidemiología de la brucelosis humana ha cambiado drásticamente en la última década, en muchas de las áreas que eran tradicionalmente consideradas como endémicas han logrado su control, mientras que en otras regiones han emergido nuevos focos de brucelosis humana ⁴. En la mayoría de los países la brucelosis es una enfermedad de notificación ante las autoridades sanitarias, pero la realidad es que existe poca notificación de la enfermedad y los números oficiales son una fracción de la incidencia real ⁵.

La brucelosis está catalogada en la lista de enfermedades de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), antigua lista B, y en la de otros organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización del Tratado del Atlántico Norte (OTAN). Su significancia como un agente potencial de bioterrorismo es conocida, siendo los aspectos importantes relacionados con este potencial: la relativa accesibilidad para obtener la bacteria de un área endémica, su fácil manipulación y la diseminación de bacterias por aerosoles ^{6,7}.

Brucelosis Humana en México

La brucelosis humana en México está sujeta a vigilancia epidemiológica con notificación semanal, encontrando que en los últimos años se han reportado en promedio más de 2,000 casos al año ⁸. La brucelosis en la población mexicana puede ser más alta que los casos notificados, debido a que la vigilancia epidemiológica es pasiva y en muchos casos no es diagnosticada ⁹. En décadas recientes se ha implementado la Campaña Nacional para la Erradicación de la Brucelosis Animal, aunque a pesar de esto continúa habiendo numerosos casos de brucelosis ^{10, 11, 12}. México continúa siendo uno de los reservorios de brucelosis humana, hasta el año 2000 hubo una disminución de los casos de brucelosis reportados, pero posteriormente la cifra ha ido en aumento, una de las razones podría ser una mejora en los sistemas de notificación ⁴. Para el año 2014 la incidencia de la enfermedad reportada por la Secretaría de Salud informa un total de 2,562 casos ¹³. En el año 2013 los estados con mayor número de casos de: Guanajuato 14.88% (417/2,802), Michoacán 14.31% (401/2,802), Sinaloa 12.42% (348/2,802), Puebla 6.96% (195/2,802), Jalisco 5.92% (166/2,802), Sonora 4.96% (139/2,802) y Tamaulipas 3.85% ¹⁴.

Brucelosis Caprina

La virulencia de las especies de *Brucella* que afectan a los pequeños rumiantes varía de acuerdo a la cepa y la carga bacteriana. La susceptibilidad del hospedero depende y se asocia con el estado fisiológico del animal. La infección de *B. melitensis* en cabras en condiciones de campo se puede observar desde la presentación aguda típica hasta la resistencia a la infección ¹⁵. Las pérdidas económicas ocurren por la pérdida de crías y por la disminución de la producción de leche ¹⁶.

Transmisión

La introducción de la brucelosis en un hato libre es por la introducción de animales infectados o por pastoreo en pastizales compartidos en áreas en donde la enfermedad está presente ^{17, 18}. Las secreciones eliminadas del tracto genital de las hembras y la placenta son la principal fuente de diseminación de *Brucella* spp., eliminándose una gran cantidad de bacterias durante el aborto o parto, pudiendo perdurar de 2 a 3 meses ^{15, 17, 18}. En

instalaciones donde los animales se encuentran hacinados el patógeno se puede diseminar rápidamente seguido de abortos, representando una amenaza sanitaria seria para el hato y los trabajadores ¹⁹. Bajo ciertas condiciones, *Brucella* spp. pueden mantener su infectividad al mantenerse en materia orgánica como fetos, membranas fetales, heces, agua, lana, pastura o suelo ¹⁵.

La infección ocurre generalmente por ingestión o por contacto directo a través de la mucosa nasal o la conjuntival y ocasionalmente por la mucosa genital. En las crías la mayoría de las infecciones son adquiridas al momento del consumo de calostro o leche, también se infectan *in útero* o al pasar por el canal de parto. Los cabritos que nacen de madres infectadas son portadores, si los linfonodos (LN) del tracto gastrointestinal se infectan pueden diseminar las bacterias en las heces ^{15, 17, 18}. La infección persistente en glándula mamaria y LN supramamarios, lo que lleva a una constante o intermitente eliminación de *Brucella* spp. en la leche. El número de bacterias eliminadas en la leche es relativamente bajo, pero es suficiente para causar infección a las crías y a los ordeñadores ¹⁵.

Los perros, gatos y carnívoros silvestres pueden ser infectados y diseminan la enfermedad mecánicamente, llevando de un lugar a otro los fetos o placentas contaminadas. Los bovinos, rumiantes silvestres y cerdos también pueden ser infectados por *B. melitensis* si se encuentran en rebaños mixtos ¹⁵.

Signos Clínicos

En la infección experimental existe una variedad de signos clínicos descritos, mientras que en la ocurrencia natural de la enfermedad el aborto es generalmente el único signo. El aborto en hembras infectadas puede ocurrir en los 2 últimos meses de gestación, pudiendo parir crías débiles. El aborto ocurre particularmente en la primera gestación, las gestaciones subsecuentes pueden llegar a término, pero ocurre la reinvasión del útero y la placenta y las bacterias se diseminan al momento del parto ^{15, 16, 17, 18, 19}.

La infección se establece en los LN, órganos del sistema retículo-endotelial y en glándula mamaria ¹⁵. La enfermedad se puede manifestar de forma sistémica con signos de fiebre, letargia, pérdida de peso, diarrea, metritis, placentitis, mastitis aguda con producción de

leche acuosa con coágulos y disminución en la producción. A pesar de esto, los signos de mastitis en cabras infectadas naturalmente no son siempre identificables. En machos puede haber otros signos como orquitis, epididimitis y artritis cuando la infección está localizada. Sin embargo, muchos animales desarrollan infecciones autolimitantes que son asintomáticas ^{15, 17, 18}.

Diagnóstico

Como se mencionó en la transmisión de la enfermedad, las mismas vías de eliminación de la bacteria son adecuadas para la colección de muestras biológicas para el diagnóstico de la brucelosis. Las muestras de leche, hisopos vaginales, sangre, placenta, órganos de animal adulto o feto abortado, deben ser colectadas con instrumental estéril y protección como guantes, cubre boca, lentes y bata u overol. Las muestras deben ser mantenidas en refrigeración (o congelación) y ser transportadas lo más rápido posible al laboratorio, deben estar identificadas y contener la historia clínica con el diagnóstico presuntivo de brucelosis ^{20, 21}.

Diagnóstico directo: bacteriológico y molecular

El diagnóstico bacteriológico de *Brucella* spp. se puede lograr mediante el aislamiento a partir sangre, hisopados vaginales y muestras de leche del animal vivo, mientras que el bazo y los LN son los mejores sitios para obtener el aislamiento después de la necropsia. La sensibilidad en el aislamiento depende de la viabilidad de *Brucella* spp. en la muestra y el número de especímenes probados para el mismo animal. El tiempo requerido para el cultivo puede ser largo y en las muestras que contengan otras bacterias contaminantes y bajos números de *Brucella* spp. pueden no ser detectadas ^{17, 18, 20, 22}.

Los ensayos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) han demostrado ser métodos valiosos para detectar Ácido Desoxirribonucleico (DNA) de diferentes microorganismos y proveen una opción para el diagnóstico de la brucelosis. Muchos autores han reportado buena sensibilidad con base en diferentes marcadores moleculares para detectar DNA de *Brucella* spp. en cultivos puros. Sin embargo, pocos estudios se han realizado con muestras clínicas o de campo y pocos métodos de PCR han sido evaluados como herramienta

diagnóstica. Hasta el momento ninguna técnica parece ser lo suficientemente sensible para reemplazar a la bacteriología a partir de las diferentes muestras biológicas ²².

Diagnóstico indirecto: pruebas serológicas

La Prueba de Tarjeta es la prueba nacional e internacionalmente reconocida como prueba tamiz de brucelosis en pequeños rumiantes ^{15, 22, 23}. La Prueba de Tarjeta es suficiente para la vigilancia de los hatos libres a nivel rebaño ¹⁵. La Fijación de Complemento (FC) es la prueba más utilizada como prueba confirmatoria, a pesar de la complejidad y heterogeneidad de las técnicas en los diferentes países, se considera que la prueba es efectiva en los pequeños rumiantes y se debe considerar utilizar en conjunto con la Prueba de Tarjeta en hatos infectados, para obtener un diagnóstico individual precisa en programas de erradicación ^{15, 22, 23}.

Se han obtenido buenos resultados en pequeños rumiantes con la ELISA indirecta o en un menor grado con la ELISA competitiva utilizando diferentes antígenos, siendo las que contienen un elevado contenido de LPS liso las más confiables. Estas pruebas tienen una mayor sensibilidad que la Prueba de Tarjeta y la de FC, pero al igual que estas pruebas, son incapaces de diferenciar los animales vacunados recientemente con la cepa de *B. melitensis* Rev1 (Rev1) ²². La Inmunodifusión Radial (IDR) con hapteno nativo de *Brucella* spp. ha sido evaluada en caprinos encontrándose con una elevada sensibilidad y especificidad, tiene la capacidad de diferenciar animales infectados de vacunados, pero aún no es considerada como prueba confirmatoria ²⁴.

Tratamiento

Debido a razones económicas, epidemiológicas y de salud pública, a excepción de los perros, no se da tratamiento con quimio-terapéuticos a los animales infectados ²⁵. En México, los rumiantes infectados deben ser identificados por medio del marcaje con fierro en el masetero derecho con la letra "B" de un tamaño de 5 x 3cm para ovinos y caprinos. Se podrá utilizar otro tipo de identificación, siempre y cuando lo autorice la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) ²⁶.

Brucelosis Caprina en México

La brucelosis es una de las enfermedades más importantes en México, la significancia de la enfermedad tiene implicaciones en la salud pública y en la economía al ser factor limitante para el comercio local y global de los animales y de sus subproductos ^{11, 27}. La situación actual en la mayoría de los Estados se encuentra en control, mientras que en algunos Estados como Baja California Sur, Colima, Quintana Roo, Campeche, Yucatán, algunas regiones de Guerrero y Chiapas se encuentran en erradicación. Recientemente, algunos municipios que conforman la Región Huasteca del Estado de Hidalgo, han cambiado de fase de control a la fase de erradicación. Sólo en Sonora existe una amplia región libre de la enfermedad ^{28, 29}.

La vacunación oficial para el ganado debe ser realizada y/o supervisada por médicos veterinarios oficiales o aprobados. Las vacunas utilizadas deben ser constatadas y autorizadas por la SAGARPA, las cuales tienen que ser, para pequeños rumiantes, elaboradas con la cepa Rev1 (vacunas vivas atenuadas, liofilizadas) y deben ser aplicadas por vía subcutánea. La dosis clásica debe contener de $1-2 \times 10^9$ UFC/mL y se aplica en hembras de 3 a 4 meses de edad. La vacuna en dosis reducida debe tener un título de 1×10^5 UFC/mL y puede aplicarse a todas las hembras mayores de 4 meses que estén sanas, aun cuando estén gestantes. No debe aplicarse en ningún caso la vacuna a caprinos ni ovinos machos. Todos los animales vacunados contra la brucelosis deben identificarse con arete autorizado ²⁶. La problemática de la vacunación contra *Brucella* spp. se abordará más adelante.

Prevención y Control de la Brucelosis

La prevención y el control de la brucelosis son más complejos que la vacunación, el diagnóstico y la eliminación de los animales infectados. Cada región tiene características propias, que tienen que ser consideradas antes de la implementación de un programa para el control y erradicación de la enfermedad ³⁰. Cuando se controla la enfermedad en los animales, hay una disminución significativa de casos en la población humana ^{5, 31}.

Programas de Erradicación de la Brucelosis Animal

Pocos países tienen los recursos necesarios para la erradicación de la enfermedad por la implementación de la estrategia de diagnóstico y eliminación (D/E) de todos los animales infectados. Si la brucelosis se encuentra establecida en un área, la erradicación es casi siempre alcanzada a un enorme costo en términos de recursos. La eliminación de los animales infectados puede ocasionar resistencia por parte de los ganaderos debido a la ausencia de signos clínicos, la inadecuada compensación o la falta de animales de remplazo ^{16, 30, 31, 32}.

Programas de Control de la Brucelosis Animal

Las primeras medidas deben ser dirigidas a la restricción de la diseminación de la enfermedad. Esta puede ser alcanzada por la vacunación masiva del ganado ³⁰. Los programas de vacunación pueden enfrentarse a ciertos inconvenientes, como una deficiente cobertura de vacunación y la eficiencia de las cepas vacunales (se abordará más adelante) ^{2, 30}. Una vez que la brucelosis ha sido controlada, la vacunación puede ser gradualmente restringida o adoptar un programa combinado de vacunación con D/E. Esto requiere de especial atención en la interpretación de las pruebas diagnósticas debido, a la interferencia serológica de los animales vacunados ^{2, 31}.

Prevención de la Brucelosis en el Rebaño

El control de la brucelosis se puede lograr si la población protegida se incrementa, siendo la vacunación el método más factible para este propósito. Además, se reduce la contaminación del ambiente y en consecuencia la exposición de la población en riesgo al evitar el aborto de los animales infectados ³². La resistencia provista por la vacunación contra *B. melitensis* no es absoluta y ciertas medidas mejoran el éxito para controlar la enfermedad, como: 1) separación de las hembras del rebaño al momento del parto; 2) incinerar o enterrar profundamente los restos de membranas fetales y fetos abortados; 3) desinfección de las áreas contaminadas antes y después de barrer o limpiar con agua a chorro; 4) mantenimiento de medidas higiénicas durante la ordeña para prevenir la diseminación de ubre en ubre; y 5) separación del ganado por especie (en rebaños de ganado mixto) y por estado fisiológico (en rebaños de la misma especie) ^{16, 31}.

Prevención de la Brucelosis en la Salud Pública

La protección de la población humana se efectúa mediante la prevención y control de la enfermedad en los animales. La vacunación, como medida central para el control de la brucelosis animal, es altamente valiosa y tiene un efecto dramático en la salud humana cuando se descontinúan los programas. Un programa de control y erradicación de brucelosis necesita estar ligado a un mercado de productos lácteos de alta calidad y a la concientización de la población sobre las medidas preventivas para la preparación y consumo de alimentos lácteos, necesaria para mantener baja la prevalencia de la enfermedad^{2, 9, 27, 31}.

Prevención contra la Brucelosis Ocupacional

La brucelosis es considerada como la infección más comúnmente adquirida en los laboratorios alrededor del mundo, por lo que el aislamiento y los procedimientos experimentales deben ser llevados a cabo en un Laboratorio de Bioseguridad Tipo 3 (LBT3)⁶. La infección directa para médicos veterinarios y trabajadores de rastro es prevenida con apropiadas medidas higiénicas y de protección al momento de manipular las muestras biológicas. A diferencia de los productos lácteos, el tiempo de sobrevivencia de *Brucella* spp. en la carne parece ser extremadamente corto, a excepción de canales congeladas en donde la bacteria puede sobrevivir por años¹⁵.

Taxonomía del Género *Brucella*

El género *Brucella* pertenece a la clase de las α -proteobacterias, los miembros de esta clase incluyen familias de organismos que pueden ser patógenos o simbiontes de plantas o animales. A pesar de que las especies de *Brucella* son patógenos intracelulares de los animales, poseen una estrecha relación con organismos del suelo como *Ochrobactrum*, simbiontes de las plantas como *Rhizobium* y con fitopatógenos como *Agrobacterium*. La familia Brucellaceae consiste en los géneros *Brucella*, *Mycoplana*, y *Ochrobactrum*. Recientemente se han identificado otras bacterias con relación filogenética cercana, lo que indica que la familia está en expansión. El género vecino más cercano, fenotípica y genotípicamente, a *Brucella* es *Ochrobactrum*, en el cual se encuentran bacterias saprófitas

que son generalmente aisladas del ambiente y que ocasionalmente infectan a los humanos. El reciente aislamiento de *B. microti* del suelo, apunta a que existe un nicho ambiental que es compartido entre los géneros de la familia ^{33, 34, 35}.

Los genomas conocidos de las bacterias del género *Brucella* son muy similares en tamaño y composición. Cada especie tiene un genoma en promedio de aproximadamente 3.29 Mb en dos cromosomas circulares. El cromosoma I es de aproximadamente 2.11 Mb, mientras que el cromosoma II es de aproximadamente 1.18 Mb ^{5, 36}. En el género se encontró un grado de homología de >90% entre las seis especies clásicas, por lo que se propuso que las especies de *Brucella* debieran ser constituidas en un género monoespecífico de *B. melitensis*. La propuesta fracasó debido a que la clasificación con diferentes especies facilita la trazabilidad epidemiológica y cada una de las especies significa un riesgo biológico diferente inherente a la virulencia, lo cual es crucial para la investigación, el diagnóstico y las medidas de prevención del personal en los laboratorios ^{15, 34, 35, 37}.

Especies de *Brucella*

El género *Brucella* consiste en 6 especies conocidas como las especies “clásicas” y 4 especies “nuevas” que incluyen patógenos de mamíferos marinos, las presentes en el suelo y especies sin determinar si tienen un potencial zoonótico. Existe muy poca evidencia de la diferencia de virulencia o la preferencia de hospedero entre los biotipos de *B. melitensis* y *B. abortus*, sin embargo, los biotipos de *B. suis* tienen diferencias en la preferencia de hospedero y la virulencia hacia el humano. Las otras especies pueden ser patógenas para el humano o no. La razón se puede deber a la poca frecuencia con que los humanos son infectados, las diferencias en su virulencia o al poco conocimiento que se tiene de la especie en cuestión ^{34, 37}. *B. melitensis* es la especie más virulenta para el hombre y es la menos específica por hospedero, infectando cabras, borregos, vacas, camellos y perros ¹⁹.

Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación de las especies de *Brucella* por hospedero preferencial y patogenicidad para el humano (Modificado de Whatmore, 2009 y Godfroid, 2011)

<u>Especie</u>	<u>Biotipo</u>	<u>Hospedero preferencial</u>	<u>Patogenicidad para el humano</u>
Especies Clásicas			
<i>B. melitensis</i>	1-3	Cabras y borregos	Alta
<i>B. abortus</i>	1-6, 9	Bovinos	Alta
<i>B. suis</i>	1,3	Cerdos	Alta
	2	Jabalíes, liebres	No
	4	Renos, caribús	Alta
	5	Roedores	No
	-	Perros	Moderada
<i>B. canis</i>	-	Perros	Moderada
<i>B. ovis</i>	-	Borregos	No
<i>B. neotomae</i>	-	Roedores	No
Especies Nuevas			
<i>B. pinnipedialis</i>	-	Focas	Desconocida*
<i>B. ceti</i>	-	Delfines, marsopas	Desconocida*
<i>B. microti</i>	-	Roedores, zorros	Desconocida
<i>B. inopinata</i>	-	Desconocido	Alta

(*) Se ha descrito una infección adquirida en un laboratorio y dos infecciones naturales en las que no se ha encontrado relación con mamíferos marinos

Patogenia e Inmunidad contra *Brucella* spp.

Patogenia de *Brucella* spp.

Cuando un hospedero es infectado con *Brucella* spp., las bacterias eluden la respuesta inmune. Al mismo tiempo, resisten las acciones directas del complemento (C') y otras sustancias bactericidas resultantes de la acción de células polimorfas nucleares (PMN) y macrófagos (M θ). Para lograr esto, las especies de *Brucella* spp. deben: 1) evitar el reconocimiento inmune fuera y dentro del nicho de replicación; 2) afinar el metabolismo acorde a los nutrientes encontrados durante el ciclo de infección y; 3) manipular aspectos claves de la fisiología del M θ inhibiendo la apoptosis y modificando el tránsito intracelular dentro del fagosoma para alcanzar su nicho de replicación. Una vez en el nicho de replicación, los M θ son incapaces de destruir las bacterias al encontrarse en un sitio inalcanzable para la fusión con los lisosomas. La propiedad de replicarse sin generar daño celular obvio es una característica esencial para el establecimiento de una infección crónica^{35, 38, 39}. En una hembra gestante infectada, las bacterias se replican en grandes cantidades

en el trofoblasto placentario, al ser el útero grávido un sitio inmuno-privilegiado, si la integridad de la placenta es afectada se puede inducir el aborto ³⁵.

Las especies de *Brucella* son extremadamente eficientes en la adaptación a un nicho intracelular con bajos niveles de nutrientes y oxígeno, pH ácido y de especies reactivas de oxígeno ^{35, 39}. La habilidad de *Brucella* spp. para comportarse como un parásito sigiloso parece estar conectada con su fisiología y sus características estructurales, no por factores de virulencia “clásicos”. El escrutinio de los genomas de *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus* para la identificación de factores de virulencia clásicos ha sido poco satisfactorio. En efecto, *Brucella* spp. están desprovistas de cápsula, fimbria, pili, exotoxinas, exoproteasas, formas resistentes, variación antigénica, plásmidos o fagos lisogénicos; estructuras que están presentes en muchas bacterias relacionadas ^{38, 40, 41, 42}.

Factores de Virulencia

Lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS) ha sido identificado como un determinante mayor de virulencia al observar que los aislamientos naturales que carecían de LPS mostraron una sobrevivencia reducida. El fenotipo de LPS de las especies lisas es debido a la presencia de un LPS completo, mientras que el LPS de las especies rugosas no contiene cadenas laterales O. El LPS de *Brucella* spp. es menos activo y menos tóxico (en contraste con otras bacterias) y ha demostrado impedir la respuesta antimicrobiana del hospedero, al inhibir la actividad del C' y de los péptidos catiónicos antibacterianos (como defensinas, lactoferrina, lisozima, entre otros), previniendo así la generación de los productos pro-inflamatorios del C', C3a y C5a, y otros mediadores ^{39, 41, 43}. Adicionalmente, la típica respuesta antibacteriana no se manifiesta en la infección contra *Brucella* spp., porque previene la detección por receptores tipo Toll 4 (TLR4) por la presencia de un lípido A que es poco reconocible ⁴³.

Adaptación Inicial al Ambiente Intracelular

Uno de los obstáculos a los que se enfrentan las especies de *Brucella* dentro de la célula fagocítica es el estrés celular, debido a la ausencia de nutrientes dentro del fagosoma ácido. Inmediatamente después de la fagocitosis, *Brucella* spp. comienzan la expresión de genes que codifican rutas biosintéticas o catabólicas de proteínas, aminoácidos, nucleótidos y lípidos para ser utilizados como energía y/o fuentes de carbono en ciertos puntos de la infección ^{40, 44}. La respuesta es desencadenada por la alarmona (p)ppGpp (tetra o pentafofosfato de guanosina) y, resulta en el arresto del crecimiento y en la inhibición de la síntesis de RNA y de proteínas ribosomales. El gen *rsh* codifica para una sintetasa de la alarmona, la regulación completa es parcialmente entendida, pero las cepas mutantes deficientes de este gen mostraron morfología alterada y la inhabilidad de enfrentar la falta de nutrientes. Además, este gen está involucrado en la regulación del sistema de secreción tipo IV, VirB, de *Brucella* spp. (VirB) ⁴⁵.

Reguladores de Quorum Sensing

En el contexto intracelular de *Brucella* spp. el quorum sensing (QS), a través del regulador VjbR, puede prevenir la multiplicación de las bacterias hasta alcanzar el nicho de replicación, lo que puede sugerir que la respuesta a la limitada difusión de nutrientes está relacionada directa o indirectamente con el ajuste del metabolismo y la adaptación al medio intracelular. Subsecuentemente, el regulador BabR puede jugar un papel en reactivar el metabolismo basal ⁴⁰. Se sabe que el QS en *Brucella* spp. está involucrado en la regulación de los determinantes de virulencia ligados a la superficie celular (como VirB, flagelo y proteínas de membrana externa) ³⁵. El autoinductor *N*-dodecanoil-*DL*-homoserin lactona (C12-HSL) se une a VjbR para mediar la supresión de la expresión de *VirB*, a su vez regula a FtcR, que regula la expresión de componentes flagelares. Se ha sugerido que C12-HSL activa la producción de TNF- α por el M θ , por lo que la producción *in vitro* en pequeñas concentraciones de C12-HSL por *B. melitensis* sea una estrategia para mantener un sistema de QS sigiloso y muy sensible ^{39, 44}.

Sistema de Dos Componentes BvrS/BvrR

El sistema de dos componentes BvrS/BvrR (BvrS/R), junto con QS, pueden contribuir a la adaptación a un ambiente intracelular ⁴⁰. Seguido de la identificación de estímulos ambientales aún no determinados, BvrS/R se activa y coordina una respuesta a través de la expresión de ciertos genes. BvrS/R es esencial para la virulencia al regular modificaciones en la superficie de la envoltura bacteriana que son relevantes para la virulencia. También controla directamente elementos involucrados en el ajuste del metabolismo durante el tránsito intracelular al nicho replicativo. La inactivación de este sistema en cepas mutantes de *Brucella* spp. lleva a defectos en la adhesión, invasión y en la replicación intracelular ^{40, 46}.

Sistema de Secreción Tipo IV, VirB, de Brucella spp.

La acidificación del fagosoma y la falta de nutrientes proveen una señal para la expresión del operón *virB*. El aparato VirB es codificado por 12 genes en el cromosoma II y esta inducción requiere de Rsh y del Factor de Integración al Hospedero (IHF). VirB juega un papel principal en la patogenicidad y sobrevivencia intracelular, al requerirse de un VirB funcional para lograr la perturbación del tráfico intracelular y establecerse en el nicho de replicación ^{35, 43, 44}. Después de entrar a los M ϕ , las bacterias no opsonizadas en el fagosoma interactúan con endosomas-lisosomas adquiriendo sus marcadores de superficie, el fagosoma es subsecuentemente capaz de excluir estos marcadores para adquirir marcadores del Retículo Endoplásmico (RE), generando una Vacuola Contenedora de *Brucella* (BCV). La adquisición de marcadores de membrana de RE depende de los efectores secretados de VirB, sugiriendo que uno de los papeles potenciales de los efectores sea para excluir los marcadores lisosomales adquiridos después de la internalización o para interceptar el tráfico de membrana entre el RE y Golgi, y así evadir la fusión con los lisosomas ^{39, 43, 44}. Se ha documentado respuesta inmunológica contra VirB, por lo que una vez que se establece la infección intracelular, la supresión de factores de virulencia como VirB es necesaria para reducir el reconocimiento de *Brucella* spp. por el sistema inmune ⁴⁴.

β -1,2-Glucano Cíclico

Las balsas lipídicas son microdominios de proteínas-lípidos en la membrana de la célula hospedera, que sirven para el transporte de moléculas seleccionadas o como estaciones de relevo en la señalización intracelular pero también representan puntos para el anclaje o entrada de variedad de toxinas y patógenos como *Brucella* spp. Las moléculas de β -1,2-Glucano Cíclico (C β G) están presentes en *Brucella* spp. en grandes cantidades, representando del 1-5% del peso seco de la célula. El C β G interfiere con el tráfico intracelular actuando sobre las balsas lipídicas de las membranas celulares y fagosomas reclutando la proteína Flotilina-1, evento independiente de VirB y que está relacionado con la prevención de la unión fagosoma-lisosoma en fagocitos profesionales y no profesionales tras la generación de la BCV ⁴⁷.

Enzimas y Proteínas

En *Brucella* spp. las enzimas de defensa contra las especies reactivas de oxígeno producidas por los M θ , como catalasa, superóxido dismutasa y peroxidasa (alquil hidroperóxido reductasa, *ahpC* y *ahpD*), catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno como una herramienta defensiva. La isla de denitrificación puede permitir a *Brucella* spp. sobrevivir dentro del fagosoma por la enzima óxido nítrico reductasa, la cual reduce el nitrato en gas dinitrógeno que le permite crecer en condiciones de bajo oxígeno. La ureasa de *Brucella* spp. hidroliza la urea para formar ácido carbónico y dos moléculas de amonio, lo que puede proveer de una fuente asimilable de nitrógeno y proteger contra la acidificación letal ³⁹.

B. abortus y *B. melitensis* pueden suprimir activamente la señalización de la respuesta inmune al producir Btp1 y TcpB respectivamente. Estas proteínas tienen un dominio que inhibe la señalización de TLR4 y TLR2 al inducir la ubiquitinación y degradación de la proteína de señalización MAL (Myd88 Adapter-Like), lo que inhibe la maduración de Células Dendríticas (DC) y su capacidad para producir citocinas pro-inflamatorias ⁴³. Otro mecanismo de evasión de la respuesta inmune por parte de TcpB es mediante el secuestro de fosfatidil inositoles que tienen que ver con la sinapsis inmunológica, incrementando la

resistencia de la célula hospedero contra la eliminación mediada por linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$)⁴⁸. Otra proteína, el Factor A de Virulencia en *Brucella* spp. (BvfA), es una proteína periplásmica única en el género, sin homólogos encontrados y sin dominios estructurales conservados reportados. Este factor es regulado sólo en respuesta al choque ácido dentro de los M θ y se sugiere que juegue un papel en el establecimiento del nicho intracelular³⁹.

Inmunidad Contra *Brucella* spp.

La mayoría de las investigaciones de la evasión de la respuesta inmune están basadas en la interacción de las especies de *Brucella* en diferentes modelos, principalmente el modelo murino y en líneas celulares humanas. Es importante notar que los resultados en las diferentes especies de *Brucella* spp., así como los modelos empleados en diferentes estudios, pueden variar en cuanto a su relativa susceptibilidad y similitud con el hospedero natural^{48, 49}.

La infección por *Brucella* spp. ha demostrado ser un activador potente de la respuesta inmune innata y la mayoría de las bacterias son eliminadas por las especies reactivas de oxígeno durante el estallido respiratorio de los M θ . La respuesta inmune adaptativa también es activada y se favorece la diferenciación de linfocitos T para el control de la infección. Sin embargo, las especies de *Brucella* pueden persistir por muchos años dentro de los M θ estableciendo una infección crónica^{49, 50}. La respuesta por los $CD8^+$ se considera crítica en la resolución de las infecciones bacterianas intracelulares, pero los detalles del porqué *Brucella* spp. persisten a pesar de la presencia de $CD8^+$ se están comenzando a investigar⁴⁸. Las proteínas de *Brucella* spp. juegan un papel importante en la inducción de la respuesta inmune celular con perfil de linfocitos T cooperadores 1 (Th1) en el hospedero. Para patógenos intracelulares como *Brucella* spp., la producción de Interferón gamma (IFN- γ), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina-12 (IL-12) por linfocitos Th1, M θ activados y DC es necesaria para el control de la infección. Se consideran importantes a tres mecanismos de la respuesta inmune adaptativa contra la brucelosis: 1) la producción de IFN- γ por $CD4^+$; 2) la acción citotóxica de $CD8^+$ y de linfocitos $\gamma\delta$; y 3) la acción de anticuerpos opsonizantes^{49, 51, 52}.

En la infección experimental de borregas gestantes y no gestantes con una cepa virulenta de *B. melitensis* inoculada por vía conjuntival, en pocos días las bacterias son controladas en la conjuntiva probablemente por las moléculas microbidas presentes, la actividad del tejido linfoide asociado a mucosas y el drenaje hacia otras estructuras linfoides. Existe movilización de células y se puede observar un decremento de linfocitos $\gamma\delta$, Linfocitos T Cooperadores ($CD4^+$), $CD8^+$ en LN regionales durante la primera semana pos-infección, lo que puede sugerir apoptosis de estas células o la migración hacia otros LN. Posteriormente se induce la respuesta local linfoproliferativa asociada con producción de IFN- γ para controlar la infección. Al mismo tiempo se observa un incremento significativo de anticuerpos IgG a nivel local, principalmente contra el LPS. El decremento de *B. melitensis* observado en los LN 14 días después de la infección sugiere el inicio de una respuesta inmune que controla la infección a los 4 meses. En hembras gestantes, la producción de IFN- γ puede estar relacionada con la dinámica de infección por *B. melitensis*, en la cual tras una etapa inicial de bacteriemia la placenta es colonizada y disminuye el número de bacterias circulantes, lo que podría llevar a la disminución de IFN- γ y al aborto. Después del aborto se genera una segunda bacteriemia en el animal infectado e incrementa la respuesta específica de IFN- γ ⁵¹.

Receptores Involucrados en la Respuesta Inmune

El reconocimiento por células de la respuesta inmune innata involucra a los receptores de membrana TLR con la unión a los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) del microorganismo. La unión produce cambios conformacionales en los TLR que permiten atraer moléculas a MyD88, que es una molécula adaptadora para diferentes TLR y receptores de interleucinas y que son requeridos para iniciar una cascada de señalización que culmina en la activación del factor de transcripción NF- κ B que desencadena la producción de citocinas, quimiocinas y otros péptidos antimicrobianos que ayudan en el control de la infección ^{38, 53, 54}. La interacción de la proteína TcpB de *Brucella* spp. con el TLR en las células del hospedero ha demostrado tener influencia en la inducción de la respuesta inmune innata. Se ha descrito que TcpB comparte secuencias de aminoácidos con dominios TIR (dominio intracelular de TLR) de mamíferos e interfieren con la señalización

vía TLR2 y TLR4. TcpB también interactúa con la proteína MAL suprimiendo la señalización por TLR4 ⁵³.

Citocinas en la Respuesta Inmune

Al momento de la infección, la interacción inicial de *Brucella* spp. con M θ y DC, se direcciona la respuesta inmune hacia una respuesta pro-inflamatoria o antiinflamatoria ⁴⁹. La producción de quimiocinas como RANTES, MCP-1, y MIP-1 α puede jugar un papel contra *Brucella* spp. al ser quimio-atrayentes de leucocitos importantes en la activación de la respuesta inmune Th1 ⁵⁴.

Después de la internalización de las bacterias se liberan citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 que activan a las Células Presentadoras de Antígeno (APC) como parte del sistema inmune innato. La secreción de TNF- α e IL-12 por las APCs es esencial para la resistencia contra bacterias intracelulares, formando un ciclo que finaliza en la producción de IFN- γ . Adicionalmente, TNF- α es necesario para la eliminación de *Brucella* spp. por los M θ por una ruta independiente de IFN- γ . La inhibición de la producción de TNF- α es atribuida a la OMP 25 de *Brucella* spp. y se sugiere que es clave para el parasitismo de *B. suis* en el M θ ^{48, 49, 55, 56}. IL-12 es crítica para activar a células NK (NK) y que secreten IFN- γ , a su vez favorece la diferenciación de CD4⁺ hacia un perfil Th1 productor de IFN- γ . IL-12 es requerida sólo durante los primeros días de la infección en el momento de la expansión clonal de células T, además de producir un efecto sinérgico con el Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF) para incrementar la producción de fagocitos. La eliminación de *Brucella* spp. es optimizada por la combinación de IL-12 con IL-18 para la producción de IFN- γ por las células T, generando una realimentación positiva para Th1 ^{49, 54, 55, 56, 57, 58}. IL-18 es importante en la defensa contra patógenos intracelulares al tener actividad quimio-atrayente para CD4⁺ ⁵⁷. En la respuesta inmune celular Th1, el IFN- γ es producido principalmente por CD4⁺, CD8⁺ y probablemente por NK, posteriormente la producción es sostenida en su mayoría por CD4⁺ ^{51, 59, 60}. IFN- γ es una citocina crucial para el control de *Brucella* spp., una de sus mayores funciones es la estimulación de mecanismos efectores de células fagocíticas, la activación de los M θ por

IFN- γ previene del establecimiento de *Brucella* spp. en el nicho de replicación, aunque si se establece en la BCV la acción de IFN- γ no produce efecto^{35, 49}. La expresión de IFN- γ , TNF- α e IL-2 simultáneamente son de importancia en la generación de una respuesta de memoria CD8⁺. También se requiere de IL-2 al regular la expresión de granzimas y es importante para la expansión y sobrevivencia de CD8⁺⁴⁸.

Respuesta Inmune contra Brucella spp.

La resistencia a la infección es dependiente de la producción de IFN- γ mediado desde la primera semana por CD4⁺ y CD8⁺⁶¹. Se ha demostrado la importancia de las células CD4⁺ productoras de IFN- γ en el control de *Brucella* spp., las cuales no son reemplazadas por CD8⁺. La deficiencia de CD8⁺, la respuesta Th2 y Th17 aparentemente no afectan cualitativamente el curso de la infección⁶². La infección primaria por *Brucella* spp. induce una respuesta de baja calidad en cuanto la capacidad funcional de CD8⁺, que junto con la poca transición a células de memoria, juegan un papel menor el control de la infección y no son capaces de participar en la respuesta subsecuente^{48, 62}. La memoria inmunológica por linfocitos T y células plasmáticas juegan un papel importante en el control de la infección secundaria protectora, la cual es la clave de una vacunación efectiva⁴⁹. La presentación de antígenos de *Brucella* spp. por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo I (MHC I) y por el II (MHCII) a CD8⁺ y CD4⁺, respectivamente, es necesaria para controlar o eliminar la infección⁶². Para persistir dentro del hospedero por tiempo prolongado, *Brucella* spp. deben ser capaces de inhibir la presentación de antígenos y evadir la vigilancia de los linfocitos T, promoviendo la infección crónica. La presentación de péptidos derivados de *Brucella* spp. en moléculas de MHC-II es requerida para generar una respuesta de CD4⁺ en la infección en humanos, ratones y bovinos⁶³. En estudios recientes se ha demostrado que la infección de M θ humanos con *B. abortus* inhibe la expresión de moléculas MHC-II y la presentación de antígenos a CD4⁺. Este fenómeno es generado por lipoproteínas del LPS de *B. abortus* que impiden la presentación de MHC-II mediante la formación de macrodominios en la membrana plasmática de las APCs, modulando indirectamente la función de CD4⁺⁵⁰. Se sugiere que la una vez en el nicho de replicación en el RE, *B. abortus* puede provocar estrés y consecuentemente alterar el ensamblaje de los péptidos en

las moléculas de MHC-I generando moléculas inmaduras que se quedan retenidas en el RE, impidiendo el tráfico intracelular hacia la superficie ⁶³.

Finalmente, otro mecanismo de evasión de la respuesta inmune adaptativa es mediante la apoptosis de linfocitos T. A pesar de que la infección de linfocitos T es muy baja y no existe replicación, se ha propuesto que *B. abortus* es capaz de inducir la apoptosis por acción directa de lipoproteínas de membrana externa (L-Omp19) durante los episodios de bacteriemia que ocurren tanto en la brucelosis aguda como en la brucelosis crónica, siendo los CD4⁺ más susceptibles que los CD8⁺ ⁵⁰.

Problemática de la Vacunación con Rev1 Contra la Brucelosis

Las vacunas disponibles son derivadas de cepas atenuadas que contienen mutaciones que tienen efecto sobre la sobrevivencia de la bacteria ⁶⁴. Es conocido que las vacunas disponibles sólo son efectivas en sus hospederos específicos y la protección cruzada no se ha podido conseguir (salvo para *B. ovis* con la vacuna Rev1) ⁶⁵. Esto es importante ya que especies ganaderas no tradicionales o fauna silvestre como renos, búfalos de agua, yaks, camellos y otros ungulados de dedos pares, son susceptibles a la enfermedad; y son importantes en la economía de muchos países y en la epidemiología de la enfermedad ^{35, 42}. Las vacunas vivas atenuadas contienen ciertas características a considerar para su utilización, las cuales se mencionan a continuación.

Virulencia Residual

Al ser Rev1 una vacuna viva atenuada, uno de los inconvenientes principales de la vacunación es la posibilidad de la persistencia bacteriana en el hospedero, su potencial de transmisión (en hembras gestantes y lactantes) y la posibilidad de reversión a virulenta ^{32, 42}. La vacuna debe ser manejada con cuidado, ya que médicos veterinarios y vacunadores han resultado infectados por inoculación accidental y la cepa contiene resistencia a estreptomycin, un antibiótico que es utilizado terapéuticamente en el humano ^{16, 42, 52, 66}.

No se recomienda la vacunación con dosis estándar de hembras adultas en lactación, algunos animales pueden abortar o eliminar Rev1 en la leche, la eliminación en leche puede

ser transitoria con baja carga bacteriana, pero la eliminación puede persistir por dos lactaciones ^{16, 66, 67}. Rev1 ha sido aislada de lesiones testiculares de sementales caprinos y ovinos, razón por la cual se ha considerado peligrosa para los machos. Sin embargo, estos hallazgos son poco frecuentes y el patrón de la infección inducida después de la vacunación conjuntival o subcutánea en machos jóvenes y adultos es similar a la inducida en hembras. Rev1 no coloniza los órganos genitales y permanece restringida exclusivamente a los LN y al bazo. Por lo tanto, Rev1 carece de efectos secundarios relevantes en machos, y es la vacuna de elección no sólo para la protección contra *B. melitensis*, sino que algunos autores también la consideran contra *B. ovis* ⁶⁶.

Diferente Eficiencia de Rev1

En algunos países, uno de los inconvenientes con el uso de la cepa Rev1 es que, por una deficiente coordinación en la producción y estandarización de métodos, se ha generado una variabilidad en la eficiencia de las vacunas disponibles. Las vacunas ineficientes pueden promover un nicho fértil en hospederos débilmente inmunizados, permitiendo que cepas virulentas de *Brucella* spp. sean transmitidas a través de los animales infectados ^{25, 42}. Desde que Rev1 fue desarrollada en 1950, muchas semillas se han hecho disponibles para diferentes maquiladores y comercializadores de la vacuna. Los resultados en el campo reflejan que las diferencias en la virulencia residual e inmunogenicidad entre las diferentes vacunas de Rev1 son las responsables de las discrepancias en los resultados de la seguridad de la vacuna en animales adultos ⁶⁷. Por esta razón, en 1970 del pase 101 de la cepa original del Dr. Elberg, se realizó una semilla liofilizada que fue caracterizada con cualidades similares a la utilizada en los primeros experimentos, siendo esta semilla la única validada por la Farmacopea Europea para su uso como vacuna. Hoy en día, sólo pocos maquiladores han adoptado esta semilla para realizar la vacuna comercial, mientras que otros utilizan cepas no caracterizadas ^{67, 68}.

Interferencia en el Diagnóstico Serológico

La vacunación con las *cepas lisas* (L) como Rev1 inducen anticuerpos que pueden ser detectados por las pruebas serológicas de rutina para el diagnóstico de la brucelosis. Esto complica la interpretación de las pruebas serológicas cuando se implementa la vacunación.

La vacunación con Rev1 a dosis estándar por vía subcutánea estimula una respuesta serológica con altos títulos de anticuerpos durante el mes subsecuente a la vacunación. Los títulos bajan posteriormente y la mayoría de los animales vacunados resultan negativos posterior a un año de la vacunación ^{16, 31, 32}. A pesar de que existen métodos de vacunación y pruebas serológicas que prácticamente podrían eliminar este problema, la interferencia con el diagnóstico serológico ha sido el argumento que ha prevalecido como un inconveniente, lo cual hace de la Rev1 incompatible en programas de D/E. Este argumento es el que ha generado una fuerte corriente a favor de abandonar las cepas L clásicas o su substitución por cepas rugosas (R) pero hasta el momento no existe una cepa R que esté aprobada contra *B. melitensis* ⁶⁶.

Dosis y Vías de Administración Alternativas a la Dosis Estándar

Es importante aclarar que la información referente a la vacunación en machos antes señalada, así como las dosis y la vía de administración conjuntival de la vacuna que se mencionarán ahora, son resultado de investigaciones científicas que no han sido autorizadas por la Campaña Nacional Contra la Erradicación de la Brucelosis en los Animales para su utilización, por lo que se debe tomar sólo en carácter informativo.

Se reconoce habitualmente que la dosis estándar aplicada por vía subcutánea en animales jóvenes produce una protección de 2.5 años y hasta por lo menos 4.5 años en cabras ^{69, 70, 71}. El argumento de la virulencia residual y la interferencia con el diagnóstico serológico han estimulado la investigación en métodos alternativos de vacunación en animales adultos, incluyendo animales gestantes con dosis reducidas o vacunación por vía conjuntival ¹⁶.

Las limitaciones en el diagnóstico serológico pueden ser superadas mediante la vacunación conjuntival en cabritos de 3-6 meses de edad, con una dosis de $1-2 \times 10^9$ UFC en 30-50 μ L, la cual reduce enormemente la interferencia con el diagnóstico serológico y permite la fácil discriminación de los animales infectados en la etapa adulta. La vacunación conjuntival de animales jóvenes protege contra el aborto en animales desafiados experimentalmente ^{16, 66, 69}.

Se conoce que la dosis estándar produce abortos en hembras gestantes, por lo que se ha intentado reducir la dosis para incrementar la cobertura de vacunación en animales adultos que no han sido vacunados o en donde la enfermedad es de reciente introducción. Las dosis muy reducidas (1×10^4 UFC/mL) aplicadas por vía subcutánea no producen aborto, pero la inmunidad conferida se ve disminuida. La dosis reducida de 1×10^6 UFC/mL es la recomendada por la OMS/FAO para vacunar animales adultos sin importar el estado fisiológico, a pesar de que se han reportado aislamientos de la cepa en hisopos vaginales, abortos y en los fetos. La dosis reducida podría no ser recomendada debido a la carencia de seguridad y el riesgo de inducir una débil inmunidad por la diferente eficiencia entre las vacunas de Rev1 antes mencionada ⁶⁷.

Cepa Vacunal Rev1 y Mutación en el Gen *invA* de *Brucella melitensis*

Origen y características de Rev1

La cepa vacunal contra *B. melitensis* fue desarrollada por Elberg, Herzberg y Faunce en la década de 1950, derivada de la cepa virulenta de *B. melitensis* 6056, cuando la vacuna de *B. abortus* S19 ya estaba disponible para el ganado bovino ^{52, 68, 72}. La vacuna contra *B. melitensis* fue desarrollada originalmente como una cepa dependiente y resistente a estreptomycin, asumiendo que el control del crecimiento de la bacteria en el animal sería generado por la coinyección del antibiótico. Esta mutante brindó buenos resultados en el modelo murino, pero en el modelo caprino y en mono los resultados fueron poco satisfactorios, la razón fue atribuida al hecho de que la cepa sobrevivía en el animal por un periodo más corto que el necesario para estimular una respuesta inmune adecuada. Esto llevó a la re-selección de una cepa no dependiente de estreptomycin pero manteniendo la resistencia. Desde entonces la hipótesis ha sido que la inmunidad conferida por la cepa vacunal efectiva contra *Brucella* spp. requiere de la persistencia y la habilidad de multiplicarse en el hospedero. La cepa resistente fue denominada como Rev1 y resultó lo suficientemente atenuada en ratones y cuyos, por lo que posteriormente se probó en cabras, con excelentes resultados de protección ^{68, 73}.

Rev1 retiene las características comunes de las especies de *Brucella* spp., contiene un LPS liso con un polisacárido-O similar a las cepas virulentas de campo, por lo que la identificación de Rev1 se realiza principalmente por la comparación de sus características fenotípicas, como el crecimiento lento y pequeñas colonias en agar sólido. Rev1 es susceptible a concentraciones de 20 µg/mL de fuscina básica y tionina, también es susceptible a 5 UI/mL de penicilina G y es resistente a 2.5 µg/mL de estreptomina. La actividad de la ureasa de la cepa vacunal es más lenta comparada con cepas virulentas, pero la producción de ácido sulfhídrico (H₂S) se asemeja a la de otras cepas de *B. melitensis* ^{20, 52, 68, 72}. También se identificó que Rev1 contiene una mutación ribosomal y posiblemente otros defectos genéticos ³⁵.

Mutación en el Gen *invA* de *Brucella melitensis*

Un paso crucial en la sobrevivencia intracelular es el proceso de invasión, durante el cual *Brucella* spp. deben lidiar con el estrés oxidativo y de nutrientes en el que es necesario que ocurra un cambio metabólico. Estas condiciones incrementan la concentración de alarmonas, este incremento es interpretado como una señal de alerta para adaptarse al estrés. A pesar de ser inicialmente benéficas, la acumulación de alarmonas puede tener efectos adversos y, para inhibir los efectos tóxicos de la acumulación de las mismas, las bacterias transcriben y expresan enzimas Nudix que pueden hidrolizar a las alarmonas. Las hidrolasas Nudix son una subfamilia de enzimas que se encuentran en más de 250 organismos, que incluyen virus, bacterias, arqueas y eucariontes. Al remover los substratos juegan un papel protector, regulador y de señalización en el metabolismo, incrementando la sobrevivencia de las bacterias en las células hospedero. La habilidad de los patógenos intracelulares de identificar y adaptarse al ambiente hostil de la célula hospedero es considerado un importante factor de virulencia ^{74, 75, 76, 77}.

En un estudio previo al presente trabajo, el gen BMEI0215 (*invA*) fue interrumpido con la introducción de un casete de kanamicina, generando un plásmido que se introdujo en *B. melitensis* 133 desde *E. coli* S17.1 a través de ensayos de conjugación. Posteriormente, las colonias mutantes fueron seleccionadas por su resistencia a kanamicina y a su susceptibilidad a tetraciclina y ampicilina ⁷⁶. La mutación del gen *invA* de *B. melitensis* 133

resultó en la atenuación *in vivo* en el modelo murino. A los 15 días pos-infección, los ratones infectados con la cepa mutante tuvieron elevados niveles de colonización comparados con la cepa vacunal Rev1; sin embargo, la concentración fue menor que la de las cepas *B. melitensis* 133 y 16M. Posteriormente los niveles de la mutante *invA* disminuyeron a niveles similares a Rev1, mientras que las cepas virulentas permanecieron elevadas, lo que sugiere el control de la infección de la cepa mutante. Se concluyó que el gen *invA* es importante para la invasión y la adaptación intracelular, pero no es relevante para la replicación intracelular en los modelos de cultivo celular. Los resultados de los experimentos de virulencia residual en modelo murino sugiere que el gen *invA* es requerido para una virulencia completa ⁷⁶.

En el laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM) se desarrolló la cepa mutante en el gen *invA* de la cepa de *B. melitensis* Rev1, *Brucella melitensis* Rev1 *invA*-km (Rev1/*invA*), utilizada en este trabajo. Se utilizó el plásmido pJA3 con resistencia a kanamicina construido por Alva, 2014 y fue introducido a *B. melitensis* Rev1 por electroporación (información sin publicar).

JUSTIFICACIÓN

En la vacunación contra *B. melitensis* se requiere principalmente inducir una inmunidad mediada por células, la cual es lograda por la utilización de una cepa viva atenuada que simule las condiciones más cercanas a la infección natural. A pesar de que la vacunación con Rev1 produce una infección controlada que genera una respuesta inmune eficaz y duradera, existen inconvenientes como la virulencia residual. Se espera que la mutación en el gen *invA* a la cepa vacunal de *B. melitensis* Rev1 produzca un nivel de atenuación suficiente, que disminuya o elimine las características no deseadas de la cepa Rev1, pero que al mismo tiempo persista y se multiplique por el tiempo suficiente como para generar una respuesta inmune protectora.

HIPÓTESIS

La cepa de *Brucella melitensis* Rev1 *invA*-km es atenuada e induce una respuesta inmune celular y humoral suficiente para proteger contra el desafío con una cepa virulenta de *Brucella melitensis* en el modelo caprino.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar la duración de la respuesta inmune humoral, la protección conferida en hembras caprinas gestantes y la expresión de citocinas de la respuesta inmune celular producidas por la cepa *Brucella melitensis* Rev1 *invA*-km.

Objetivos Específicos:

- Evaluar la duración de la respuesta inmune humoral con las pruebas serológicas de Tarjeta al 3% e Inmuno-difusión Radial.
- Comparar la protección conferida frente al desafío experimental en hembras caprinas vacunadas y no vacunadas gestantes con una cepa de virulenta de *B. melitensis*.
- Estandarización de PCR tiempo real de secuencias de citocinas Th1 y Th2 para medir la expresión de citocinas de la respuesta inmune.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

En el presente estudio se trabajó con 24 cabras hembras (*Capra hircus*) de entre 1-3 años de edad (peso promedio de 38.8 kg) y un macho (peso 89 kg) procedentes de hatos sin antecedentes clínicos y serológicos de brucelosis del Estado de Guanajuato y del Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la FMVZ-UNAM. Los animales fueron alojados en las instalaciones del Centro de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Animal (CENID-Microbiología animal) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Cuajimalpa, D.F. Las hembras fueron separadas aleatoriamente en 3 grupos de 8 hembras cada uno y el macho se mantuvo en un corral individual. Cada grupo se mantuvo en un corral de 1.70 m de ancho por 7 m de largo, con comederos y bebederos individuales, suelo de cemento y drenaje al final del corral. El alojamiento y manejo de los animales fue previamente aprobado por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (SICUAE) de la FMVZ-UNAM.

El presente trabajo formó parte de una serie de investigaciones en la que se compartieron las instalaciones simultáneamente con otros experimentos en los que se probó otra cepa mutante de Rev1 en los trabajos: “Protección conferida por la mutante Δ ery-CD de *Brucella melitensis* Rev1 en cabras gestantes, frente al desafío experimental” y “Evaluación de la capacidad de colonización y abortogenicidad de la cepa mutante Δ ery-CD de *Brucella melitensis* Rev 1 en cabras”.

Sincronización de Estro y Diagnóstico de Gestación

Previo a la sincronización del estro, se realizó el diagnóstico de gestación por ultrasonido con el equipo UltraScan 90 (Ami Medical Inc.) por vía transabdominal. Posteriormente se sincronizó el estro de las cabras por grupos, con una semana de separación, con el protocolo de esponjas intravaginales de liberación controlada con Acetato de Flugestona (Chrono Gest® CR, Intervet) colocadas con un aplicador, que fue inmerso en una solución antiséptica entre cada aplicación. Al noveno día se administraron por vía subcutánea 300UI

de eCG (Folligon®, Intervet), en la región axilar izquierda. Se retiraron las esponjas dos días después de la administración de gonadotropina sérica de yegua preñada (eCG), se realizó la detección de estro y se realizaron montas dirigidas con el semental y posteriormente se dejó al macho con las hembras durante dos días. Al día 21 posteriores a la monta, se utilizó al macho para la detección del retorno al estro y para realizar la monta dirigida en caso de ser necesario. Se realizó un segundo diagnóstico de gestación por ultrasonido vía transrectal a los 45 días después de la monta.

Vacunación

Las 24 hembras se dividieron en forma aleatoria en tres grupos de 8 animales cada uno. El primer grupo (grupo *invA*) fue vacunado con la cepa Rev1/*invA*, previo a la vacunación, la cepa fue inoculada en ratón y se recuperó del bazo 2 semanas después para asegurar que las bacterias estuvieran viables, en la fase lisa y sin contaminantes. Posteriormente se realizó la curva de crecimiento para determinar las UFC/mL por el método de Miles y Misra²⁰. Antes de la vacunación se realizaron lavados y diluciones pertinentes en Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) para alcanzar la dosis reducida de 1×10^6 UFC/1mL, la dosis inoculada fue cuantificada por el mismo método. El segundo grupo (grupo Rev1) fue vacunado con Rev1 y se utilizó la vacuna Melirev-R (PRONABIVE), la pastilla liofilizada fue reconstituida con el diluyente estéril incluido, agitada y aplicada en volumen de 1mL por vía subcutánea; el tercer grupo (grupo SSF) fue el control y las cabras fueron inoculadas con 1mL de Solución Salina fisiológica estéril. La vacunación fue realizada por vía subcutánea en la región axilar derecha.

Pruebas Serológicas

Toma de Muestras

Se colectaron muestras de sangre para la obtención de suero mediante el procedimiento de venopunción yugular en tubos con sistema de vacío (Vacutainer®, BD) de 6mL con agujas calibre 21Gx1-1/2” (0.8 x 38) de los días 0, 7, 15, 21, 30, 45, 60, 75 y 90 pos-vacunación (p.v.) y los días 0, 9, 15, 30 pos-desafío (p.d.) y el día de la necropsia (N).

Prueba de Tarjeta al 3% e Inmunodifusión Radial

Previo al inicio del experimento se realizó el diagnóstico serológico por la Prueba de Tarjeta al 3% a todos los animales, al igual que a las muestras de los días antes mencionados. A las muestras positivas a Prueba de Tarjeta al 3% se les realizó la prueba de IDR, también se realizó la prueba de IDR en el día 0 p.v. y día 0 previo al desafío experimental. La Prueba de Tarjeta al 3% se efectuó mediante el procedimiento estándar con el antígeno de *B. abortus* cepa 1119-3 (Aba test tarjeta al 3%, PRONABIVE). La prueba de IDR se realizó en placas elaboradas previamente en el laboratorio de brucelosis del CENID-Microbiología animal con hapteno nativo de *B. melitensis*, la interpretación de la prueba se realizó conforme a se describe en Hernández y Díaz, 2000²⁴.

Desafío Experimental con Cepa Virulenta de *Brucella melitensis* 16M

Las cabras fueron trasladadas a las unidades de aislamiento del CENID-Microbiología animal, aproximadamente a los 110 días de gestación. Una vez en las unidades de aislamiento las hembras fueron desafiadas con la cepa virulenta *B. melitensis* 16M a una dosis de 4×10^5 UFC/mL en un volumen de 100 μ L por vía conjuntival. La cepa de *B. melitensis* fue previamente inoculada en ratón, recuperada a los 14 días del bazo y fue contabilizada por el método de Miles y Misra²⁰.

Aislamiento e Identificación Bacteriológica

Eutanasia de los Animales

Al término de la gestación o a la presencia del aborto, se realizó la eutanasia de los animales mediante la insensibilización instantánea con un disparo con pistola de perno cautivo calibre 0.22 (Cash Special) facilitado por el Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM. Posteriormente, por corte de las venas yugulares, se realizó el desangramiento dentro de los primeros 30s después del disparo de acuerdo a la NOM-033-ZOO-1995.

Toma de Muestras y Cultivo en Medio Sólido

Durante la necropsia se obtuvieron muestras de bazo, cotiledones, tejido mamario, leche e hisopado vaginal y de los LN (submandibulares, retrofaríngeos, parotídeos, prescapulares, mesentéricos, inguinales y supramamarios). Se colectaron muestras de bazo, hígado, pulmón y contenido abomasal de los fetos/cabritos. Los órganos colectados fueron diseccionados para remover la grasa y el tejido excedente, se sumergieron en etanol al 70%, se flamearon y se depositaron en bolsas de plástico nuevas. Para macerar las muestras se añadieron de 1-3mL de PBS estéril en la bolsa, una vez macerados se sembraron con hisopos estériles en placas con medio Farrell, elaborado con TSA (Agar Trypticaseína Soya, MCD LAB) como medio base y el suplemento selectivo de *Brucella* (Modified *Brucella* Selective Supplement, OXOID); las placas se incubaron a 37°C hasta por 14 días. Las bolsas con los órganos fueron almacenadas a -20°C, en caso de requerir resiembras. Todos los procedimientos fueron realizados en condiciones de esterilidad en el laboratorio de brucelosis del CENID-Microbiología Animal.

Identificación de las Cepas Aisladas

Las colonias sospechosas de *B. melitensis* fueron resembradas en medio TSA o en medio selectivo de Farrell, en caso de ser necesario. Se realizó la tinción de Gram mediante el procedimiento estándar, al igual que la prueba de ureasa (Urea Agar Base, BD). Para la diferenciación de las cepas vacunales de la de campo se utilizó medio TSA suplementado con 2.5µg/mL de estreptomina (sulfato de estreptomina, Gibco) para identificar la cepa Rev1. Para la cepa mutante *invA* de *B. melitensis* Rev1 se utilizó TSA suplementado con 50µg/mL de kanamicina (sulfato de kanamicina, Gibco) y TSA suplementado con 5UI/mL de penicilina G (penicilina G potásica, Sigma) para la cepa virulenta de *B. melitensis* 16M.

Extracción de RNA y síntesis de cDNA a partir de Células Mononucleares de Sangre Periférica

Toma de Muestras

Se colectaron muestras sanguíneas para la obtención de sangre mediante el procedimiento de venopunción yugular en tubos con sistema de vacío con heparina (Vacutainer®, BD) de

6mL con agujas calibre 21Gx1-1/2” (0.8 x 38) en los días 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 p.v. de los grupos *invA*, Rev1 y SSF. Se obtuvieron muestras de los mismos días p.d. únicamente del grupo SSF.

Obtención de Células Mononucleares de Sangre Periférica

De las muestras de sangre se extrajeron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con Ficol (Ficoll-Paque PLUS, GE healthcare®). La sangre se centrifugó a 400 x g durante 15 min para coleccionar la fase leucoplaquetaria y posteriormente mezclarla gentilmente con 5mL de PBS en un tubo nuevo. En el tubo nuevo, con una pipeta Pasteur se adicionaron cuidadosamente sobre el fondo 3mL de Ficol sin mezclar los componentes y se centrifugó a 400 x g durante 30min. Después de la centrifugación se separaron las fases (plasma, PBMC, ficol y eritrocitos-granulocitos) y se colectó la fase con las PBMC, las cuales se colocaron en un tubo nuevo con 3mL de PBS, se centrifugó a 100 x g por 5 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla se homogenizó gentilmente en 3mL de PBS y se centrifugó nuevamente. Por último se desechó el sobrenadante y la pastilla se re-suspendió en 1mL de medio RPMI 1640 (Gibco) y se separó en dos alícuotas de 500µL y se conservaron a -70° C hasta su utilización.

Extracción de RNA

A una de las alícuotas de las PMBC se le agregaron 700 µL de TRIzol® LS Reagent (Ambion), se mezcló en agitación en vortex y se incubó a temperatura ambiente por cinco minutos. Posteriormente se agregaron 200 µL de cloroformo frío, se mezcló vigorosamente manualmente durante 15 s, se incubó en refrigeración por 15 min y se centrifugó a 12,000 x g por 15 min a 4° C. Después de la centrifugación se separó la fase acuosa en un microtubo nuevo y se agregó 500 µL de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,000 x g por 10 min a 4° C. Posteriormente se decantó el isopropanol y se agregó 1mL de etanol al 70% y se centrifugó a 7,500 x g por 5 minutos a 4° C. Finalmente se decantó el etanol y se dejó secar completamente en aire seco, una vez seca la pastilla se agregó 30 µL de agua libre de nucleasas y se conservó a -70° C hasta su utilización.

Síntesis de cDNA

La realización de la síntesis de cDNA de los grupos se efectuó con First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). Las muestras de RNA se cuantificaron y calcularon para obtener 1 μ / μ L de cDNA aproximadamente. El RNA y el cDNA obtenidos se cuantificaron con un Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

La primera reacción se calculó utilizando el templado de RNA total previamente cuantificado, y se completó en caso de ser necesario con agua libre de nucleasas para alcanzar un volumen de 10 μ L:

$$1a \text{ reacción} = \frac{1\mu\text{g}/\mu\text{L}}{\text{RNA total ng}/\mu\text{L}}$$

Para la segunda reacción se utilizaron los reactivos con los volúmenes que indica el fabricante para obtener un volumen final de 20 μ L.

Diseño de Iniciadores y Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la Medición de la Expresión de Citocinas

Diseño de Iniciadores para la Evaluación de la Respuesta Inmune

Se eligieron las citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-12 para medir la expresión de citocinas de la respuesta inmune celular Th1, mientras que para la respuesta Th2 se eligió a IL-4 e IL-10. Se utilizó a GAPDH como gen constitutivo **Cuadro 2**. Para el diseño de los iniciadores se realizó una búsqueda en NCBI y se utilizaron los programas de Basic Local Alignment Search Toll (BLAST) [disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>], el software ClustalX [disponible en: <http://www.clustal.org/>] para el alineamiento de los iniciadores a partir de las secuencias diseñadas y Serial Cloner Software 2.6 para el ensayo *in silico* de los iniciadores.

Cuadro 2. Secuencias de Iniciadores de Citocinas y Alineamientos Significativos en BLAST

Iniciador: Sentido: 5'- CAAGGCAGAGAACGGGAAG -3'
GAPDH Contrasentido: 5'- GCCTTCTCCATGGTAGTGAAG -3'

Producto amplificado: 144 pb

CAAGGCAGAGAACGGGAAGCTCGTCATCAATGGAAAGGCCATCACCATCTTCCAGGAGCGAGA
 TCCTGCCAACATCAAGTGGGGTGATGCTGGTGCTGAGTACGTGGTGGAGTCCACTGGGGTCTTC
 ACTACCATGGAGAAGGC

<u>Especie</u>	<u>No. GenBank</u>	<u>Cuenta</u> <u>Total</u>	<u>Cobertura</u>	<u>Valor E</u>	<u>Identidad</u>
<i>Capra hircus</i>	<u>AJ431207.1</u>	38.2	100%	0.001	100%
<i>Ovis aries</i>	<u>NM_001190390.1</u>	56.5	100%	0.001	100%
<i>Ovis aries</i>	<u>DQ386891.1</u>	38.2	100%	0.001	100%
<i>Ovis aries</i>	<u>AF030943.1</u>	56.5	100%	0.001	100%

Iniciador: Sentido: 5'- GTACGAACCCATCTACCAGG -3'
TNF-α Contrasentido: 5'- ATGATCCCAAAGTAGACCTGC -3'

Producto amplificado: 123 pb

GTATGAACCCATCTACCAGGGAGGAGTCTTCCAGCTGGAGAAGGGAGATCGCCTCAGTGCTGAG
 ATCAACCTGCCGACTACCTGGACTATGCCGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGATCAT

<u>Especie</u>	<u>No. GenBank</u>	<u>Cuenta</u> <u>Total</u>	<u>Cobertura</u>	<u>Valor E</u>	<u>Identidad</u>
<i>Capra hircus</i>	<u>AY304502.1</u>	40.1	100%	4e-04	100%
<i>Capra hircus</i>	<u>AF276985.1</u>	40.1	100%	4e-04	100%
<i>Capra hircus</i>	<u>X77317.1</u>	40.1	100%	4e-04	100%
<i>Capra hircus</i>	<u>NM_001286442.1</u>	40.1	100%	4e-04	100%

Iniciador: Sentido: 5'- GCTGATTCAAATTCGGGTGG -3'
IFN-γ Contrasentido: 5'- TGACTTCTCTTCCGCTTTCTG -3'

Producto amplificado: 117 pb

GCTGATTCAAATTCGGGTGGATGATCTGCAGATCCAGCGCAAAGCCATAAATGAATCATCAAG
 GTGATGAATGACCTGTCGCCAAAATCTAACCTCAGAAAGCGGAAGAGAAGTCA

<u>Especie</u>	<u>No. GenBank</u>	<u>Cuenta</u> <u>Total</u>	<u>Cobertura</u>	<u>Valor E</u>	<u>Identidad</u>
<i>Capra hircus</i>	<u>EF375708.1</u>	40.1	100%	4e-04	100%
<i>Capra hircus</i>	<u>AY603405.1</u>	40.1	100%	4e-04	100%
<i>Capra hircus</i>	<u>NM_001285682.1</u>	40.1	100%	4e-04	100%
<i>Capra hircus</i>	<u>U34232.1</u>	40.1	100%	4e-04	100%

Cuadro 2. (Continuación)

Iniciador: Sentido 5'- ACCAGAACATGCTGGCAGCT -3'
IL-12 Contrasentido: 5'- TGAAGAAGGATGCAGAGCTTGA -3'

Producto amplificado: 133 pb

ACCAGAACATGCTGGCAGCTATTGCTGAGCTAATGCAGGCCCTGAATTTTCGACAGTGAGACTGT
 GCCACAGAAACCCTCCCTGGAAGAACTGGATTTTTATAAGACAAAAGTCAAGCTCTGCATCCTT
 CTTCA

<u>Especie</u>	<u>No. GenBank</u>	<u>Cuenta</u> <u>Total</u>	<u>Cobertura</u>	<u>Valor E</u>	<u>Identidad</u>
<i>Capra hircus</i>	<u>NM_001285638.1</u>	40.1	100%	4e-04	100%
<i>Capra hircus</i>	<u>AB600567.1</u>	40.1	100%	4e-04	100%
<i>Capra hircus</i>	<u>AY603407.1</u>	40.1	100%	4e-04	100%
<i>Capra hircus</i>	<u>AF003542.1</u>	40.1	100%	4e-04	100%

Iniciador: Sentido 5'- GAATTCATGCATGGAGCTGCC -3'
IL-4 Contrasentido: 5'- CCTGTAGATACGCCTAAGCTC -3'

Producto amplificado: 108 pb

GAATTCATGCATGGAGCTGCCTGTAGCAGACGTCTTTGCTGCCCAAAGAATGCAACTGAGAAG
 GAAACCTTCTGCAGGGCTGGAATTGAGCTTAGGCGTATCTACAGGA

<u>Especie</u>	<u>No. GenBank</u>	<u>Cuenta</u> <u>Total</u>	<u>Cobertura</u>	<u>Valor E</u>	<u>Identidad</u>
<i>Capra hircus</i>	<u>NM_001285681.1</u>	42.1	100%	1e-04	100%
<i>Capra hircus</i>	<u>DQ384927.1</u>	42.1	100%	1e-04	100%
<i>Capra hircus</i>	<u>AY648947.1</u>	42.1	100%	1e-04	100%
<i>Capra hircus</i>	<u>U34273.1</u>	42.1	100%	1e-04	100%

Iniciador: Sentido 5'- CTGCCCTGCGAAAACAAGAG -3'
IL-10 Contrasentido: 5'- GTAGTTGATGAAGATGTCAAACCTC -3'

Producto amplificado: 114 pb

CTGCCCTGCGAAAACAAGAGCAAGGCGGTGGAGCAGGTGAAGAGAGTCTTCA
 ATATGCTCCAAGAGAGGGGTGTCTACAAAGCCATGAGTGAGTTTGACATCTTC
 ATCAACTAC

<u>Especie</u>	<u>No. GenBank</u>	<u>Cuenta</u> <u>Total</u>	<u>Cobertura</u>	<u>Valor E</u>	<u>Identidad</u>
<i>Capra hircus</i>	<u>XM_005690416.1</u>	40.1	100%	4e-04	100%
<i>Capra hircus</i>	<u>DQ837159.1</u>	40.1	100%	4e-04	100%
<i>Ovis aries</i>	<u>NM_001009327.1</u>	40.1	100%	3e-04	100%
<i>Ovis aries</i>	<u>Z29362.1</u>	40.1	100%	3e-04	100%

Determinación de la Temperatura de Alineamiento en la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Punto Final

A partir de caprinos no vacunados se obtuvieron muestras de sangre para la obtención de PBMC por el método antes descrito. En vez de congelar las alícuotas a -70°C en el último paso, las PBMC se incubaron durante 24h / 37°C / 5% CO_2 añadiéndoles Pokeweed (PWM) (Lectina de *Phytolacca americana*, Sigma) como estimulante. La extracción de RNA y la síntesis de cDNA se realizaron con los procedimientos antes descritos.

La realización del gradiente de temperatura se efectuó en un termociclador (MultiGen Optimax, Labnet International Inc.) en el que se realizó la PCR para cada una de las secuencias. La reacción se preparó con 6.5 μL de Mezcla (PCR master Mix (2x), Thermo Scientific), 0.4 μL de iniciador sentido, 0.4 μL de iniciador contrasentido, 4.7 μL de agua libre de nucleasa y 1.0 μL de templado de cDNA; para un volumen final de 12 μL . Los iniciadores se utilizaron a una concentración de $10\mu\text{M}/\mu\text{L}$ y el cDNA en $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Finalmente se visualizaron en un gel de agarosa al 1%. Las condiciones para la PCR fueron: 1) Pre calentamiento a 95°C / 3 min / 1 ciclo (c); 2) Desnaturalización a 95°C / 30 s / 45 c; 3) Alineamiento, con gradiente de $50\text{-}62^{\circ}\text{C}$ / 30 s / 45 c; Extensión a 72°C / 30 s / 45 c; 4) Extensión final a 72°C / 7 min / 1 c; y 5) Enfriamiento a 4°C .

Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

Con la temperatura de alineamiento establecida se realizaron pruebas para la estandarización de la PCR tiempo real (*qPCR*), se probaron las PBMC estimuladas con PWM (y algunas muestras problema) por triplicado en una placa óptica de 96 pozos en Light Cycler 480 (Roche). Las reacciones se prepararon con 4.1 μL de agua libre de nucleasas, 6.5 μL de mezcla, 0.2 μL de iniciador sentido, 0.2 μL e iniciador contrasentido, 1.0 μL de agente intercalante (SYTO® 9, Ambion) y 1 μL de cDNA; para un volumen final de 12 μL . La concentración de los iniciadores fue la misma que la utilizada en la PCR punto final, el agente intercalante se diluyó a una concentración 1:1000 y el cDNA se utilizó a 1,000 ng/ μL . Se utilizó el software LigtCycler® 480 SW 1.5 con un formato de detección de SYBR Green I/HRM Dye en las siguientes condiciones, **Cuadro 3**.

Cuadro 3. Plantilla utilizada para la medición de la expresión de citocinas en qPCR

<i>Pre-incubación:</i>							
<u>Temperatura</u> (°C)	<u>Modo de</u> <u>Adquisición</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Ritmo</u> (°C/s)	<u>Adquisiciones</u> (por °C)	<u>Temperatura</u> <u>secundaria</u> (°C)	<u>Tamaño</u> <u>de paso</u> (°C)	<u>Retraso</u> <u>de paso</u> (ciclo)
95	Ninguno	3min	4.4	-	0	0	0
<i>Amplificación:</i>							
<u>Temperatura</u> (°C)	<u>Modo de</u> <u>Adquisición</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Ritmo</u> (°C/s)	<u>Adquisiciones</u> (por °C)	<u>Temperatura</u> <u>secundaria</u> (°C)	<u>Tamaño</u> <u>de paso</u> (°C)	<u>Retraso</u> <u>de paso</u> (ciclo)
95	Ninguno	30s	4.4	-	0	0	0
70	Ninguno	30s	2.2	-	60	1	3
72	Sencillo	12s	4.4	-	0	0	0
<i>Extensión final:</i>							
<u>Temperatura</u> (°C)	<u>Modo de</u> <u>Adquisición</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Ritmo</u> (°C/s)	<u>Adquisiciones</u> (por °C)	<u>Temperatura</u> <u>secundaria</u> (°C)	<u>Tamaño</u> <u>de paso</u> (°C)	<u>Retraso</u> <u>de paso</u> (ciclo)
72	Ninguno	5min	4.4	-	0	0	0
<i>Curva Melting:</i>							
<u>Temperatura</u> (°C)	<u>Modo de</u> <u>Adquisición</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Ritmo</u> (°C/s)	<u>Adquisiciones</u> (por °C)	<u>Temperatura</u> <u>secundaria</u> (°C)	<u>Tamaño</u> <u>de paso</u> (°C)	<u>Retraso</u> <u>de paso</u> (ciclo)
95	Ninguno	5s	4.4	-	-	-	-
65	Ninguno	1min	2.2	-	-	-	-
97	Continuo	-	1.1	5	-	-	-
<i>Enfriamiento:</i>							
<u>Temperatura</u> (°C)	<u>Modo de</u> <u>Adquisición</u>	<u>Tiempo</u>	<u>Ritmo</u> (°C/s)	<u>Adquisiciones</u> (por °C)	<u>Temperatura</u> <u>secundaria</u> (°C)	<u>Tamaño</u> <u>de paso</u> (°C)	<u>Retraso</u> <u>de paso</u> (ciclo)
40	Ninguno	30s	2.2	-	0	0	0

RESULTADOS

Pruebas Serológicas

En los **Cuadros 4 y 5** se muestra el resumen de resultados de la Prueba de Tarjeta al 3% y de IDR, respectivamente. Todas las muestras resultaron negativas para el día 0 en ambas pruebas, así mismo para la prueba de IDR al día 0 previo al desafío experimental (Día 0*). Las hembras 3 y 15 de los grupos *invA* y Rev1, respectivamente, no mostraron reacción positiva a la Prueba de Tarjeta al 3% en ningún momento p.v. Los números en el cuadro indican los días en que se obtuvieron resultados positivos p.v. y p.d. (ver en Material y Métodos). En la **Figura 1** se muestran los controles de ambas pruebas. Posteriormente, en la **Figura 2** se muestra una gráfica con las respuestas serológicas por grupo a lo largo de todo el experimento. Al observar la poca duración de la respuesta serológica en el grupo Rev1 se realizó el conteo de UFC de un frasco de la vacuna Rev1 del mismo lote y se encontró que la dosis fue de 1×10^3 UFC/mL.

Cuadro 4. Resultados de la Prueba de Tarjeta al 3% en cabras vacunadas con Rev1/*invA*, Rev1 y sin vacunar a diferentes tiempos pos-vacunación y pos-desafío.

Grupo <i>invA</i>				Grupo Rev1				Grupo SSF			
Cabra	Día 0	p.v.	p.d.	Cabra	Día 0	p.v.	p.d.	Cabra	Día 0	p.v.	p.d.
1	-	21 - 30	-	9	-	15	-	17	-	-	-
2	-	15 - 30	-	10	-	7 - 30	-	18	-	-	-
3	-	-	-	11	-	15 - 21	-	19	-	-	-
4	-	15 - 21	-	12	-	15	-	20	-	-	-
5	-	21 - 30	-	13	-	15	-	21	-	-	-
6	-	15 - 45	30 - N	14	-	15	-	22	-	-	-
7	-	15 - 60	-	15	-	-	N	23	-	-	-
8	-	15 - 90	-	16	-	15 - 21	-	24	-	-	-

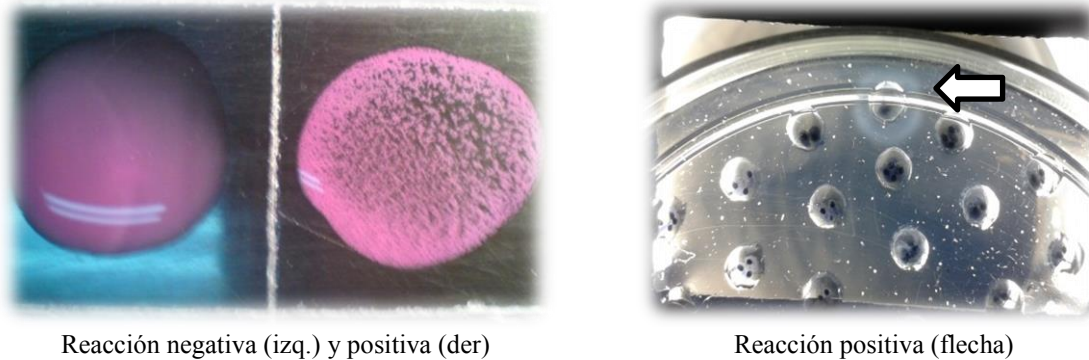
Pos-vacunación: (p.v.). Pos-desafío: (p.d.). Día de la Necropsia: (N)

Cuadro 5. Resultados de la prueba de IDR en cabras vacunadas con Rev1/*invA*, Rev1 y sin vacunar a diferentes tiempos post-vacunación

Grupo <i>invA</i>					Grupo Rev1					Grupo SSF				
Cabra	Día0	Día0*	p.v.	p.d.	Cabra	Día0	Día0*	p.v.	p.d.	Cabra	Día0	Día0*	p.v.	p.d.
1	-	-	-	-	9	-	-	-	-	17	-	-	-	-
2	-	-	-	-	10	-	-	-	-	18	-	-	-	-
3	-	-	-	-	11	-	-	-	-	19	-	-	-	-
4	-	-	-	-	12	-	-	-	-	20	-	-	-	-
5	-	-	-	-	13	-	-	-	-	21	-	-	-	-
6	-	-	-	-	14	-	-	-	-	22	-	-	-	-
7	-	-	-	-	15	-	-	-	-	23	-	-	-	-
8	-	-	-	-	16	-	-	-	-	24	-	-	-	-

Pos-vacunación: (p.v.). Pos-desafío: (p.d.). Día 0 previo al desafío: (Día 0*)

Figura 1. Controles de Prueba de Tarjeta al 3% (izq.) e Inmunodifusión Radial (der.)



Reacción negativa (izq.) y positiva (der)

Reacción positiva (flecha)

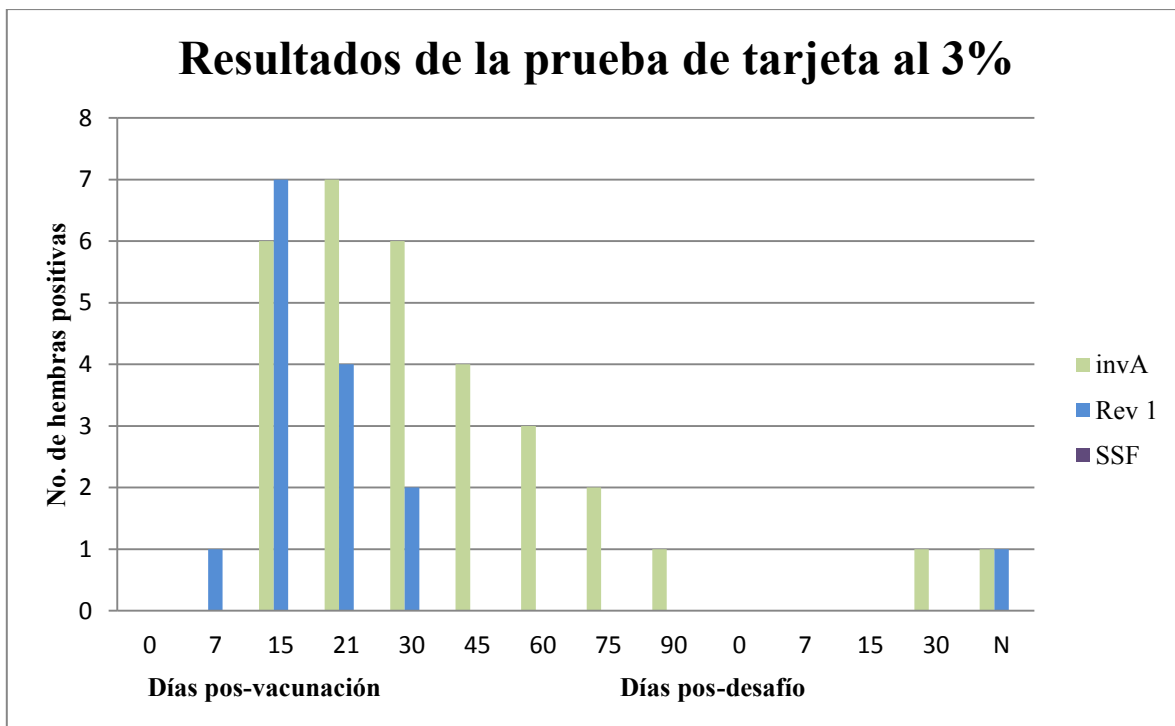


Figura 2. No. de hembras positivas por grupo a la Prueba de Tarjeta al 3% a lo largo del experimento

Ocurrencia de Aborto o Parto

A partir de la fecha de desafío experimental con la cepa virulenta de *B. melitensis* 16M, las hembras fueron revisadas diariamente en las unidades de aislamiento para identificar la ocurrencia de aborto o de parto. Lamentablemente el primer diagnóstico de gestación no

fue preciso, debido a que algunas de las hembras presentaron gestación temprana que no pudo ser identificada al momento del diagnóstico, lo que se reflejó en partos fuera de la fecha planeada (cabras 9, 15, 20). A pesar de haber utilizado el protocolo de sincronización se obtuvieron gestaciones desfasadas, que pudieron ser debidas a la falla en la fertilización por el macho o en el diagnóstico de gestación subsecuente, o por la vacunación. En algunas hembras la gestación fue comprobada al momento de realizar la necropsia programada, al haber pasado las fechas probables de parto esperadas. En el **Cuadro 6** se presentan los casos de aborto, parto o necropsia programada y las crías que tuvieron. **Figura 3.**

Cuadro 6. Ocurrencia de Parto o Aborto pos-desafío con la cepa virulenta de *B. melitensis* 16M en los grupos vacunados y sin vacunar

Grupo invA			Grupo Rev1			Grupo SSF		
Cabra	Parto/Aborto	Crías	Cabra	Parto/Aborto	Crías	Cabra	Parto/Aborto	Crías
1	No gestante	0	9	Parto previo	1	17	Aborto	2
2	Parto	1	10	Necropsia programada	1	18	No gestante	0
3	Necropsia programada	1	11	Parto	2	19	Parto	2
4	Parto	1	12	Necropsia programada	1	20	Parto previo	2
5	No gestante	0	13	Parto	2	21	Aborto	2
6	Parto	2	14	Necropsia programada	1	22	Necropsia programada	0
7	Parto previo	1	15	Parto previo	2	23	Parto	1
8	No gestante	0	16	Necropsia programada	1	24	Gestante	1



Parto



Feto abortado

Figura 5. Ocurrencia de Parto o Aborto

Aislamiento Bacteriológico e Identificación de la Cepa Aislada

Los órganos y tejidos antes mencionados fueron procesados en el laboratorio para el cultivo bacteriológico en medio selectivo. Las colonias sospechosas fueron resembradas para una mejor identificación y asegurar su viabilidad. Se realizaron las pruebas de resistencia o susceptibilidad en medio TSA suplementado con antibiótico, prueba de ureasa y tinción de Gram. Ninguna de las muestras aisladas mostró crecimiento en medio TSA suplementado con kanamicina. Las muestras de las cabras 6, 16 y 24 presentaron crecimiento en medio TSA con estreptomicina, lo cual señala contaminación con la cepa Rev1 en algún momento del experimento. En las cabras 6 y 24, en las que hubo aislamiento de Rev1, hubo también aislamiento de la cepa 16M, al encontrar que en al menos uno de los órganos también hubo crecimiento en medio suplementado con penicilina G, lo que indica la presencia de las dos cepas en la misma muestra. En las hembras 15, 18, 19, 21 y 23 hubo crecimiento en medio TSA suplementado con penicilina G, lo que indica la presencia de la cepa 16M. Todos los aislamientos fueron positivos a la prueba de ureasa y resultaron Gram negativos. En las **Figuras 4 y 5** se muestran ejemplos de las pruebas realizadas. En el **Cuadro 7** se presenta el resumen del aislamiento e identificación de las cepas de *B. melitensis* aisladas.

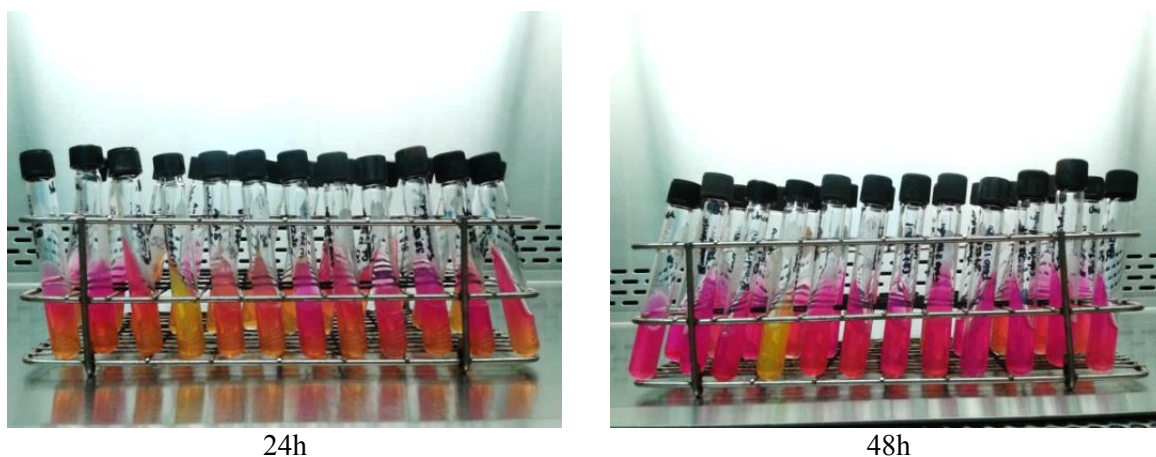
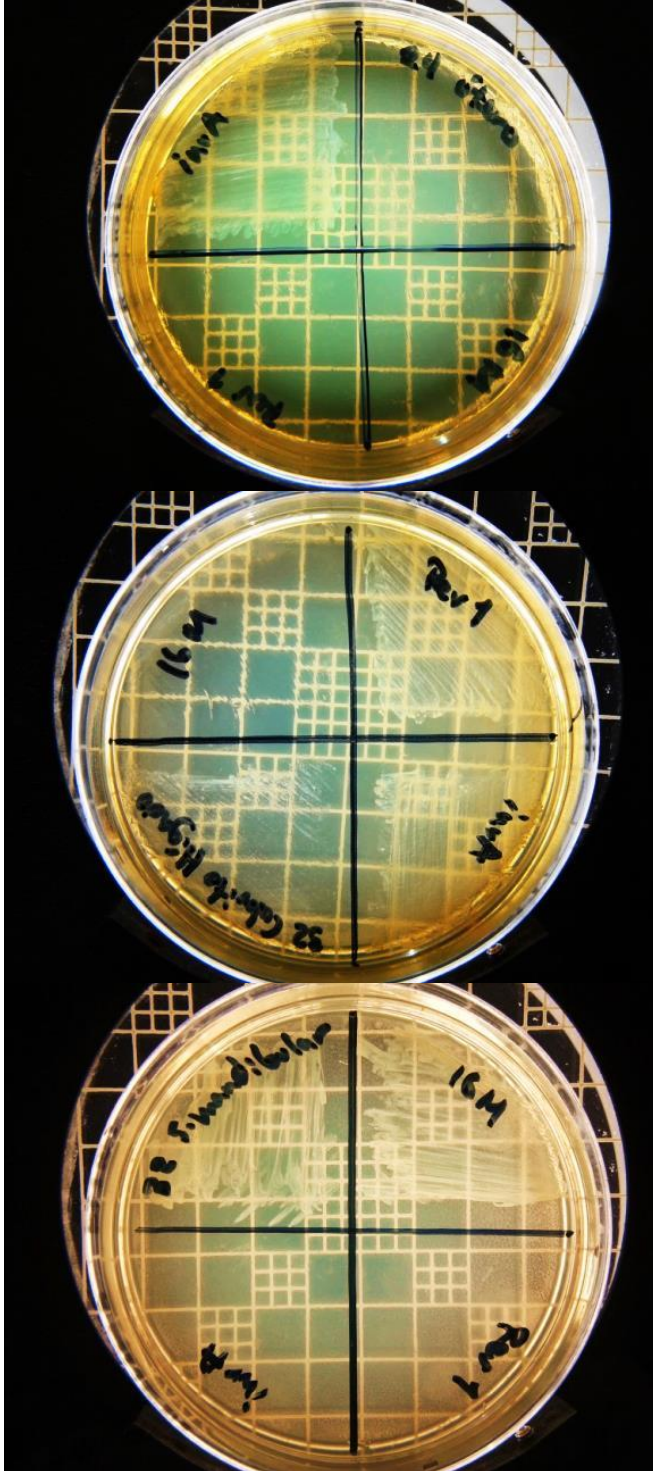


Figura 4. Prueba de Ureasa a las 24h y 48h de los aislamientos *B. melitensis*. Se observa en color rosa los positivos y en amarillo negativos a la prueba. Los primeros tres tubos de izquierda a derecha: *B. melitensis* 16M, *B. melitensis* Rev 1 y *B. melitensis* Rev1/*invA*. Cuarto tubo negativo. Quinto tubo en adelante: muestras positivas de los aislamientos obtenidos a partir de órganos de las hembras



Medio suplementado con Kanamicina

Cuadrante Superior

Izquierdo: *B. melitensis* Rev1/*invA*

Derecho: muestra problema

Cuadrante Inferior

Izquierdo: *B. melitensis* Rev1

Derecho: *B. melitensis* 16M

Medio suplementado con Estreptomicina

Cuadrante Superior

Izquierdo: *B. melitensis* 16M

Derecho: *B. melitensis* Rev1

Cuadrante Inferior

Izquierdo: muestra problema

Derecho: *B. melitensis* Rev1/*invA*

Medio suplementado con Penicilina G

Cuadrante Superior

Izquierdo: muestra problema

Derecho: *B. melitensis* 16M

Cuadrante Inferior

Izquierdo: *B. melitensis* Rev1/*invA*

Derecho: *B. melitensis* Rev1

Figura 5. Identificación de la cepa de *B. melitensis* por el crecimiento en medio TSA suplementado con antibióticos. Controles y muestras problema.

Cuadro 7. Resumen de ocurrencia de aborto, aislamientos e identificación de las cepas de *B. melitensis*

<u>Grupo</u>	<u>Cabra</u>	<u>Aborto</u>	<u>Aislamiento de Órgano</u>	<u>Cepa</u>
<i>invA</i>	6	No	LN: parotídeo, retrofaríngeo, prescapular, supramamario Bazo, Útero y Glándula mamaria Cabrito: Pulmón	16M/Rev1
Rev1	15	No	LN: submandibular	16 M
	16	No	Útero	Rev1
SSF	17	Sí		
	18	No	LN: prescapular	16 M
	19	No	Cabrito 2: Bazo	16 M
	21	Sí	LN: parotídeo Glándula mamaria y Placenta Feto 1: Hígado, Bazo y Feto 2: Pulmón	16 M
	23	No	LN: submandibular	16 M
	24	No	LN: submandibular, parotídeo, mesentérico Bazo Cabrito: Hígado y Pulmón Hisopo Uterino	16M/Rev1

Determinación de la Temperatura de Alineamiento en la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Punto Final

Se realizaron gradientes a diferentes temperaturas, de 50 a 61° C, para determinar la temperatura de alineamiento de los iniciadores y de amplificación de las secuencias del gen constitutivo y de las citocinas seleccionadas en PCR punto final y posteriormente establecer la temperatura en *qPCR*. En las **Figuras 6 y 7** se muestran en geles de agarosa al 1% con las temperaturas en donde hubo coincidencia de más de una secuencia en las diferentes temperaturas.

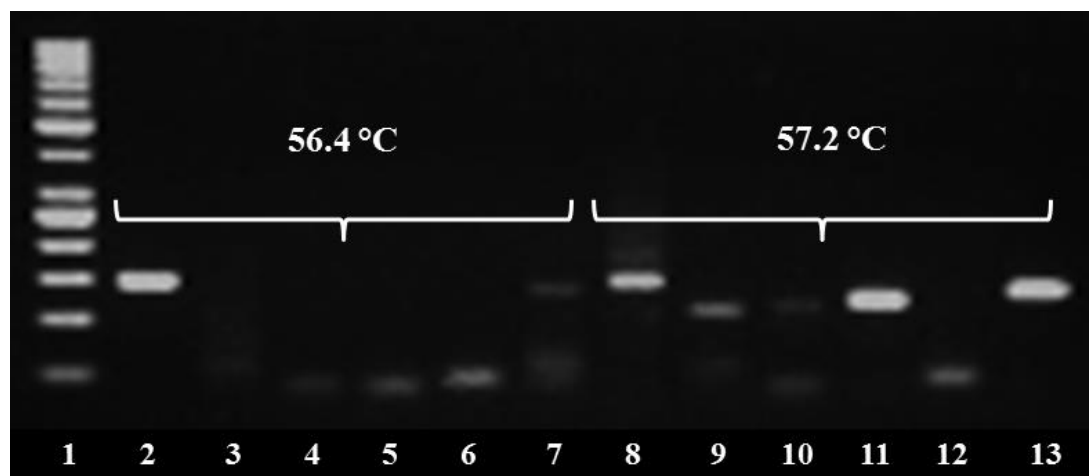
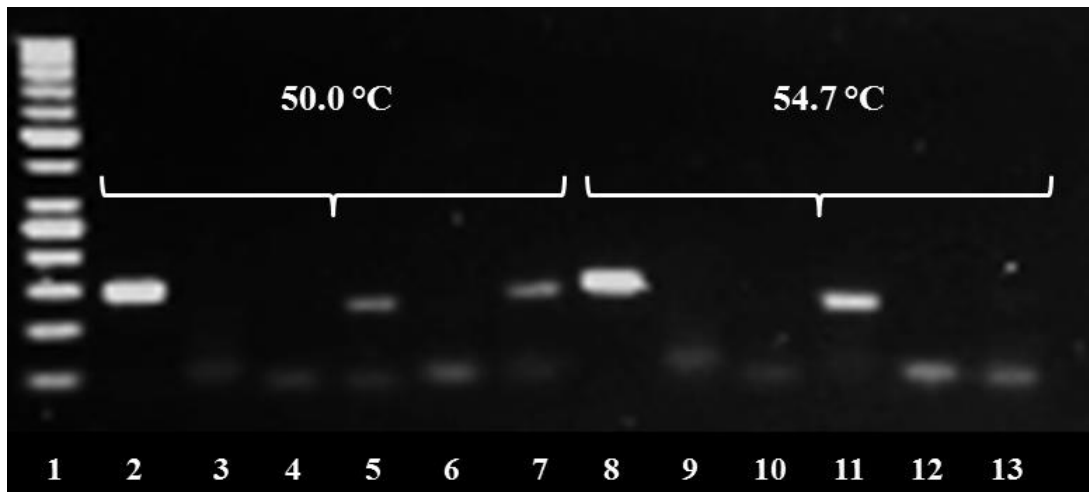


Figura 6. Gradientes para las secuencias de GAPDH, IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-12 en Gel de Agarosa al 1%. Carril: 1: marcador de tamaño. 2 y 8: GAPDH. 3 y 9: IL-4. 4 y 10: IL-10. 5 y 11: TNF- α . 6 y 12: IFN- γ . 7 y 13: IL-12.

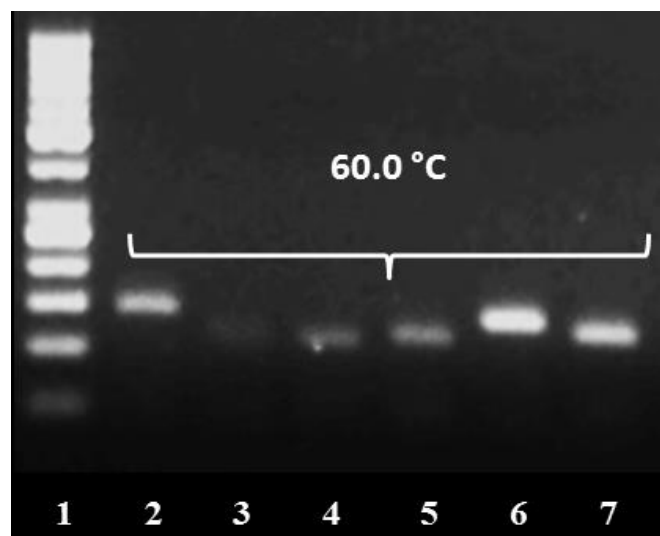


Figura 7. Secuencias de GAPDH, IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-12 en Gel de Agarosa al 1%. Carril: 1: marcador de tamaño. 2: GAPDH. 3: IL-4. 4: IL-10. 5: TNF- α . 6: IFN- γ . 7: IL-12.

Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

Por motivo de diferencia en la dosis en los grupos vacunados los experimentos se realizaron hasta la estandarización de las secuencias de GAPDH, TNF- α e IFN- γ . De forma preliminar en las **Figuras 8, 9 y 10** se muestran las curvas de amplificación y análisis realizados con el software LigtCycler® 480 SW 1.5.

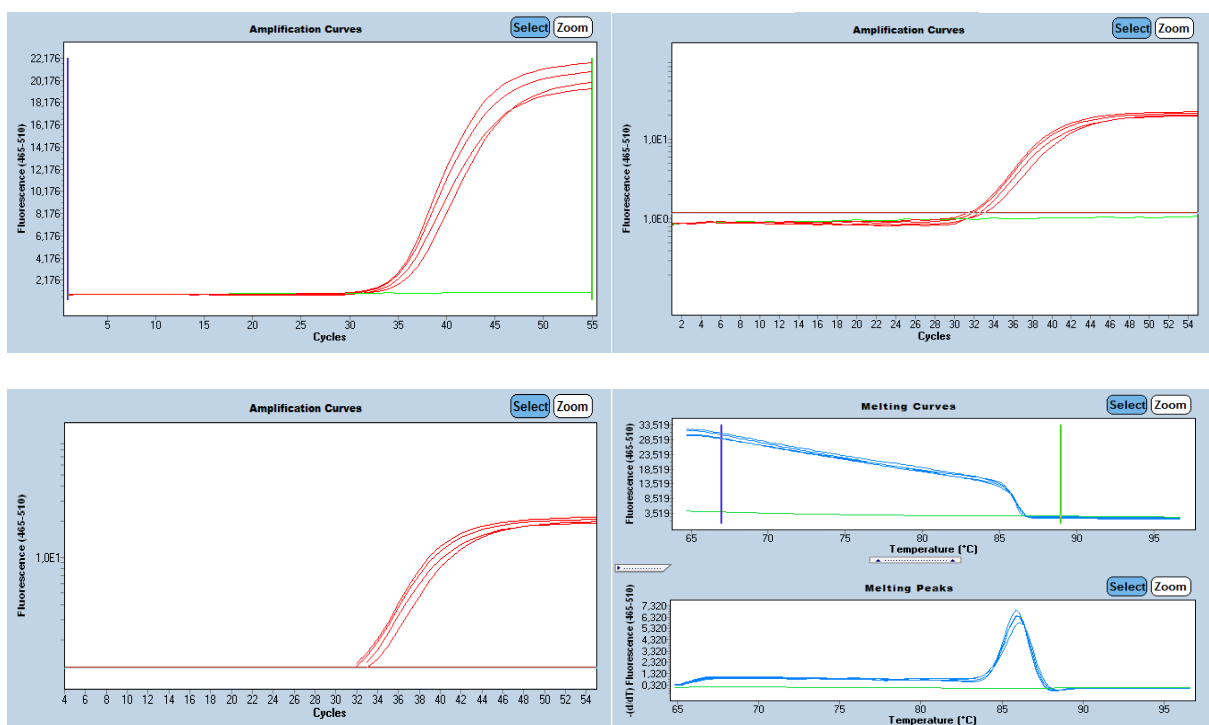


Figura 8. Análisis de Curvas de amplificación para GAPDH en qPCR en 60° C.
Superior izquierda: curva de amplificación. **Superior derecha:** análisis de ruido de banda.
Inferior izquierda: análisis de umbral. **Inferior derecha:** análisis de curva y pico de fusión.

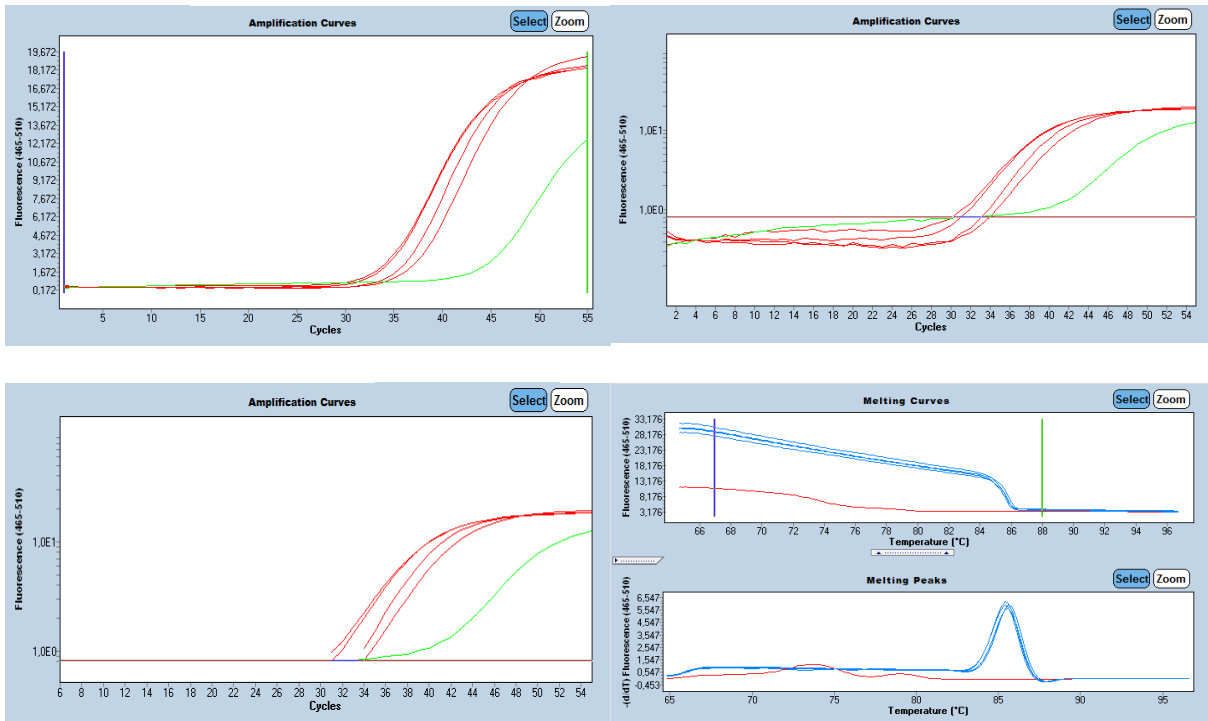


Figura 9. Análisis de Curvas de amplificación para TNF- α en qPCR en 60° C.
Superior izquierda: curva de amplificación. **Superior derecha:** análisis de ruido de banda.
Inferior izquierda: análisis de umbral. **Inferior derecha:** análisis de curva y pico de fusión.

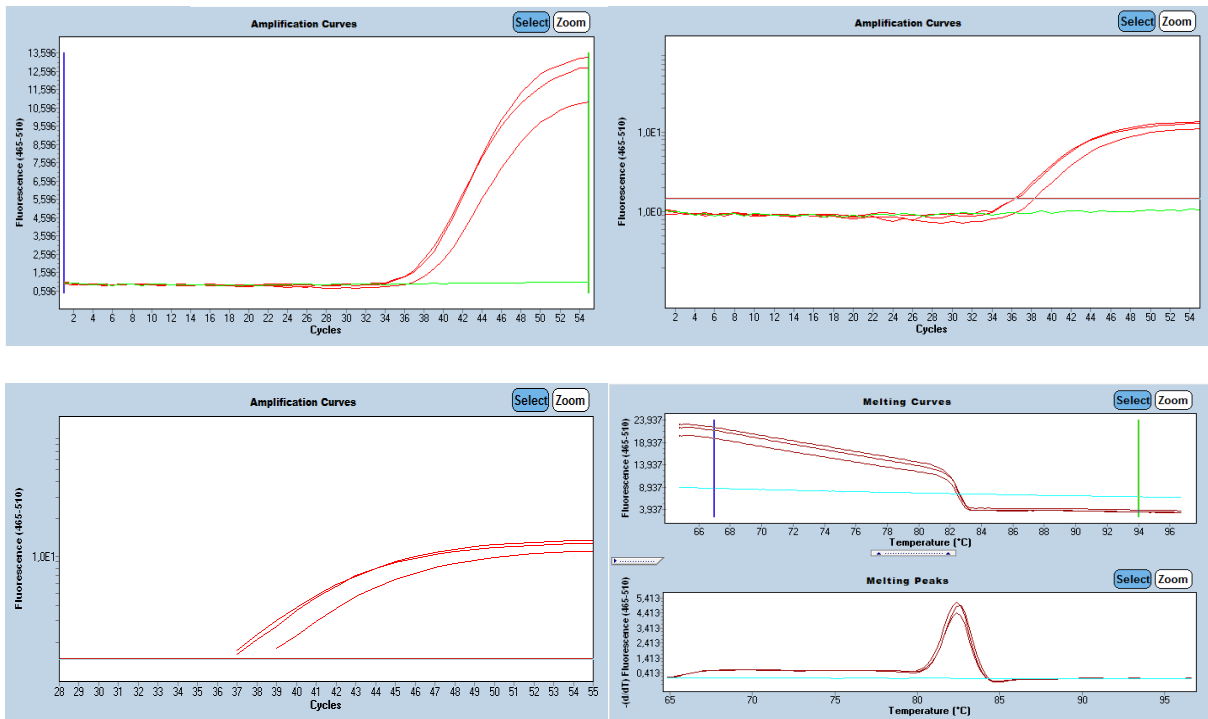


Figura 10. Análisis de Curvas de amplificación para IFN- γ en qPCR en 60° C.
Superior izquierda: curva de amplificación. **Superior derecha:** análisis de ruido de banda.
Inferior izquierda: análisis de umbral. **Inferior derecha:** análisis de curva y pico de fusión.

El software LigtCycler® 480 SW 1.5 en el análisis de curva melting se puede discernir entre la fluorescencia producida por los amplicones o por estructuras secundarias que puedan producir fluorescencia, como se muestra en las figuras anteriores. Adicional a este análisis se realizó un gel de agarosa al 1% de muestras estimuladas con PWM para visualizar la ausencia de estructuras secundarias **Figura 11**.

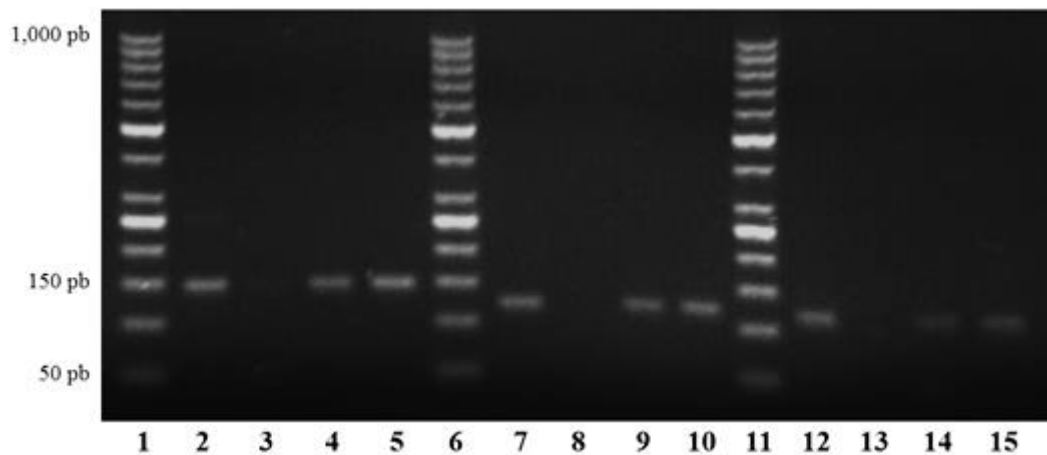


Figura 11. Gel de Agarosa al 1% para GAPDH, TNF- α e IFN- γ post-qPCR Carril 1, 6, 11: marcador de tamaño. **2:** control positivo GAPDH, **3:** control de reacción negativo GAPDH (H₂O), **4 y 5:** muestras positivas para GAPDH. **7:** control positivo TNF- α , **8:** control de reacción negativo TNF- α (H₂O), **9 y 10:** muestras positivas para TNF- α . **12:** control positivo IFN- γ , **13:** control de reacción negativo IFN- γ (H₂O), **14 y 15:** muestras positivas para IFN- γ .

DISCUSIÓN

Respuesta Serológica

La medición de la respuesta serológica mediante las pruebas diagnósticas de rutina está dirigida hacia el LPS de las especies lisas de *Brucella* ⁷⁸. Las cepas de *B. melitensis* Rev1 y *B. melitensis* Rev1/*invA* utilizadas en este trabajo tienen la misma composición estructural de LPS que la cepa virulenta *B. melitensis* 16M, por lo que se esperaba una respuesta serológica medible contra el mismo con la Prueba de Tarjeta al 3%. En el presente estudio se obtuvo una respuesta serológica positiva en las hembras con un el número máximo de 7/8 cabras, entre los 15 y los 21 días p.v., en los grupos Rev1 e *invA* respectivamente. La respuesta serológica se redujo rápidamente en el grupo Rev1 y para el día 45 p.v. ya no se encontraron reacciones serológicas positivas, mientras que en el grupo *invA* se extendió, en un individuo, hasta el día 110. En diferentes estudios realizados en pequeños rumiantes se han obtenido resultados diversos con la administración de dosis reducida. Sin embargo, la respuesta serológica obtenida en este trabajo fue de muy corta duración en ambos grupos, particularmente en el grupo Rev1, ya que en estudios similares con la administración subcutánea de dosis reducida (10^6 UFC/mL) de Rev1 en borregas se obtuvo respuesta serológica medible con la Prueba de Tarjeta con duración de 4 a 8 semanas (n=43) ⁷⁹. En otro estudio, a las 4 semanas el 90% de las borregas utilizadas mantuvo una respuesta seropositiva a la Prueba de Tarjeta, cerca del 40% a las 12 semanas y la respuesta se redujo paulatinamente hasta un 20% a las 36 semanas (n=92) ⁸⁰. Como se mencionó anteriormente, la razón de estas diferencias en la duración de la respuesta serológica puede ser por la diferente eficiencia de las cepas vacunales de Rev1 utilizadas en los diferentes estudios ⁶⁷.

Tras observar la corta duración de la respuesta serológica en el grupo Rev1 se realizó el conteo de UFC de un frasco de la vacuna de Rev1 del mismo lote y se encontró que la dosis fue de 1×10^3 UFC/mL, la cual dista de la dosis indicada por la campaña y la recomendada internacionalmente, dicha discrepancia entorpece la comparación de resultados de este trabajo. El día en que se realizó la vacunación, ambas cepas vacunales se mantuvieron en refrigeración y cubiertas de la luz solar durante el transporte al corral y la vacunación,

manteniendo así la cadena fría, por lo que descartamos un error en este sentido. Con la administración de dosis reducidas la subsecuente respuesta serológica resulta con menor duración que con la vacunación con dosis estándar⁸⁰. La vacunación con dosis estándar en animales jóvenes induce una respuesta serológica medible desde las dos semanas y puede durar en algunos animales hasta los 6 meses (o más) y ha demostrado ser la mejor dosis y etapa fisiológica para la vacunación y protección contra el aborto, independientemente de la vía de administración^{67, 69}. La respuesta positiva a la Prueba de Tarjeta es aparentemente influenciada por la dosis administrada, no sólo en la proporción de animales positivos sino también en la duración de las reacciones seropositivas⁷⁹. La respuesta inmune mediada por células juega un papel principal en la defensa contra la infección por *Brucella* spp., la respuesta humoral no se relaciona con una inmunidad protectora, pero es un indicativo de la estimulación antigénica producida⁸⁰. Por otro lado, se menciona que la protección a largo plazo requiere de la persistencia de anticuerpos inducidos por la vacuna y en la generación de células de memoria capaces de una rápida reactivación⁸¹.

Se esperaba una respuesta serológica detectable en los grupos vacunados, resultante de una respuesta inmune secundaria; sin embargo, no se obtuvo respuesta serológica evidente en ninguno de los grupos vacunados p.d., salvo en las hembras en donde hubo aislamiento de *B. melitensis* 16M (cabras 6 y 15); en las demás hembras vacunadas no se encontró respuesta serológica alguna. La Prueba de Tarjeta al 3% se realizó en tres ocasiones diferentes con sus respectivos controles. En una respuesta inmune secundaria los anticuerpos son producidos más rápidamente y en mayor cantidad debido a la presencia de linfocitos B de memoria de reactivación rápida. En general, las células de memoria (linfocitos B y T) se encuentran estratégicamente en los órganos linfoides secundarios o en el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), listas para iniciar una respuesta inmune secundaria tras la re-exposición con el antígeno^{82, 83}. En animales protegidos contra la brucelosis clínica, la respuesta inmune está sujeta a variación individual incluso bajo condiciones controladas y no siempre puede ser detectable por algunas técnicas diagnósticas, se ha propuesto que la magnitud y la duración de una respuesta inmune detectable deben ser reducidas en animales vacunados tras eliminar la infección más pronto. En este sentido, las técnicas diagnósticas con mayor sensibilidad en rumiantes son

ELISA indirecta y el Ensayo por Fluorescencia Polarizada (FPA), en comparación con la Prueba de Tarjeta al 3% ⁸⁴.

Tampoco se obtuvo respuesta serológica en los animales no vacunados (grupo SSF) p.d. En la infección natural se puede esperar una respuesta serológica de 2-4 semanas post-infección, pero la respuesta puede no presentarse o ser variable dependiendo de la vía de infección, dosis, cepa y estatus fisiológico, entre otros factores ^{51, 84}. En la infección del útero grávido puede esperarse una prolongada y persistente alza de títulos de anticuerpos, pero esta respuesta puede ser retardada hasta el momento del aborto o del parto. Si la infección se encuentra muy localizada, como en la glándula mamaria o en algunos LN la estimulación de la respuesta serológica puede ser mínima ¹⁵.

De la misma forma se esperaba encontrar respuesta serológica positiva la prueba de IDR en el grupo SSF p.d., pero al no encontrar resultados positivos, se puede pensar que la dosis de desafío utilizada, el estado fisiológico de las hembras al momento del desafío y el tiempo que las hembras estuvieron expuestas a la bacteria, podrían estar relacionados con la respuesta negativa. En otros experimentos con sueros de pequeños rumiantes con historial de infección natural se encontró que la prueba de IDR tuvo un 94.5% de sensibilidad, y en animales vacunados, la prueba de IDR demostró tener la mayor especificidad al diferenciar los animales infectados de los vacunados ⁸⁵. La unión de los anticuerpos a los haptenos es mediante enlaces no covalentes y se genera una interacción reversible, para que se generen anticuerpos de alta afinidad hacia los mismos se requiere de una exposición prolongada con el antígeno ⁸⁶. Probablemente el tiempo de exposición al antígeno (40 días), aunado al estado fisiológico de las hembras y la dosis de desafío administrada no fueron suficientes para generar los anticuerpos para producir una reacción positiva a IDR.

Protección contra la cepa Virulenta

En el presente estudio se obtuvo aislamiento de la cepa virulenta del 62.5% (5/8) de las hembras del grupo SSF (cabras 18, 19, 21, 23 y 24), no se puede determinar la susceptibilidad al o protección contra el aborto en los grupos evaluados, ya que se obtuvieron gestaciones en diferentes tiempos o no hubo gestación a pesar de la sincronización del estro. En otros estudios se han obtenido porcentajes del 90-100% en

aislamiento y presencia de aborto en el grupo control, en aquellos experimentos se han utilizado dosis de 1×10^7 UFC de *B. melitensis* 16M en ambos ojos en hembras gestantes y de 1×10^9 UFC en no gestantes, realizando la necropsia de los animales hasta 30 días después del parto o aborto ^{87, 88, 89}. Con la cepa virulenta de *B. melitensis* 53H38 se utilizan dosis de 5×10^7 UFC en ambos ojos, inoculando desde 90 días de gestación, obteniendo la mayor frecuencia de aislamientos a las dos semanas posteriores al aborto o parto ^{51, 60, 84}. Para incrementar el número de aislamientos se recomienda sembrar simultáneamente y por duplicado en medio básico y selectivo, y sembrar el mayor número de placas por órgano que sea posible, ya que el aislamiento depende de la cantidad y viabilidad de las bacterias presentes en la muestra, y de la contaminación con otras bacterias que pueden afectar el aislamiento primario ^{20, 22}.

Adicionalmente a la baja dosis de desafío en este experimento, la vía de inoculación conjuntival pudo haber influido en una pronta eliminación de la infección. La respuesta inmune en las membranas mucosas (como la conjuntiva) está asociada con MALT, en la que seguido a la exposición al antígeno, la respuesta inmune adaptativa es iniciada en el sitio y resulta en la generación de inmunoglobulinas, así como también en células T efectoras y reguladoras ⁹⁰. En un experimento realizado en bovinos observaron que la inoculación con la cepa virulenta de *B. abortus* por vía conjuntival produjo de forma incidental, en algunas de las hembras, una respuesta inmune lo suficientemente fuerte para eliminar la infección, observando una diseminación reducida en comparación con la inoculación subcutánea ⁹¹. En experimentos en borregas con infección experimental por vía conjuntival con una cepa virulenta de *B. melitensis* se observó que en unos pocos días las bacterias fueron controladas ⁵¹. En cabras se encontró que el desafío experimental con *B. melitensis* H38 con dosis de 10^5 UFC/mL fue menos severo de lo que se esperaba y sólo se recuperaron pocas colonias de los LN cercanos a la cabeza y en pocos animales se encontró una infección generalizada ⁹². Con esto se puede decir que la dosis de 4×10^5 UFC/mL utilizada en el presente trabajo pudo ser suficiente en las hembras susceptibles (gestantes) del grupo SSF para lograr el aislamiento de la cepa virulenta o producir el aborto en las cabras 17, 19, 21, y 24; igualmente se logró el aislamiento en dos de las hembras no gestantes (Cabras 18 y 23) y las dos restantes (Cabras 20 y 22) probablemente lograron controlar la infección.

Por otro lado, se recuperó la cepa Rev1 en medio suplementado con estreptomina en la cabra 6, 16 y 24, de los grupos *invA*, Rev 1 y SSF respectivamente, lo que indica que en algún momento del experimento hubo contaminación con esta cepa, en los grupos. Como se mencionó anteriormente, el trabajo formó parte de una investigación en la que se compartieron las instalaciones simultáneamente con otros proyectos en los que se probó otra cepa mutante de Rev1, probablemente la contaminación surgió de los abortos provocados por el desafío en cabras gestantes con la cepa Rev1 en dosis reducida. Al no conocer el momento exacto ni la carga bacteriana con la que hubo contaminación no podemos explicar si la infección con ambas cepas (Rev1 y 16M) tiene algún efecto positivo o negativo, por un lado no hubo aborto en las hembras en las que hubo contaminación pero por otro lado hubo diseminación de las cepas hacia el útero y los cabritos. En los grupos vacunados en 2 de las hembras se logró aislar la cepa 16M (cabra 6 y 15). Lo que indica que hubo protección del 87.5% (7/8) de las hembras contra la misma cepa. Estas hembras resultaron positivas a la Prueba de Tarjeta al 3% en los últimos días de muestreo p.d. La cabra 15 del grupo Rev1 no mostró anticuerpos durante el muestreo p.v., a diferencia de la cabra 6 en la que si hubo reacciones seropositivas. El aislamiento de la cepa 16M en la cabra 6 del grupo *invA* a pesar de haber sido positiva a la Prueba de Tarjeta al 3% podría ser asociada a la contaminación con Rev1 o a que realmente no fue protegida contra la infección de la cepa virulenta. No hubo aislamiento en medio suplementado con kanamicina de la cepa Rev1/*invA* en ninguna de las hembras en donde hubo aislamiento, lo que descarta persistencia de la cepa Rev1/*invA* o la contaminación por la misma hacia los otros grupos.

Estandarización de PCR tiempo real

Uno de los objetivos planteados para este trabajo era la evaluación de la expresión de citocinas en PCR tiempo real, se decidió no llevarlo a cabo por la diferencia de dosis en los grupos vacunados, pero se estandarizó la prueba para GAPDH, TNF- α e IFN- γ . Si bien existen métodos para evaluar la respuesta inmune celular Th1 por la identificación de marcadores de superficie celular por medio de citometría de flujo ^{93, 94}, la medición de las citocinas en suero por ELISA ⁹⁵ o en ensayos de liberación de IFN- γ (u otras citocinas) ^{51, 96}, la medición de la expresión de citocinas mediante *q*PCR puede fungir como un análisis

complementario. La desventaja de la *q*PCR frente a las pruebas antes mencionadas es la correlación de la expresión de mRNA con la producción de la citocina, pero tiene las ventajas de poder utilizar secuencias para cualquier citocina, no se requiere de incubar a las PBMC con antígenos o células vivas de *Brucella* ssp., lo que implica un riesgo de infección para el personal. El costo de las pruebas es un factor a considerar así como también la capacitación del personal en cuestión. Adicionalmente, se puede mejorar la detección de las secuencias con el uso de sondas y con las coincidencias en las temperaturas de alineamiento obtenidas en los ensayos se podría pensar en la estandarización de una PCR multiplex.

Utilización de la mutante *invA* de *B. melitensis* Rev1 como inmunógeno en el modelo caprino

Los resultados de la atenuación *in vivo* en el modelo murino de la cepa virulenta de *B. melitensis* mutada en el gen *invA*⁷⁶ condujo a la mutación de la cepa vacunal en el mismo gen esperando que la modificación de la sobrevivencia de la bacteria en el medio intracelular produzca una atenuación suficiente, pero que al mismo tiempo persista y se multiplique por el tiempo suficiente para generar una respuesta inmune protectora. Los resultados demuestran que la cepa mutante Rev1/*invA* es atenuada y tiene un comportamiento similar a Rev1 en cuanto a la respuesta serológica. A su vez, dado que se obtuvieron gestaciones a diferentes tiempos, a pesar de la sincronización del estro, es muy probable que para la vacunación con Rev1/*invA* se tenga que seguir la misma recomendación de esperar por lo menos un mes después de la vacunación para comenzar los empadres^{16, 67}. Para poder recomendar a Rev1/*invA* como candidato para vacuna se requiere de un mayor número de experimentos. Se conocen datos *in vitro* e *in vivo* de la mutación en la cepa virulenta en el modelo murino, pero no se conocen datos de virulencia residual o inmunogenicidad para Rev1/*invA*. Además se requiere de probar la dosis estándar en animales jóvenes, ensayos de colonización, abortogenicidad en hembras gestantes y su probable uso en machos. Adicionalmente se requiere de un método de mutación del gen que no requiera de la inserción de un casete de resistencia a antibiótico (en este caso kanamicina) y que se realice en la cepa vacunal de referencia internacional. Al probar y superar a la vacuna Rev1 en estos aspectos, se podrá considerar a Rev1/*invA* como

un candidato para la vacunación contra *B. melitensis* en caprinos y probablemente en otras especies.

Dada la exitosa erradicación de *B. abortus* y *B. melitensis* en algunos de los países, se cuestiona si las investigaciones en la generación de nuevas vacunas son necesarias. La respuesta es que la organización y las condiciones ambientales favorables encontradas en los países en donde se ha logrado erradicar son un factor importante y esas condiciones son difícilmente alcanzables o siquiera posibles en muchas de las áreas en donde la brucelosis es endémica³⁵. La ausencia de una vacuna segura para animales gestantes y para humanos ha generado diferentes estrategias para el desarrollo de nuevas alternativas, cada una con de ellas con sus ventajas y desventajas. Dentro de los candidatos se encuentra la bacterina de *B. melitensis* H38^{16, 42, 66}, subunidades antigénicas (como proteínas recombinantes)⁵², vacunas de DNA^{42, 52, 81} y la irradiación de *Brucella* spp. con rayos gamma⁶². De los candidatos a vacunas de *Brucella* spp. descritos en la literatura, sólo pocas han sido probados en los hospederos naturales, ninguno de los candidatos ha probado ser adecuado al no conferir una protección superior a las vacunas disponibles^{35, 97}.

El desarrollo de vacunas protectoras contra *Brucella* spp. requiere de la selección de un protocolo de vacunación que favorezca un perfil de células Th1, la presentación de antígenos y la inmunidad humoral. Para lo cual las vacunas vivas parecen ser las herramientas más factibles y potentes para desarrollar células Th de este tipo de respuesta. La gran mayoría de los estudios en vacunas son analizados por la respuesta serológica que producen y no incluyen una caracterización de las células de memoria^{48, 62}. Con el conocimiento desarrollado en años recientes y los años por venir, es muy probable y deseable que las investigaciones en vacunas incluyan parámetros de protección contra la enfermedad clínica, respuesta serológica protectora y memoria inmunológica. Y que para obtener y evaluar estos resultados es necesario que se conozca el tiempo, la duración y la producción del perfil de citocinas adecuado para lograrlo.

CONCLUSIONES

En el presente estudio pudimos observar que la vacunación en el modelo caprino con la dosis reducida de la cepa *Rev1/invA* produce una respuesta inmune humoral detectable por la prueba de tarjeta al 3% de menor duración a la obtenida en otros estudios con la cepa de referencia de *Rev1*, lo que sugiere una menor interferencia en el diagnóstico con esta prueba y con la prueba de IDR al no observar reacciones positivas.

En el presente experimento se observó que la cepa *Rev1/invA* es atenuada al no haber sido identificada en ninguna de las hembras en las que se obtuvieron aislamientos. Si bien la dosis de desafío y el número de hembras gestantes en los diferentes grupos no fueron suficientes para evaluar la protección contra el aborto, la vacunación con *Rev1/invA* demostró ser suficiente contra la diseminación generalizada de la cepa virulenta tras el desafío experimental.

Se requieren más experimentos para recomendar el uso de la cepa *Rev1/invA* y poder afirmar que existen ventajas debido a la mutación inducida y que no simplemente fue generada por la utilización de la cepa *Rev1*.

La información en el modelo caprino es escasa por lo que es importante la generación de nueva información, las hembras caprinas gestantes pueden funcionar como un paso en la evaluación de seguridad de las vacunas candidato y poder pensar en el uso en el modelo de primates no humanos para poder dilucidar su posible uso en humanos. El diseño de iniciadores y la estandarización de la PCR realizada en este trabajo pueden ser utilizadas como análisis complementario en la medición de las citocinas involucradas en la generación de una respuesta inmune celular y humoral requerida para la protección contra la brucelosis.

REFERENCIAS

1. Organización mundial de la Salud (OMS). Brucellosis in humans and animals. [En línea 2014. Citado el 27 de agosto de 2014]. Disponible en: <http://www.who.int/csr/resources/publications/Brucellosis.pdf>
2. Blasco JM, Molina-Flores B. Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 2011; 27 (1); 95-104
3. Potter ME. Chapter 15. Brucellosis. In: Morris G, Potter ME. Foodborne Infections and Intoxications 4th Ed. Academic Press. USA. 2013: 239-249
4. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos E.V. The new global map of human brucellosis. Lancet: Infectious Diseases 2006; 6: 91-99
5. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. Veterinary Microbiology 2010; 140: 392-398
6. Pappas G, Panagopoulou P, Christou L, Akritidis N. *Brucella* as a biological weapon. Cellular and Molecular Life Sciences 2006; 63: 2229-2236
7. Pappas G, Panagopoulou P, Christou L, Akritidis N. Category B potential bioterrorism agents: bacteria, viruses, toxins, and foodborne and waterborne pathogens. Infectious Disease Clinics of North America 2006; 20: 395-421
8. Dirección General de Epidemiología. Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la brucelosis. [En línea 2014. Citado el 27 agosto de 2014]. Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig_epid_manuales/03_2012_Manual_Brucelosis_vFinal_13nov12.pdf
9. Osegura D, Frankena K, Udo H. Prevalence and risk factors for brucellosis in goats in areas of Mexico with and without brucellosis control campaign. Tropical Animal Health Production 2013; DOI 10.1007/s11250-013-0375-
10. Memish ZA, Balkhy HH. Brucellosis and International Travel. Journal of Travel Medicine 2004; 11: 49-55
11. Luna-Martínez J.E, Mejía-Terán C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. Veterinary Microbiology. 2002; 90: 19-30
12. López-Merino A, Migranas-Ortíz R, Pérez-Miravete A, Magos C, Salvatierra-Izaba B, Tapia-Conyer R, *et al.* Seroepidemiología de la brucelosis en México. Salud Pública 1992; 34: 230-240

13. Dirección General de Epidemiología. Información Epidemiológica. Boletín Histórico. [En línea 2015; citado el 29 enero 2015] disponible en:
http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/boletin/intd_historicos.html
14. Secretaría de Salud. Información Epidemiológica de Morbilidad Reporte Correspondiente a Diciembre de 2013. [En línea 2014. Citado el 27 de agosto de 2014] Disponible en:
http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/inf_morbilidad/2013/12Reporte%20diciembre_2013.pdf
15. Comité Científico en Salud Animal y Bienestar Animal. Brucellosis in sheep and goats (*Brucella melitensis*). [En línea 2014. Citado el 11 de Septiembre de 2014]. Disponible en:
http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scah/out59_en.pdf
16. Alton GG. Control of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats - A review. Tropical Animal Health and Production 1987; 19; 65-74
17. Matthews J. Abortion. In: Matthews J. Diseases of the Goat 3rd Ed. Wiley-Blackwell. UK. 2009: 36-36
18. Smith MC, Sherman DM. Reproductive System. In: Goat Medicine 2nd Ed. Wiley-Blackwell. USA. 2009: 588-589
19. Elzer PH, Hagius SD, Davis DS, del Vecchio VG, Enright FM. Characterization of the caprine model for ruminant brucellosis. Veterinary Microbiology 2002; 90; 425-431
20. Alton GG, Jones LM, Pietz DE. Laboratory techniques in brucellosis. World Health Organization monograph series no. 55. Geneva. 1975
21. Marín CM, Blasco JM. Diagnóstico bacteriológico de la brucelosis animal. In: Díaz E, Hernández, Valero G, Arellano B, et al. Diagnóstico de brucelosis animal. SAGAR, INIFAP, IICA, OMS-OPS. México. 2000: 20-38
22. Garin-Bastuji B, Blasco JM, Marín C, Albert D. The diagnosis of brucellosis in sheep and goats, old and new tools. Small Ruminant Research 2006; 62; 63-70
23. Díaz E, Blasco JM, Suárez F. Prueba de tarjeta modificada para el diagnóstico de la brucelosis caprina. Veterinaria México. 1999; 30 (4); 307-311
24. Hernández L, Díaz E. Prueba de inmunodifusión radial con hapteno nativo para el diagnóstico de la brucellosis, In: Díaz E, Hernández, Valero G, Arellano B, et al. Diagnóstico de brucelosis animal. SAGAR, INIFAP, IICA, OMS-OPS. México. 2000: 92-97
25. Moreno E. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. Frontiers in Microbiology 2014; 5: 213

26. Norma Oficial Mexicana. NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales.
27. Solorio-Rivera JL, Segura-Correa JC, Sánchez-Gil LG. Seroprevalence of and risk factors for brucellosis of goats in herds of Michoacan, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine* 2007; 82: 282-290
28. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Situación Zoonositaria en los Estados de la República Mexicana (2 de diciembre de 2014) [en línea 2014; citado el 5 enero 2015] disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=26787>
29. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Situación Actual [en línea 2015; citado el 27 enero 2015] disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4414>
30. Moreno E. Brucellosis in Central America. *Veterinary Microbiology* 2002; 90: 31-38
31. Godfroid J, Dahouk SA, Pappas G, Roth F, Matope G, Muma J, *et al.* A “One Health” surveillance and control of brucellosis in developing Countries: Moving away from improvisation. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2013; 36: 241-248
32. Minas A. Control and eradication of brucellosis in small ruminants. *Small Ruminant Research* 2006; 62; 101-107
33. Bowman D.D. Introduction to the alpha-proteobacteria: *Wolbachia* and *Bartonella*, *Rickettsia*, *Brucella*, *Ehrlichia*, and *Anaplasma*. *Topics in Companion Animal Medicine* 2011; 26 (4): 173-177
34. Ficht T. *Brucella* taxonomy and evolution. *Future Microbiology* 2010; 5(6): 859–866.
35. Godfroid J, Scholze HC, Barbier T, Wattiau P, Fretin D, Whatmore AM, *et al.* Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Preventive Veterinary Medicine* 2011; 102: 118-131
36. del Vecchio V.G, Kapatral V, Elzer P, Patra G, Mujer C.V. The genome of *Brucella melitensis*. *Veterinary Microbiology* 2002; 90; 587-592
37. Whatmore AM. Current understanding of genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infection, Genetics and Evolution* 2009; 9: 1168-1184
38. Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Weiss DS, Guzmán-Verri C, Chacón-Díaz C, Rucavado A, Moriyón I, *et al.* *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of the infection. *PLoS ONE*. 2007; 2(7): e631. doi:10.1371/journal.pone.0000631

39. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. *Brucella*: a pathogen without classic virulence genes. *Veterinary Microbiology* 2008; 129: 1-14
40. Barbier T, Nicolas C, Letesson JJ. *Brucella* adaptation and survival at the crossroad of metabolism and virulence. *FEBS Letters* 2011; 585: 2929-2934
41. Gomes P, Costa G, Azevedo V, Costa S. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories* 2006; 5 (13): doi:10.1186/1475-2859-5-13
42. Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ. Brucellosis. New aspects of an old disease. *Journal of Applied Microbiology* 2005; 98: 1270-1281
43. de Jong MF, Rolán HG, Tsolis RM. Innate immune encounters of the (Type) 4th kind: *Brucella*. *Cellular Microbiology* 2010; 12(9): 1195-1202
44. Rambow AA, Petersen EM, Gourley CR, Splitter GA. *Brucella* regulators: self-control in a hostile environment. *Cell Press* 2009; 17 (8); 371-377
45. Dozot M, Bolgegraln RA, Delure RM, Hallez R, Ouahrani-Bettache S, Danse I, *et al.* The stringent response mediator Rsh is required for *Brucella melitensis* and *Brucella suis* virulence, and for expression of the type IV secretion system *virB*. *Cellular Microbiology* 2006; 8(11): 1791-1802
46. Viadas C, Rodríguez MC, Sangari FJ, Gorvel JP, García-Lobo JM, López-Goñi I. Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrS/BvrS two-component regulatory system. *PLoS ONE* 2010; 5(4): e10216. doi:10.1371/journal.pone.0010216
47. Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AE, Ugalde R, *et al.* Cyclic β -1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nature Immunology* 2005; 6(6): 618-625
48. Durward M, Radhakrishnan G, Harms J, Bareiss C, Magnani D, Splitter GA. Active evasion of CTL mediated killing and low quality responding CD8⁺ cells contribute to persistence of brucellosis. *PLoS ONE* 2012; 7(4): e34925. doi:10.1371/journal.pone.0034925
49. Baldwin CL, Goenka R. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: Do bacteria instruct the cell to facilitate chronic infection? *Critical Reviews in Immunology* 2006; 26(5): 407-442
50. Velásquez LN, Delpino MV, Ibañez AE, Coria LM, Cruz M, Scian R, *et al.* *Brucella abortus* induces apoptosis of human T lymphocytes. *Microbes and Infection* 2012; 14: 639-650

51. Pérez-Sancho M, Durán-Ferrer M, García-Seco T, Macías P, García N, Martínez I, *et al.* Interferon-gamma responses in sheep exposed to virulent and attenuated *brucella melitensis* strains. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2014; 160: 123-128
52. Avila-Calderon ED, Lopez-Merino A, Sriranganathan N, Boyle SM, Contreras-Rodríguez A. A history of the development of *Brucella* vaccines. *BioMed Research International* 2013; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/743509>
53. Sengupta D, Koblansky A, Gaines J, Brown T, West AP, Zhang D, *et al.* Subversion of innate immune responses by *Brucella* through the targeted degradation of TLR signaling adapter, MAL. *The Journal of Immunology* 2010; 184: 956–964
54. Costa G, Matos D, Barbosa N, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Costa S. Central role of Myd88-dependent Dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. *The Journal of Immunology* 2008; 180:1080-1087
55. Zhan Y, Liu Z, Cheers C. Tumor Necrosis Factor alpha and Interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by direct mechanisms. *Infection and Immunity* 1996; 64(7): 2782
56. Golding B, Scott DE, Scharf O, Huang LY, Zaitseva M, Lapham C, *et al.* Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes and Infection* 2001; 3: 43-48
57. Paranavitana C, Zelazowska E, Izadjoo M, Hoover D. Interferon- γ associated cytokines and chemokines produced by spleen cells from *Brucella*-immune mice. *Cytokine* 2005; 30: 86-92
58. Zhan Y, Cheers C. Endogenous Interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infection and Immunity* 1995; 63(4): 1387-1390
59. Vitry MA, de Trez C, Gorlely S, Dumoutier L, Akira S, Rhyffel B, *et al.* Crucial role of gamma interferon-producing CD4⁺ Th1 cells but dispensable function of CD8⁺ T cell, B cell, Th2, and Th17 responses in the control of *Brucella melitensis* infection in mice. *Infection and Immunity* 2012; 80(12): 4271-4280
60. Suraud V, Jacques I, Olivier M, Guilloteau LA. Acute infection by conjunctival route with *Brucella melitensis* induces IgG⁺ cells and IFN- γ producing cells in peripheral and mucosal lymph nodes in sheep. *Microbes and Infection* 2008; 10: 1370-1378
61. Murphy E, Robertson GT, Parent M, Hagius SD, Roop RM, Elzer PH, *et al.* Major histocompatibility complex class I and II expression on macrophages containing a virulent strain of *Brucella abortus* measured using green fluorescent protein-expressing brucellae and flow cytometry. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2002; 33: 191-200
62. Vitry MA, Mambers DH, de Trez C, Akira S, Ryffel B, Letesson JJ, *et al.* Humoral immunity and CD4⁺ Th1 cells are both necessary for a fully protective immune

- response upon secondary infection with *Brucella melitensis*. The Journal of Immunology 2014; 192: 3740-3752
63. Barrionuevo P, Delpino MV, Pozner RG, Velásquez LN, Cassataro J, Giambartolomei GH. *Brucella abortus* induces intracellular retention of MHC-I molecules in human macrophages down-modulating cytotoxic CD8⁺ T cell responses. Cellular Microbiology 2013; 15(4): 487-502
 64. Fitch T, Kahl-McDonagh MM, Arenas-Gamboa AM. Brucellosis: The case for live, attenuated vaccines
 65. Muñoz PM, de Miguel MJ, Grilló MJ, Marín C, Barberán M, Blasco JM. Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. Vaccine 2008; 26: 2562-2569
 66. Blasco JM. Existing and future vaccines against brucellosis in small ruminants. Small Ruminant Research 2006; 62: 33-37
 67. Blasco JM. A review of the use of *B. melitensis* Rev1 vaccine in adult sheep and goats. Preventive Veterinary Medicine 1997; 31: 275-283
 68. Banai M. Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: laboratory aspects and field observations. Veterinary Microbiology 2002; 90: 497-519
 69. Fensterbank R, Verger JM, Grayon M. Conjunctival vaccination of young goats with *Brucella melitensis* strain Rev1. Annals of Veterinary Research 1987; 18: 397-403
 70. Alton GG. Duration of the immunity produced in goats by the Rev1 *Brucella melitensis* vaccine. Journal of Comparative Pathology 1966; 76: 241-252
 71. Alton GG. Further studies on the duration of the immunity produced in goats by the Rev1 *Brucella melitensis* vaccine. Journal of Comparative Pathology 1968; 78: 173-178
 72. Cloeckert A, Grayon M, Grépinet O. Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev1 by PCR-RFLP based on a mutation in the *rpsL* gene. Vaccine 2002; 20: 2546-2550
 73. Elberg SS, Faunce K. Immunization against *Brucella* infection. VI. Immunity conferred on goats by a nondependent mutant from a streptomycin-dependent mutant strain of *Brucella melitensis*. The American Journal of Pathology 1955; 31(6): 1065-1075
 74. Gaywee J, Radulovic S, Higgins JA, Azad AF. Transcriptional analysis of *Rickettsia powazekii* invasion gene homolog (*invA*) during host cell infection. Infection and Immunology 2002; 70 (11): DOI: 10.1128/IAI.70.11.6346-6354.2002

75. Gaywee J, Xu W, Radulovic S, Bessman MJ, Azad AF. The *Rickettsia prowazekii* Invasion Gene Homolog (*invA*) Encodes a Nudix Hydrolase Active on Adenosine (5')-pentaphospho-(5')-adenosine*. *Molecular & Cellular Proteomics* 2002; 1(3):179-185
76. Alva J, Arellano B, Hernández R, Suárez F. The *invA* gene of *Brucella melitensis* is involved in intracellular invasion and is required to establish infection in a mouse model. *Virulence* 2014; 5 (4): 1-12
77. Mildvan AS, Xia Z, Azurmendi HF, Saraswat V, Legler PM, Massiah MA, *et al.* Structures and mechanisms of Nudix hydrolases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2005; 433: 129-143
78. Alonso-Urmeneneta B, Marín C, Aragón V, Blasco JM, Díaz R, Moriyón I. Evaluation of Lipopolysaccharides and Polysaccharides of Different Epitopic Structures in the Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Brucellosis in Small Ruminants and Cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1998; 5 (6); 749-754
79. Sales-Henriques HLR, Hueston WD, Hoblet KH, Shulaw WP. Field trials evaluating the safety and serologic reactions of reduced-dose *Brucella melitensis* Rev1 vaccination in adult sheep. *Preventive Veterinary Medicine* 1992; 13: 205-215
80. Delgado S, Cármenes P, Fernández M. Seroprevalences and lack of abortions after vaccination of Churra sheep with reduced doses of Rev.1 *Brucella melitensis* vaccine by subcutaneous or conjunctival routes. *Preventive Veterinary Medicine* 1995; 23: 153-161
81. Zepp F. Principles of vaccine design-lessons from nature. *Vaccine* 2010; 28S: C14-C24
82. Ademokun AA, Dunn-Walters. Immune responses: Primary and secondary. In: *Encyclopedia of life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester 2010. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000947.pub2
83. Zanetti M. Immunological Memory. In: *Encyclopedia of life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester 2013. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000951.pub3
84. Durán-Ferrer M, León L, Nielsen K, Caporale V, Mendoza J, Osuna A, *et al.* Antibody response and antigen-specific gamma-interferon profiles of vaccinated and unvaccinated pregnant sheep experimentally infected with *Brucella melitensis*. *Veterinary Microbiology* 2004; 100: 219-231
85. Díaz E, Marín C, Alonso B, Aragón V, Pérez S, Pardo M, *et al.* Evaluation of serological tests for diagnosis of *Brucella melitensis* infection of goats. *Journal of Clinical microbiology* 1994; 32(5): 1159-1165

86. Rodkey LS, Nisonoff A. Haptens. In: Encyclopedia of life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester 2001.
87. Phillips RH, Elzer PH, Hagius SD, Walker JV, Fatemi MB, Enright FM. A *Brucella melitensis* high-temperature-requirement A (htrA) deletion mutant is attenuated in goats and protects against abortion. *Research in Veterinary Science* 1997; 63: 165-167
88. Kahl-McDonagh MM, Elzer PH, Hagius SD, Walker JB, Perry QL, Seabury CM, *et al.* Evaluation of novel *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants for safety and efficacy in the goat model of brucellosis. *Vaccine* 2006; 24: 5169–5177
89. Edmonds MD, Cloeckaert A, Hagius SD, Samartino LE, Fulton WT, Walker JV, *et al.* Pathogenicity and protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis* $\Delta omp25$ deletion mutant. *Research in Veterinary Science* 2002; 72: 235-239
90. Herbrand H, Pabst O. Immune responses at mucosal surfaces. In: Encyclopedia of life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester 2012. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000901.pub2
91. Plommet M. Live vaccines: virulence, immunogenicity/protection and safety: Historical, Theoretical and practical considerations applied to the *Brucella melitensis* Rev1 vaccine. FAO/WHO/OIE Round Table on the Use of Rev1 Vaccine in Small Ruminants and Cattle; 1995 21-22 de septiembree; Alfort, Francia. Centre National d'Études Vétérinaires et Alimentaires. 1995:7-18
92. Alton GG, Vaccination of goats with reduced doses of Rev.1 *Brucella melitensis* vaccine. *Research in Veterinary Science* 1970; 11(1); 54-59
93. Suraud V, Jacques I, Olivier M, Guilloteau LA. Acute infection by conjunctival route with *Brucella melitensis* induces IgG⁺ cells and IFN- γ producing cells in peripheral and mucosal lymph nodes in sheep. *Microbes and Infection* 2008; 10: 1370-1378
94. Karimina A, Kavoossy G, Khatami S, Zowghi E, Ardestani SK. Study of interleukin-10 and interleukin-12 productions in response from two different *Brucella* strains. *Comparative immunology. Microbiology & Infectious Diseases* 2002; 25: 85-93
95. Demirdag K, Ozden M, Kalkan A, Godekmerdan, Kilic SS. Serum cytokine levels in patients with acute brucellosis and their relation to the traditional inflammatory markers. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2003; 39: 149-153
96. Weynants V, Godfroid J, Limbourg B, Saegerman C, Letesson JJ. Specific bovine brucellosis diagnosis based on in vitro antigen-specific gamma interferon production. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33(3): 706-712
97. Conde-Álvarez R, Arce-Gorvel V, Gil-Ramírez Y, Iriarte M, Grilló MJ, Gorvel JP, Moriyón I. Lipopolysaccharide as a target for brucellosis vaccine design. *Microbial pathogenesis* 2013; 58: 29-43