



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

Evaluación de la capacidad de colonización y abortogenicidad de la cepa mutante
***ΔeryCD de Brucella melitensis* Rev 1 en cabras**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Alfonso Muñoz Muñoz

TUTORA PRINCIPAL DE LA TESIS DRA. BEATRIZ ARELLANO REYNOSO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS

DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

DR. RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2014



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.

El presente trabajo fue financiado por los proyectos:

Comportamiento *in vitro* e *in vivo* de dos cepas mutantes de *Brucella melitensis*, como inmunógenos en el modelo caprino. UNAM-Convocatoria PAPIIT-2010. No. de proyecto IT222511.

Estudio Epidemiológico de Enfermedades que afectan la producción caprina en México. Proyecto No. 48599, SAGARPA-CONACyT.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme realizar esta experiencia.

A la Dra. Beatriz abrimme las puertas para realizar este proyecto.

A mi comité tutorial; El Dr. Efrén y el Dr. Rigo, por sus valiosos comentarios para la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones

A mi novia por su amor y comprensión.

A mi familia por su ayuda incondicional.

A mis amigos por los buenos momentos de trabajo y diversión.

A todas las personas que hicieron posible la realización del proyecto

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUCCIÓN	8
1.1 Distribución geográfica	9
1.2 Características del género	11
1.3 Patogenia	13
1.4 Vacunación contra la brucelosis	15
1.5 Mutantes de <i>Brucella</i> que han sido evaluadas como inmunógenos	18
2 JUSTIFICACION	19
3 HIPÓTESIS	20
4 OBJETIVO	21
4.1 Objetivos específicos	21
5 MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1 Cepas	22
5.2 Animales	22
5.3 Inoculación	23
5.4 Muestreo	23
5.5 Estudio bacteriológico	24
5.6 Extracción de ADN	Error! Bookmark not defined.
5.7 Técnica de PCR	25
6 RESULTADOS	26
6.1 Pruebas serológicas	26
6.2 Presencia de partos y abortos	27
7 DISCUSIÓN	35
8 CONCLUSIONES	38
9 BIBLIOGRAFÍA	39
10 APÉNDICE	47

Resumen

ALFONSO MUÑOZ MUÑOZ. Evaluación de la capacidad de colonización y abortogenicidad de la cepa mutante $\Delta eryCD$ de *Brucella melitensis* Rev 1 en cabras. Bajo la dirección de: Dra. Beatriz Arellano Reynoso, Dr. Efrén Díaz Araricio y Dr. Rigoberto Hernández Castro.

Se desarrolló la mutante *eryCD* a partir de la cepa vacunal Rev 1 de *Brucella melitensis*, con el objetivo de establecer la capacidad de colonización y causar aborto en cabras. Se trabajó con dos grupos de hembras caprinas adultas, de entre 2 y 4 años de edad, que se colocaron en dos grupos de ocho animales cada uno. Se gestaron y se vacunaron a dosis de 1×10^6 UFC/mL, a los 110 días de gestación, un grupo como control con la cepa parental Rev 1 de *B. melitensis* y el otro grupo con la mutante $\Delta eryCD$ Rev 1 de *B. melitensis*. Se mantuvieron bajo vigilancia hasta el parto o aborto, al ocurrir cualquiera de estos eventos, las cabras se sacrificaron y se tomaron muestras para aislamiento bacteriológico de los distintos linfonodos, así como de bazo, glándula mamaria, placenta y útero, además un hisopo de exudado vaginal y del feto de los siguientes órganos: bazo, pulmón y líquido abomasal. Las muestras se sembraron en medio Farrell, si éstas fueron positivas a *Brucella* se les realizó extracción de ADN, así como su posterior análisis de PCR, para determinar si eran cepa vacunal o mutante. Se realizó la prueba de tarjeta al 3% a las cabras después de la vacunación; donde se encontró que el grupo de la mutante $\Delta eryCD$ presentó títulos de anticuerpos a los siete días post-vacunación, mientras que el grupo Rev 1 presentó títulos de anticuerpos a partir de los 15 días y los sueros de este grupo fueron positivos por menos días que el grupo de la mutante $\Delta eryCD$. Respecto a la colonización, resultaron ocho muestras positivas a Rev 1 en el grupo control, así como ocho muestras positivas a $\Delta eryCD$ en el grupo de la mutante, sin embargo en este grupo se encontraron 18 muestras positivas a la cepa Rev 1 y cinco muestras que tenían el ADN de ambas cepas, esto indica que el grupo que utilizó la cepa mutada sufrió una contaminación del grupo que fue vacunado con la cepa Rev 1. En el transcurso del experimento ocurrieron dos abortos en el grupo inoculado con la mutante; sin embargo, en los productos sólo se encontró colonización de la cepa Rev 1. De acuerdo a los datos obtenidos se concluye que la cepa mutante $\Delta eryCD$, es un candidato idóneo para ser inoculado en cabras; ya que en los abortos registrados no hubo presencia de la mutante y en las pruebas serológicas los anticuerpos contra *Brucella* fueron más persistentes en las cabras inoculadas con la mutante.

Abstract

The *eryCD* mutant was developed from the vaccine strain *Brucella melitensis* Rev 1, with the aim of establishing colonization and abortion ability in goats. Female adult goats between 2 and 4 years, were placed in two groups of eight animals each. They were pregnant and inoculated at a dose of 1×10^6 CFU / mL at 110 days of gestation whether with the parental strain *B. melitensis* Rev 1 or the mutant Δ *eryCD* of *B. melitensis* Rev 1. They were kept under surveillance until they delivered or aborted. The occurrence of any of these events, the goats were sacrificed and sampled for bacteriological isolation of different lymph nodes, as well as spleen, mammary gland, placenta and uterus; also swab from vaginal exudates and from the following organs of the fetus: spleen, lung and abomasal fluid. Samples were cultured in Farrell medium, once they were positive for *Brucella* underwent DNA extraction and subsequent PCR analysis to indentify the strain. 3% Card test was performed to the goats after immunization. The Δ *eryCD* mutant group presented antibody titers from seven days post-vaccination, while the Rev 1 group had antibody titers after 15 days and the sera of this group were positive for fewer days that the mutant group Δ *eryCD*. Regarding colonization, Rev 1 strain was isolated from eight positive samples in the control group, as well as Δ *eryCD* was isolated from eight samples in the mutant group. However, in this group 18 samples were also positive for the Rev 1 strain, while five samples had the DNA of both strains, indicating that the mutant strain group suffered contamination from the group that was vaccinated with the Rev 1 strain. In the course of the experiment there were two abortions in the mutant group and the Rev 1 strain was isolated from those samples. Our results show that the mutant strain Δ *eryCD*, is a likely candidate to be used in goats; since *Brucella* antibodies were more persistent in goats inoculated with the mutant and no abortions were attributed to this strain.

Keywords: goats, *Brucella melitensis* Rev 1, Δ *eryCD*, vaccine, colonization.

Introducción

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de distribución mundial que afecta a especies animales, ya sean domésticas o de vida silvestre y al hombre; cuyo agente etiológico son las bacterias del género *Brucella* (Alton et al., 1988). En el género se reconocen diez especies clásicas, las cuales se han diferenciado con base en sus características antigénicas, así como la preferencia de hospedero; *B. abortus* (bovinos), *B. canis* (perros), *B. ceti* (delfines, marsopas y ballenas), (Foster et al., 2007), *B. microti* (zorros rojos y roedores de campo), (Scholz et al., 2009a), *B. neotomae* (roedores), *B. ovis* (ovinos), *B. pinnipedialis* (focas, lobos marinos), (Foster et al., 2007) *B. suis* (cerdos), *B. inopinata* descrita en 2009, aislada de una infección en implante mamario de una paciente de 71 años, (Scholz et al., 2009b) y *B. melitensis* (ovinos y caprinos).

Brucella fue aislada por primera vez en 1887 por David Bruce del bazo de soldados que morían en la isla de Malta de una enfermedad llamada Fiebre de Malta. El reservorio del germen no fue descubierto hasta 1904, cuando se aisló a partir de la leche y la orina de cabras aparentemente sanas. Cuando se suspendió el consumo de leche de cabra cruda, la incidencia de la enfermedad descendió en forma brusca. La bacteria fue denominada inicialmente *Micrococcus melitensis*, y más tarde fue rebautizada con el nombre de *Brucella melitensis* en honor a su descubridor. Otro microorganismo del grupo fue aislado por Bang en Dinamarca en 1897 de ganado que padecía de aborto infeccioso (Enfermedad de Bang) al que denominó *Bacillus abortus* y el tercero fue cultivado en los EE.UU en 1914 del feto de una cerda prematuramente expulsado (*Bacillus suis*). En 1920 Evans reconoció que los tres microorganismos estaban estrechamente emparentados y fueron incluidos en un género aparte denominado *Brucella*.

En la actualidad la brucelosis es una de las enfermedades bacterianas más importantes en México y el mundo, y su impacto se ve reflejado en las grandes pérdidas económicas en el sector agropecuario, que resultan de la enfermedad en el ganado y de las restricciones aplicadas tanto a los animales infectados como a los productos de éstos, además de su impacto en salud pública. En animales el efecto más importante en los se

observa en las hembras ya que el aborto es la característica principal; en los machos se manifiesta provocando epididimitis, orquitis, e infertilidad. (Díaz-Aparicio, 2013)

En el hospedero primario la bacteria presenta un marcado tropismo por los órganos reproductores y glándulas mamarias (Smith y Ficht, 1990). La enfermedad se disemina en los rebaños por vía venérea (monta y actividad sodómica), o por contacto de las mucosas (conjuntivas, respiratorias y digestivas) con tejidos infectados (abortos, placentas) o con secreciones. Aunque se ha observado que *Brucella* puede sobrevivir por algún tiempo en entornos abiertos, la bacteria apenas se divide y finalmente muere. (Moreno, 2014)

Distribución geográfica

La brucelosis tiene una distribución geográfica limitada, siendo un problema importante en el Mediterráneo, el oeste de Asia y algunas zonas de África y Latinoamérica, especialmente en países con bajos recursos económicos (Corbel 1997; Moreno y Moriyón 2002). En el centro y norte de Europa y en Australia la infección por *B. abortus* ha sido prácticamente erradicada. En Norteamérica, la brucelosis es especialmente prevalente en las zonas agrícolas del norte y centro de México (Gándara et al., 2001), mientras que en Canadá y Estados Unidos ha disminuido considerablemente en los últimos años. *B. abortus* está presente en todos los países de América central, siendo la prevalencia de un 4 a un 8% (Figuras 1 y 2) (Moreno, 2002).

En los países en donde la incidencia de la enfermedad es muy baja, los animales infectados se eliminan. En cambio países donde la incidencia es alta, es preferible la vacunación como forma de control, dado que el sacrificio de un gran número de animales desestabilizaría el sector pecuario. (Díaz-Aparicio, 2013)

Los datos oficiales en humanos, indican que la morbilidad de brucelosis en México registra una tasa promedio de 6.98 casos por 100,000 habitantes en el periodo comprendido de 1988 a 1993, con un comportamiento estable, registrándose cerca de 6,000 casos por año (NOM-022-SSA2-1994), para el año 2012 la Secretaría de Salud de México (SS) reportó cerca de 3,500 casos y para el año 2013 la cifra disminuyó a 1729 casos en todo el país. (SINAVE/DGE/SALUD 2013).

La brucelosis en México afecta preferentemente a amas de casa, estudiantes y campesinos y al grupo de edad entre 15 y 44 años. Estudios seroepidemiológicos establecen valores de seropositividad entre 0.24 y 13.5%, con una prevalencia nacional de 3.24%. En áreas endémicas el valor registrado es de 18.6% de positividad. (Rodríguez-Domínguez, 1994).

Figura 1. Mapa global de la brucelosis humana

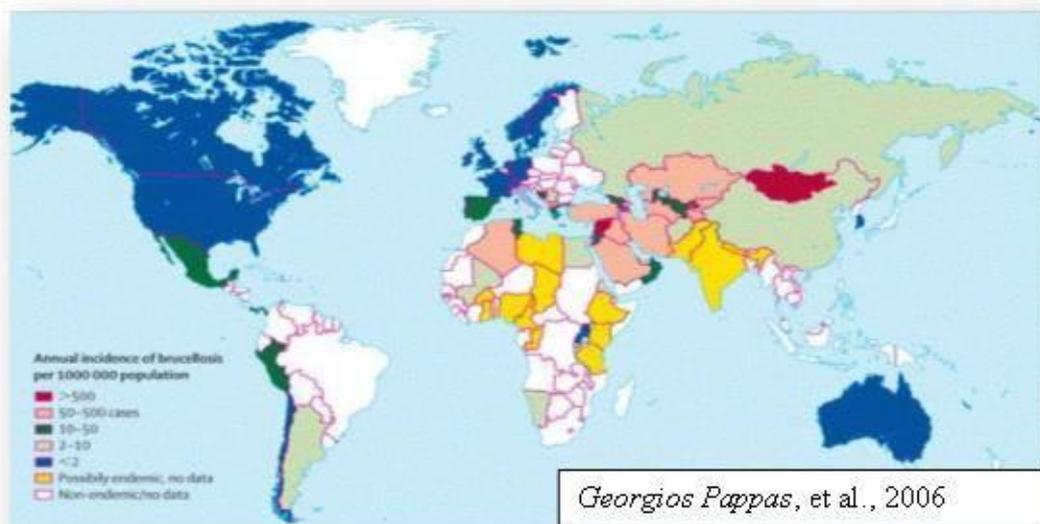
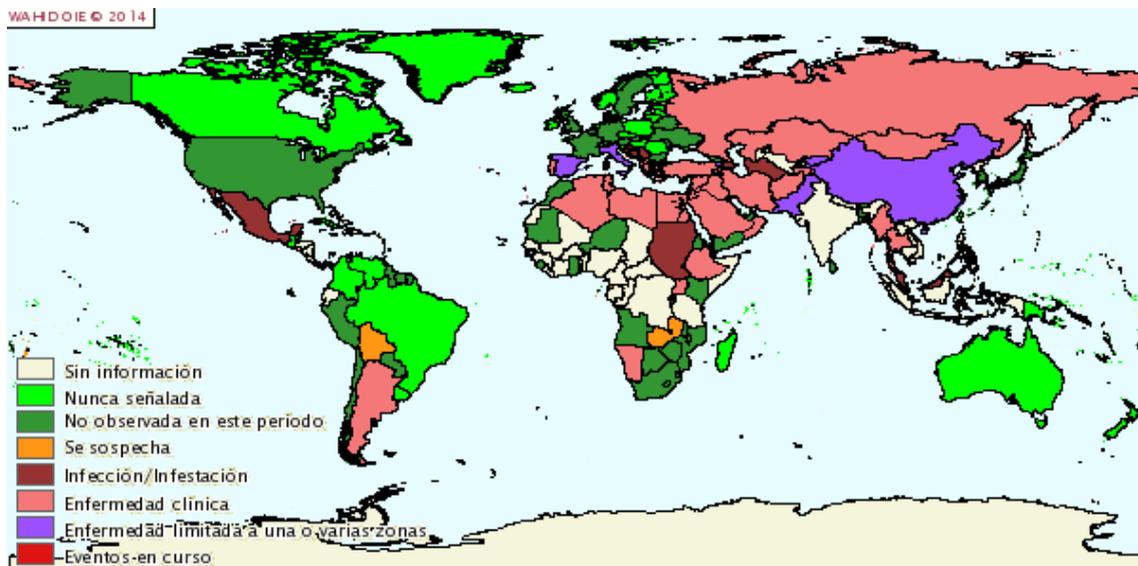


Figura 2. Situación mundial de reporte de *B. melitensis* en animales: Enero de 2014 (OIE)



Características del género

Los microorganismos del género *Brucella* son cocobacilos Gram negativos, no esporulados, sin cápsula, carentes de pili y flagelos. (Estein, 2006)

Las especies de *Brucella* pueden ser clasificadas como “lisas” (smooth, S) o “rugosas” (rough, R), esta diferenciación es de acuerdo al tipo de LPS expresado en mayor proporción en la superficie de LPS-S que LPS-R, respectivamente. (Estein, 2006)

El LPS-S consta de una parte glicolípídica (lípidos A), inserta en la membrana externa y otra polisacáridica expuesta hacia el exterior. Esta última se divide en dos secciones: el núcleo o “core”, más interno y la cadena O (polisacárido O: PSO). Esta cadena es un homopolímero lineal de perosamina que se encuentra ausente en el LPS-R de las especies rugosas (*B. ovis* y *B. canis*) (Moreno, et al., 1984). El PSO es el antígeno (Ag) inmunodominante de superficie, capaz de inducir una respuesta serológica en la mayoría de los animales en contacto con especies lisas de *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*); además es la estructura antigénica más expuesta y blanco de anticuerpos (Ac) protectores (Plommet, 1987).

Como características particulares del género *Brucella* se destacan la presencia de dos cromosomas (2,1 Mb y 1,5 Mb), la ausencia de plásmidos y la existencia de fagos líticos específicos. No se han descrito factores de virulencia bacterianos clásicos, como exotoxinas, enzimas citolíticas, fimbrias, flagelos o cápsula (Smith y Ficht, 1990). Una característica atípica para una bacteria virulenta, es la baja actividad biológica de su lipopolisacárido (LPS) en comparación con lo observado en otras bacterias Gram negativas patógenas (Cherwonogrodzky, et al., 1990; Moreno, et al., 1981a; Moreno, et al., 1981b).

B. melitensis es una especie lisa con tres biotipos (1, 2 y 3), deriva en enfermedad que afecta caprino, ovinos y bovinos, causa abortos, generalmente son en el último tercio de la gestación. La transmisión vertical de *Brucella* a las crías ocurre durante el parto o la lactación (Díaz-Aparicio, 2013).

La cepa S19 de *B. abortus* es una mutante espontánea atenuada, utilizada para vacunar al ganado bovino. El metabolismo del eritritol es la diferencia más conocida y el más importante entre la S19 y cepas silvestres de *B. abortus*.

En la S19 el eritritol inhibe en lugar de promover el crecimiento de la bacteria, debido a la ausencia de los genes *eryC* y *eryD* (Sangari, et al., 2000). Sperry y Robertson reportaron en 1975 la ausencia de d-eritrolosa-1-fosfato deshidrogenasa, un enzima esencial en la vía catabólica del eritritol en la S19, en consecuencia la acumulación d-eritrolosa 1-fosfato y una disminución de los niveles de ATP, llevan a inhibición del crecimiento bacteriano, se cree que la brucelosis provoca menos abortos espontáneos en los seres humanos que lo hace en animales debido a la ausencia de eritritol en la placenta y el feto humano. (Poole, et al., 1972)

En humanos y en roedores el eritritol no está presente en los tejidos reproductores ni en placenta, y a pesar de esto la bacteria localiza en dichos tejidos. Tampoco está presente este azúcar en macrófagos, donde *Brucella* se replica eficientemente. El operón responsable del metabolismo del eritritol fue clonado, y se obtuvieron mutantes definidas genéticamente, demostrándose que las mutantes de la cepa *B. abortus* 2308, incapaces de metabolizar eritritol, no tienen afectada su virulencia (Sangari y Agüero. 1996).

En el ganado bovino la bacteria se ubica en la placenta y órganos reproductores por su afinidad por el eritritol. La respuesta inmune frente a *Brucella*, patógeno intracelular facultativo, depende principalmente de la activación de la inmunidad mediada por células, con la participación de células T CD4+ de tipo Th1, que secretan interferón gama (INF- γ), citocinas que estimula tanto la actividad bactericida de macrófagos como la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+. Estos últimos son capaces entonces de destruir células infectadas con *Brucella*. (Rivers, et al., 2006)

Patogenia

La mayoría de los animales se infectan directamente a través de la mucosa orofaríngea, por ingestión de alimentos contaminados o por inhalación de polvo de los establos con microorganismos que los animales han secretado con la leche o los exudados vaginales después del aborto (Rodríguez et al., 2001). Inmediatamente después de la penetración e independientemente de la vía de entrada, las bacterias son transportadas, libres o en el interior de células fagocíticas, hasta los linfonodos más próximos al lugar de entrada. Si las bacterias no son destruidas, pueden sobrevivir largos períodos de tiempo en el interior de las células fagocíticas. Los linfonodos responden a la agresión por medio de una hiperplasia reticuloendotelial y linfática, que puede tardar varias semanas en producirse y persistir durante meses (Rodríguez et al., 2001). En los fagosomas de los macrófagos, *Brucella* sobrevive y se multiplica, inhibiendo la fusión del fagosoma que contiene la bacteria y el lisosoma, mediante la acidificación rápida del fagosoma (Ko y Splitter 2003). En células fagocíticas no profesionales, la internalización de *Brucella* se asocia al dominio extracelular de la proteína tirosina quinasa y la activación de una serie de pequeñas GTPasas (Guzmán-Berri et al., 2001), tendiendo a localizarse dentro del retículo endoplásmico rugoso (Corbel, 1997). En infecciones experimentales, en ratones, se ha observado que la infección tiene dos fases: durante las primeras dos semanas la bacteria se multiplica rápidamente; en la segunda fase, el número de bacterias se estabiliza hacia la quinta o sexta semana y luego decrece lentamente hasta desaparecer (Hong et al., 2000). La especial afinidad que estas bacterias tienen por el endometrio grávido y por la placenta fetal de bovinos hace que estas bacterias también proliferen extensamente en trofoblastos de la placenta que rodean al feto, lo que condiciona que la principal manifestación clínica de la infección aguda en los animales sea el aborto durante el último tercio de la gestación, o el nacimiento de animales prematuros poco viables. En bovinos machos provoca alteraciones testiculares y una disminución de la fertilidad, acompañadas algunas veces por abscesos en testículos y epidídimo (Hausler y Koontz, 1974). En humanos la infección se produce a través del contacto con secreciones de animales infectados o consumo de leche cruda o queso contaminado. El consumo de carne no es una fuente de contaminación (Mandell, 1995). *Brucella* puede ingresar al organismo a través de lesiones de la piel, mientras se manipulan animales infectados o sus desechos. En países en que la infección por *Brucella* es endémica en la población

animal, la infección por *Brucella* en humanos es frecuente, sin embargo, la transmisión persona a persona es extremadamente inusual (Fiori et al., 2000). La enfermedad puede ser adquirida por exposición ocupacional de los trabajadores de mataderos, carniceros y veterinarios, al inhalar aerosoles contaminados o en viajes a lugares donde la infección es endémica. Las infecciones asociadas al trabajo de laboratorio representan el 2% de los casos y se ha informado que el período de incubación de la brucelosis adquirida por accidente en el laboratorio puede variar entre seis semanas a cinco meses (Fiori et al., 2000).

Vacunación contra la brucelosis

El control de la brucelosis se basa en la vacunación e identificación de los animales infectados así como la eliminación de los mismos. La vacunación constituye un importante pilar en un plan de control para que en una etapa posterior, la enfermedad pueda ser erradicada (Nicoletti, 1993; Minas, 2006).

Las vacunas tradicionales en brucelosis han seguido dos líneas principales de desarrollo: las vacunas atenuadas vivas y las vacunas inactivadas o bacterinas homólogas o heterólogas, en ambos casos se trata de vacunas celulares (bacteria entera). El empleo de vacunas atenuadas asegura la inducción de una respuesta inmunitaria amplia contra un gran número de componentes y una reestimulación del sistema inmune gracias a la replicación de la bacteria (Estein, 2006).

Durante la década de los 50 y como una consecuencia de los pobres avances que se habían dado en la prevención de la brucelosis caprina y ovina mediante la utilización de la S19 de fracciones antigénicas de microorganismos del género *Brucella* o de bacterinas elaboradas a partir de los mismos; el Dr. Elberg de la Universidad de Berkeley, California, EE.UU., desarrolló una cepa vacunal de *B. melitensis* para ser usada en cabras y ovejas. Esta es una mutante de la cepa virulenta 6056 (no dependiente de la estreptomycinina) a la que denominó *B. melitensis* Rev 1 (reverse one = Rev 1), debido a que la cepa después de múltiples pases en medios de cultivo artificiales tenía la propiedad de revertir su virulencia, pero en un grado mayor al de su antecesora: una Mutante Dependiente de la Estreptomycinina. (Acha y Szyfres, 1988; Blasco, 1998).

Sólo se dispone de vacunas eficaces contra *Brucella* para bovinos (*B. abortus* S19 y *B. abortus* RB51) y caprinos (*B. melitensis* Rev 1), no existen inmunógenos que protejan cerdos, perros, ovejas o humanos, además las vacunas animales disponibles en la actualidad conservan cierto grado de virulencia por lo que no son aceptables para su utilización en humanos (Smith y Ficht, 1990; Estein, 2006). Estas cepas son capaces de establecer una infección limitada imitando el proceso de infección natural por cepas silvestres y confiriendo de esta manera protección contra el aborto y la infección. Sin embargo, el empleo de estas vacunas, en especial Rev 1 puede ocasionar abortos en las hembras gestantes e infertilidad. Estas vacunas inducen anticuerpos que interfieren con las pruebas serológicas de rutina, impidiendo la diferenciación entre animales infectados

y vacunados. Al respecto, se han implementado modificaciones en la forma de administración: por un lado la reducción de la dosis inyectada, permitiendo vacunar animales púberes sin consecuencias serológicas duraderas (Deyoe et al., 1979). Por otro lado, la inoculación por la vía conjuntival ha mostrado inducir buena inmunidad con una respuesta serológica de corta duración, permitiendo incluso la revacunación (Díaz-Aparicio et al., 2004). Finalmente, la restricción etaria, (vacunación de animales prepúberes) con dosis completa, permite la diferenciación de la mayoría de los animales vacunados, a partir de una cierta edad y mediante el uso de técnicas complementarias, ya que la Norma Oficial Mexicana recomienda la vacunación en edades tempranas, (NOM 041).

La cepa Rev 1 es una vacuna viva atenuada que es el inmunógeno oficial en México y solamente se vacunan hembras. Sin embargo, presenta inconvenientes por su virulencia residual, ya que puede causar abortos, excretarse en leche y exudado vaginal, y exhibiendo tropismo hacia el eritritol que está presente en la placenta de los rumiantes. Se conoce que la vacuna causa una infección generalizada a las 2 semanas posteriores a la inmunización, pero ésta es resuelta alrededor de los tres meses post-infección. (NOM-041-ZOO-1995)

El uso de cepas rugosas, con expresión limitada de PSO, fue abordado primeramente con la cepa 45/20 y en la actualidad con *B. abortus* RB51 (cepa resistente a la rifampicina) (Estein, 2006), ya que esta es una cepa poco estable, con capacidad de revertir a formas virulentas; por esta razón se usó como vacuna muerta. Los ensayos realizados mostraron que su poder protector era bajo y que los lotes presentaban variaciones difíciles de controlar. La cepa RB51, usada actualmente en EE. UU, Chile, Colombia, Costa Rica, México y Uruguay para el control de la brucelosis bovina, no induce Ac anti-PSO. Sin embargo, en el bovino, los datos de protección son contradictorios dependiendo de la vía de administración, la dosis, la edad del animal vacunado y la prevalencia de la enfermedad en el rodeo. Por otro lado, el empleo experimental de RB51 en pequeños rumiantes, ovinos y caprinos, no confiere protección (Moriyon et al., 2004).

Aunque la cepa S19 presenta características muy estables, la cepa Rev 1, por su parte, puede derivar hacia formas o variantes indeseables, sea en razón de una

disociación hacia el fenotipo rugoso, o hacia formas lisas de mayor virulencia (Bosserey, 1991).

A partir de 1964 la OMS recomendaron la vacunación para la prevención de la brucelosis ovina y caprina debía realizarse con la cepa Rev 1 de *B. melitensis* por la vía subcutánea, en edades comprendidas entre los 3 y 6 meses por ser la que mayores garantías ofrecía para la inmunización de estas especies domésticas. Esto, se fundamentó porque desde la inclusión en los programas de prevención de brucelosis con la vacuna, se observó que la cepa mantenía su virulencia para el hombre, a pesar de su manipulación en el laboratorio, por lo que la eliminación de la misma a través de la leche de los animales en lactación constituía un grave riesgo para la salud pública. (Martínez–Herrera, 2001).

Rev 1 es la vacuna de uso más extendido para la prevención de la brucelosis en ovejas y cabras, además continúa siendo la vacuna de referencia con la que comparar otras vacunas. Normalmente se suministra a corderos y cabritos a los 3-6 meses de edad por inyección subcutánea única. La dosis estándar está entre $0,5 \times 10^9$ a 2×10^9 organismos viables. (NOM-041-ZOO-1995).

En México la vacunación con la cepa Rev 1 se aplica por vía subcutánea en dosis clásica de 1×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC/mL), está contraindicada en cabras gestantes, ya que puede producir el aborto, debido a ello se utiliza la Rev 1 a dosis reducida de 1×10^5 UFC/mL (NOM 041); al usar la vacuna en esta dosis las cabras adultas resultan negativas a las diferentes pruebas serológicas de tres a siete meses después de la inmunización (Martínez, et al., 2005).

Rev 1 presenta la desventaja adicional de ser una cepa resistente a la estreptomicina, uno de los antibióticos de elección para el tratamiento de la brucelosis humana (Alton y Elberg, 1967). Una estrategia en el desarrollo de nuevas vacunas implica la obtención de mutantes atenuadas a partir de mutaciones en genes de metabolismo o factores de virulencia presentes en las cepas de interés.

Mutantes de *Brucella* que han sido evaluadas como inmunógenos

Una mutante de *B. melitensis* 16M denominada *purE201* (cepa “aromáticodependiente”) a pesar de su inmunogenicidad, resultó demasiado virulenta para pequeños ruminantes (Cheville et al., 1996). Por otra parte, la inmunización con la mutante VTRM1 protegió parcialmente contra la infección y el aborto de cabras gestantes (Elzer et al., 1998). En otro estudio la administración parenteral u oral de otra mutante autotrófica denominada *B. melitensis* WR201 protegió contra el desafío intranasal con *B. melitensis* 16M. Cabe destacar que la administración enteral estimuló la respuesta inmune sistémica y una protección adicional a nivel del sistema inmune común de mucosas (Izadjoo et al., 2004)

Entre otras mutantes en factores de virulencia, se han ensayado mutantes en genes que codifican para el LPS o las OMPs. En el primer caso, cabe mencionar la obtención de una mutante rugosa a partir de *B. abortus* 2308 mediante una delección en el gen que codifica para la fosfoglucomutasa (*pgm*). Esta vacuna ensayada en ratón, estimula una respuesta Th1, confiere una protección similar a la cepa 19 contra *B. abortus* y además no induce anticuerpos contra el PSO (Ugalde et al., 2003).

Justificación

La vacunación es una medida de control eficiente y económica contra la brucelosis, principalmente en países con alta prevalencia. La cepa de *B. melitensis* Rev 1 es la vacuna oficial en México para el control de la brucelosis en ovinos y caprinos, entre sus desventajas se encuentran la producción de abortos en animales gestantes, así como la posible excreción en leche y exudados. Las medidas que se han adoptado para minimizar el riesgo consisten en aplicar dosis reducidas de antígeno, lo que conlleva en muchas ocasiones a una pobre respuesta inmune (Díaz-Aparicio, et al., 2004). El operón *ery* es un rasgo distintivo del género *Brucella* y a su vez forma parte de su virulencia al estar involucrado en el metabolismo del eritritol. Se ha demostrado que este azúcar es capaz de estimular el crecimiento de todas las especies de *Brucella* en medios de cultivo, adicionalmente las altas concentraciones de eritritol en placenta y útero grávido, sumada a la estimulación del crecimiento, dieron origen al paradigma, que sostenía que este azúcar era el responsable del tropismo de la bacteria hacia los tejidos reproductores (Smith, y Ficht, 1990). De acuerdo con esta hipótesis, la cepa vacunal *B. abortus* S19 como mutante espontánea, es menos infectiva y no crece en presencia de eritritol (1mg/ml) en los medios de cultivo debido a que no cuenta con el operón *ery* completo (Sangari y Agüero. 1996). Las bondades que ofrece la cepa de *B. abortus* S19 se pueden ver reflejadas en la vacuna *B. melitensis* Rev 1, si se modifica o interrumpen los genes del operón *ery*, que codifica para un conjunto de proteínas que favorecen que la bacteria tenga tropismo hacia el eritritol. La mutante $\Delta eryCD$ de *B. melitensis* Rev 1 podría ser de gran utilidad teniendo en cuenta que uno de los inconvenientes que muestra la cepa de referencia *B. melitensis* Rev 1 son los abortos en la vacunación de cabras gestantes, y dado que a la mutante se le han eliminado genes que están relacionados con la utilización del eritritol presente en placenta y útero grávido, se presume que el empleo de esta mutante como vacuna en cabras podría dar mejores resultados en cuanto a la cantidad de abortos que desencadena en comparación con la vacuna actual, *B. melitensis* Rev 1.

Hipótesis

La mutante $\Delta eryCD$ de *Brucella melitensis* Rev 1, provoca menor cantidad de abortos y posee la capacidad de colonización reducida, comparado con la cepa parental Rev 1.

Objetivo General

Evaluar la capacidad de la mutante $\Delta eryCD$ de *B. melitensis* Rev1, para colonizar y causar abortos en cabras.

Objetivos específicos

1. Evaluar la respuesta serológica de las después de la vacunación de las cabras con la mutante o con Rev 1.
2. Evaluar la presencia de abortos
3. Evaluar la virulencia residual de las cepas; mutante o Rev 1 en linfonodos y órganos de cabras así como en algunos órganos de cabritos y fetos, tras la inoculación y el posterior sacrificio

Materiales y Métodos

Cepas

Se utilizó como control la cepa parental Rev 1 de *B. melitensis* (**MELIREV-R** de laboratorios *PRONABIVE* con registro gubernamental mexicano (SAGARPA): Reg. B-0653-00. Esta bacteria se cultivó en agar Trypticaseina Soya (TSA) a 37 °C en una incubadora con presencia de oxígeno, posteriormente se creció en caldo Trypticaseina Soya (TSB) y se congeló a -70°C en alícuotas de 1 ml compuestas de 70% TSB y 30% de glicerol, hasta su uso. Para cuantificar se tomó una alícuota congelada y se suspendió en 9 ml de TSB que se incubó por 21 h, se le realizaron diluciones décuples, y se sembró en TSA cada dilución por triplicado, se incubaron 48 h a 37°C y se determinó el número de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml).

La mutante Δ eryCD de *B. melitensis* Rev 1, tiene una deleción en parte de los genes C y D del operón *ery*, equivalente a 702 pares de bases (pb) que reduce las funciones del catabolismo del eritritol (Sangari y Agüero. 1994). Esta mutante fue hecha y donada por el Dr. Felix Sangari de la Universidad de Cantabria, España. La mutante fue inoculada en ratón Balb/c, vía intraperitoneal, después de 3 días se sacrificó el ratón, se recuperaron el bazo, el hígado y los pulmones que fueron suspendidos en PBS estéril, flameados y macerados en bolsas estériles y finalmente sembrados en TSA. Se logró aislar la bacteria y se siguió el mismo procedimiento que la cepa parental Rev 1.

Animales

Se utilizaron cabras adultas, con buena condición corporal de entre 2 y 4 años de edad, se separaron en dos grupos de 8 animales cada uno, de forma aleatoria, se colocó cada grupo en un corral distinto con espacio de 3 metros cuadrados por cabra, se alimentaron con concentrado proteico y mineral comercial así como heno de alfalfa a libre acceso. Las cabras fueron mantenidas, estudiadas y sacrificadas en el Cenid-Micobiología INIFAP ubicado en el km 15.5 carretera federal México Toluca Col. Palo Alto México D.F. Así como el comité de bioética de la UNAM autorizó el estudio. Las cabras provenían de un rebaño libre de brucelosis del estado de Guanajuato, México. Se les realizó prueba de tarjeta al 3% como prueba diagnóstica de *Brucella* acuerdo a la Norma

Oficial Mexicana 041 (NOM 041). Las cabras fueron sometidas a un diagnóstico de gestación (Dx) con el fin de comprobar que el estado de gravidez en el que se encontraran, después las cabras se sincronizaron y se gestaron; la sincronización de estros se realizó de la siguiente manera: Se aplicó una esponja intrauterina comercial (Chrono Gest® CR), cuyo principio activo es acetato de flugestona a razón 20 mg durante 14 días, a los 12 días de aplicada la esponja se les administró gonadotropina sérica de yegua gestante (PMSG) de la misma casa comercial (Folligon®) a una dosis de 500 UI, vía intramuscular. Dos días después del retiró la esponja y se introdujo el macho al corral de las hembras, para que realizara las montas que ocurrieron un lapso de dos días, y se reintrodujo el macho 21 días después de estas montas por la posibilidad de que alguna repitiera celo. El diagnóstico de gestación se realizó con ultrasonido y transductor transrectal (Ami, alliance medical inc) modelo: *Ultra Scan 900*. A 45 días después de las montas. Esperando obtener la mitad de las cabras gestantes.

Inoculación

La *Brucella* provoca abortos en el último tercio de la gestación (Hausler y Koontz, 1974), por esta razón ambos grupos fueron inmunizados por vía subcutánea a los 110 días de gestación. Un grupo fue vacunado con la cepa de *B. melitensis* Rev 1 a dosis de 1×10^6 UFC/mL, con PBS como diluyente, por vía subcutánea en el pliegue escapular izquierdo, el segundo grupo se vacunó con la cepa mutante Δ eryCD de *B. melitensis* Rev 1, con el mismo diluyente, por la misma vía y a la misma dosis que la cepa control *Brucella melitensis* Rev 1.

Muestreo

Se tomaron muestras de sangre completa a todas las cabras antes y después de la vacunación en intervalos de una semana para realizar las pruebas de tarjeta al 3%. Inmediatamente después del parto o aborto se tomaron muestras de exudado vaginal, placenta y leche, para determinar la colonización de tejidos. Posterior a estos eventos, se sacrificaron las cabras y cabritos de acuerdo a la NOM-033-ZOO-1995, con pistola de perno cautivo calibre 0.22 (Cash special No. de serie 21849). Se colectaron los distintos linfonodos y muestras de órganos, en bolsas de plástico estériles y se

guardaron en refrigeración mientras se trasladaban al laboratorio de bacteriología, dentro de las dos primeras horas posteriores al sacrificio. Los linfonodos colectados fueron: submandibulares, retrofaríngeos, preescapulares, parotídeos, supramamarios, inguinales y mesentéricos, así como glándula mamaria, útero y bazo. De los cabritos o fetos abortados se tomaron muestras de bazo, pulmón, hígado y líquido abomasal.

Estudio bacteriológico

Las muestras de linfonodos y órganos, fueron sumergidas en etanol al 70% para flamearlas de manera rápida, se les agregaron de 2-5 ml de PBS dependiendo del tamaño y consistencia de la muestra y se maceraron en bolsas estériles, una vez homogenizada la muestra se tomó una porción impregnada en hisopo estéril para sembrarlo en cajas Petri con agar TSA adicionado con el suplemento de Farrell (OXOID). En las sustancias acuosas como leche y líquido abomasal, sólo se sembró el hisopo impregnado con la muestra en medio Farrell, se incubaron y se identificaron las colonias sugerentes a *Brucella*.

Las colonias sugerentes a *Brucella*; (crecimiento después de tres días, colonias muy pequeñas de color blanco azulado, etc.) se les realizó tinción de Gram para identificar la morfología de la bacteria, posterior a esto las colonias se crecieron para formar biomasa para su posterior extracción de ADN y su identificación por PCR.

Los aislamientos obtenidos de las muestras fueron sometidos a identificación por PCR para comprobar que la cepa recuperada fuese la misma que la vacunada.

Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico se realizó utilizando tiocianato de guanidina (Pitcher et al., 1989) a partir de cultivo puro. Se emplearon 100 ng del ADN extraído como templete para realizar la PCR. La PCR se realizó como lo describe (Sangari et al., 1994) para la cepa *B. abortus* S19, los oligonucleótidos se encuentran flanqueando la secuencia del operón *ery* (Cuadro 1) en la que se encuentra la delección de 702 pb y

amplifican un producto de 361 pb cuando se trata de la S19, y un producto de 1063 pb para las demás cepas de *Brucella*, ya que éstas poseen completo el operón *ery*. (Sangari y Agüero. 1994)

Técnica de PCR

La PCR, se realizó en un volumen total de 50 µL, que contenía amortiguador para PCR 1X, 1 mM de magnesio, 200 µM de cada nucleótido trifosfatado, y dos unidades de Taq polimerasa. Se utilizaron reactivos comerciales de invitrogen®.(Martínez-Chavarría, et al., 2006)

Cuadro 1. Secuencias de Oligonucleótidos empleados en este estudio.

Oligonucleótido	Secuencia	Genes
ery-1	5' TTGGCGGCAAGTCCGTCGGT 3'	
ery-2	5' CCCAGAAGCGAGACGAAACG 3'	<i>eryC-eryD</i>

Las condiciones de la reacción de PCR que identifica a la cepa Rev 1, y la mutante $\Delta eryCD$ fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos a 94°C por 1 min, 59°C por 30 seg. y 72°C por 1 min 30 seg. y una extensión final a 72°C por 5 min.

Resultados

Pruebas serológicas

Las cabras vacunadas con la cepa Rev 1 fueron positivas a la prueba de tarjeta al 3% desde del día 15, sin embargo se encontraron 3 de las 8 cabras negativas al día 45 post vacunación. En el grupo $\Delta eryCD$, se observaron siete cabras de ocho positivas al día siete, para el día 15 el grupo completo era positivo a la prueba de tarjeta y continuaron así hasta el día del sacrificio (Cuadro 2).

Grupo Rev 1	Día 0	Día 7	Día 15	Día 21	Sacrificio a partir del día 40
1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
2	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
4	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
5	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
6	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
7	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
8	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
Grupo $\Delta eryCD$	Día 0	Día 7	Día 15	Día 21	Sacrificio a partir del día 40
1	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
4	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
5	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
6	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
7	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

 Positivo

 Negativo

Cuadro 2. Resultados de las pruebas de tarjeta al 3%, a partir del día de la vacunación.

Presencia de partos y abortos

En el grupo de cabras inoculado con Rev 1 se presentó un parto prematuro de aproximadamente 140 días de gestación, solo fue un producto vivo y sin signos aparentes de debilidad ni anormalidades. Al realizar el cultivo bacteriológico se encontró crecimiento de *Brucella* en dos muestras; entre ellas la placenta que fue localizada en una pileta que compartían ambos grupos del experimento. De las demás cabras de este grupo, cuatro estuvieron gestantes pariendo en tiempo y forma, en dos de ellas se encontró colonización y en las tres vacías que se sacrificaron al término del experimento, se obtuvo en una de ellas aislamiento de *Brucella*.

En el grupo Δ eryCD se registraron 2 cabras abortadas; (Cuadro 3) con tres y dos productos cada una, de aproximadamente 130 a 132 días de gestación; y a los 10 días posteriores al primer parto registrado en el grupo Rev 1. Al realizar el estudio bacteriológico a partir de los linfonodos y órganos se obtuvieron colonias típicas de *Brucella* en cabras y fetos. Posterior a los abortos, una de las cabras restantes con gestación realizó el parto con normalidad, de un sólo cabrito muy débil con marcada caquexia, que de igual forma al realizar los cultivos pertinentes encontramos presencia de *Brucella* tanto en la cabra como en el producto. La última cabra gestante realizó el parto de un cabrito sano y no se encontró crecimiento de *Brucella* en los cultivos de las muestras. Las cuatro cabras que no estuvieron gestantes se sacrificaron al final del experimento y se encontró en dos de ellas colonización de *Brucella* en los cultivos bacterianos.

Cuadro 3: Número de cabras vacunadas con Rev 1 o con la mutante que abortaron, así como el número de cabras y sus productos de las que se logró aislamiento de *Brucella*; previo al diagnóstico por PCR.

Grupos	Cabras por grupo	Cabras gestantes	Cabras abortadas	Cantidad de cabras con aislamientos de <i>Brucella</i>	Cantidad de cabras con aislamientos de <i>Brucella</i> en cabritos o fetos	Total de aislamientos en cabras
Rev 1	8	5	0	4	0	8
Δ eryCD	8	4	2	5	3	26

Las muestras positivas a colonización fueron sometidas a análisis de PCR para comprobar si coincidía la cepa vacunada con la recuperada en cada una de las cabras, respecto al grupo que pertenecían. En este análisis se encontró que el total de las muestras recuperadas en el grupo de Rev 1 eran coincidentes con la cepa vacunada (Rev 1); encontrando una banda de 1063 pb (Figura 3 y Cuadro 4)

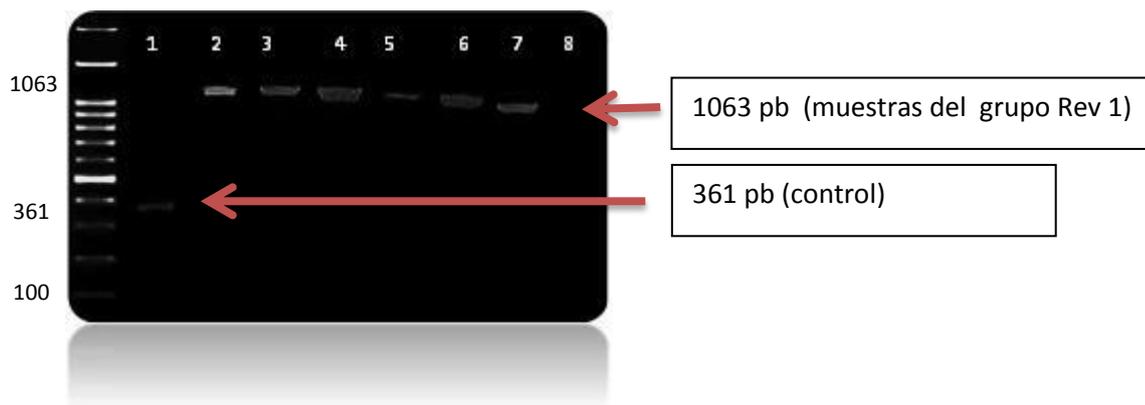


Figura 3. PCR de las muestras con aislamiento del grupo de *B. melitensis* Rev 1. Identificando las muestras positivas a Rev1 (1063 pb) en los carriles: 2 al 7, Carril 1 control de operación incompleto y carril 8 blanco. Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio, con marcador de peso molecular de 100 pb ladder de marca invitrogen ®.

Cuadro 4. Sitios de colonización de la cepa Rev 1 en el grupo Rev 1 sin presencia de contaminación, analizado por PCR.

Grupo Rev1	Submand. Der.	Submand. Izq.	Parotid. Der.	Parotid. Izq.	Retrof. Der.	Retrof. Izq.	Preesc. Der.	Preesc. Izq.	Inguinal Der.	Inguinal Izq.	Mamario Der.	Mamario Izq.	Mesentéricos	Bazo	Gland. mamaria	Leche
1			Rev 1					Rev 1								
2							Rev 1	Rev 1								
3																
4																
5																
6																
7			Rev 1													
8																

Grupo Rev 1	Útero	Hisopo Vaginal	Placenta	Total de aislamientos
1			Rev 1	3
2			Rev 1	3
3				0
4			Rev 1	1
5				0
6				0
7				1
8				0

 Gestante

 No Gestante

En el grupo de la mutante, se realizó de igual forma análisis por PCR a los aislamientos de *Brucella*, se encontró que de las 26 muestras obtenidas, 18 fueron positivas a Rev 1, cinco a ambas cepas y sólo tres a la mutante (Cuadros 5 y 6) (Figura 4).

Cuadro 5. Identificación de muestras aisladas; ya sea vacunal Rev1 o mutante $\Delta eryCD$, por análisis de PCR.

Grupos	Cantidad de aislamientos	Positivos a Rev1	Positivos a $\Delta eryCD$	Positivos a $\Delta eryCD$ y a Rev 1
Rev1	8	8	0	0
$\Delta eryCD$	26	18	3	5

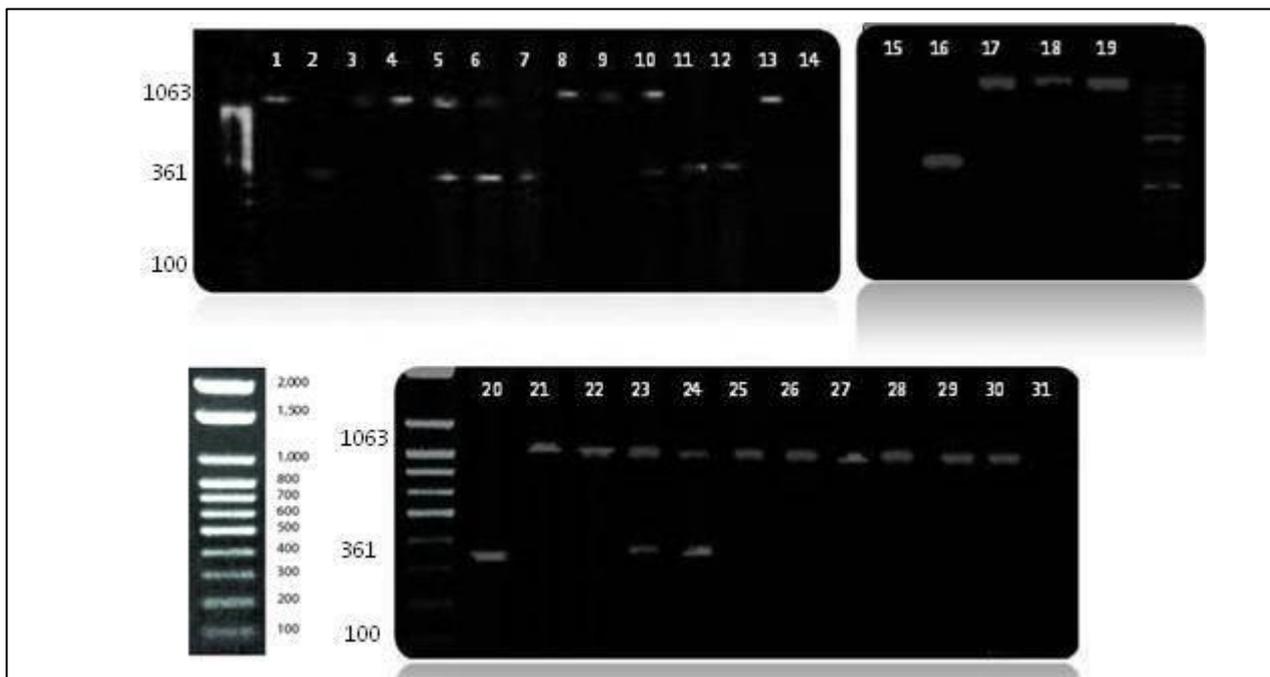


Figura 4. PCR de las muestras con aislamientos de *Brucella* del grupo de la mutante $\Delta eryCD$. Identificando las muestras positivas a Rev 1 (1063 pb) en los carriles: 3, 4, 8, 9, 13, 17, 18, 19, 21, 22, 25, 26, 27, 28, 29 y 30 así como las muestras positivas a la mutante (361 pb), en los carriles 7, 11 y 12. También se identificaron muestras correspondientes a las dos cepas vacunadas en los carriles: 5, 6, 10, 23 y 24. Los carriles con muestras control fueron: 2, 16 y 20, para la mutante y el carril 1 para Rev 1. Los carriles blanco fueron: 14, 15 y 31. Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio, con marcador de peso molecular de 100 pb ladder de marca invitrogen®.

Cuadro 6. Sitios de colonización de la cepa mutante $\Delta eryCD$ o contaminación por Rev 1 en el grupo $\Delta eryCD$, analizado por PCR.

Grupo Δery	submand. Der.	submand. Izq.	Parot. Der.	Parot. Izq.	Retrofar. Der.	Retrofar. Izq.	Preesc. Der.	Preesc. Izq.	Inguinal Der.	Inguinal Izq.	Mamario Der.	Mamario Izq.	Mesentéricos	Bazo	Gland. mamaria	Leche
1							Δery									
2				Rev 1	Rev 1	Rev 1	Rev 1		Rev 1		Rev 1	Rev 1	Rev 1	Rev 1	Δery Rev 1	
3	Rev 1							Δery Rev 1				Rev 1	Δery Rev 1	Δery Rev 1		
4			Δery									Δery				
5																
6						Δery Rev 1	Rev 1	Rev 1			Rev 1					
7																
8																

Grupo Δery	Útero	Hisopo Vaginal	Placenta	Total de aislamientos
1				1
2		Rev 1	Rev 1	12
3			Rev 1	6
4				2
5				0
6			Rev 1	5
7				0
8				0

 Gestante

 No Gestante

Respecto a los aislamientos de fetos o cabritos, encontramos que en las muestras analizadas por PCR pertenecientes a cinco fetos de dos cabras abortadas y un cabrito nacido de un parto normal, todos del grupo de la mutante; sólo hubo presencia de cepas de *Brucella* con el operón *ery* completo, pertenecientes a contaminación con la cepa vacunal Rev 1 (Figuras 5 y 6).

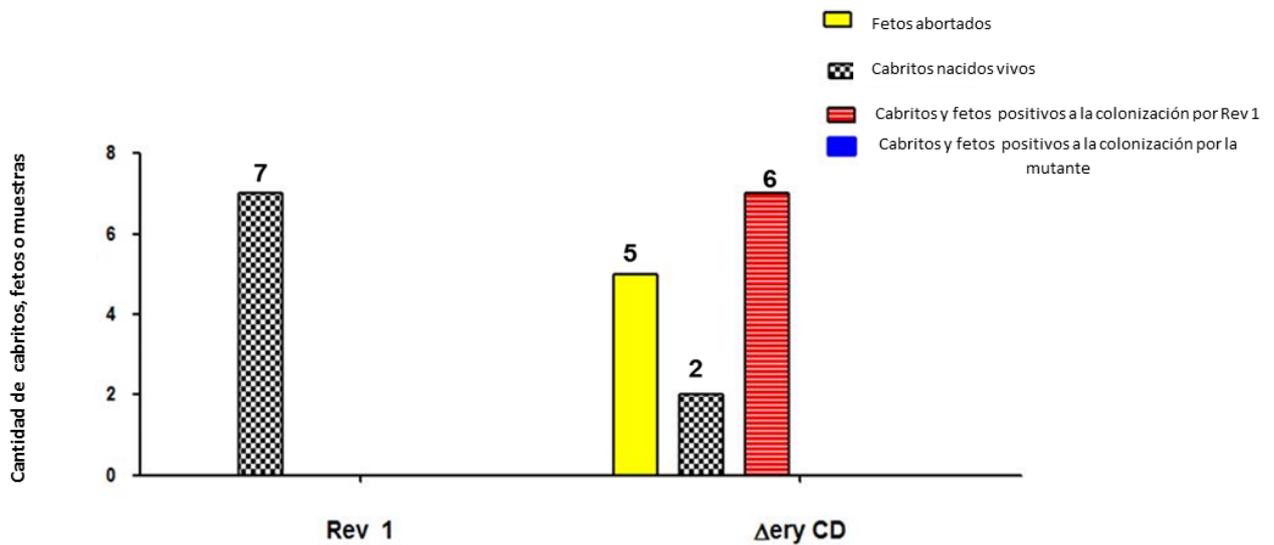


Figura 5. Cantidad de Fetos y cabritos en cada uno de los grupos, así como la identificación por PCR de las muestras pertenecientes a los productos con crecimiento de *Brucella*.



Figura 6. PCR de los aislamientos de *Brucella* de fetos y cabritos del grupo de la mutante $\Delta eryCD$. Identificando las muestras positivas a Rev 1 (1063 pb) dentro de los carriles 2 al 9, el control: la mutante (361 pb) en el carril 1, así como el blanco en el carril 10. Gel de agarosa al 1% en TAE teñido con bromuro de etidio, con marcador de peso molecular de 100 pb ladder de marca invitrogen®.

DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la capacidad de la cepa mutante $\Delta eryCD$ de *B. melitensis* Rev 1 para colonizar y causar abortos en cabras.

En los resultados obtenidos en la prueba de tarjeta se observó que la persistencia de los anticuerpos contra *Brucella*, en las cabras después de la vacunación se comportan de manera muy diferente en cada grupo; ya que el grupo inoculado con la cepa *B. melitensis* Rev 1 se observó en los primeros 7 días sólo dos cabras positivas de las ocho del grupo, para el día 15 todos los sueros aglutinaban y al día 40 ya se encontró que 3 cabras dieron negativo a la prueba; sin embargo, en el grupo de la mutante a partir del día siete post vacunación se registraron siete cabras positivas de las ocho del grupo llegando al día 15 a tener todas positivas y estos resultados fueron persistentes hasta el sacrificio de las mismas (más de 45 días posteriores a la inoculación de la vacuna). Cabe la posibilidad que la persistencia de anticuerpos se deba a la reinfección. Guilloteau et al., 2006, reporta que mutantes en *bp26* de *B. melitensis* Rev 1, en ovinos, la respuesta que observan es similar a la parental (Rev 1). Este experimento refleja que la mutante y la parental se comportan de forma diferente, respecto a los títulos de anticuerpos producidos. Trabajos publicados anteriormente (Villa et al., 2008; Díaz-Aparicio, et al., 2004) muestran que el porcentaje de abortos atribuidos a la vacunación con Rev 1 rondan el 20% de las hembras gestantes vacunadas. Nuestro estudio no cuenta con datos reveladores debido a la presencia de la cepa testigo en el grupo vacunado con la mutante, este es posiblemente el dato más controversial de todo el experimento, que deja dudas sobre la forma de cómo llegó a introducirse la cepa mencionada; la hipótesis más probable sugiere el parto de una de las cabras del grupo testigo aproximadamente 10 días antes de los abortos fue la responsable, ya que la placenta de esta cabra fue arrojada en una pileta que compartían ambos grupos, ya que este era el único sitio de contacto entre ellos, dando como resultado los dos abortos mencionados. La interrogante de porque sólo un grupo fue afectado y otro no, sería muy arriesgado discutirlo, ya que no se cuenta con elementos suficientes para formular hipótesis al respecto.

Sin embargo, con respecto a los aislamientos, llaman la atención los sitios de mayor colonización de cada una de las cepas, ya sea la Rev 1 o la mutante; es destacable

que la cepa mutante no se encontró colonizando ningún órgano con presencia rica en eritritol, como es el aparato reproductor, ej. útero grávido o placenta; coincidiendo con (Smith y Ficht, 1990), que señalan que los sitios ricos en eritritol atraen la colonización de la *Brucella*; pues es de esperarse que mientras la cepa Rev 1 posee los genes que favorecen tanto el tropismo como la utilización del eritritol, la cepa mutante no sea tan eficiente para colonizar estos sitios o utilizarlos a su favor. Aunque en el grupo de cabras vacunadas con $\Delta eryCD$ de *B. melitensis* Rev 1, presentaron dos abortos y un cabrito que nació muy débil, la bacteria aislada del aparato reproductor de la madre, así como en los productos fue la cepa Rev 1. Estos mismos resultados coincidieron en la prueba de PCR, sugiriendo que la cepa Rev1 es capaz de traspasar la barrera placentaria. Sugiriendo que aunque la mutante sólo tenga afectada su virulencia en los genes de catabolismo del eritritol, la baja de colonización en el útero grávido sea el motivo que impide traspasar la placenta.

En los dos grupos se registraron cabras gestantes que parieron en condiciones normales y no se obtuvo colonización ni de las madres ni de los productos; de igual forma en el grupo de la mutante se registraron cabras vacías con presencia de colonización en algunos linfonodos. Tal como menciona (Edmonds et al., 2002) que no todas las cabras ya sean gestantes o vacías presentan colonización tras la vacunación con Rev 1, es importante esta observación ya que en los dos grupos se registraron cabras que no fueron susceptibles a la colonización estando gestantes.

Tomando en cuenta las muestras positivas del grupo de la mutante y después de la identificación por PCR, es importante destacar que si se deja a un lado las muestras positivas a Rev 1 en este grupo, la suma de los linfonodos y órganos colonizados da la misma cantidad; ocho en cada grupo, sugiriendo que las dos cepas se comportan de forma muy parecida en cuanto a la cantidad de colonización más no en los mismos sitios ya que los resultados indican que la colonización en el grupo de la mutante estuvo localizada en lugares distintos al aparato reproductor o cercanos al sitio de vacunación dado que las 8 muestras positivas a esta incluyendo las que tienen presencia de las dos cepas se localizaron en lugares como linfonodos preescapulares, retrofaríngeos, mesentéricos, entre otros. (ver Cuadros 4 y 6). coincidiendo con trabajos anteriores de mutantes de *B. melitensis* probadas en cabras en las que eran semejantes la cantidad de linfonodos colonizados en las cabras, de la cepa parental y con las mutantes (Edmonds

et al., 2002; Roop et al., 2001), A diferencia del grupo control, que colonizó órganos y linfonodos de toda índole, estas evidencias demuestran que la capacidad de colonización de la mutante está más limitada que la cepa Rev 1, al restringir en gran medida la colonización de órganos reproductores en la cepa deletada, dándole oportunidad al organismo de montar una respuesta inmune adecuada sin dañar los productos de la gestación.

Las diferentes vacunas que actualmente existen inducen diversos grados de protección, pero cada una de ellas posee una o más desventajas, que van desde una baja capacidad para inducir un nivel adecuado de inmunidad hasta interferencias con los métodos de diagnóstico de rutina actualmente utilizados en el control de la enfermedad, por ejemplo la vacuna *B. abortus* RB51 utilizada en campañas de vacunación en bovinos, por distintas razones, no ha logrado satisfacer la condición de eficacia (Bagnat y Manetti, 2000; Schurig et al., 2002). Recientemente se están creando mutantes atenuadas como *B. abortus* delta-pgm (Comerci, et al., 2013) que genera protección similar a S19 y con la ventaja de que no genera anticuerpos anti-O. De igual forma la mutante Δ eryCD de *B. melitensis* Rev 1, demuestra tener ventajas sobre *B. melitensis* Rev 1, ya que en éste trabajo se observó que no estaba involucrada en abortos, siendo esta la principal desventaja de la cepa parental.

Si bien los genes *eryCD* del operón del eritritol son responsables del catabolismo de este azúcar para beneficio de la bacteria como lo indica Sangari et al., 1994; la delección de estos debería dar como resultado la reducción de la colonización de la *Brucella* en nichos donde la abundancia de este azúcar es mayor, tal como se ha visto en la cepa de *B. abortus* S19. Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que la interrupción de los genes mencionados en la mutante está relacionada con la ausencia de tropismo de la bacteria hacia lugares ricos en eritritol.

Conclusiones

La cepa mutante $\Delta eryCD$ induce la producción de anticuerpos por un periodo más largo que la cepa vacunal *B. melitensis* Rev 1.

La cepa mutante $\Delta eryCD$ de *B. melitensis* Rev 1 posee una menor capacidad de colonización en órganos reproductores ricos en eritritol, que la mutante $\Delta eryCD$ de *B. melitensis* Rev 1. Asimismo, no produce abortos, debido a que no se encontró en las muestras obtenidas de los fetos o cabritos colonizados, ni en órganos reproductores de las madres.

La prueba de PCR fue una herramienta útil para discriminar la presencia de la cepa, lo cual nos permitió determinar la existencia de contaminación.

Bibliografía

- Acha, P.N. y Szyfres, B. (1988): Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales, OPS 2ª Edición, Washington, D.C., EUA, pp: 14 - 36.
- Alton G.G., Angus RM, Jones LM, Verger J.M. (1988): Laboratory techniques for the brucellosis laboratory, INRA, Paris. brucellosis in goats, five years after vaccination with reduced-dose *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine. Trop Anim Health Prod. 36, 117-121.
- Alton G.G., Elberg S.S. (1967): Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. A review of ten years of study. Vet. Bull. 37, 793-800.
- Bagnat, E. y J. C. Manetti (2000): Proof of efficacy of the RB51 and strain 19 antibrucellosis vaccines in cattle, Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires), Vol. 81, N.º 6, pp. 428-429.
- Blasco, J.M. (1998): Profilaxis Vacunal de la Brucelosis en los Rumiantes. Las Vacunas Tradicionales y las Nuevas Vacunas. Memorias del Tercer Foro Nacional de Brucelosis. Acapulco, Guerrero México, pp: 225-226.
- Bosseray, N. (1991): *Brucella melitensis* Rev-1 living attenuated vaccine: stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. Biologicals. 19, 355-363.
- Cherwonogrodzky J.W., G.Dubray, E.Moreno and H.mayer (1990): Antigens of *Brucella* p19-64. In :K.Nielsen and J.R.Duncan (ed.), Animal brucellosis. CRC Press, Boca Raton Fla.
- Cheville N.F., Olsen S.C., Jensen A.E. (1996): Bacterial persistence and immunity in goats vaccinated with a *purE* deletion mutant or the parental 16M strain of *Brucella melitensis*. Infect. Immun. 64, 2431-2439.

- Comerci D., Rey –Serantes D, Carballo E., Paramidani E., Bagnat E. y Ugalde J.(2013): Evaluación de la eficacia protectora de la vacuna antibrucélica experimental *Brucella abortus* Delta-pgm en bovinos. sns (SENASA) vol. 1, N.º 2
- Corbel M. (1997): Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 3, 213-221.
- Deyoe BL, Dorsey TA, Meredith KB, Garrett L. (1979): Effect of reduced dosages of *Brucella abortus* strain 19 in cattle vaccinated as yearlings. Proc Annu Meet U S AnimHealth Assoc. 83, 92-104.
- Díaz-Aparicio E, Hernández AL, Suárez-Güemes F. (2004): Protection against brucellosis in goats, five years after of vaccination with *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine in reduce dose. *Trop Anim Health and Prod* 36:117-121.
- Díaz-Aparicio E., (2013): Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 32 (1), 43-51
- Edmonds MD, Cloeckert A, Hagius SD, Samartino LE, Fulton WT, Walker JV, Enright FM, Booth NJ, Elzer PH.(2002): Pathogenicity and protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis* Deltaomp25 deletion mutant.*Res Vet Sci.*; 72(3):235-9.
- Elzer P.H., Enright F.M., MacQuiston J.R., Boyle S.M., Schurig G.G. (1998): Evaluation of a rough mutant of *Brucella melitensis* in pregnant goats. *Res Vet Sci.* 64, 259-260.
- Estein SM (2006): Brucellosis: Immunity and vaccination (a review) *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, Vol VII N° 05.
- Fiori P, S Mastrandrea, P Rappelli, P Cappuccinelli. (2000): *Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 38, 2005-2006.

- Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckaert A. (2007): *Brucella ceti* sp. and *Brucella pinnipedialis* sp. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57(Pt 11):2688-93.
- Gándara B, A López, M Rigel, E Martínez-Romero. (2001). Limited genetic diversity of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol* 39, 235-240.
- Georgios Pappas, Photini Papadimitriou, Nikolaos Akritidis, Leonidas Christou, Epameinondas V Tsian (2006): The new global map of human brucellosis, 6: 91–99.
- Guilloteau L.A, Laroucau K , Olivier M, Grillo M J, Marin CM, Verger JM, Blasco JM. (2006): Residual virulence and immunogenicity of CGV26 and CGV2631 *B. melitensis* Rev. 1 deletion mutant strains in sheep after subcutaneous or conjunctival vaccination. *Vaccine*, Apr 24;24(17):3461-8.
- Guzmán-Berri C, E Chaves-Olarte, C von Eichel-Streibe, I López-Goñi, M Thelestam, S Arvidson, J Gorvel, E Moreno. (2001): GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes. *J Biol Chem* 276, 44435-44443.
- Hausler W, F Koontz. (1974): *Manual of Clinical Microbiology*. 2nd ed. E. Lennette, E. Spaulding, J. Truant (eds.). American Society of Microbiology. Washington, D. C. Pgs. 295-301.
- Hong P, R Tsolis, T Ficht. (2000): Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect Immun* 68, 4102-4107.
- Izadjoo MJ, Bhattacharjee AK, Parnavitana CM, Hadfield TL, Hoover DL. (2004): Oral vaccination with *Brucella melitensis* WR201 protects mice against intranasal challenge with virulent *Brucella melitensis* 16M. *Infect Immun.* 72, 4031-4039.

- Ko J, G Splitter. (2003): Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* 16, 65-78.
- Mandell G, J Bennet, R Dolin. (1995): Principles and practice of infectious diseases. 4th ed. Vol 2., Pp. 2053-2057. Churchill Livingstone. Philadelphia, USA.
- Martínez-Chavarría LC, Verdugo-Rodríguez A, Hernández-Castro R. (2006) Identificación de la cepa vacunal *B. abortus* S19 en muestras de leche de vaca. *Vet, Méx.*, 37 (4).
- Martínez – Herrera, D.I. (2001): *Determinación de Brucella melitensis cepa Rev-1 a partir de leche de cabras vacunadas*. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Veracruz, México.
- Martínez OL, René Pérez De la Rosa, Díaz-Aparicio E, Andrew Charles Snyderlaar Hardwicke, Hernández AL, Suárez-Güemes F. (2005): Shedding of *Brucella melitensis* Rev 1 strain in the milk of reduced dose-vaccinated goats, *Técnica pecuaria México*, 43(3):399-404.
- Minas A. (2006): Control and eradication of brucellosis in small ruminants. *Small Ruminant Research*. 62, 101-107.
- Moreno E, I Moriyón. (2002): *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Nat Acad Sci* 99, 1-3.
- Moreno E. (2002): Brucellosis in Central América. *Vet Microbiol* 90, 31-38.
- Moreno E., (2014): Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis *Front. Microbiol.*, doi: 10.3389/fmicb.2014.00213.

- Moreno E., Jones L.M., Berman D.T. (1984): Immunochemical characterization of rough *Brucella* lipopolysaccharides. *Infect Immun.* 43, 779-82.
- Moreno, E., Berman, D. T., and Boetcher, L. A. (1981a): Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* 31: 362-370.
- Moreno, E., Speth, S. L., Jones, L. M., and Berman, D. T. (1981b): Immunochemical characterization of *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides. *Infect. Immun.* 31: 214-222.
- Moriyon, I., Grillo, M. J.; Monreal, D., Gonzalez, D., Marin, C., Lopez-Goni, I., Mainar-Jaime, R. C., Moreno, E., Blasco, J. M. (2004): Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet. Res.* 35, 1-38.
- Nicoletti, P. (1993): The eradication of brucellosis in animals. *Saudi Med. J.* 14, 288-292.
- NOM-041-ZOO-1995, NORMA Oficial Mexicana, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. <file:///C:/Users/Poncho/Downloads/NOM-041-ZOO-1995.pdf> accesado el 20 de Julio de 2014
- Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. (1989): Rapid extraction of genomic DNA with guanidinium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 8:151-156.
- Plommet M. (1987): Brucellosis and immunity: humoral and cellular components in mice. *Ann. Inst.Pasteur Microbiol.* 138, 105-109.
- Poole PM, Whitehouse DB, Gilchrist MM. (1972): A case of abortion consequent upon infection with *Brucella abortus* biotype 2. *J Clin Pathol;* 25:882-4.

- Rivers R, Andrews E, González-Smith A, Donoso G, Oñate A. (2006): *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. Arch. Med. Vet. 38, N° 1
- Rodríguez A, A Orduña, X Ariza, I Moriyon, R Díaz, J Blasco, A Almaraz, F Martínez, C Ruiz, R Abad. (2001): *Manual de Brucelosis*. Ed. Junta de Castilla y León. Copyright. Zamora, España.
- Rodríguez-Dominguez J, NOM-022-SSA2-1994; <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m022ssa24.html>. accesado el día 19 de Mayo del 2014.
- Roop RM 2nd, Phillips RW, Hagius S, Walker JV, Booth NJ, Fulton WT, Edmonds MD, Elzer PH. (2001): Re-examination of the role of the *Brucella melitensis* HtrA stress response protease in virulence in pregnant goats. Vet Microbiol. 3;82(1):91-5.
- Sangari F. y J. Agüero. (1996): Molecular basis of *Brucella* pathogenicity: un update. Microbiología Sem.12:207-218.
- Sangari FJ, Garcia-Lobo JM, Agüero J. (1994): The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. FEMS Microbiol Lett 121:337-342.
- Sangari FJ, Garcia-Lobo JM, Agüero J., (2000): The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*, Microbiology, 146, 487–495.
- Sangari JF, Agüero J. (1994): Identification of *Brucella abortus* B19 vaccine strain by the detection of DNA polymorphism at the ery locus vaccine; 12:435-438.
- Secretaría de salud, México, Notificación Semanal de Nuevos Casos de Enfermedades http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/inf_morbilidad/2013/7Reporte%20julio_2013.pdf. accesado 5 de junio de 2014.

- Scholz HC, Hofer E, Vergnaud G, Le Fleche P, Whatmore AM, Al Dahouk S, Pfeffer M, Krüger M, Cloeckaert A, Tomaso H. (2009a): Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9(2):153-6.
- Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al-Dahouk S, Kämpfer P, Cloeckaert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, De BK. *Brucella inopinata* sp. (2009b):, isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol.* 10.
- Schurig G. G., Sriranganathan N., Corbel M. J. (2002): Brucellosis vaccines: past, present and future, *Vet Microbiol* 90 (1-4), pp. 479-96.
- SINAVE/DGE/SALUD2013
Situación epidemiológica según la OIE en animales domésticos
http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap?disease_type_hidden=0&disease_id_hidden=183&selected_disease_name_hidden=Brucelosis+%28Brucella+melitensis%29+%282006+-%29+&disease_type=0&disease_id_terrestrial=183&species_t=0&disease_id_aquatic=-999&species_a=1&sta_method=semesterly&selected_start_year=2010&selected_report_period=1&selected_start_month=1 accesado el día 31 de marzo de 2014.
- Smith, L. D. and Ficht, T.A. (1990): Pathogenesis of *Brucella*. *Crit. Rev. Microbiol.*, 17: 209-229.
- Sperry, J. F. and Robertson, D. C. (1975): Erythritol catabolism by *Brucella abortus*. *J Bacteriol* 121, 619±630.
- Ugalde J.E., Comerci D.J., Leguizamón M.S., Ugalde R.A. (2003): Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucosyltransferase (*pgm*) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. *Infect Immun.* 71, 6264-6269.

- Villa R, Perea Marcell, Díaz-Aparicio E, Hernández AL, Suárez-Güemes F., Alicia Soberón Mobarak, (2008): Presencia de aborto y mortinatos en cabras inmunizadas contra brucelosis con las vacunas RB51, *rfbK* y Rev 1. *Téc Pecu Méx*, 46(3):249-258.

Apéndice

Cuadro 7. Diagnóstico de gestación, Cabras abortadas, así como productos abortados en cada grupo de estudio; ya sea la Mutante $\Delta eryCD$ o Rev 1

Grupo Δery	Dx gestación	Abortos	Productos
1	Vacía		
2	Gestante	Positivo	3
3	Gestante	Positivo	2
4	Vacía		
5	Vacía		
6	Gestante		1
7	Gestante		2
8	Vacía		

Grupo Rev 1	Dx gestación	Abortos	Productos
1	Gestante		2
2	Gestante		1
3	Vacía		
4	Gestante		2
5	Gestante		1
6	Vacía		
7	Gestante		1
8	Vacía		