



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**

**VIRULENCIA RESIDUAL DE LA MUTANTE  $\Delta virB11::Gm^r$  DE  
*Brucella canis***

**TESIS  
QUE PARA OPTAR EL GRADO  
DE MAESTRA EN CIENCIAS PRESENTA:**

**M.V.Z. MONSERRAT GABRIELA MEINGUER CRUZ**

**TUTOR PRINCIPAL:  
DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**COMITÉ TUTOR: DRA. BEATRIZ ARELLANO REYNOSO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**DR. RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y  
SALUD ANIMAL**

**México D.F.**

**Diciembre 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo fue financiado por el proyecto:

DESARROLLO DE UNA VACUNA CONTRA *Brucella canis*. SEP-CONACyT

2009-01-130601.

## **Agradecimientos**

**A Dios por permitirme llegar a este momento especial en mi vida.**

**Al Dr. Efrén Díaz por su apoyo y confianza para el desarrollo de éste trabajo así como su disponibilidad y decisiva ayuda en todo.**

**A mi comité tutorial: Dra. Beatriz Arellano y Dr. Rigoberto Hernández por su orientación científica y sus aportaciones durante el desarrollo de la tesis.**

**A los integrantes del Jurado por sus aportaciones críticas a éste trabajo.**

**A mi madre por sus palabras de aliento que no me dejó decaer para que siguiera adelante y siempre sea perseverante y cumpliera con mis ideales.**

**A mi esposo por su sacrificio, esfuerzo y por brindarme su comprensión, cariño y amor.**

**A mis hermanos por apoyarme en esta etapa tan trascendental en mi vida.**

**Y a todos los que me han ayudado durante estos años en el desarrollo de esta tesis, Muchas Gracias.**

## ÍNDICE

RESUMEN .....	5
ABSTRACT .....	6
1. INTRODUCCIÓN .....	7
1.1 GENERALIDADES .....	7
1.2 ETIOLOGÍA.....	7
1.3 <i>Brucella canis</i> .....	8
1.3.1 TRANSMISIÓN .....	10
1.3.2 PATOGÉNESIS .....	10
1.4 VIRULENCIA DE <i>Brucella</i> .....	12
1.5 TRÁNSITO INTRACELULAR.....	12
1.5.1 SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO IV .....	14
1.6 INMUNIDAD .....	16
1.6.1 INMUNIDAD INNATA .....	16
1.6.2. INMUNIDAD ADAPTATIVA .....	17
1.6.2.1 INMUNIDAD HUMORAL.....	17
1.6.2.2 INMUNIDAD CELULAR .....	18
1.7 DIAGNÓSTICO .....	19
1.8 SALUD PÚBLICA .....	20
2. JUSTIFICACIÓN.....	21
3. HIPÓTESIS .....	22
4. OBJETIVO GENERAL .....	22
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
5.1 CEPAS BACTERIANAS.....	23
5.2 ANIMALES.....	23
5.3 INOCULACIÓN .....	23
5.4 HEMOCULTIVO .....	24
5.5 SOBREVIVENCIA DE LA MUTANTE <i>B. canis</i> DE <i>Dvirb11 ::Gm<sup>r</sup></i> ....	24
6. RESULTADOS .....	25
6.1 HEMOCULTIVO .....	25
6.2 SOBREVIVENCIA DE LA MUTANTE DE <i>Brucella canis</i> <i>ΔvirB11::Gm<sup>r</sup></i> .....	27
7. DISCUSIÓN .....	30
8. CONCLUSIONES .....	33
9. BIBLIOGRAFÍA .....	34

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la virulencia residual de la mutante de *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  en el modelo canino. Se trabajó con doce perros de la raza Beagle de tres meses de edad procedentes de un criadero sin antecedentes clínicos, ni serológicos de brucelosis canina; se inocularon con la mutante a una dosis de  $3.3 \times 10^9$  UFC/mL por vía subcutánea. A los 15, 30, 45 y 60 días posteriores a la inoculación, se sacrificaron humanitariamente tres perros por cada periodo de tiempo. En cada periodo se colectaron muestras de sangre completa así como nódulos linfáticos (retrofaríngeos, submaxilares, parotídeos, preescapulares, mesentéricos, inguinales, poplíteos), bazo, hígado y órganos reproductores. La sangre se inoculó en caldo brucella con 5% de citrato de sodio incubándose a 37°C, durante diez días, posteriormente se inoculó en agar brucella cada tercer día. Con la finalidad de observar el crecimiento de la bacteria en sangre, los órganos fueron macerados y sembrados por duplicado en placas de agar brucella adicionadas con gentamicina a una concentración de 2.5 µg/ml. De la sangre se aisló la mutante  $\Delta virB11::Gm^r$  en perros sacrificados a los 60 días, lo que demuestra una bacteremia prolongada. De los nódulos linfáticos se logró el aislamiento de la bacteria a partir de los 15 días, en hígado únicamente se aisló en un perro a los 30 días, en el bazo se aisló a partir de los 15 días, y en los órganos reproductores, vejiga y orina no se logró aislamiento. Se demostró que aunque hubo bacteremia y presencia de la mutante en nódulos linfáticos hasta los 60 días, la colonización de bazo e hígado fue reducida y en órganos reproductores fue nula, esto es atribuido, a que la mutante  $\Delta virB11::Gm^r$  presenta una virulencia atenuada y la mutación afecta su capacidad para colonizar.

**Palabras clave:** *Brucella canis*, perros, mutante virulencia residual.

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the residual virulence of the mutant of *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  in the canine model. This work was done with twelve Beagle breed dogs three months of age from a laboratory animal vivarium without canine brucellosis serological or clinical history, these dogs were inoculated with the mutant of *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  at a dose of  $3.3 \times 10^9$  CFU/mL subcutaneously. At 15, 30, 45 and 60 days post vaccination, three dogs were euthanized for each time period. At each point samples of whole blood, lymph nodes: Retropharyngeal, submandibular, parotid, prescapular, mesenteric, inguinal, popliteal, spleen, liver and reproductive organs were collected. The blood was inoculated into brucella broth with 5% of sodium citrate and incubated at 37 ° C for ten days, then inoculated into brucella agar every third day. In order to observe the growth of the bacteria in the blood, the organs were macerated and inoculated in duplicate on brucella agar plates with gentamicin at a concentration of 2.5 µg / ml. The mutant of *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  was isolated from the blood of 2 of 3 dogs that were slaughtered in the last day 60, demonstrating prolonged bacteremia. Isolating the strain mutant from the lymph nodes was achieved since 15 to 60 days, isolating at the liver was done in only one dog at the day 30, at the spleen isolating the mutant was achieved from day 15 to day 60, at the reproductive organs and urinary bladder no isolation was achieved. It showed that although there was bacteremia and the presence of the mutant in the lymph node to day 60, the colonization of the spleen and liver was reduced and in reproductive organs was nil, this is attributed to mutant strain  $\Delta virB11::Gm^r$  has an attenuated virulence and mutation affects their ability to colonize.

Keywords: dogs, *Brucella canis*, mutant, residual virulence.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 GENERALIDADES

*Brucella* spp. causa una de las zoonosis más comunes en todo el mundo (Pappas et al, 2006). El género *Brucella*, fue descrito por primera vez por Meyer y Shaw en 1920 y debe su nombre al médico militar David Bruce, quien en 1887, fue el primero en aislar uno de los microbios que componen este género a partir de bazos de soldados británicos fallecidos en la isla de Malta (Corbel-Brinley-Morgan, 1984).

*Brucella* es un patógeno intracelular facultativo, que se ha adaptado para sobrevivir bajo diferentes condiciones, evadiendo diferentes mecanismos de defensa del organismo hospedador. Sin embargo, se ha observado que *Brucella* spp. carece de factores clásicos de virulencia, tales como plásmidos o bacteriófagos lisogénicos, producción de exotoxinas, variación antigénica o presencia de cápsula o fimbrias. Por tanto, son otros los factores o mecanismos que están implicados en la virulencia de las especies de *Brucella* (Martín, 2010). Un factor de virulencia es el lipolisacárido (LPS), que posee una estructura química singular que lo diferencia del LPS de otras bacterias gram negativas (Martirosyan et al, 2011). Según la naturaleza de su LPS se puede encontrar en fase lisa (LPS-S) o en fase rugosa (LPS-R), lo cual depende de la presencia de cadenas polisacáridas. Las especies que se consideran lisas son: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis* y *B. microti*, las cuales expresan un LPS-S, mientras que *B. ovis* y *B. canis* carecen de la cadena O del LPS y en consecuencia son naturalmente rugosas (Zygmunt et al, 2009).

### 1.2 ETIOLOGÍA

El género *Brucella* pertenece a la familia de *Brucellaceae* de la subdivisión alfa-2 de las proteobacterias y está filogenéticamente relacionado con el género *Ochrobactrum*, que es un saprofito que ocasionalmente infecta a los seres humanos (Godfroid et al, 2011), así como con bacterias patógenas de animales como *Bartonella* y *Rickettsia*, de plantas como *Agrobacterium*, y con simbiontes como *Rhizobium* (Moreno et al, 1990).



Este género está compuesto por bacterias gram negativas, de forma cocobacilar de 0.5 a 0.7 mm de diámetro y 0.6 a 1.5 mm de longitud, son aeróbicas, no fermentativas, inmóviles y con una temperatura óptima de crecimiento de 36 a 38°C, aunque pueden llegar a sobrevivir en un intervalo de 20 a 40°C. Su genoma contiene un 58 a 59 % de guanina y citosina, organizado en la mayoría de las cepas en dos cromosomas con un tamaño de 2.2 Mb y 1.1 Mb (Moreno y Moriyón, 2002).

Hasta 1985, el género *Brucella* constaba de seis especies: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. neotomae* y *B. canis*. En el 2007, se reconocieron como nuevas especies a *B. ceti* y *B. pinnipedialis* las cuales infectan preferencialmente a cetáceos y pinnípedos respectivamente (Foster et al, 2007). En 2008, se reportó una nueva especie, *B. microti* que fue aislada por primera vez de un roedor (*Microtus arvalis*) (Scholz et al, 2008) y por último, *B. inopinata* aislada recientemente de una infección en implantes de mama en una mujer con signos clínicos relacionados con la brucelosis (Scholz et al, 2010), esta última especie es la única que no ha sido aislada de un animal.

### **1.3 *Brucella canis***

*B. canis* es un cocobacilo inmóvil, no esporulado, aerobio estricto. Crece en agar sangre, agar tripticasa soya, medio de Thayer-Martin modificado y medio difásico de Ruíz Castañeda para hemocultivo; dado que son colonias rugosas, no requieren suero, ni CO<sub>2</sub> para el crecimiento, no produce H<sub>2</sub>S, son oxidasa y ureasa positivas (Larsson y Da Costa, 1980; Soloaga et al, 2004). Las cepas de campo de *B. canis* son siempre rugosas y tienen un crecimiento de tipo mucoide (M+) (Ardoino et al, 2006).

*Brucella canis* fue aislada en Estados Unidos de America (EUA) por primera vez en 1968 por Leland, Carmichael y Brunner de perros de raza Beagle y ha sido reconocida en varios países. De acuerdo con el Centro para la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública de la Universidad de Iowa (CFSPH), EUA en el 2012, *B. canis* parecía estar ampliamente diseminada en los EUA especialmente en los estados del sur, así como en Canadá, México, América Central y algunos países de Europa, África específicamente en Túnez, Nigeria, Madagascar y en Asia en Filipinas, Malasia, India, Corea, Japón,

Taiwán y China. Nueva Zelanda y Australia parecen estar libres de este microorganismo (CFSPH, 2012).

Diferentes estudios han realizado muestreos serológicos que han llevado al diagnóstico y a la caracterización de cepas en diferentes partes del mundo tales como EUA (Brower et al, 2007), Canadá (Forbes-Pantekoek, 1988) Rusia (Kulakov et al, 1997), Nigeria (Adesiyum et al, 1986), Trinidad (Brown et al, 1982), Italia (Ebani et al, 2003), Brasil (Larsson y Da Costa, 1980), Chile (Borie et al, 2002), China (Barg et al, 1981), Suecia (Ström et al, 2012), México (Flores et al, 1977), es especialmente frecuente en EUA, América Central, América del Sur (Carmichael, 1990; Carmichael-Shin, 1996).

Hay pocos estudios sobre la situación actual de la brucelosis canina, en México esta enfermedad se diagnosticó por primera vez en 1974, mediante el aislamiento de *B. canis* a partir de sangre de perros callejeros que reveló que 140 (28%) fueron positivos en la prueba de aglutinación para *B. canis*, en ocho de estos animales se logró aislar *B. canis* (Flores y Segura, 1976). Estudios realizados en 1976, en los que se sacrificaron perros positivos a *B. canis* lográndose aislar en cultivos puros de los tejidos en 6 de 59 perros estudiados (10.2%). En 22 de estos animales (37%) se encontraron títulos elevados de anticuerpos (Flores et al, 1977). En 1980 se encontraron 12 animales positivos de 107 muestras de suero (11.21%), dos provenían de animales importados, muestreados en el aeropuerto de la ciudad de México y el resto correspondía a perros provenientes de diferentes clínicas veterinarias (Gutiérrez, 1980). En 1997, Velázquez encontró 94 animales positivos (45.4 %) en 207 muestras. Se han publicado resultados de estudios que revelan la existencia de *B. canis* en criaderos de perros en la Ciudad de México, así como en perros de otros lugares de la República Mexicana (Méndez et al, 1999; Briseño et al, 2004).

En 1999, en un criadero de perros en el Distrito Federal se presentó un brote de abortos, por lo que se realizó un estudio serológico, de 33 animales analizados se encontraron 15 positivos (45%) mediante la prueba de aglutinación en placa, posteriormente se realizó el aislamiento de *B. canis* (Méndez et al, 1999). Estudios realizados en 182 perros procedentes de

diferentes zonas del Distrito Federal, México, revelan que solo 48 perros (26.37%) fueron positivos. En cuanto a la presencia de la enfermedad era más frecuente en los animales que tenían de 2 a 4 años ya que presentaban en promedio títulos más altos (Jiménez, 2000).

Con el fin de conocer la frecuencia de la brucelosis canina, en el 2006 se realizó un muestreo en los animales que acuden al Hospital de pequeñas especies y al departamento de reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México; Se realizaron pruebas serológicas y cultivos bacteriológicos a 56 perros con problemas reproductivos, 24 (42.8%) resultaron positivos en serología y tres (5.3%) en hemocultivo, dentro de los signos que se encontraron en animales positivos a serología fueron la atrofia testicular, orquitis, epididimitis, y discoespondilitis (Briseño et al, 2004).

### **1.3.1 TRANSMISIÓN**

La principal vía de contagio de *B. canis* es a través del contacto con secreciones vaginales, durante el estro, parto, aborto, post-parto. En la placenta las bacterias se pueden encontrar en concentraciones de hasta  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL. En machos las bacterias se eliminan a través del semen, aunque ambos sexos eliminan las bacterias en la orina, las concentraciones en el macho son más altos, llegando a  $10^3$ - $10^6$  UFC/mL. Por ello, resulta más peligrosa la orina de un macho como una fuente de infección, ésta eliminación de bacterias a través de la orina comienza a las 4-8 semanas después la infección (Wanke, 2004). Se han encontrado bajas concentraciones de bacterias en saliva, heces, secreciones nasales y oculares, aunque de poca importancia como fuente de infección (Wanke, 2004).

### **1.3.2 PATOGÉNESIS**

Las vías de entrada de este patógeno son la genital, oro-nasal o conjuntival, siendo la dosis mínima infectante de aproximadamente  $10^6$  UFC/mL por vía oral y  $10^4$ - $10^5$  UFC/mL por la vía conjuntival (Carmichael y Joubert, 1988). Después de la internalización de *Brucella* en las superficies de las mucosas

del animal (oronasal, conjuntival o genital), penetra en el tejido y a partir de entonces más bacterias se adhieren a las mucosas siendo fagocitadas por los macrófagos y otras células fagocíticas donde son capaces de sobrevivir y multiplicarse (Corbel, 1997). Esto contribuye al aumento de la virulencia, ya que estas bacterias migran a los nódulos linfáticos y comienzan una bacteremia en un intervalo de 7-30 días después de la infección, persistiendo durante al menos 6 meses y después de manera intermitente, hasta los 64 meses. Las bacterias alcanzan órganos diana a través de la sangre y producen los cambios patológicos característicos de la enfermedad. Esta bacteria tiene predilección por los tejidos productores de esteroides tales como los testículos, epidídimo y próstata, durante la fase aguda de la enfermedad, la mayoría de los perros pueden presentar epididimitis. El daño testicular inicia con el desarrollo de anticuerpos anti-espermáticos que se pueden encontrar en el fluido sanguíneo y de próstata en aproximadamente 11 a 14 semanas después de la infección. *B. canis* también se localiza en la próstata de los machos, lo que puede dar lugar a signos clínicos clásicos de la prostatitis, incluyendo aumento de tamaño de la próstata, proceso que es muy doloroso para el animal ya que le dificulta orinar y defecar (Makloski, 2011).

En el caso de las hembras la bacteria se encuentra en el útero y se ha logrado aislar del estómago del feto, lo que sugiere que los cachorros ingieren el líquido amniótico infectado por esta bacteria (Holleth, 2006; Wanke, 2004). Otros órganos y tejidos son infectados mediante la propagación de la bacteria a través de la sangre, como lo son los discos intervertebrales, el riñón, el hígado, y también forman complejos antígeno-anticuerpo en la úvea anterior del ojo (Makloski, 2011).

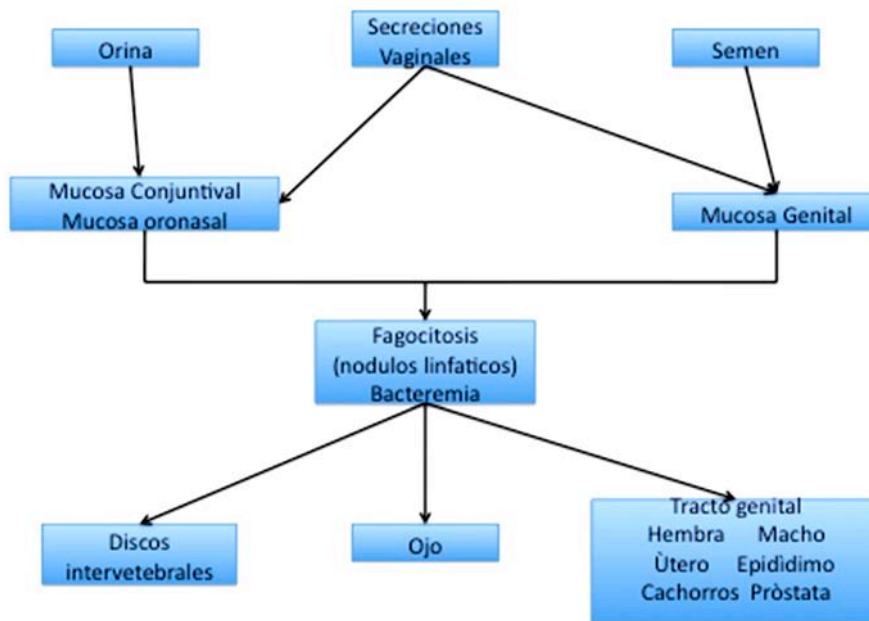


Figura 1. Patogénesis de la brucelosis canina. (Wanke, 2004)

#### 1.4 VIRULENCIA DE *Brucella*

*Brucella* spp., tiene la capacidad de establecer una infección crónica, evolucionando a través de estrategias para evadir la respuesta inmune del hospedero y así evitar su destrucción. La membrana externa de *Brucella* spp., contribuye a la reducción de cargas negativas en la superficie y como consecuencia, esta bacteria no se une al sistema de complemento, como son las defensinas microbicidas, las fosfolipasas, la lactoferrina, la lisozima (Martirosyan et al, 2011). Algunos factores de virulencia son esenciales para la invasión de la célula huésped, mientras que otros son cruciales para evitar ser eliminados por el anfitrión, permitiendo que *Brucella* spp., pueda sobrevivir y proliferar dentro de su vacuola replicativa y así permitir su escape evitando la detección por el sistema inmune del hospedero (Fugier et al, 2007).

#### 1.5 TRÁNSITO INTRACELULAR

Estudios acerca del tránsito intracelular de esta bacteria demuestran que más del 90% de las bacterias mueren dentro de las primeras horas de la infección.

En consecuencia, solo el 10% restante establecerán con éxito un nicho replicativo (Von Bargen et al, 2012).

Los anticuerpos y el complemento contribuyen a que la bacteria sea opsonizada para después ser fagocitada sobreviviendo y replicándose dentro de los macrófagos, aunque también puede entrar en las células del hospedero en ausencia de opsoninas, entonces la vía de entrada está mediada por las balsas lipídicas, mecanismo dependiente de TLR4 y PI3-K (quinasa) y se ha demostrado que participan en la fagocitosis, el tránsito del fagosoma y su maduración (Martín et al, 2010). *Brucella* spp. protege su propia existencia, al evitar la fusión de la vacuola contenedora de *Brucella* (BCV), con los lisosomas de las células hospederas. Los primeros BCVs están enriquecidos en colesterol y flotillin-1, que es una proteína implicada en la señalización de las balsas lipídicas asociado con la maduración del fagosoma y con la interacción de la vía endocítica. Se ha propuesto que el glucano cíclico  $\beta$ -1-2 modifica las balsas lipídicas ricas en colesterol presentes en la membrana de las BCV, también está relacionado con la maduración de BCV tanto en las células epiteliales como en los macrófagos (Arellano et al, 2005).

Durante los primeros minutos después de la invasión de los fagocitos, *Brucella* spp. interactúa con compartimientos endosomales tempranos. Esto se confirma por la detección de marcadores endosomales tempranos en la BCV, tales como el receptor de transferrina, el guanosín trifosfato (GTP) unido a proteína Rab5, o el antígeno endosomal temprano (EEA1); también participa en este proceso inicial el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). La asociación inicial con los endosomas tempranos es un evento transitorio y comienza a disminuir a los 10 min después de la infección. Sin embargo, parece que en estos primeros tiempos, la acidificación del compartimento BCV es un requisito para su posterior maduración (Martirosyan et al, 2011). Simultáneamente las BCVs adquieren progresivamente una proteína lisosomal asociada a membrana-1 (LAMP-1) y siguen siendo positivos para este marcador hasta 4 h después de la infección. En contraste, la bacteria interactúa transitoriamente con compartimientos endocíticos finales, que se caracterizan por la presencia de

una pequeña proteína de unión (GTP) a Rab7 y a receptores 6-fosfato de manosa. Con la disminución de la proteína de LAMP-1, las BCVs adquieren marcadores del retículo endoplasmático (RE) tales como calreticulina o calnexina. En el espacio luminal del RE el marcador de glucosa-6-fosfatasa detectada por microscopia de electrones confirma la fusión entre la BCV y ER. En esta etapa *Brucella* spp., ha alcanzado un nicho seguro que garantiza su replicación y su virulencia (Starr et al, 2008; Martirosyan et al, 2011). Recientemente se ha encontrado que Rab2 media el transporte del RE-Aparato de Golgi, el compartimento intermedio del RE (ERGIC) se considera necesario para que se lleve a cabo la replicación intracelular (Lacerda et al, 2013). La interacción final con los sitios de salida del ER, requieren de Sar1, que controla la salida de vesículas de transporte COPII desde el RE al ERGIC estableciendo así, nichos replicativos derivados de RE todo esto depende de la presencia de un sistema de secreción tipo IV (T4SS) funcional, esto se ha demostrado con las mutantes *virB* que no pueden adquirir marcadores del RE y en cambio son eliminados por fagolisosomas (Celli et al, 2005).

### **1.5.1 SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO IV**

Uno de los factores de virulencia más importantes de *Brucella* spp. es el sistema de secreción tipo IV (T4SS) que es fundamental para la sobrevivencia intracelular bacteriana y su replicación (Boschiroli et al, 2002).

Los sistemas de secreción son complejos multiprotéicos comunes en las arqueas y en las bacterias. Estos sistemas de secreción versátiles translocan sustratos de DNA y proteínas a través de la envoltura celular generalmente por un mecanismo dependiente de contacto, estos sustratos alteran diversos procesos celulares del hospedero (Marchesini et al, 2011). En *Brucella* spp. el T4SS que es regulado por el operón *virB*, es esencial para evitar la fusión de lisosomas y para crear un organelo permisivo para la replicación en células del sistema inmune innato, incluyendo macrófagos, células dendríticas y trofoblastos placentarios (De Jong et al, 2010). El papel de *virB* es trasladar proteínas efectoras a través de la membrana de la BCVs al citoplasma de la célula del hospedero o en el dominio citoplasmático de la membrana vacuolar

y así modular las funciones celulares del hospedero para la biogénesis del organelo replicativo (Martirosyan et al, 2011). Este complejo está codificado por el operón *virB*, el cual está constituido por 12 genes *virB1-virB12*, que están localizados en el cromosoma II. El operón *virB* está conservado en todas las especies secuenciadas de *Brucella*. Como la estructura del T4SS de *Brucella* no está completamente caracterizado, la mayor parte de la información se relaciona con el T4SS de *Agrobacterium* y *Helicobacter* (Lacerda et al, 2013). La energía para el aparato de secreción es suministrada por tres ATPasas, *virB4*, *virB11*, y *virD4*, situadas en la membrana citoplásmica. Sólo dos de estas ATPasas, *virB4* y *virB11*, están presentes en *Brucella*, aunque carece de un homólogo de la proteína de acoplamiento *virD4* que está presente en la mayoría de T4SS, cuenta con un gen *virB12* en el operón que está situado en la superficie de *Brucella* (Mirkalantari et al, 2012). Durante la infección de macrófagos, el operón *virB* se activa rápidamente después de la internalización, alcanzando su máxima actividad a las 5 horas post infección (p.i). Cuando se establece en el compartimento intracelular replicativo comienza la replicación y el operón *virB* es reprimido. Hay dos señales importantes que intervienen en la expresión del T4SS, el pH y la falta de nutrientes (Lacerda et al, 2013).

Los sustratos proteicos del T4SS son comúnmente denominados efectores, estos manipulan las vías de la célula hospedera y las respuestas. VceA y VCEC son los primeros efectores en ser identificados conservándose en todas las especies (Von Bargen et al, 2012). En el 2011 se identificaron al menos 6 proteínas denominadas BPES, que entran al citoplasma de la célula eucariota tras la infección (Marchesini et al, 2011). Otra investigación identificó once proteínas translocadas en las células hospederas por *Brucella*, cinco proteínas dependientes del sistema de secreción *VirB*, denominadas BspA, BspB, BspC, BspE y BspF (Myeni et al, 2013).

RicA (Rab2 interacción de proteína conservada A) es una proteína efectora con una función propuesta, la hipótesis es que RicA controla la actividad Rab2. Este descubrimiento apoya el papel del T4SS en la creación de BCVs replicativas derivadas del retículo endoplasmático (RE) al permitir interacciones precisas con la vía secretora de los organelos (De Barsey et al,



2011). En otro estudio se reportó que la proteína conservada Sec24 A (CSTA) es un potencial efector de *Brucella* spp, mostrando que interactúa con Sec24 A humana, un componente del complejo de cubierta de COPII, que se asocia con los sitios de salida ER (ERES) pero su translocación en células hospederas no se ha demostrado (De Bary et al, 2012).

## **1.6 INMUNIDAD**

Debido a la naturaleza crónica de muchas enfermedades causadas por patógenos intracelulares, una respuesta adaptativa eficaz es necesaria para controlar la enfermedad (Gómez et al, 2013).

### **1.6.1 INMUNIDAD INNATA**

Las vías de entrada más comunes para *Brucella* spp., en animales y seres humanos son las membranas de las mucosas en las vías respiratorias y sistema digestivo y en el hospedero natural, también la mucosa conjuntival y las membranas que cubren los órganos sexuales.

Las bacterias son fagocitadas y llegan a los nódulos linfáticos regionales, dando lugar a la diseminación sistémica posterior. *Brucella* puede colonizar eficazmente a los monocitos/macrófagos y replicar a altos números en el hígado y el bazo. En los animales *Brucella* spp. también se multiplica en las glándulas mamarias y en los órganos reproductivos (Martirosyan et al, 2011). Las características estructurales del LPS de *Brucella* le permiten evadir dos sistemas de detección innatos que dependen de TLR4 y del sistema del complemento (Atluri et al, 2011). Además de la evasión pasiva de la inmunidad innata, *B. abortus* y *B. melitensis* despliegan una proteína que interfiere activamente con la señalización del TLR. *B. abortus* codifica dos proteínas, la primera es la Btp1 que modula la maduración de las células dendríticas infectadas, interfiriendo con la vía de señalización de TLR2 y otra proteína que está codificada por el marco de lectura abierta BAB1\_0756 la cual no se ha caracterizado. Esta inhibición da como resultado la capacidad de *Brucella* spp. para interferir con la señalización de TLR2 y TLR4 (Salcedo et al, 2008). El homólogo de *B. melitensis*, llamado TcbB (BMEI\_1674) conduce a la poliubiquitina para la degradación de MyD88 (MAL), un adaptador requerido para la señalización TLR2 y TLR4 (Atluri et al, 2011).

Los macrófagos que son infectados por *Brucella* spp. son resistentes a la activación de IFN- $\gamma$  escapando de la actividad microbicida, utilizando sus lipoproteínas para inhibir la activación de estas células mediada por el IFN- $\gamma$  y así poder evadir las respuestas inmunológicas (Barrionuevo et al, 2011). La infección por este patógeno también hace que los macrófagos sean resistentes a la apoptosis mediada por el ligando Fas exógeno o por el interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Martirosyan et al, 2011).

## **1.6.2. INMUNIDAD ADAPTATIVA**

*Brucella* spp. es capaz de interferir con el desarrollo de una respuesta protectora Th1, evitando la producción de IL-12 y afecta la actividad de células T como consecuencia de las DC infectadas (Martirosyan et al, 2011).

Las células dendríticas (DC) desempeñan un papel clave, en el inicio del control de la magnitud y en la calidad de la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, *Brucella* spp. ha desarrollado componentes que interfieren en la respuesta innata con el fin de evadir la respuesta inmune del hospedero. Se ha descubierto que este patógeno prolifera de manera eficiente dentro de las DC tanto *in vitro* como *in vivo* esto conduce a la inhibición de la maduración funcional, caracterizada por la ausencia de secreción de citoquinas proinflamatorias tales como TNF- $\alpha$  e IL-12, por lo consiguiente la presentación del antígeno a las células T vírgenes por parte de esta célula será ineficaz (Martirosyan y Gorvel, 2013).

### **1.6.2.1 INMUNIDAD HUMORAL**

La inmunidad humoral es necesaria para la plena protección contra una infección secundaria de *Brucella*, se demostró que las células TCD4+ son estimuladas para la recombinación somática por vías de señalización Myd88/IL-12p35, que provoca un cambio de isotipo para obtener anticuerpos circulantes de protección. La activación de células T depende de las células B, la hipótesis es que los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) reconocen a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de *Brucella* spp. implicando la activación de las células B. La presencia de IFN $\gamma$  y la producción de células de memoria CD4 + Th1, requieren de la presencia

de bacterias vivas y de las vías MyD88/IL-12p35 funcionales (Vitry et al, 2014).

### 1.6.2.2 INMUNIDAD CELULAR

La respuesta inmune celular es crítica para proporcionar memoria inmunológica, una propiedad necesaria en la vacunación de larga duración. La respuesta inmune mediada por IFN- $\gamma$  es esencial para la eliminación de *Brucella* spp. la respuesta inmune adaptativa se puede clasificar en tres mecanismos. En primer lugar, el IFN- $\gamma$  producido por las células CD4 +, CD8 +, y las células T  $\gamma\delta$ , activan la función bactericida de los macrófagos con el fin de obstaculizar la supervivencia intracelular de *Brucella* spp. En segundo lugar, la citotoxicidad está representada por la acción de las CD8 + y de las células T  $\gamma\delta$  que se encargan de eliminar a los macrófagos infectados y en tercer lugar, los isotipos de anticuerpos de tipo Th1, tales como IgG, son esenciales para opsonizar el patógeno y facilitar la fagocitosis hacia la vía endocítica en compartimentos degradativos. Las citoquinas claves en la eliminación de la brucelosis, son IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Martirosyan y Gorvel, 2013).

La inmunosupresión se detecta en la brucelosis crónica, con un aumento de las células T CD4 + CD25+ en el bazo, que a su vez puede desempeñar un papel en la regulación de linfocitos T efectores, lo que puede causar una eliminación deficiente de las bacterias de los órganos infectados, el bazo, el hígado y los nódulos linfáticos, debido a la alteración de la activación de linfocitos T CD8+, la disminución progresiva de los macrófagos y el reclutamiento de células dendríticas (DCs). *Brucella* spp. contrarresta el desarrollo de una respuesta inmune Th1 protectora, al afectar la secreción de IL-12 y por la inhibición de la actividad estimulante de células T por parte de las DC infectadas. Las células dendríticas infectadas que muestran un nivel intermedio de la maduración, podrían contribuir a la inducción de tolerancia en los tejidos y en el establecimiento de una infección crónica de larga duración. *B. abortus* también induce la citoquina anti-inflamatoria interleuquina-10 (IL-10) que puede ser producida por las células T CD4, células B, y macrófagos y puede inhibir la actividad bactericida de los

macrófagos contra *Brucella*, así como ser antagónico de la actividad del IFN- $\gamma$  (Atluri et al, 2011).

## 1.7 DIAGNÓSTICO

El aislamiento e identificación bacteriológica de *B. canis* es la prueba de oro. Las muestras adecuadas para cultivo son la placenta, los nódulos linfáticos, la próstata y el bazo, mientras que el semen, las secreciones vaginales y la orina, a menos que haya sido recogido por cistocentesis, con frecuencia están contaminados con otros microorganismos. La sangre colectada en un frasco de hemocultivo en condiciones aerobias es la muestra de elección debido a la falta de organismos contaminantes y a la bacteremia prolongada. El aislamiento requiere de 15 días para el primocultivo y presenta un riesgo biológico potencial de infección para el personal de laboratorio. El PCR es un ensayo rápido, altamente sensible y específico, que es una alternativa útil para la detección directa de *B. canis* respecto al cultivo. La mayoría de los ensayos de PCR están diseñados para detectar secuencias de genes conservados en todas las especies y biotipos de *Brucella* spp (Graham-Taylor, 2012). Recientemente se han desarrollado una PCR especie específica para *B. canis* (Kang et al, 2014). Los métodos utilizados para la detección de la brucelosis canina varían en sensibilidad, especificidad y complejidad, debido a que los anticuerpos no son detectables durante 3 a 4 semanas post infección (p.i), y en ocasiones hasta 12 semanas post infección, las reacciones falsas positivas pueden ser problemáticas ya que los antígenos de LPS que se utilizan, a menudo comparten epítopes con otras especies bacterianas. Los antígenos que comúnmente son utilizados para el diagnóstico de la brucelosis canina son los de *B. ovis* o LPS de *B. canis* (Davidson y Sykes, 2014).

Hay cinco métodos de diagnóstico serológico utilizados en la práctica, la prueba de aglutinación rápida (RSAT) es una prueba sencilla, rápida y sensible para detectar anticuerpos contra el antígeno del LPS de *Brucella*, se ha utiliza mercaptoetanol (ME) para hacer más sensible la prueba (Wanke, 2004). La prueba de aglutinación en tubo (TAT) detecta anticuerpos en el suero y puede ser cuantitativa; muestras con títulos inferiores a 1:200 deben

ser reexaminadas 2 semanas después. La prueba de inmunodifusión en gel de agar se utiliza para confirmar los resultados positivos de la RSAT, RSAT (2-ME) y TAT. Hay otros 2 tipos de pruebas serológicas que se han utilizado: la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA). La ELISA es más específico que el IFA y puede detectar los perros positivos dentro de los 30 días de infección (Makloski, 2011).

## **1.8 SALUD PÚBLICA**

EL motivo de preocupación por *B. canis* es que es una bacteria zoonótica. Se ha considerado que los síntomas ocasionados por este microorganismo no son tan graves como los que son causadas por otras especies tales como *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*. La incidencia de la enfermedad en los seres humanos no se conoce con exactitud. Aunque *B. canis* afecta al hombre, son muy pocos los casos reportados, generalmente el contagio se da por un contacto directo con los restos de abortos o secreciones infectadas durante el parto. Se han dado casos de infección en los laboratorios debido a la falta de precaución durante el manejo de la bacteria. La enfermedad comienza con fiebre prolongada, inflamación de los nódulos linfáticos, faringitis, dolor en las articulaciones, escalofríos y pérdida de peso (Marzetti et al, 2013).

Las tasas de seroprevalencia reportadas en humanos incluyen el 13 % en México, 0.3 % en Alemania, 0.4 % en poblaciones militares de EUA, 0.6% en los residentes de Florida, y el 67.9 % en los residentes de Oklahoma, según el Centro para la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública en la Universidad del Estado de Iowa (Makloski, 2011).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La brucelosis canina es una enfermedad infectocontagiosa de carácter zoonótico y de distribución mundial, a pesar que el impacto económico no es tan importante como el producido por otras especies de *Brucella*, no pueden minimizarse las pérdidas que genera en criaderos comerciales y el costo social producto de la enfermedad en el hombre.

Los aportes de la biotecnología y la ingeniería genética enfocadas a la inmunología, han sido cruciales para la creación de nuevas vacunas, que se generan a partir de un conocimiento detallado de los mecanismos de patogenicidad de los microorganismos y de la respuesta inmune del animal susceptible. Una estrategia en el desarrollo de nuevas vacunas implica la obtención de mutantes en genes de factores de virulencia presentes en cepas virulentas.

Actualmente no existe vacuna contra *B. canis*, se ha desarrollado la mutante  $\Delta virB11::Gm^r$  en la que se ha mutado el gen *virB11*, que codifica para un ATPasa cuya importancia radica en que proporciona energía al sistema de secreción tipo 4 y constituye uno de los factores de virulencia más importantes para la replicación intracelular de *Brucella* spp. Esta mutante ha demostrado ser incapaz de causar la enfermedad en ratones; sin embargo se desconoce su virulencia residual, por lo que la contribución de este trabajo es conocer la capacidad de esta bacteria para colonizar y provocar la enfermedad en perros, con la finalidad de determinar si ésta mutante es un buen candidato a ser usado como vacuna contra *B. canis* en caninos. El presente trabajo se propone estudiar la virulencia residual de la mutante de *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  como posible candidato a vacuna en perros.

### **3. HIPÓTESIS**

Si la mutante de *Brucella canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  está atenuada, no colonizará a perros después de los 30 días post-inoculación.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar en modelo canideo la virulencia residual de la mutante de *Brucella canis*  $\Delta virB11::Gm^r$ .

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1 CEPAS BACTERIANAS**

La mutante de *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  se obtuvo generando una mutación no polar construida a partir de la cepa silvestre de *B. canis*, dando como resultado una delección de *virB11* y reemplazándolo por un casete de gentamicina (Palomares et al, 2012).

Esta mutante fue cultivada en caldo brucella con agitación orbital (200 rpm) a 37°C durante 18 h. Este cultivo fue centrifugado a 6000 rpm/min, se desechó el sobrenadante y fue lavado dos veces con una solución de fosfatos (PBS) estéril. Para corroborar que la dosis estuviera ajustada a la concentración requerida para este experimento, se realizó una cuenta viable inoculando en cajas de agar brucella adicionada con gentamicina a una concentración de 2.5 µg/L.

### **5.2 ANIMALES**

Se trabajó con un grupo de 12 perros de la raza Beagle, 7 hembras y 5 machos de tres meses de edad, procedentes de un criadero sin antecedentes clínicos, ni serológicos de brucelosis canina. Los perros fueron alojados en jaulas (dos animales por jaula), con medidas de bioseguridad, contaban con ventilación y una temperatura adecuada. El alimento se administró dos veces al día y se les proporcionó agua a libre acceso (NOM-062-ZOO-1999).

### **5.3 INOCULACIÓN**

Para determinar la sobrevivencia de la mutante, a los perros se les administró 1 mL de la mutante *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  contenida en PBS estéril, a una concentración de  $3.3 \times 10^9$  UFC por vía subcutánea, esta dosis fue ajustada por la experiencia obtenida en experimentos anteriores de esta misma mutante (datos no publicados). El inóculo se aplicó por vía subcutánea en la región axilar izquierda, los perros fueron alojados en el bioterio de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla en condiciones idóneas de manejo y alimentación.



#### **5.4 HEMOCULTIVO**

Para la detección de la bacteria en sangre se tomó 1 mL de la muestra de sangre periférica en tubos con heparina los días 0, 3, 7, 15, 30, 45 y 60 post inoculación, se depositó en tubos con caldo brucella a 37°C y se observaron cada tercer día el crecimiento bacteriano por medio de resiembras en cajas de agar brucella.

#### **5.5 SOBREVIVENCIA DE LA MUTANTE *B. canis* DE $\Delta virb11$ ::Gm<sup>r</sup>**

Para determinar la sobrevivencia de la mutante, los animales fueron sacrificados humanitariamente con xilacina y pentobarbital sódico (NOM-062-ZOO-1999), en número de 3 en cada ocasión los días 15, 30, 45 y 60 post-vacunación.

Se colectaron muestras de sangre completa, nódulos linfáticos (retrofaríngeos, submaxilares, parotídeos, preescapulares, mesentéricos, inguinales, poplíteos), bazo, hígado, orina, vejiga y órganos reproductores los días 15, 30, 45 y 60 tomando como base lo sugerido por Edmonds et al, 2002. Los nódulos y los órganos fueron recolectados y macerados con 1 mL de PBS, inoculando por duplicado en placas de agar brucella e incubados en una atmósfera de aerobiosis a 37°C durante 5 días (Palomares et al, 2012). La sangre se sembró en caldo brucella con 5% de citrato de sodio incubándose durante 10 días en una atmosfera de aerobiosis a 37°C, de estos cultivos se resembró en agar brucella cada tercer día e incubándose las placas durante 10 días a 37°C.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 HEMOCULTIVO

Para determinar la duración de la bacteremia en sangre, se realizaron varias resiembras de la sangre de los perros en agar brucella, logrando aislar la mutante *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^f$ , en todos los animales a partir del día 7 post inoculación hasta el periodo en que fueron sacrificados (15, 30, 45 y 60 días), la presencia de la bacteria se detectó incluso en 2 de 3 animales que se sacrificaron el día 60 post inoculación (Cuadro 1).

En los animales que fueron sacrificados en el primer periodo post-inoculación (día 15), la bacteremia se presentó a los 7 días post inoculación, perdurando hasta el día 15 (Cuadro 1).

Perro No.	Día			
	0	3	7	15
1	(-)	(-)	(+)	(+)
2	(-)	(-)	(+)	(+)
3	(-)	(-)	(+)	(+)

**Cuadro 1.** Hemocultivo de los perros inoculados con la mutante de *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^f$  y sacrificados el día 15. (-) negativo a aislamiento bacteriológico y (+) positivo a aislamiento bacteriológico.

En los animales sacrificados el día 30, la bacteria persistió en la sangre de los animales desde el día 7 hasta el día 30 post inoculación como se puede ver en el Cuadro 2.

Perro No.	Día					
	0	3	7	15	21	30
4	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
5	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
6	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)

**Cuadro 2.** Hemocultivo de los perros inoculados con la mutante de *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  y sacrificados el día 30. (-) negativo a aislamiento bacteriológico y (+) positivo a aislamiento bacteriológico.

Los resultados del hemocultivo de los animales que se sacrificaron en el tercer periodo (día 45 post inoculación) se observó como la bacteremia fue intermitente ya que solo se aisló de un animal, los resultados se presentan en el Cuadro 3.

Perro No.	Día						
	0	3	7	15	21	30	45
7	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
8	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
9	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

**Cuadro 3.** Hemocultivo de los perros inoculados con la mutante de *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  y sacrificados el día 45. (-) negativo a aislamiento bacteriológico y (+) positivo a aislamiento bacteriológico.

En los animales que fueron sacrificados en el último periodo (día 60 post inoculación), se muestra como la presencia de la mutante se aisló de los 3 animales hasta el día 45 y en el día 60 solo en 2 de los 3 perros, lo que significa que la bacteremia se encuentra persistente. Estos resultados se resumen en el Cuadro 4.

Perro No.	Día							
	0	3	7	15	21	30	45	60
10	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
11	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
12	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

**Cuadro 4.** Hemocultivo de los perros inoculados con la mutante de *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  y sacrificados el día 60. (-) negativo a aislamiento bacteriológico y (+) positivo a aislamiento bacteriológico.

## 6.2 SOBREVIVENCIA DE LA MUTANTE DE *Brucella canis* $\Delta virB11::Gm^r$

Con el objeto de determinar la sobrevivencia de la mutante, se realizó la colección de los órganos y nódulos linfáticos, para su estudio bacteriológico y así poder observar la presencia de la mutante de *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$ .

A continuación se presentan los resultados del estudio realizado en los órganos y nódulos linfáticos en el modelo perro, encontrando aislamientos de los 4 periodos que comprenden el día 15 (Cuadro 5), día 30 (Cuadro 6), día 45 (Cuadro 7) y día 60 (Cuadro 8) post inoculación, en los que se realizaron los sacrificios de los animales. Se muestra la localización anatómica de los aislamientos de los nódulos linfáticos recolectados y de los órganos de los que se obtuvo su aislamiento bacteriológico de los 4 periodos comprendidos (Figura 2).

**Cuadro 5.** Aislamiento bacteriológico de perros sacrificados el día 15 post-inoculación con la mutante de *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  (-) negativo a aislamiento bacteriológico y (+) positivo a aislamiento bacteriológico.

Perro	NL SM	NL RF	NL P	NL PE	NL M	NL PO	I	B	H	Ú	T	V
1	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
3	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

NL Nódulo linfático; SM Submaxilar; RF Retrofaríngeos; P Parotídeo; PE Preescapular; M Mesentérico; PO Poplíteo; I Inguinal; B Bazo; H Hígado; U Útero; T Testículos; V Vejiga.

**Cuadro 6.** Aislamiento bacteriológico de perros sacrificados el día 30 post-inoculación con la mutante de *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  (-) negativo a aislamiento bacteriológico y (+) positivo a aislamiento bacteriológico.

Perro	NL SM	NL RF	NL P	NL PE	NL M	NL PO	I	B	H	Ú	T	V
4	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
5	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

**Cuadro 7** Aislamiento bacteriológico de perros sacrificados el día 45 post-inoculación con la mutante de *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  (-) negativo a aislamiento bacteriológico y (+) positivo a aislamiento bacteriológico.

Perro	NL SM	NL RF	NL P	NL PE	NL M	NL PO	I	B	H	Ú	T	V
7	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
8	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
9	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

**Cuadro 8.** Aislamiento bacteriológico de perros sacrificados el día 60 post-inoculación con la mutante de *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  (-) negativo a aislamiento bacteriológico y (+) positivo a aislamiento bacteriológico.

Perro	NL SM	NL RF	NL P	NL PE	NL M	NL PO	I	B	H	Ú	T	V
10	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
11	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
12	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

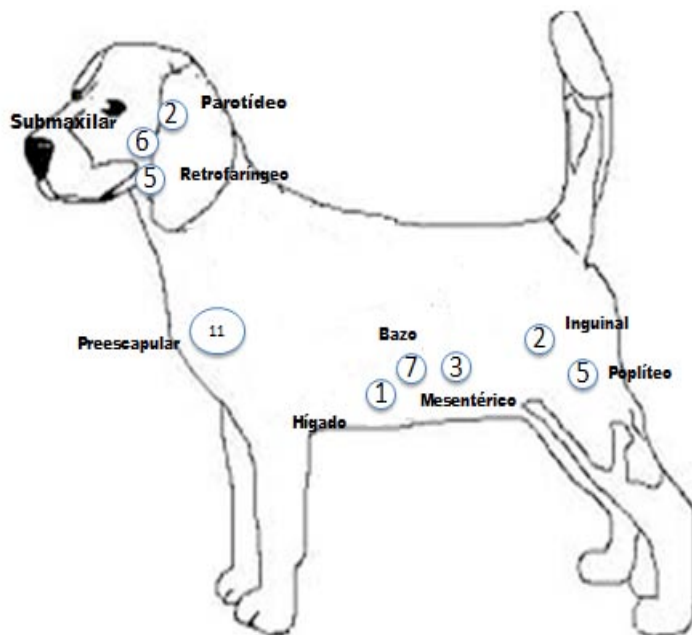


Figura 2. Resumen de aislamientos de los órganos de perros inoculados con la mutante *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  que comprende los cuatro periodos de tiempo analizados.

## 7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudió la virulencia residual de la cepa mutante de *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  en el modelo canino.

El conocimiento adquirido acerca de la virulencia de candidatos a vacunas contra la brucelosis, se basa en estudios realizados en especies lisas como *B. abortus*, y *B. melitensis*, sin embargo existen pocos reportes acerca de la virulencia y patogenicidad de candidatos a vacunas de *B. canis* (Clausse *et al.*, 2013). En el modelo murino se determinó la virulencia residual de las vacunas Rev 1 y RB51, observándose que de la cepa RB51 se obtuvieron aislamientos del hígado y del bazo hasta la quinta semana post-inoculación, y con la Rev 1 se lograron aislamientos en bazo hasta la octava semana (Hamdy *et al.*, 2002). En el presente trabajo se obtuvieron aislamientos de bazo y de hígado lo que coincide con los hallazgos antes mencionados, ya que la cepa mutante debe permanecer un período de tiempo en el animal para desencadenar una respuesta protectora.

Los resultados de sobrevivencia en el modelo perro demostraron la ausencia de la mutante de *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  en órganos reproductivos y vejiga, indicando una incapacidad de la cepa mutante para poder colonizar estos. El presente trabajo coincide con estudios previos donde se determinó la virulencia residual de la mutante de *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$ , y se demostró que no tiene la capacidad de replicarse en el modelo celular. Asimismo se sabe que en el modelo murino se obtuvieron aislamientos en bazo hasta el día 21 mostrando así que esta cepa mutante es avirulenta pero capaz de provocar una respuesta inmune humoral y celular suficiente para conferir protección frente al desafío experimental con una cepa virulenta de *B. canis*; esto confirma que el gen *virB11* es esencial para la virulencia y replicación intracelular de *Brucella* (Palomares *et al.*, 2012). Den Hartigh *et al.*, demostraron que en el modelo murino la mutación no polar de *virB11* en *B. abortus*, reduce notablemente la capacidad de persistencia en macrófagos murinos y en los bazos de los ratones hasta la octava semana después de la inoculación, mostrando así que éste gen es esencial para la supervivencia y la replicación en el animal (Den Hartigh *et al.*, 2008).

En un estudio donde se evaluó la virulencia residual de la vacuna de *B. melitensis* Rev 1 en carneros, se consiguieron aislamientos los días 15 y 30 post-inoculación en los nódulos linfáticos proximales al sitio de vacunación y del bazo, pero no se aisló de órganos reproductores (Muñoz et al, 2008); esto resalta la importancia de los hallazgos encontrados en el presente trabajo ya que no se lograron aislamientos en órganos reproductores ni en vejiga, atribuido esto a que la atenuación de la mutante disminuyó su virulencia y su capacidad de colonizarlos.

Los resultados mostrados en éste trabajo concuerdan con los trabajos antes mencionados, observando que en 11 de los 12 perros vacunados el mayor número de aislamientos se logró de los nódulos linfáticos cercanos al sitio de inoculación, tales como el preescapular, retrofaríngeo y parotídeo. Aunque hasta los 60 días hubo bacteremia y aislamiento de la mutante en nódulos linfáticos, el hecho de que la colonización del bazo fuera cercana al 50% (7 de 12 aislamientos) y que la colonización en hígado fuera reducida (1 de 12 aislamientos), en órganos reproductores y vejiga la colonización fuera nula, se puede atribuir a que la mutante disminuyó su virulencia. Estos resultados son congruentes con el enunciado de que las vacunas vivas tienen que sobrevivir el tiempo suficiente para ser inmunorreactivas en los tejidos del sistema reticuloendotelial, para garantizar una adecuada y duradera respuesta inmune. Debe destacarse que casi el 100% de los perros inoculados presentaron colonización, a diferencia de resultados observados en cabras que después de la vacunación con Rev 1, no todas las cabras inmunizadas fueron susceptibles a la colonización estando gestantes o vacías. En estudios realizados en cabras inmunizando con mutantes de *B. melitensis*, se determinó que las cabras inoculadas con la cepa parental y con las mutantes, tenían resultados semejantes en cuanto a la cantidad de linfonodos colonizados (Edmonds et al, 2002; Roop et al, 2001).

Se ha determinado que durante la infección por *B. canis* la cepa silvestre es eliminada en la orina de los perros (Serikawa et al, 1978; Carmichael y Joubert, 1988; Kauffman et al, 2014), siendo ésta una importante vía de transmisión, por esta razón en el presente estudio se colectaron la vejiga y muestras de la orina en los 12 perros inoculados, encontrando en el estudio



bacteriológico que todos los resultados fueron negativos, lo que demostró que la mutante no es eliminada por orina. En 1978, Flores realizó un experimento donde vacunó por vía subcutánea a 16 perros Beagles con la cepa mucoide menos (M-) de *B. canis* realizando estudios bacteriológicos obteniendo aislamientos bacteriológicos del bazo y de los nódulos linfáticos retrofaríngeos y preescapulares que son cercanos al sitio de la inoculación, sus resultados fueron similares a los obtenidos en el presente estudio. Asimismo se realizó hemocultivos encontrando bacteremia en los animales hasta los seis meses post-inoculación, lo que indica que la persistencia de la bacteria en sangre es una característica de la infección por *B. canis* (Wanke, 2004), pero no es necesariamente una causante de la infección generalizada en perros. En éste estudio con la mutante de *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  se determinó una bacteremia persistente aún hasta los 60 días, lo que concuerda con los resultados de Flores (1978) con respecto a la presencia de una bacteremia prolongada, esto sugiere que la persistencia de la mutante *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  podría ser favorable para conferir protección al animal.

## 8. CONCLUSIONES

- ✓ Se demostró que la mutante de *B. canis*  $\Delta virB11::Gmr$  es capaz de colonizar nódulos linfáticos y bazo en la mayoría de los perros, pero en órganos reproductores la colonización fue nula y no presentó eliminación por orina.
- ✓ La inoculación en perros con la mutante de *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  causa bacteremia persistente aún hasta los 60 días.
- ✓ La inoculación con la mutante de *B. canis*  $\Delta virB11::Gm^r$  en el modelo canino, no provocó la presencia de signos clínicos, ni lesiones macroscópicas en los órganos y nódulos linfáticos trabajados.
- ✓ La cepa mutante podría ser un buen candidato a ser usada como vacuna.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Adesiyum AA, Abdullahi SU, Adeyanju JB. Prevalence of *Brucella abortus* and *Brucella canis* antibodies in dogs in Nigeria. *Journal Small Animal Practice*, 1986, 27: 31-37.
- Ardoino SM, Baruta DA, Toso RE. Brucelosis canina. *Ciencia Veterinaria* 2006, vol. 8, N° 1.
- Arellano RB, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AE, Ugalde R, Moreno E, Moriyón I, Gorvel JP. Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nature immunology* 2005, 6(6):618-25.
- Atluri VL, Xavier MN, de Jong MF, den Hartigh AB, Tsolis RM. Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts., *Annual review of microbiology* 2011, 65:523-41.
- Barg L, de Godoy AM, Passos EB. Investigation of agglutinins for *Brucella abortus* and *Brucella canis* in human sera from Bahia-Brazil. *Arq. Esc. Vet.* 1981, 33:43-50.
- Barrionuevo P, Delpino MV, Velásquez LN, Samartino CG, Coria LM, Ibañez AE, Rodríguez ME, Cassataro J, Giambartolomei GH. *Brucella abortus* inhibits IFN-g-induced FcγRI expression and FcγRI- restricted phagocytosis via toll-like receptor 2 on human monocytes/macrophages. *Microbes and Infection* 2011, 13: 239-250
- Borie C, Cepeda R, Villarroel M, De Los Reyes M. Descripción de características reproductivas en tres perros seropositivos a *Brucella canis*. *Archivos Medicina Veterinaria* 2002, 34: 111-116.
- Boschioli M. L., Ouahrani-Bettache S., Foulongne V., Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, Cazevieuille C, Lavigne JP, Liautard JP, Ramuz M, O'Callaghan D. Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Veterinary Microbiology* 2002, 90, 341–34810.
- Briseño GH, Pàramo RR, Flores CR, Suárez GF. Problemas reproductivos en perros machos infectados con *Brucella canis*. *Veterinaria México* 2004, 35: 121-128.

- Brower A, Okwumabua O, Massengill C, Muenks Q, Vanderloo P, Duster M, Homb K, Kurth K. Investigation of the spread of *Brucella canis* via the U.S. interstate dog trade. *International Journal of Infectious Diseases* 2007, Volume 11, Issue 5, Pages 454–458.
- Brown J, Dreesen DW, Wooley RE, Blue JL, Shotts EB Jr. Serosurvey for *Brucella canis* antibodies in stray dogs of North Georgia and Port of Spain, Trinidad. *Caribbean Journal Science* 1982, 17: 95-105.
- Carmichael LE. *Brucella canis*. In: *Animal Brucellosis*. Nielsen KH and Duncan JR Ed. CRC Press Boca Raton. 1990. Florida, USA, pp. 336-350.
- Carmichael LE, Joubert JC. Transmission of *Brucella canis* by contact exposure. *Cornell Veterinary* 1988, 78: 63-73.
- Carmichael LE, Shin SJ. Canine brucellosis: A diagnostician's dilemma. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (small animal)* 1996, 11: 161-165.
- Celli J, Salcedo SP, Gorvel JP. *Brucella* coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, 102: 1673–1678.
- Clause M, Díaz AG, Ghersi G, Zylberman V, Cassataro J, Giambartolomei GH, Goldbaum FA, Estein SM. The vaccine candidate BLSOmp31 protects mice against *Brucella canis* infection. *Vaccine*. Dec 2013, 9; 31(51):6129-35.
- Corbel MJ. Brucellosis: an overview. *Emerging Infectious Diseases Journal* 1997, 3: 213-221.
- Corbel MJ, Brinley-Morgan WJ. Genus *Brucella* Meyer and Shaw 1920, 173<sup>AL</sup>, p. 377-388. In N. R. Krieg et al. (ed.), *Bergey's manual of systemic bacteriology* 1984, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.
- Davidson AP, Sykes JE. Chapter 53 - Canine Brucellosis. *Canine and Feline Infectious Diseases* 2014, Pages 512-519.
- De Bary M, Jamet A, Filopon D, Nicolas C, Laloux G, Rual JF, Muller A, Twizere JC, Nkengfac B, Vandenhoute J, Hill DE, Salcedo SP, Gorvel JP, Letesson JJ, De Bolle X. Identification of a *Brucella* spp.

secreted effector specifically interacting with human small GTPase Rab2. *Cellular Microbiology* 2011, 13(7):1044-58.

- De Barse M, Mirabella A, Letesson JJ, De Bolle X. A *Brucella abortus* cstA mutant is defective for association with endoplasmic reticulum exit sites and displays altered trafficking in HeLa cells. *Microbiology* 2012, 158(Pt 10): 2610-8.
- Den Hartigh AB, Rolan HG, De Hong MF, Tsolis RM. *VirB3* to *VirB6* and *VirB8* to *VirB11*, but Not *VirB7*, are essential for mediating persistence of *Brucella* in the reticuloendothelial system. *Journal of bacteriology* 2008, 190(13):4427-36.
- De Jong MF, Rolán HG, Tsolis RM. Microreview: Innate immune encounters of the (Type) 4th kind: *Brucella*. *Cellular Microbiology* 2010, Volume 12, Issue 9, pages 1195–1202.
- Ebani VV, Cerri D, Fratini F, Bey RF, Andreani E. Serological diagnosis of brucellosis caused by *Brucella canis*. *New Microbiology* 2003, 26: 65-73.
- Edmonds MD, Cloeckert A, Hagius SD, Samartino LE, Fulton WT, Walker JV, Enright FM, Booth NJ, Elzer PH. Pathogenicity and protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis* Delta omp25 deletion mutant. *Research in Veterinary Science* 2002, 72(3):235-9.
- Fugier E, Pappas G, Gorvel JP. Virulence factors in brucellosis: implications for aetiopathogenesis and treatment. *Expert reviews in molecular medicine* 2007, 9(35):1-10.
- Flores CR. Canine brucellosis: Analysis of methods for diagnosis and treatments. Faculty of the Graduate School of Cornell University August 1978.
- Flores CR, Segura R. A serological and bacteriological survey of canine brucellosis in Mexico. *Cornell Vet.* 1976, 66:347-352,
- Flores CR, Suárez GF, Ramírez PC, Carmichael L.E. Canine Brucellosis: Bacteriological and Serological Investigation of Naturally Infected Dogs in Mexico City. *Journal Clinical Microbiology* 1977, 6: 591-597.

- Forbes LB, Pantekoek JF. *Brucella canis* Isolates from Canadian Dogs. The Canadian Veterinary Journal 1988, 29(2): 149–152.
- Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckert A. *Brucella ceti* sp. nov and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. International. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2007, 57(Pt 11):2688-93.
- Gómez G, Adams LG, Ficht AR, Ficht TA. Host-*Brucella* interactions and the *Brucella* genome as tools for subunit antigen discovery and immunization against brucellosis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 2013, vol. 3, artc.17.
- Graham EM, Taylor DJ. Bacterial Reproductive Pathogens of Cats and Dogs. The Veterinary clinics of North America. Small animal practice 2012, 42; 561–582.
- Gutiérrez HR. Contribución al estudio sobre *Brucella canis* en perros nacionales y en perros introducidos al país por la aduana del Aeropuerto Internacional de la Ciudad de México. Facultad de Medicina Veterinaria: Universidad Nacional Autónoma de México, 1980.
- Godfroid J, Scholz HC, Barbier T, Nicolas C, Wattiau P, Fretin D, Whatmore AM, Cloeckert A, Blasco JM, Moriyon I, Saegerman C, Muma JB, Al Dahouk S, Neubauer H, Letesson JJ. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. Preventive Veterinary Medicine 2011, Volume 102, Issue 2, 1, Pages 118–131
- Hollett RB. Canine brucellosis: outbreaks and compliance. Theriogenology 2006, 66(3):575-87.
- Hamdy MER, El-Gibaly SM, Montasser AM. Comparison between immune responses and resistance induced in BALB/c mice vaccinated with RB51 and Rev. 1 vaccines and challenged with *Brucella melitensis* bv. 3. Veterinary Microbiology 2002, 2; 88(1):85-94.
- Jiménez FF. Comparación de 3 antígenos utilizados para el diagnóstico serológico de la brucelosis canina por la prueba de aglutinación en placa con y sin  $\beta$ -mercaptoetanol. Tesis de

Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, 2000.

- Kang SI, Lee SE, Kim JY, Lee K, Kim JW, Lee HK, Sung SR, Heo YR, Jung SC, Her M. A new *Brucella canis* species-specific PCR assay for the diagnosis of canine brucellosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2014.
- Kauffman LK, Bjork JK, Gallup JM, Boggiatto PM, Bellaire BH, Petersen CA. Early detection of *Brucella canis* via quantitative polymerase chain reaction análisis 2014, 61(1):48-54.
- Kulakov IK, Zheludkov MM, Dranovskaia EA, Skavronskaia AG. Comparative study of the antigenic composition of *Brucella canis* strains by immunoblotting. *Molekuliarnaia Genetika Mikrobiologiia Virusologiia* 1997, 3: 15-17.
- Lacerda TL, Salcedo SP, Gorvel JP. *Brucella* T4SS: the VIP pass inside host cells. *Current opinion in microbiology* 2013, 16(1):45-51.
- Larsson MH, da Costa EO. Isolation of *Brucella canis*. *International Journal Zoonoses* 1980, 7: 125-130.
- Makloski CL. Canine brucellosis management. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice* 2011, 41(6):1209-19.
- Marchesini MI, Herrmann CK, Salcedo SP, Gorvel JP, Comerci DJ. In search of *Brucella abortus* type IV secretion substrates: screening and identification of four proteins translocated into host cells through *VirB* system. *Cell Microbiology* 2011, 13:1261–1274.
- Martín MAI. Estudio de factores implicados en la virulencia de *Brucella ovis* y *Brucella canis*. Universidad de Salamanca, Departamento de Microbiología y Genética, 2010.
- Martín MAI, Vizcaíno N, Fernández LL. Cholesterol, ganglioside GM1 and class A scavenger receptor contribute to infection by *Brucella ovis* and *Brucella canis* in murine macrophages. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2010, 12(3):246-51.
- Martirosyan A, Gorvel JP. *Brucella* evasion of adaptive immunity. *Future Microbiology* 2013, 8.2; p147.

- Martirosyan A, Moreno E, Gorvel JP. An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunological reviews* 2011, 240(1):211-34.
- Marzetti S, Carranza C, Roncallo M, Escobar GI, Lucero NE. Recent trends in human *Brucella canis* infection. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 2013, 36(1):55-61.
- Méndez NG, Mota CE, Arellano RB, Monroy BJ, Díaz AE. Seguimiento de un brote de *Brucella canis* en un criadero de perros en la Ciudad de México. *Técnica Pecuaria México* 1999, 37: 43-50
- Mirkalantari S, Amirmozafari N, Kazemi B, Irajian G. Molecular cloning of *virB12* gene of *Brucella melitensis* 16M strain in pET28a vector. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2012, 511-513.
- Moreno E, Moriyón I. *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 2002, 99(1): 1–3.
- Moreno, E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M, Mayer H. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *Journal of Bacteriology* 1990, 172: 3569–3576.
- Muñoz PM, de Miguel MJ, Grilló MJ, Marín CM, Barberán M, Blasco J.M. Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. *Vaccine* 2008, 19; 26(21):2562-9.
- Myeni S, Child R, NgTW, Kupko JJ, Wehrly TD, Porcella SF, Knodler LA, Celli J. *Brucella* Modulates Secretory Trafficking via Multiple Type IV Secretion Effector Proteins. *PLOS Pathogens* 2013, Vol. 9, Issue 8.
- NOM-062-ZOO-1999, NORMA Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, <http://www.senasica.gob.mx/?doc=743>.
- Palomares RE, Arellano RB, Hernández CR., Tenorio GV, Salas TE, Suárez GF, Díaz AE. Immunogenic Response of *Brucella canis virB10* and *virB11* Mutants in a Murine Model. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2012; 2: 35.



- Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases* 2006, Volume 6, Issue 2, Pages 91 – 99.
- Roop RM, Phillips RW, Hagius S, Walker JV, Booth NJ, Fulton WT, Edmonds MD, Elzer PH. Re-examination of the role of the *Brucella melitensis* HtrA stress response protease in virulence in pregnant goats. *Veterinary microbiology* 2001, 3; 82 (1): 91-5.
- Salcedo SP, Marchesini MI, Lelouard H, Fugier E, Jolly G, Balor S, Muller A, Lapaque N, Demaria O, Alexopoulou L, Commerci DJ, Ugalde RA, Pierre P, Gorvel JP. *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLOS Pathogens* 2008, 4:e21.
- Serikawa T, Muraguchi T, Nakao N, Irie Y. Significance of urine-culture for detecting infection with *Brucella canis* in dogs. *Japanese Journal of Veterinary Science* 1978, 40: 353–355.
- Scholz HC, Hubalek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kämpfer P, Neubauer H, Cloeckaert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Falsen E, Bahn P, Göllner C, Pfeffer M, Huber B. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2008 58 (Pt 2):375-82.
- Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Kämpfer P, Cloeckaert A, Maquart M, Zygmunt M.S, Whatmore AM, Pfeffer M, Huber B, Busse HJ, De BK. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2010, 60 (Pt 4):801-8.
- Soloaga R, Salinas A, Poterallo M, Margari A, Suar B, Lucero N, Almuzaea M. Bacteriemia por *Brucella canis*: Aislamiento con el Sistema Bact-Alert. *Revista Argentina Microbiología* 2004, 36: 81-84.
- Starr T, Ng TW, Wehrly TD, Knodler LA, Celli J. *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2008, 9(5):678-94.

- Ström H. B, Löfqvist K, Ernholm L, Eld K, Cedersmyg M, Hallgren G, The first case of *Brucella canis* in Sweden: background, case report and recommendations from a northern European perspective, *Acta Veterinaria Scandinavica* 2012, 27;54:18
- The Center for food security and public health (CFSPH), Iowa State University, College of Veterinary Medicine 2012. [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis\\_canis.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_canis.pdf)
- Vitry MA, Hanot Mambres D, De Trez C, Akira S, Ryffel B, Letesson JJ, Muraille E. 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, 15;192(8):3740-52
- Von Bargen K, Gorvel JP, Salcedo SP. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS microbiology reviews* 2012, 36(3): 533-62.
- Wanke MM. Canine brucellosis. *Animal reproduction science* 2004, 82-83:195-207.
- Zygmunt MS, Blasco JM, Letesson JJ, Cloeckert A, Moriyón I. DNA polymorphism analysis of *Brucella* lipopolysaccharide genes reveals marked differences in O-polysaccharide biosynthetic genes between smooth and rough *Brucella* species and novel species-specific markers. *BMC Microbiology* 2009, 9:92.