



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**Efecto del eritritol en la colonización de *Brucella melitensis* (Rev 1 eryCD), en
el tracto reproductor de machos cabríos**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

PRESENTA:

MVZ. Isauro Alejandro López Vásquez

Comité tutorial:

Dr. Efrén Díaz Aparicio, INIFAP

Dr. Jorge Luis Tórtora Pérez, FESC-UNAM

Dr. Rigoberto Hernández Castro, Hospital Gea González

Ciudad Universitaria Cd. Mx. Marzo 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A los doctores del comité tutorial; Efrén Díaz Aparicio, Jorge Luís Tórtora Pérez y Rigoberto Hernández Castro, por sus aportaciones en la elaboración de la tesis.

Al Dr. José de Jesús Olmos Espejel por su valiosa ayuda en la medición del eritritol.

A mis papás y hermanos por sus consejos y apoyo incondicional.

A todas las personas que contribuyeron para que el trabajo fuera posible.

El estudio fue parcialmente financiado por el proyecto: Evaluación de inmunógenos proteicos encapsulados para la prevención de la brucelosis caprina. PAPIIT IT201517.

Índice

1.0 Resumen	4
2.0 Summary	5
3.0 Introducción	6
3.1 Antecedentes	6
3.2 Situación de la brucelosis	7
3.3 Características del género <i>Brucella</i>	8
3.4 Brucelosis en cabras	9
3.5 Vacuna Rev 1 contra <i>B. melitensis</i> en pequeños rumiantes	10
3.6 ¿Porque no se vacunan machos?.....	11
3.7 Estudios de vacunación en machos.....	11
3.8 Papel del eritritol en el tracto reproductivo de machos.....	12
3.9 Características de la cepa experimental <i>B. melitensis</i> Rev 1 Δ eryCD.....	13
4.0 Justificación	14
5.0 Hipótesis	15
6.0 Objetivo general	16
6.1 Objetivos específicos.....	16
7.0 Material y Métodos	17
7.1 Animales	17
7.2 Vacunación.....	17
7.3 Colección de muestras	17
7.4 Estudios Serológicos	18
7.5 Bacteriología.....	18
7.6 Extracción de ADN y PCR	19
7.7 Análisis de Histopatología.....	20
7.8 Inmunohistoquímica.....	20
7.9 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	21
8.0 Resultados	24
8.1 Respuesta Serológica	24
8.2 Aislamientos bacteriológicos en aparto reproductivo	25
8.3 PCR.....	26
8.4 Resultados Histopatología e Inmunohistoquímica.....	27
8.5 Concentración eritritol.....	29

9.0	Discusión	32
10.0	Conclusiones	35
11.0	Literatura citada	36

1 Resumen

Se evaluó el efecto que tiene el eritritol en la colonización de la cepa experimental de *Brucella melitensis* Rev 1 Δ eryCD y la cepa vacunal *B. melitensis* Rev 1 en el tracto reproductor de machos cabríos. Para el estudio se formaron tres grupos de 15 machos cada uno, dos de los grupos se vacunaron cuando los animales tenían aproximadamente seis meses de edad, el primer grupo con la cepa experimental Δ eryCD, el segundo grupo con la cepa vacunal Rev 1 y el grupo testigo fue inyectado con solución salina fisiológica estéril. Los tratamientos se aplicaron por vía subcutánea a la altura del pliegue del codo, ambas cepas se administraron a una dosis de 2×10^9 UFC/mL a intervalos de 30 días, durante cinco meses. A tres machos de cada grupo se les tomaron muestras de sangre y se les aplicó la eutanasia, para coleccionar los ganglios linfáticos inguinales, mesentéricos, mediastínicos, bazo, testículos, epidídimos, vesículas seminales, glándulas bulbouretrales y ámpula, para realizar estudios serológicos, bacteriológicos, PCR, histopatológicos, de Inmunohistoquímica y HPLC. En los animales vacunados con Δ eryCD y Rev 1 hubo una respuesta serológica con una duración de 121 días y 91 días post-vacunación, respectivamente. Referente a la colonización, la cepa Δ eryCD nunca se aisló de ningún órgano colectado, mientras que la cepa Rev 1 se aisló e identificó a partir de una muestra de testículo 91 días posteriores a la vacunación. Todos los tejidos analizados fueron negativos a PCR, incluso la muestra positiva a bacteriología. No se produjeron lesiones en los órganos reproductivos y glándulas sexuales accesorias en ningún animal, además, todas las muestras fueron negativas en la prueba de inmunohistoquímica. La relación entre la concentración de eritritol y la presencia de *B. melitensis* en tejido no se pudo realizar debido a que la técnica de HPLC para medir eritritol no se logró estandarizar, dado que el músculo retenía el analito en más de un 58%, además de la poca estabilidad del derivado, por lo cual solo se realizó el desarrollo del método y parte de la optimización. En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que la vacunación con ambas cepas no tiene un tropismo hacia órgano reproductivo y podría ser una opción para proteger a los machos cabríos.

2 Summary

The effect that erythritol has on the colonization of the experimental strain of *Brucella melitensis* Rev 1 Δ eryCD and the vaccine strain *B. melitensis* Rev 1 in the reproductive tract of male goats was evaluated. For the study, three groups of 15 males each were formed, two of the groups were vaccinated when the animals were approximately six months old, the first group with the experimental strain Rev 1 Δ eryCD, the second group with Rev 1 and the witness group was injected with sterile physiological saline. The treatments were applied subcutaneously at the level of the elbow fold, both strains were administered at a dose of 2×10^9 CFU/mL. At 30-day intervals, for five months, three males in each group were taken blood samples and euthanized to collect the inguinal, mesenteric, mediastinal lymph nodes, spleen, testicles, epididymis, seminal vesicles, bulbourethral glands and ampulla, for Perform serological, bacteriological, PCR, histopathological, Immunohistochemical and HPLC studies. In animals vaccinated with Rev 1 Δ eryCD and Rev 1 there was a serological response lasting 121 days and 91 days post-vaccination respectively. Regarding colonization, the Rev 1 Δ eryCD strain was never isolated from any organ collected, while the Rev 1 strain was isolated and identified from a testicle sample of a male 91 days after vaccination. All tissues were PCR negative including the one that tested positive for bacteriology. There were no lesions in the reproductive organs and accessory sex glands in any animal; in addition, all samples were negative to immunohistochemistry. The relationship between the concentration of erythritol and the presence of *B. melitensis* in tissue it could not be performed because the measurement of the analyte by HPLC could not be standardized, since the muscle retained the analyte in more than 58%, in addition to the poor stability of the derivative, so only the development was performed of the method and part of the optimization. In conclusion, the results obtained show that the vaccines studied do not have a tropism as such towards reductive organs, do not generate lesions and could be an option to protect male goats.

3 Introducción

En México, la producción caprina representa la principal actividad económica en zonas marginadas de Zacatecas, la comarca lagunera, la región mixteca de la sierra madre del sur (Puebla, Oaxaca y Guerrero) y en la zona del bajío, donde representan una de las principales fuentes de ingresos, a nivel nacional se tiene un estimado de nueve millones de cabras en territorio mexicano, que producen anualmente 3,400 toneladas de carne y 163, 650, 000 litros de leche, donde 250 mil familias de las zonas rurales viven de la caprinocultura (SAGARPA, 2017; CONEVAL, 2017; SIAP-SADER, 2018). El principal sistema de producción en México es de tipo extensivo y en menor número explotaciones de tipo intensivo (SAGARPA, 2013). Esto genera grandes limitaciones en la caprinocultura debido al bajo ingreso económico dado por la poca valoración de la leche y del cabrito, repercutiendo en el manejo sanitario del hato, en donde la brucelosis representa una de las enfermedades de mayor importancia, debido a que es una zoonosis, que es considerada “enfermedad ocupacional” de personas que trabajan con animales infectados o sus tejidos, es decir, particularmente veterinarios, granjeros y trabajadores de mataderos, así como de personas que consumen derivados lácteos sin pasteurizar (Castro et al., 2005; SSA, 2012).

3.1 Antecedentes

La enfermedad fue descrita por primera vez en 1887 por David Bruce, que logró aislar cocobacilos Gram negativos del bazo de cinco soldados británicos que murieron de fiebre en Malta (Bruce, 1887). En 1905, Zammit demostró que cabras infectadas, aparentemente sanas, transmitían la brucelosis al consumir su leche sin pasteurizar (Zammit, 1905; Wyatt, 2005). La bacteria fue nombrada inicialmente *Micrococcus melitensis*, y más tarde se le cambió el nombre a *Brucella melitensis* en honor a David Bruce (Hernández, 2002; Vega-López et al., 2008).

En México las primeras descripciones sobre brucelosis se realizaron en 1905 y 1906, por los doctores Valenzuela y Carbajal. En 1921, el doctor Manuel Vergara describió casos de brucelosis en la ciudad de Puebla (Vega-López et al., 2008) y en

1923, se aisló e identificó por primera vez *B. melitensis* en 5 casos clínicos de humanos con síntomas sugerentes a brucelosis, con lo cual se constató de forma inequívoca la existencia de brucelosis en México (Hernández, 2002).

3.2 Situación de la brucelosis

A nivel mundial, la brucelosis es considerada una de las zoonosis más importantes, los mayores niveles de incidencia se sitúan en el Medio Oriente, la región mediterránea, África Subsahariana, China, India, Perú y México. Actualmente, el crecimiento más agudo en número de casos se registra en países de Asia Central y Suroriental (OIE). Mientras que los países que se encuentran libres del agente infeccioso en animales de producción son; Europa Occidental y del Norte, Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda (OIE).

El gobierno mexicano implementado desde 1995, la campaña para el control y erradicación de la brucelosis en los animales, sin embargo, la incidencia de la enfermedad aún perdura. Solo el estado de Sonora se encuentra libre de brucelosis causada por especies lisas y el 31% del territorio nacional está reconocido en fase de erradicación de brucelosis (reconocidos los estados de Baja California Sur, Campeche, Colima, Guerrero, Nayarit, Quintana Roo y Yucatán) (SENASICA) Figura 1.

Figura 1. Situación actual del control de brucelosis en México.



3.3 Características del género *Brucella*

La brucelosis es una zoonosis bacteriana causada por microorganismos intracelulares del género *Brucella*. Son cocobacilos, Gram negativos, aeróbicos estrictos, inmóviles, de crecimiento lento, con tamaño entre 0.5-0.7 μm x 0.5-1.5 μm (Hernández, 2002; Castro et al., 2005). El género comprende varias especies que se pueden dividir en función de su hospedero preferencial en: *B. abortus* que ocasiona brucelosis principalmente en bovinos, *B. canis* que infecta principalmente a perros, *B. melitensis* que afecta principalmente caprinos y ovinos, *B. suis* que infecta principalmente cerdos, *B. ovis* que solo afecta a los ovinos, *B. neotomae* que se presenta en ratas de desierto, *B. ceti* y *B. pinnipedialis* que se asocia con infección en mamíferos marinos, *B. microti* que infecta al ratón de campo, y *B. inopinata* relacionada con una infección de implante mamario (Corbel, 1997; Jahans et al., 1997; Cloeckert et al., 2001; Boschiroli et al., 2001; Osterman y Moriyon 2006; Scholz et al., 2008; De-BK et al., 2008).

Con el estudio de las secuencias genómicas se ha logrado observar en *Brucella* spp., la ausencia de genes que codifican para diversos factores de virulencia como cápsula, fimbrias, exotoxinas, citolisinas, así como variación antigénica (Moreno y Moriyón, 2002; Cluter et al., 2005). El genoma de la mayoría está constituido por dos cromosomas circulares y todas las especies carecen de plásmidos (Flores-Castro, 2010). La membrana externa de la bacteria está compuesta por el lipopolisacárido (LPS), que se considera un importante factor de virulencia, presenta tres regiones con diferentes propiedades químicas y biológicas: el lípido A, el oligosacárido central y el polisacárido O (Raetz et al., 2002; Lapaque et al., 2005; Conde-Álvarez et al., 2013; Valvano et al., 2011).

Las cepas del género *Brucella* se dividen en lisas y rugosas de acuerdo a su LPS; las cepas lisas expresan en el LPS la cadena O, mientras que las especies rugosas han reducido sustancialmente o carecen de la cadena O. Las cepas lisas, *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* son patógenas para los humanos. De las cepas rugosas *B. canis* y *B. ovis*, solo *B. canis* es patógena para los humanos, pero ambas son totalmente virulentas para sus hospederos naturales caninos y ovinos, respectivamente (Rajashekara et al., 2004).

3.4 Brucelosis en cabras

El principal agente etiológico de la brucelosis en caprinos es *B. melitensis*. También es el principal agente responsable de la brucelosis humana, conocida como Fiebre de Malta (FAO, 2006). El ganado infectado presenta signos clínicos de gran importancia económica, en las hembras sexualmente maduras provoca reducción de la fertilidad, aborto, disminución en la producción de leche durante la vida útil del animal, en los machos coloniza el aparato reproductivo ocasionado orquitis y epididimitis, aunque también se han reportado caso de artritis (West et al., 1978; Alton, 1990; Robles et al., 2007; Blasco y Molina-Flores, 2011; McDermott et al., 2013; Lebreet al., 2014).

La principal vía de trasmisión de *B. melitensis* es la oral, por la ingesta de alimento o agua contaminados con secreciones vaginales o restos de abortos de animales infectados. Para las brucelas lisas, no se acepta que la vía venérea tenga importancia epidemiológica en la transmisión de la enfermedad, sin embargo, *B. melitensis* es excreta en leche y calostro, de tal modo que la mayoría de las infecciones latentes probablemente se contraen a través del consumo de estos productos (Samartino y Enright, 1993; Grillo et al., 1997; Blasco, 2010; OIE, 2010; Poester et al., 2013).

La prueba de tarjeta con antígeno de *B. abortus* a una concentración del 3%, es la prueba clásica más utilizadas para el diagnóstico serológico de brucelosis en caprinos, dado que detecta la presencia de anticuerpos circulantes IgM de origen vacunal e IgG debidos a infecciones naturales. Esta prueba tiene una sensibilidad cercana al 100%, además es sencilla, económica y práctica. No obstante, existe el riesgo de dar resultados falsos positivos por reacciones cruzadas con géneros bacterianos como *Salmonella*, *E. coli*, *Yersinia* y *Pseudomonas*, por lo cual la NOM-041-ZOO-1995 para el control y erradicación de brucelosis indica que se debe utilizar la prueba de fijación del complemento (FC) como prueba confirmatoria. Sin embargo, en caso de cabras vacunadas con Rev 1 a cualquier dosis, la campaña estable que no debe realizarse las pruebas de tarjeta y FC, hasta después de 8

meses post vacunación, ya que antes estas pruebas no son capaces de diferenciar entre anticuerpos vacunales y de infección. Por lo cual la utilización de técnicas como la inmunodifusión radial (IDR) con hapteno nativo, es una prueba que permite diferenciar tempranamente los animales vacunados de los infectados (Alton et al., 1988; Díaz-Aparicio et al., 1994; Blasco, 2004).

El control y erradicación en México de la brucelosis se apoya en la identificación de los animales infectados y en la eliminación de los mismos. Asimismo, la vacunación de los animales constituye un importante pilar para el control de la enfermedad (Nicoletti, 1993; Minas, 2006).

3.5 Vacuna Rev 1 contra *B. melitensis* en pequeños rumiantes

Es una vacuna viva que se derivó originalmente de *B. melitensis*, en 1957, por pase secuencial en medios que contenían estreptomycinina hasta que se desarrollaron clones resistentes a la estreptomycinina (Elberg y Faunce, 1957). El uso de esta vacuna desde esos años y hasta la actualidad es mundial, porque es eficaz para proteger contra la brucelosis al ganado ovino y caprino, debido a que induce una respuesta celular semejante a la causada por la infección natural.

La cepa Rev 1 produce un alto nivel de inmunidad contra una infección natural o experimental (Alton, 1987). Sin embargo, presenta desventajas al vacunar cabras y ovejas gestantes a una dosis de 1×10^9 UFC/mL, presenta virulencia residual causando abortos y la excreción de la bacteria en fluidos vaginales y leche. Además de que ingresa a la sangre de las ovejas un día después de la inmunización y puede persistir en ella durante 60 días, de ahí se puede explicar su capacidad de transmisión entre los animales (Kojouri y Gholami, 2009).

A nivel nacional para el control de brucelosis se utiliza la cepa Rev 1 a una dosis de 1 o 2×10^9 UFC/mL en cabritas jóvenes, de 3 a 4 meses de edad y la dosis reducida 1×10^5 UFC/mL en cabras adultas no gestantes mayores de cinco meses.

3.6 ¿Porque no se vacunan machos?

La Norma oficial mexicana para el control de brucelosis (NOM-041-ZOO-1995) establece que no debe aplicarse en ningún caso la vacuna *B. melitensis* Rev 1 a caprinos machos, esto debido a la aseveración de que la cepa tiene un tropismo hacia los órganos reproductivos del macho por la presencia del eritritol, sin embargo, no existen trabajos que lo comprueben dicha aseveración, esto trae como consecuencia que los machos queden desprotegidos contra la enfermedad. West et al., 1978, menciona que la causa fundamental de no vacunar machos es que no son relevantes en la epidemiología de la enfermedad y la cepa vacunal puede inducir artritis e incapacitarlos (hasta 13% de animales vacunados). por lo tanto, la cepa vacunal no se utiliza y se realizan pocos estudios al respecto.

3.7 Estudios de vacunación en machos

La vacunación de carneros contra la infección por *B. ovis* se utilizó por primera vez en Nueva Zelanda en 1955. Sin embargo, este procedimiento disminuyó después de varios años, porque en muchos casos, la vacunación con cepa 19 de *B. abortus* ocasionaba secuelas adversas. Estos incluyeron una pequeña proporción de carneros con persistencia del organismo en el semen durante períodos prolongados (Buddle, 1962; Hughes y Claxton, 1968). Cojera posterior a la vacunación que afecta hasta el 75% y abscesos en el lugar de la inyección, aunque no está claro la dosis que se empleaba (Kater y Hartley, 1963; West et al., 1978).

Existen otros trabajos en ovinos, realizados por el grupo de José María Blasco en España, donde señala inequívocamente que la Rev 1 puede aplicarse en carneros sin causar los trastornos referidos en los órganos reproductivos. En el estudio vacunaron con Rev 1 a 29 corderos de tres meses de edad a una dosis de 2×10^9 UFC/mL y 14 corderos fueron revacunados con 5×10^8 UFC/mL a los 14 meses de edad, seis corderos permanecieron sin vacunar. Todos los carneros fueron desafiados vía conjuntival a los veintiún meses de edad empleando la cepa virulenta de *B. ovis* con dos gotas de 33 μ L cada una, que contenían 5×10^8 UFC y se mataron

ocho semanas después. En el estudio histopatológico en el epidídimo, testículos y glándulas vesiculares se observaron lesiones más severas en el grupo testigo que en los grupos vacunados, pero nunca estuvo involucrada la cepa vacunal sino la cepa de desafío (Blasco et al., 1987).

Otro estudio fue realizado por Muñoz et al., en el 2008, quienes evaluaron la respuesta inmunopatológica y la distribución de Rev 1 en corderos inmunizados de tres a cuatro meses de edad y mayores de un año, los animales se mataron a intervalos establecidos, en ambos grupos no se encontró colonización en órganos genitales y glándulas accesorias, restringiéndose la cepa *B. melitensis* Rev 1 específicamente en los nódulos linfáticos, craneal, escrotal, iliaco, pre-escapular y el bazo.

3.8 Papel del eritritol en el tracto reproductivo de machos

El eritritol es un alcohol polihídrico de cuatro carbonos que los rumiantes sintetizan en el tracto reproductor. *Brucella* es uno de los pocos géneros bacterianos capaces de utilizar eritritol como fuente de carbono, lo que constituye un rasgo distintivo de este microorganismo (Keppie et al., 1965; Corbell y Briimley, 1982). La presencia del eritritol en los testículos y en las vesículas seminales de toros, carneros, venados y machos cabríos, así como en la placenta de los ungulados, estimularía multiplicación de *Brucella* (Keppie et al., 1965; Alton y Forsyth, 1996).

Los cuatro genes del catabolismo de eritritol están organizados en el operón *ery* dentro del fragmento cromosomal de *B. abortus*, tiene cuatro marcos de lectura abierta. El primer gen (*eryA*) codifica para eritritol cinasa. El segundo gen (*eryB*) es para eritritol fosfato deshidrogenasa. El tercer gen (*eryC*) codifica para una xilosa isomerasa y el cuarto gen (*eryD*) codifica para un regulador de la expresión del operón (Figura. 2) (Barbier et al., 2014).

El catabolismo del eritritol es iniciado por el operón *ery*, pero participa un segundo operón que se encuentra debajo del operón *ery*, es altamente conservado y que contiene tres ORF, incluidos *tpiA2* y *rpiB* (Figura. 2) (Geddes et al., 2013).

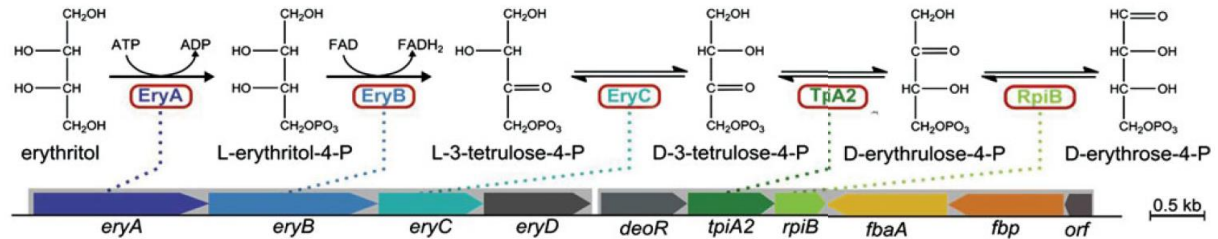


Fig. 2. Catabolismo del eritritol por *Brucella* spp. (1) El eritritol se fosforila por la eritritol quinasa (*eryA*) para producir L-eritritol-4-P que luego se oxida por la *eryB* deshidrogenasa a L-3-tetrolosa-4-P, ahora este intermediario se convierte en D-eritrosa-4-P a través de tres reacciones de isomerización catalizadas por *eryC*, *tpiA2* y *rpiB*. Los genes están organizados en dos operones que comprenden también dos reguladores (*eryD* y *deoR*). D-eritrosa-4-P es procesada adicionalmente por enzimas de la ruta de la pentosa fosfato para generar fructosa-6-P y gliceraldehído-3-P, dos intermediarios de la glucólisis/gluconeogénesis (Barbier et al., 2014).

El uso de la ruta para metabolizar el eritritol, no se limita a *Brucella*, ni a su estilo de vida patógeno intracelular, sino que es compartido por otros miembros como *Ochrobactrum anthropi* que es una bacteria ambiental, *Rhizobium leguminosarum* y *Sinorhizobium meliloti*, ambos simbioses de plantas (Sangari y Agüero, 1991).

3.9 Características de la cepa experimental *B. melitensis* Rev 1 Δ *eryCD*

La cepa *B. melitensis* Rev 1 Δ *eryCD* se construyó cumpliendo las mismas características que la cepa vacunal *B. abortus* S19, tiene una delección de 702 pb en los genes *eryC* y *eryD* para inhibir el catabolismo del eritritol. Esta vacuna fue elaborada por el Dr. Félix Sangari de la Universidad de Cantabria, España en el 2014. Al poseer la cepa Rev 1 el operón *ery* completo, puede metabolizar el azúcar eritritol y esto podría favorecer su capacidad para colonizar los órganos sexuales, por lo cual a utilizar una vacuna con la delección en el operón *ery*, se pueden disminuir los efectos que ocasionaría la vacunación de cabritos con la cepa Rev 1.

4 Justificación

La vacunación es un método de prevención que se utiliza en diversas enfermedades de manera exitosa. En el ganado caprino para el control de la brucelosis se emplea a nivel mundial la cepa viva atenuada Rev 1, ya que ha demostrado que confiere un alto nivel de inmunidad, sin embargo, en los machos cabríos no se utiliza dicha vacuna debido a la aseveración que tiene tropismo hacia los órganos sexuales del macho, donde la presencia del azúcar eritritol favorece su colonización y proliferación, sin que se existan caso que lo demuestren. Esto ha ocasionado que los machos no se vacunen y queden desprotegidos contra la enfermedad. Es por ello que la utilización de una cepa experimental, como es el caso *B. melitensis* Rev1 Δ eryCD, que a diferencia de Rev1, carece de los genes que le permiten metabolizar el eritritol, por lo cual no colonizaría los órganos reproductivos, podría ser una alternativa para proteger a los machos y reducir las pérdidas económicas ocasionadas por eliminación de animales positivos.

5 Hipótesis

Si existe la presencia del eritritol en los órganos sexuales del macho cabrío, entonces en los cabritos vacunados con la cepa experimental de *B. melitensis* Rev 1 $\Delta eryCD$ no se inducirá la colonización y la presencia de lesiones en los órganos sexuales, a diferencia de los inmunizados con la cepa parental Rev 1.

6 Objetivo general

Demostrar que la presencia del eritritol en los órganos sexuales del macho cabrío, no induce la presencia de lesiones en el aparato reproductor de cabritos vacunados con la cepa *B. melitensis* Rev 1 Δ eryCD.

6.1 Objetivos específicos

- Determinar por medio de la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) la concentración de eritritol, en órganos sexuales y en las glándulas accesorias de cabritos de seis a 12 meses de edad.
- Establecer la relación entre la presencia de eritritol, la colonización y las lesiones causadas por las cepas de *B. melitensis* Rev 1 Δ eryCD y Rev 1 parental, en órganos sexuales y en las glándulas accesorias de cabritos.

7 Material y Métodos

7.1 Animales

Se adquirieron cuarenta y ocho cabritos de cuatro a cinco meses de edad procedentes de rebaños libres de brucelosis, a estos animales se les realizó la prueba de tarjeta al 3% para corroborar su estatus seronegativo, y posteriormente se alojaron en instalaciones del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad que pertenece al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en el Km 15.5, de la Carretera federal México-Toluca en la Ciudad de México, que cuenta con las instalaciones adecuadas para el manejo de pequeños rumiantes.

7.2 Vacunación

Con estos animales se formaron tres grupos de 15 cabritos cada uno. Dos de los grupos se vacunaron cuando los animales tenían aproximadamente seis meses de edad, el primer grupo con la cepa experimental $\Delta eryCD$, el segundo grupo con Rev 1 y el tercer grupo se inyectó con solución salina fisiológica estéril (SSF) como grupo control. En los tres casos las aplicaciones fueron por vía subcutánea a la altura del pliegue del codo, ambas cepas se administraron a una dosis de 2×10^9 UFC/mL.

7.3 Colección de muestras

El día cero previo a la vacunación, a 3 cabritos que no fueron incluidos en los grupos experimentales, se les aplicó la eutanasia con la finalidad de conocer el estatus de salud y realizar pruebas previas a la evaluación de los grupos. La eutanasia fue mediante la insensibilización instantánea con un disparo con pistola de perno cautivo calibre 0.22 (Cash Special) y exanguinación por corte de las venas yugulares dentro de los 30 primeros segundos de acuerdo a la NOM-033-SAG/ZOO-2014, se colectaron los ganglios linfáticos inguinales, mesentéricos, mediastínicos, bazo, los testículos, los epidídimos, las vesículas seminales, las glándulas bulbouretrales y el ámpula para estudios de bacteriología, histopatología,

inmunohistoquímica, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Posteriormente cada mes durante cinco meses se sometieron a eutanasia tres cabritos de cada grupo repitiendo el proceso antes mencionado.

7.4 Estudios Serológicos

A todos los animales se le tomaron muestras de sangre de la vena yugular el día cero (antes de la vacunación) y antes de practicarles la eutanasia. Mediante agujas vacutainer desechables (21 mm) y tubos sin anticoagulante, cada muestra se rotuló con la identificación del animal, se centrifugaron a 3,500 rpm x 5 min, se separó el suero en tubos de 1.5 ml estériles y se congelaron a -20°C para su uso posterior. El suero se utilizó para el diagnóstico de *B. melitensis* mediante la prueba de tarjeta al 3%. A las muestras positivas se les realizó la prueba complementaria de inmunodifusión radial (IDR) empleando hapteno nativo (HN), que permitiera diferenciar si un animal es positivo debido a la vacunación o por una infección de campo.

7.5 Bacteriología

Las muestras de nódulos linfáticos, mesentéricos, mediastínicos, bazo, testículos, epidídimos, vesículas seminales, glándulas bulbouretrales y el ámpula, se identificaron con el número de animal y se trabajaron en el laboratorio de enfermedades bacterianas de los pequeños rumiantes del INIFAP, donde a cada órgano se le agregó 2 mL de solución salina estéril y se maceró de manera independiente. Con ayuda de hisopos estériles se tomó muestra del macerado y se sembraron de manera masiva en placas de agar Farrell. Se incubaron por 10 días a 37°C, cada tercer día se revisaron para ver si existía crecimiento de algún microorganismo, de ser así se realizaba tinción de Gram. En los cultivos que presentaban características a *Brucella* spp., se resembraba en placas de agar *Brucella* para tener un cultivo puro para PCR y guardar la cepa a -20°C.

7.6 Extracción de ADN y PCR

La extracción de ADN se realizó a partir de las muestras colectadas de testículos y epidídimos de las distintas eutanasias. De igual forma se analizaron todos los órganos obtenidos en la tercera eutanasia (91 días post vacunación). Los tejidos utilizados se descongelaron y maceraron de manera independiente, se tomaron 250 µL del macerado y se realizó la extracción con el juego de reactivos comercial QIAamp DNA Mini Kit, acorde al procedimiento del fabricante. Se utilizó entre 100 ng del ADN extraído como template para realizar la PCR.

Para la PCR se preparó un volumen de 50 µL, que contenía amortiguador para PCR 1X, 1 mM de magnesio, 200 µM de cada nucleótido trifosfatado, 1 µM de cada uno de los oligonucleótido y dos unidades de Taq polimerasa.

Las condiciones de la reacción de la PCR fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos a 94°C por 1 min, 59°C por 30s, 72°C por 1:30 min y una extensión final de 72°C por 5 min.

Cuadro 1.- Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para detección de *B. melitensis* mediante PCR.

Oligonucleótido	Secuencia	Genes
Ery 1	5`TTGGCGGCAAGTCCGTCCGGT`3	eryC-eryD
Ery 2	5`CCCAGAAGCGAGACGAAACG`3	

Se preparó un gel de agarosa al 2%, en el cual se depositó 5 µL del producto amplificado de la PCR y se corrió a 60V durante 1 h.

El producto esperado para la cepa Δ eryCD fue de 361 pb, por la delección de los genes C y D, y para Rev1 de 1063 pb (Sangari et al., 1994).

7.7 Análisis de Histopatología

Las muestras de testículos, epidídimos, vesículas seminales, glándulas bulbouretrales y ámpula, al momento de ser colectadas se fijaron en formalina al 10%, y se llevaron a el laboratorio de histología y biología de la UNAM-FES Cuautitlán campo 4, donde se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol, para después ser incluidas en parafina, se seccionaron a un tamaño aproximado de 4 μm , para ser montadas en portaobjetos, rehidratadas y teñidas con hematoxilina y eosina (HE), y se observaron en el microscopio óptico.

7.8 Inmunohistoquímica

En la técnica se utilizaron los testículos y epidídimos obtenidos a lo largo del estudio en los diferentes grupos. Los bloques se seccionaron a 4 μm , se montaron al portaobjetos y fijaron con albúmina de Mayer, al día siguiente se desparafinaron con xileno y fueron rehidratados a través de una serie de lavados con alcohol en concentraciones decrecientes. La recuperación de antígeno se realizó calentado la solución tampón de citrato de sodio 10 mM (pH 6) en microondas durante 1 min, posteriormente se introdujeron los portaobjetos y se dejaron incubando durante nueve minutos en esta solución, se lavaron con solución tampón de fosfato salino, después se utilizó el peróxido de hidrogeno al 3% durante 5 min para inactivar la peroxidasa endógena y se bloqueó con leche descremada al 5% durante 15 min a temperatura ambiente. A los portaobjetos se les agregó el anticuerpo primario policlonal de conejo contra *B. melitensis* a una dilución de 1:10 (Sigma-Aldrich), y se incubaron durante toda la noche a 4°C, al día siguiente se utilizó el anticuerpo secundario IgG anti-conejo de cabra conjugado con peroxidasa a una dilución de 1:100 (Sigma-Aldrich), y se dejó incubar durante 2 h a 37°C, se realizó el revelado con diaminobencidina al 0.5% durante 10 min y se contrastó con hematoxilina de Harris durante 1 min, los portaobjetos se deshidrataron, se aclararon y se montaron para su lectura en microscopio óptico.

Como testigo positivo, se infectó una rata Wistar por vía intra-peritoneal con 1 ml de una cepa de referencia de *B. melitensis* 16M a una concentración de 2×10^6 UFC/mL, a los 16 días post-infección se le practicó la eutanasia por dislocación cervical, se obtuvo el bazo y se fijó en formalina al 10%, posteriormente se incluyó en parafina para su procesamiento.

7.9 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La medición de eritritol se realizó mediante la técnica de HPLC. Los reactivos utilizados fueron: meso-eritritol como estándar interno y cloruro de 4-nitrobenzoilo (PNBC, por sus siglas en inglés) como derivatizante, ambos adquiridos de la empresa Sigma-Aldrich.

Preparación de estándares

Se trabajó con muestras estándares para el desarrollo y optimización del método. Para la preparación del estándar de eritritol, se utilizó un volumen de entre 20 y 150 μ L del eritritol a una concentración de 40 ppm y se mezcló con 150 μ L de PNBC a 20,000 ppm. Mientras que el estándar de PNBC puro se preparó solo con 150 μ L de PNBC a 20,000 ppm.

Al final todas las mezclas se incubaron durante 10 min a 50°C, se aforó hasta 1 mL con agua desionizada y se analizó con el sistema HPLC.

Efecto del pH en la reacción de derivatización

En el estudio se evaluó el efecto que tenía el pH en la estabilidad del derivado, para ello se realizaron experimentos por separado con las muestras estándares en donde se les agregó un buffer de carbonato a pH = 11 o un buffer borato con pH = 8.0. Se incubaron durante 10 min a 50°C, se aforó hasta 1 mL con agua desionizada y se analizó con el sistema HPLC.

Curva de calibración

Se preparó una curva de calibración agregando diferentes alícuotas de estándar de eritritol seguidos de 150 μ L de PNBC a 20,000 ppm y 200 μ L de una disolución buffer de carbonatos 0.1 M. Cada disolución se incubó por 10 min a 50 °C y se aforó a 1 mL con agua desionizada. La linealidad se evaluó en el intervalo de concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, y 6 mg/L. Se evaluó la repetibilidad preparando e inyectando por triplicado cada punto de la curva, se calculó el porcentaje del coeficiente de variación (CV %) en cada punto.

Técnica de extracción en tejido con disolventes

Para el desarrollo del método se utilizaron muestras de testículo de ganado ovino procedente de mercados locales. El tejido se cortó en trozos de aproximadamente 2 x 2 cm, se liofilizó en el laboratorio de virología y enfermedades respiratorias de cerdos de la FES Cuautitlán-UNAM. Posteriormente las muestras se trabajaron en el laboratorio de química analítica de la FESC Cuautitlán-UNAM.

Para extraer el eritritol del músculo, los tejidos liofilizados se maceraron utilizando un mortero de ágata, posteriormente se pesó 100 mg del macerado y se le agregó 1.5 mL de ACN, se agitó con vórtex durante 2 min, para después, centrifugar a 3,500 rpm durante 15 min para precipitar contaminantes del tejido, por último, el sobrenadante se recuperó en viales y se evaporó a sequedad con un flujo de nitrógeno a temperatura ambiente.

Derivatización

Los residuos de la extracción se resuspendieron en 150 μ L de PNBC a una concentración de 20,000 mg/L y se incubó durante 10 min a 50°C. Finalmente, la mezcla se aforó hasta 1 mL con agua desionizada y se analizó con el sistema HPLC.

Efecto matriz

Se evaluó el efecto matriz del músculo, con la finalidad de conocer la concentración real del analito dentro del tejido. Para ello, durante el estudio se realizaron varias mediciones de las siguientes muestras: A) Estándar, B) músculo fortificado antes de realizar la extracción, C) músculo fortificado después de realizar la extracción, D) blanco y E) PNBC puro. Cada estándar y muestra fortificada utilizada tenía una concentración de 8 mg/L de eritritol. Las muestras fueron derivatizadas y analizadas con el sistema HPLC.

Posteriormente, se hizo el cálculo del recobro de eritritol en cada una de las muestras y se determinó si existe diferencias entre la respuesta en la muestra fortificada antes y después de la extracción y se compararon con la disolución estándar.

Condiciones cromatográficas

Las separaciones fueron realizadas en un cromatógrafo *Waters* compuesto por una bomba binaria 1625, un detector UV/VIS modelo 2487 y un automuestreador 717 plus. Se utilizó una columna ZORBAX XB-Phenyl de 150 mm de largo, 4.6 mm de ancho y diámetro de partícula de 3.5 µm. La fase móvil estuvo compuesta por el gradiente descrito en el Cuadro 2. La longitud de onda fue 260 nm.

Cuadro 2. Gradiente de elución utilizado como fase móvil para la separación del eritritol mediante HPLC.

Tiempo (min)	% MeOH	% Agua	Flujo (mL/min)
0	65	35	1.2
6	85	15	1.2
8	65	35	1.2
12	65	35	1.2

8 Resultados

8.1 Respuesta Serológica

La respuesta serológica antes y después de la vacunación, se determinó mediante la prueba de tarjeta al 3% (Cuadro 3). En este estudio todos los animales resultaron seronegativos antes de aplicar la vacuna (día 0), y 35 días posteriores a la vacunación (primer análisis) dos de tres animales eutanasiados del grupo Rev 1 y los tres del grupo $\Delta eryCD$ presentaron anticuerpos vacunales. Por otro lado, en el seguimiento de la respuesta humoral, el grupo testigo se mantuvo negativo durante todo el estudio, en cambio el grupo experimental $\Delta eryCD$ presentó el mayor número de animales seropositivos en cada evaluación, además de una mayor duración de anticuerpos detectándose 126 post-vacunación en dos de tres animales, mientras que en el grupo Rev 1 la respuesta serológica persistió hasta los 91 días en un animal (Cuadro 3). Cabe aclarar que todos los animales positivos a la prueba de tarjeta resultaron negativos a la prueba de IDR, lo que indica que los anticuerpos detectados eran ocasionados por la vacunación y no por una infección de campo.

Cuadro 3. Resultados de la prueba de tarjeta al 3% al momento de la eutanasia

Grupos	Días post-vacunación					
	0	35	63	91	126	183
Testigo	-	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Rev 1	-	2/3	1/3	1/3	0/3	0/3
$\Delta eryCD$	-	3/3	2/3	2/3	2/3	0/3

8.2 Aislamientos bacteriológicos en aparto reproductivo

Los aislamientos de *B. melitensis* en los diferentes órganos colectados se muestran en el Cuadro 4. En el grupo testigo y $\Delta eryCD$ no hubo ningún aislamiento de *B. melitensis* en los distintos órganos analizados a lo largo del estudio. Por el contrario, en el grupo Rev 1 la cepa vacunal *B. melitensis* Rev 1 se aisló a partir de una muestra de testículo izquierdo 91 días posteriores a la vacunación. Fue el único caso, pero para descartar que el medio de cultivo utilizado agar Farrell, hubiera inhibido el crecimiento de *B. melitensis* se volvieron a inocular todas las muestras del día 91 post-vacunación en agar *Brucella*, con los mismos resultados.

Cuadro 4.- Numero de Aislamientos de *Brucella melitensis* en los órganos colectados de machos cabríos de los dos grupos vacunados y del grupo testigo sin inmunizar.

Órganos	Testigo	$\Delta eryCD$	Rev 1
Bazo	0	0	0
NL Inguinal	0	0	0
NL Mediastínicos	0	0	0
NL Mesentéricos	0	0	0
Testículo Derecho	0	0	0
Testículo Izquierdo	0	0	1
Epidídimo Derecho	0	0	0
Epidídimo Izquierdo	0	0	0
Glándula Bulbo Uretral	0	0	0
Vesícula seminal	0	0	0
Ámpula	0	0	0
Total	0	0	1

8.3 PCR

En el estudio de la PCR, todos los órganos analizados dieron resultado negativo a la prueba, no se detectó ADN de *B. melitensis* incluso en el tejido que resultó positivo a bacteriología (Figura 3. Carril: 3), sin embargo, para confirmar que la cepa aislada era *B. melitensis*, se realizó la PCR directamente del aislamiento dando como resultado “positiva” a *B. melitensis* Rev 1 con 1063 pb igual que el testigo positivo (Figura 4).

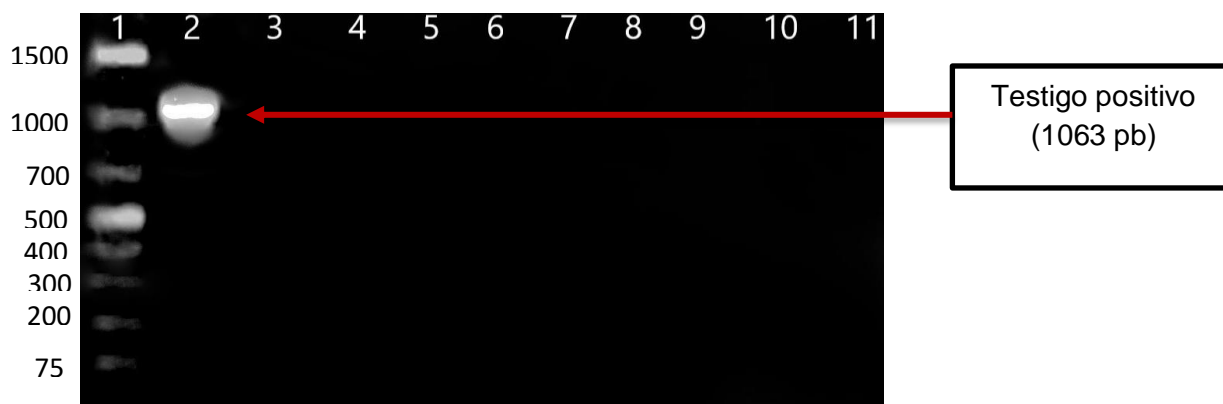


Figura 3. PCR de Testículo y Epidídimos; Carril 1: Marcador de pares de bases; carril 2: Testigo positivo cultivo de Rev 1 *B. melitensis* (1063 pb); Carriles (3,4,5,6): Testículo izquierdo, Testículo derecho, Epidídimo izquierdo y Epidídimo derecho de macho vacunado con Rev 1; Carriles (7, 8, 9, 10): Testículo izquierdo, Testículo derecho, Epidídimo izquierdo y Epidídimo derecho de macho vacunado con $\Delta eryCD$; Carril (11): Testigo Negativo.



Figura 4. PCR de tejidos y cultivo; carril (1): Marcador de pares de bases; Carril 2: Testigo positivo *B. melitensis* (1063 pb); carril (8): Cultivo de *B. melitensis* del aislamiento obtenido del macho cabrío; Carriles (3, 4, 6, 5, 7, 9,10,11): muestras de testículos y epidídimos de los diferentes grupos; Carril (12): Testigo Negativo.

8.4 Resultados Histopatología e Inmunohistoquímica

El examen histopatológico de los testículos y glándulas accesorias demostró que la vacunación no generó cambios en aparato reproductivo. Las muestras analizadas histológicamente fueron normales en todos los casos incluso en el animal del cual se realizó el aislamiento de *B. melitensis*. Por lo tanto, no hubo diferencias entre los cabritos vacunados y los no vacunados (Figura 5). Con respecto a la inmunohistoquímica los resultados concuerdan con el estudio histopatológico, pues no se detectaron antígenos de *B. melitensis* en las muestras de testículos y epidídimos analizadas (Figura 6), incluyendo la muestra que había sido positiva por bacteriología, aun cuando se utilizó una dilución de anticuerpos muy baja 1:10 anticuerpo primario y 1:100 el secundario, por el contrario en el testigo positivo se observaron grandes áreas focales color marrón de acuerdo a lo esperado, por la oxidación de la diaminobencidina.

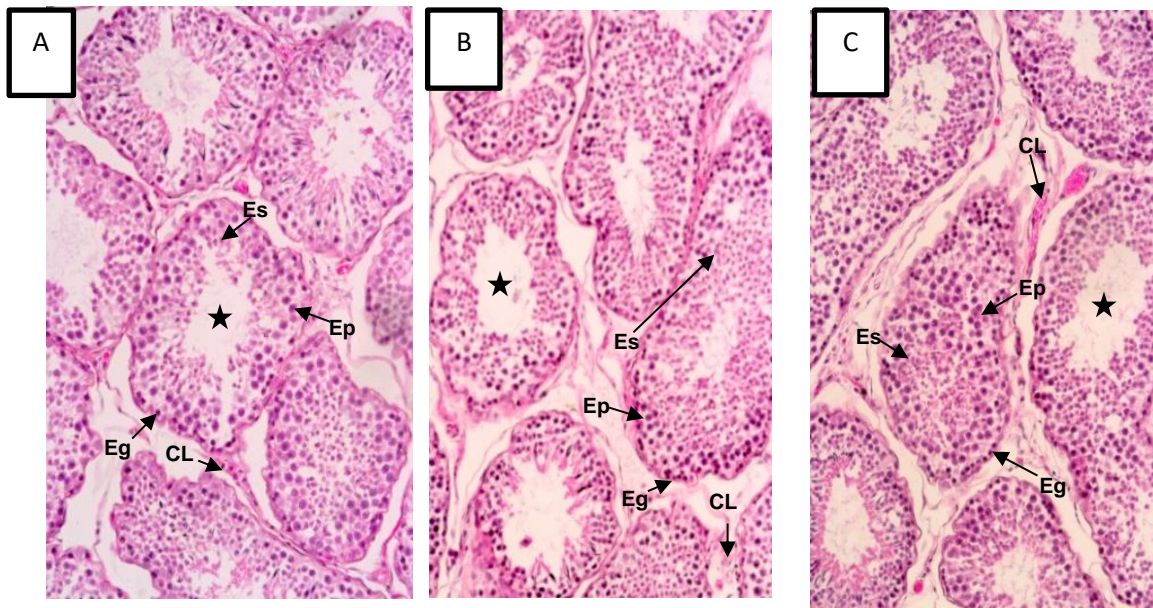


Figura 5. Histología de Testículos colectados 91 días posteriores a la vacunación. (A) Grupo Testigo: (B) Grupo Rev 1: (C) Grupo Δ eryCD. HE, 20x. En donde se aprecian los túbulos seminíferos de los testículos. En el intersticio se pueden apreciar algunas células de Leydig (CL). En el epitelio seminífero están presentes células germinales; espermatogonias (Eg), espermatocitos primarios (Ep) y espermatocitos secundarios (Es), el lumen no se observan espermatozoides (★). Los tejidos no presentan cambios ocasionados por la vacunación.

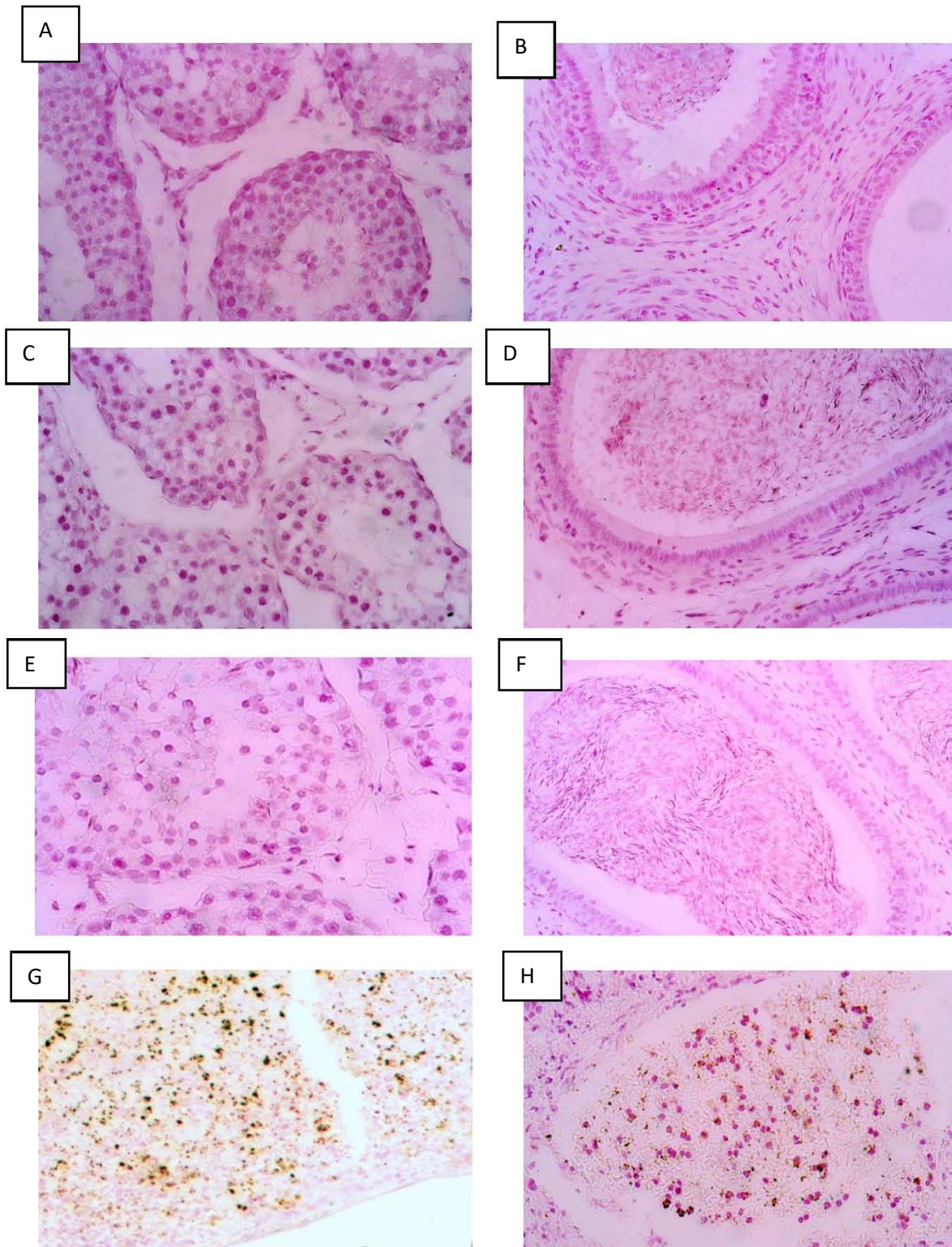


Figura 6. Detección de *B. melitensis* mediante Inmunohistoquímica en muestras de testículos y epidídimos. Grupo testigo; (A) Testículo y (B) Epidídimo: Grupo Rev 1; (C) Testículo y (D) Epidídimo: Grupo Δ eryCD; (E) Testículo y (F) Epidídimo; las muestras no presentan marcación por los anticuerpos específicos para detectar *B. melitensis*. IHC, x40. Control positivo; (G) y (H) bazo de rata infectado con cepa de *B. melitensis* 16M. Presenta áreas multifocales color marrón por la detección de anticuepos de *B. melitensis* en las células del bazo. IHC, x20 y x40 respectivamente.

8.5 Concentración de eritritol

La medición muestras estándares, mostró dos señales muy bien separadas en el cromatograma (Figura 7), en donde el primer pico pertenece al PNBC (línea verde), mientras que el segundo pico corresponde al derivado de interés (Línea negra). Cabe aclarar que el pico del eritritol es pequeño debido a que representa la concentración más baja que se midió.

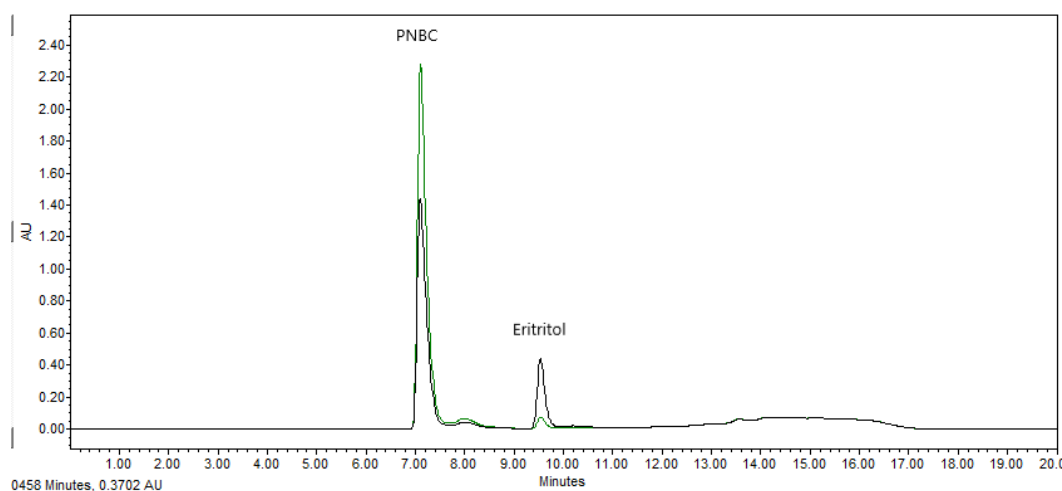


Figura 7. Cromatograma del estándar de eritritol y PNBC medidos mediante HPLC. Línea negra = estándar eritritol, línea verde = PNBC.

Efecto del pH en la repetibilidad de la técnica de muestras estándares

La evaluación del pH mostró que los buffers mejoraban la estabilidad de la molécula, así como la repetibilidad del método. De esta manera se logró determinar que el buffer de carbonato de sodio disminuía variabilidad del derivado en las distintas mediciones realizadas, por lo contrario, si no se utilizaba ningún buffer aumentaba la variación. Además, se pudo determinar que al utilizar buffer de carbonato había una mayor recuperación del derivado y las menores recuperación se obtenían cuando se utilizaba el buffer de boratos (Figura 8).

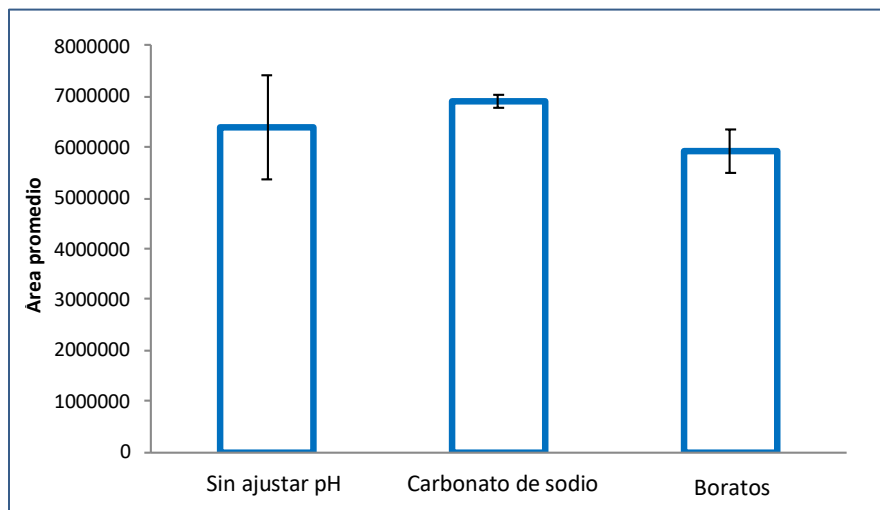


Figura 8. Área promedio obtenidas de muestras estándares utilizando modificaciones del pH.

Curva de calibración

La curva de calibración realizada con muestras estándares mostró efecto lineal conforme aumentaban las concentraciones de eritritol (Figura 9). Por lo tanto, se pudo determinar que las mediciones tenían un alto grado de exactitud, era reproducible, de esta manera se buscó la medición del analito en tejido con el método desarrollado.

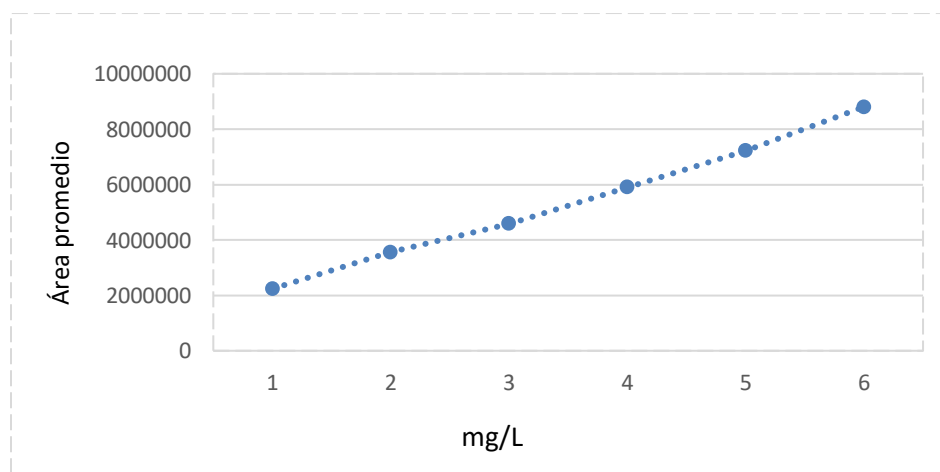


Figura 9. Curva de calibración construida en el intervalo entre 1 y 6 mg/L a partir de diluciones estándares de eritritol.

Efecto matriz

Debido a que la concentración de eritritol presentaba variación constante cuando se realizaba la medición en tejido, se evaluó el efecto que tenía la matriz de los órganos en dicha variación. El análisis mostró que cuando el eritritol utilizado para fortificar tejidos tenía poco contacto con la matriz, la cantidad recuperada era mayor que cuando el analito estaba en contacto con el tejido. Por lo tanto, las muestras fortificadas al final de la extracción (FF), que ya no tenían contacto con tejido, solo con el extracto, presentaban la mayor área, sin embargo, cuando se fortificaba el tejido desde el inicio de la extracción (FI) el área es más pequeña incluso que el estándar, debido a que el eritritol con el que se fortificó queda atrapado en el tejido y parte del eritritol propio del tejido no se logró extraer. Por lo que, al hacer el cálculo de la cantidad de eritritol retenida fue de aproximadamente el 58% comparando la muestra FI y FF. De esta manera el 58% se le podría sumar al blanco y conocer la cantidad real, sin embargo, el porcentaje retenido era muy alto y no siempre era constante, lo cual impidió realizar la medición del tejido. En promedio la cantidad recuperada fue de 4.2 mg de un total de 8 mg agregados. Por lo tanto, la cantidad de analito retenido es tan alto que impide un correcto calculo.

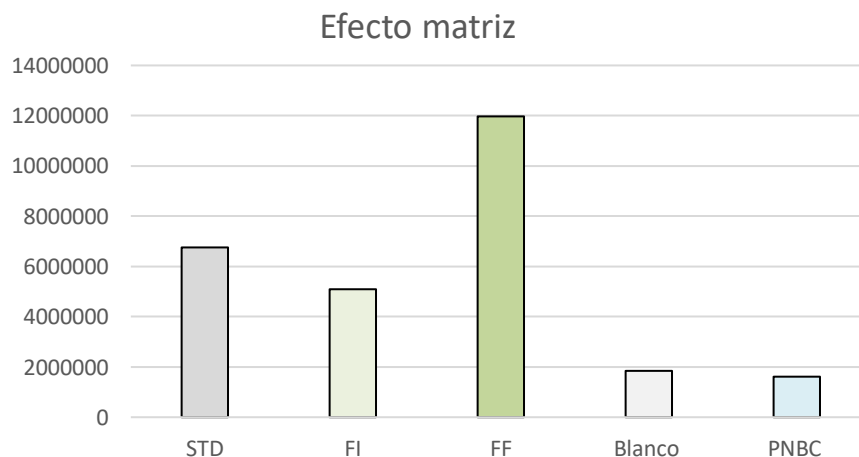


Figura 10. Áreas promedio de estándares y tejidos fortificados.

9 Discusión

La vacunación sigue siendo el procedimiento más exitoso para prevenir enfermedades infecciosas en animales y humanos (Oñate et al., 2003). En el mundo la vacuna Rev 1 se ha usado de manera eficaz para el control de la brucelosis en hembras ovinas y caprinas (Blasco, 1997). Sin embargo, la utilización de dicha cepa en los pequeños ruminantes machos está prohibida, debido a que muchos veterinarios están convencidos de que la vacunación induce lesiones testiculares e infertilidad (Muños et al., 2008). Además, se considera que los machos no son importantes en la epidemiología de la brucelosis (West et al., 1978), esto ha ocasionado que se generen pocos estudios al respecto. En machos caprinos nunca se había realizado alguna evaluación sobre la vacunación, lo cual crea una controversia sobre la inmunización en estos animales.

En el presente estudio se realizó la primera vacunación en machos cabríos con la cepa experimental de *B. melitensis* Rev 1 Δ eryCD y la cepa parental de *B. melitensis* Rev 1. Los resultados encontrados fueron que ambas cepas provocaron una respuesta serológica post-vacunación muy similar, que fue de entre tres a cuatro meses. La cual difiere con relación a diversos estudios donde se ha visto que Rev 1 estimula una respuesta humoral por más de un año en carneros, cabras y ovejas (Fensterbank et al., 1982a; Fensterbank et al., 1982b; Muños et al., 2008). De hecho, se le considera un problema porque interfiere con el diagnóstico serológico bastante tiempo posterior a la vacunación (García-Carrillo, 1981). Sin embargo, la protección contra *Brucella* spp., requiere la generación de una respuesta inmune de tipo Th1 (Oliveira y Splitter, 1995; Golding et al., 2001). Por lo tanto, aunque la respuesta serológica fue de corta duración, habría que estudiar la respuesta celular, y sobre todo realizar un estudio de la protección conferida por las cepas estudiadas usando desafío experimental para conocer que tanto protegen.

Con respecto a la colonización bacteriana, aunque se cree que la cepa vacunal Rev 1 tienen tropismo hacia los órganos reproductivos, en el presente estudio las cepas *B. melitensis* Rev 1, parental y experimental no mostraron este rasgo, pues solo un

animal de quince vacunados presentó colonización de testículo en el grupo Rev 1, por el contrario, en el grupo $\Delta eryCD$ en ningún animal se aisló la cepa vacunal. Resultados similares fueron encontrados por Lantier y Festerbank, (1985) al aislar la cepa Rev 1 de epidídimo en tres de 97 carneros estudiados, mientras que Tolari y Salvi, (1980) aislaron *Brucella* spp., en un carnero que había sido inmunizado con Rev 1 y presentaba orquitis bilateral. Son los únicos casos positivos reportados, ya que en la mayoría de estudios se ha encontrado que no ocasiona colonización de aparato reproductor (García-Carrillo, 1981; Fensterbank et al., 1982b; Blasco et al., 1987; Marín et al., 1990). Por lo tanto, el tropismo y colonización de las cepas vacunales hacia órganos reproductivos es relativamente bajo como se demostró con Rev 1 o incluso nulo en el caso de la cepa experimental $\Delta eryCD$, por lo cual podrían ser opciones viables para proteger a los machos contra la enfermedad y evitar riesgos de que se infecten y tener que eliminarlos.

En el estudio de PCR, la técnica no detectó ADN de *B. melitensis* en una muestra positiva a bacteriología, la técnica solo resultó positiva cuando se realizó directamente del aislamiento. Aunque, este no es el único caso donde la bacteriología es más sensible que la PCR. Büyükcangaz et al., (2011), en un estudio con órganos de fetos de ruminantes encontró una sensibilidad del 83% en la PCR para *Brucella* spp., comparada con la bacteriología. Mientras que Álvarez et al., (2016), solo pudo detectar ADN de la cepa vacunal Rev 1 en dos de cuatro animales positivos a bacteriología a partir de muestras de pulmones y contenido de abomaso. Otros trabajos con resultados similares son los realizados por Chakravorty et al., (2005), quienes encontraron una sensibilidad de la PCR utilizando tejido pleural y ganglios linfáticos al 75% y 69.2%, respectivamente. Mientras que, en el estudio de Cheng et al., (2004) la sensibilidad de la PCR fue de 81.2% para diferentes tejidos. Se han propuesto muchas posibles razones para la baja sensibilidad, entre estos se encuentran presencia de inhibidores en los macerados de los órganos (Büyükcangaz et al., 2011), el bajo número de bacterias en la muestra (Erdenliğ et al., 2015), grandes cantidades de ADN genómico (Fakh et al., 2006). Aunque en el presente estudio se esperaba una mayor sensibilidad de la PCR, los resultados encontrados son similares a los estudios mencionados. Posiblemente por una baja

cantidad de bacterias, ya que el aislamiento además de tarda bastante en crecer y presentaba poca cantidad de colonias, aunado a los inhibidores que pueda contener que afecte la sensibilidad de la técnica.

En cuanto a los resultados histopatológicos, las cepas vacunales *B. melitensis* Rev 1 y Δ eryCD no causaron lesiones de aparato reproductivo. Resultados que concuerdan con lo observado por Blasco, (1997), en donde los animales vacunados con Rev 1 no presentaron lesiones y los que llegaron a presentarlas no se aisló Rev 1 sino la cepa de desafío. En este caso de igual manera la cepa no fue aislada en la mayoría de animales por lo cual esto se relaciona directamente en la ausencia de lesiones, en el caso del cabrito positivo, cabe la posibilidad que la infección apenas se estuviera estableciendo por lo cual no hubo alteraciones.

Respecto a la búsqueda de *B. melitensis* empleando la técnica de inmunohistoquímica, todas las muestras de testículo y epidídimos fueron negativas a esta prueba, incluso el testículo positivo a bacteriología, sin embargo, los resultados negativos podrían deberse a una dilución excesiva de los anticuerpos (Lacave et al. 2012), que la zona en donde se alojó la bacteria no se incluyó en las secciones trabajadas de inmunohistoquímica (Sözmen et al., 2004) o que el número mínimo de unidades formadoras de colonias de *Brucella* spp., por gramo de tejido sea menor a 10^6 lo cual daría resultados negativos (Meador et al., 1986).

Con relación a la medición de eritritol, existen pocas investigaciones donde se determine la concentración de polioles en muestras con matriz (Nojiri et al., 2000; Guadalupe y Pereira, 2016). La primera vez que se realizó fue por Keppie et al., (1965) en testículos y vesícula seminal de ovinos, caprinos, toros y jabalís, mediante cromatografía de papel. A raíz de ello en el presente trabajo se buscó hacer la primera medición en HPLC, la cual es una técnica altamente eficiente y que tiene una gran resolución para un amplio rango de compuestos orgánicos (Fifield, 2000). Los resultados encontrados fueron que, al medir el analito, más del 58% quedaba retenido en la muestra, sin embargo, no se podía hacer un estimado de la concentración por que el porcentaje retenido era alto y no siempre era constante.

Lo cual es ocasionado por el efecto matriz que tiende a reducir o incrementar la intensidad de iones de los analitos y afecta directamente la reproducibilidad (Clarke et al., 1996). Además, la variabilidad se aumentó por que el eritritol es una molécula con efecto desestabilizador debido a su tamaño (Athés y Combes, 1998). Sin dejar de lado que su medición también es un desafío porque este compuesto carece de grupos cromóforos por lo que no se puede detectar en UV, por lo tanto, es necesario una reacción de derivatización (Nojiri et al., 2000) o detecciones indirectas de UV (Pospíšilová et al., 1998; Paroni et al., 2006; Pospíšilová et al., 2007). Por lo cual, en el presente estudio solo se realizó parte del desarrollo y estandarización de la técnica, ya que la medición en muestras con matriz es muy compleja y es necesario de mayor tiempo para lograr cambios en el método, que permitan una medición más exacta.

10 Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la aplicación de la cepa *ΔeryCD* por vía subcutánea a una dosis de 2×10^9 ufc, no ocasiona colonización, del aparato reproductivo del macho cabrío.

Se demostró que las cepas de *B. melitensis* Rev 1, parental y experimental, no causan lesiones en órganos reproductivos y que podrían ser utilizadas para prevenir la infección por *B. melitensis* de machos cabríos.

Las concentraciones de eritritol en testículos y glándulas accesorias son desconocidas, pero se pudo comprobar que ambas cepas no tienen como tal un tropismo hacia dichos órganos.

11 Literatura citada

- Alton GG y Forsyth JRL. 1996. *Brucella* in: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris, France: INRA.
- Alton GG. 1987. Control of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. A review. Trop Anim Health Prod, 19 (2), 65-74.
- Alton GG. 1990. *Brucella melitensis*, in: Nielsen and Duncan (Eds.), Animal Brucellosis. CRC Press, Florida, pp. 383-409.
- Álvarez LP, Marcellino RB, Martínez A, Robles CA. 2016. Duplex PCR for the diagnosis of *Brucella melitensis* and its differentiation from the REV-1 vaccine strain. Small Ruminant Research <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.11.004>
- Athés V. y Combes D. 1998. Effect of high hydrostatic pressure on enzyme stability. *Progress in Biotechnology*, vol.15. 205-210.
- Barbier T, Collard F, Zúñiga-Ripa A, Moriyón I, Godard T, Becker J, Wittmann C, Emile Van SE, y Letesson JJ. 2014. Erythritol feeds the pentose phosphate pathway via three new isomerases leading to D-erythrose-4-phosphate in *Brucella*. Vol 11. No 50. Pp 17815-17820
- Blasco JM y Molina-Flores B. 2011. Control and eradication of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. Vet. Clin North Am Food Anim Pract. 27: 95-104.
- Blasco JM, Marín CM, Barberán M, Moriyón I, Díaz R. 1987. Immunization with *Brucella melitensis* Rev 1 against *Brucella ovis* infection of rams. Vet Microbiol. 14 (4): 381-92.
- Blasco JM. 1997. A review of the use of *B. melitensis* Rev-1 vaccine in adult sheep and goats. Prev Vet Med; 31: 275-81.
- Blasco JM. 2004. Estado actual de la brucelosis en España. Salud animal. Vol. 15 No. 58 , págs. 22-34.

- Blasco JM. 2010. Control and eradication strategies for *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Prilozi*. 31 (1):145-165.
- Boschioli ML, Foulongne V, O'Callaghan D. 2001. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr. Opin Microbiol* 4(1): 58-64.
- Bruce D. 1887. Note on the discovery of a micro-organism in Malta fever. *Practitioner*, 39, 161.
- Buddle MB. 1962. Production of immunity in rams against *Brucella ovis* infection. *N. Z. Vet J.* 10: 111-15.
- Büyükcangaz E, Şen A, Çarli KT, Kahya S. 2011. Comparison of direct culture versus PCR for the detection of *Brucella* in aborted fetuses of cattle and sheep in Turkey. *Vet Rec.* 168, 430.
- Castro HA, González SR, Prat MI. 2005. Brucellosis: una revisión práctica. *Acta Bioquím Clín Latinoam*; 39:203-16.
- Chakravorty S, Sen MK, and Tyagi JS. 2005. Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis by Smear, Culture, and PCR Using Universal Sample Processing Technology. *J Clin Microbiol* 43 Suppl 9: 4357-436.
- Cheng VCC, Yam WC, Hung IFN, Woo PCY, Lau SKP, Tang BSF, Yuen KY. 2004. Clinical evaluation of the polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Pathol* 57:281–285.
- Clarke SD, Hill HM, Noctor TAG, Thomas D. 1996. Matrix-related modification of ionization in bioanalytical liquid chromatography-atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry. *Phar Sci.* 2:203-207.
- Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Paquet JY, Garin-Bastuji B, Foster G, Godfroid J. 2001. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes Infect.* 3(9):729-738.
- Cluter SJ, Whatmore AM, Commander NJ. 2005. Brucellosis: New aspects of an old disease. *J Appl Microbiol*; 98: 1270.
- Conde-Alvarez R, Arce-Gorvel V, Gil-Ramirez Y, Iriarte M, Grillo MJ, Gorvel JP, Moriyon I. 2013. Lipopolysaccharide as a target for brucellosis vaccine design. *Microb Pathog* 58, 29-34.

- CONEVAL. 2017. Estadísticas de San Luis Potosí. Disponible en: <http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/slp/default.aspx?tema=me&e=24> acceso el día 17 de agosto de 2019
- Corbel MJ y Briimley Morgan WJ. 1982. Classification of the genus *Brucella* the current position. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 1 (1): 281-289.
- Corbel MJ. 1997. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis.* 3(2):213-221.
- De BK, Stauffer L, Koylass MS, Sharp SE, Gee JE, Helsel LO, Steigerwalt AG, Vega R, Clark TA, Daneshvar MI, et al. 2008. Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *J Clin Microbiol.* 46(1):43-49.
- Díaz-Aparicio E, Marin C, Alonso-Urmeneta B, Aragon V, Pérez-Ortiz S et al. 1994. Evaluation of serological tests for diagnosis of *brucella melitensis* infection of goats. *J Clin Microbiol.* 32: 1159-1165.
- Elberg SS, Faunce KJJr. 1957. Immunization against *Brucella* infection. VI. Immunity conferred on goats by a nondependent mutant from a streptomycin-dependent mutant strain of *Brucella melitensis*. *J Bacteriol.* 73 (2): 211–217.
- Erdenliğ GS, Tel OY, Keskin O. 2015. Comparison of PCR and bacteriological culture to diagnose *Brucella* species in clinical samples collected from cows in brucellosis suspected herds. *Harran Univ. Vet Fak Derg.* 4 (2): 48-52.
- Fakhr MK, Mcevoy JM, Sherwood JS y Logue, CM. 2006. Adding a selective enrichment step to the iQ-Check real-time PCR improves the detection of *Salmonella* in naturally contaminated retail turkey meat products. *Letters in Applied Microbiology.* 43: 78-83.
- FAO. Global livestock production and health atlas. 2006. Rome (Italy). Electronic edition. Available at: <http://kids.fao.org/glipha/>. Acceso Mayo 5, 2019.
- Fensterbank R, Pardon P, Marly J.1982a. Comparison between Subcutaneous and Conjunctival Route of Vaccination with Rev-1 Strain against *Brucella melitensis* infection in ewes. *Ann Rech Vét.* 13 (4): 295- 301.
- Fensterbank R, Renseigné NJ. Marly. 1982b. Efficacy of *Brucella melitensis* rev. 1 vaccine against *Brucella ovis* infection in rams. *Ann. Rech. Vét.* 13 (2): 185-190.

- Fifield FW. 200. Separation techniques. En: Environmental Analytical Chemistry. Eds. F.W. Fifield y P. J. Haines Blackwell Science Ltd. London. 2 decision.
- Flores-Castro R. 2010. La situación actual de las zoonosis más frecuentes en el mundo. Gac Méd Méx.146:423-429.
- García-Carrillo C. 1981.Protection of rams against *Brucella ovis* infection by *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine. Zentralbl Veterinarmed B. 28:425-431.
- Geddes BA, Hausner G, Oresnik IJ. 2013. Phylogenetic analysis of erythritol catabolic loci within the Rhizobiales and proteobacteria. BMC Microbiol. 13:46.
- Golding BDE, Scott O, Scharf L, Huang M, Zaitseva C, Lapham N, Eller y Golding H. 2001. Immunity and protection against *Brucella abortus*. Microbes Infect. 3:43-48.
- Grillo MJ, Barberán M, Blasco JM. 1997. Transmission of *Brucella melitensis* from sheep to lambs. *Vet Rec*.140 (23): 602-605.
- Guadalupe CA y Pereira JD. 2016. A simple method for determination of erythritol, maltitol, xylitol, and sorbitol in sugar-free chocolates by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. Electrophoresis. 37: 2986-2991.
- Hernández R. 2002. Brucellosis. Rev Med UV. 2:35-38.
- Hughes KL and Claxton PD. 1968. *Brucella ovis* infection: An evaluation of microbiological. serological and clinical methods of diagnosis in the ram. Aust. Vet J. 44: 41-7.
- Jahans KL, Foster G, Broughton ES.1997. The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. Vet Microbiol. 57(4): 373-382.
- Kater JC y Hartley WJ. 1963. Lameness in rams following vaccination against *Brucella ovis* infection. N.Z. Vet J. 11: 65-67.
- Keppie J, Williams AE, Witt K, Smith H. 1965. The role of erythritol in the tissue localization of the *brucella*. Br J Exp Pathol. 46:104-108.
- Kojouri GA, Gholami M. 2009. Post vaccination follow-up of *Brucella melitensis* in blood stream of sheep by PCR assay. Comp Clin Pathol. 18 (4): 439-442.

- Lacave MI, Caballero GT. 2012. Atlas de inmunohistoquímica: Caracterización de células, tejidos y órganos normales. España. Edi. Díaz de Santos.
- Lantier F y Festerbank R. 1985. Kinetics of Rev 1 infection in sheep. In: VJMyP M, editor. *Brucella melitensis*. Bruselas, Luxemburgo: Martinus Nijhoff; p. 247-51.
- Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP. 2005. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 60-66.
- Lebre A, Velez J, Seixas D, Rabado E, Oliveira J, Saraiva deCunha J, Silvestre AM. 2014. Brucellar spondylodiscitis: Case series of the last 25 years. *Acta Med Port.* 27: 204-10.
- Marín CM, Barberán M, Jiménez de Bagues MP y Blasco JM .1990. Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of Rev 1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. *Res Vet Sci.* 48:209-215.
- McDermott J, Grace D, Zinsstag J. 2013. Economics of brucellosis impact and control in low-income countries. *Rev Sci Tech.* 32 (1): 249-61.
- Meador, VP, Tabatabai, LB, Hagemoser, WA, Deyoe, BL 1986: Identification of *Brucella abortus* in formalin-fixed, paraffin embedded tissues of cows, goats and mice with avidin-biotin-peroxidase complex immunoenzymatic staining technique. *Amer J Vet Res.* 47: 2147-2150.
- Minas A. 2006. Control and eradication of brucellosis in small ruminants. *Small Ruminant Research.* 62, 101-107.
- Moreno E, y Moriyón I. 2002. *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 99: 1-3. doi: 10.1073/pnas.022622699.
- Muñoz PM, de Miguel MJ, Grilló MJ, Marín CM, Barberán M, Blasco JM. 2008. Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. *Vaccine.* 19; 26 (21): 2562-2569.
- Nicoletti P. 1993. The eradication of brucellosis in animals. *Saudi Med. J.* 14, 288-292.

- Nojiri S, Taguchi N, Oishi M, Suzuki S. 2000. Determination of sugar alcohols in confectioneries by high-performance liquid chromatography after nitrobenzoylation. *J Chromatogr.* 893 (1): 195-200.
- OIE. 2010. Bovine brucellosis, Chapter 2.4.3. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. OIE, París, 1-35.
- OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. Disponible en: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/brucelosis/> acceso el día 03 de mayo de 2019
- OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. Disponible en: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap acceso el día 03 de mayo de 2019.
- Oliveira SC y Splitter GA. 1995. CD8 type 1 CD4hi CD4RBlo T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 25:2551-2557.
- Oñate AA, Céspedes S, Cabrera A, Rivers R, González A, Muñoz C, Folch H, Andrews E. 2003. A DNA Vaccine Encoding Cu, Zn Superoxide Dismutase of *Brucella*. *Infection and Immunity.* 71(9): 4857- 4861.
- Osterman B y Moriyon I. 2006. International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*: Pamplona, Spain. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56:1175.
- Paroni R, Fermo I, Molteni L, Folini L, Pastore MR, Mosca A, Bosi E. 2006. Lactulose and mannitol intestinal permeability detected by capillary electrophoresis. *J Chromatogr.* 834: 183-187.
- Poester FP, Samartino LE, Santos RL. 2013. Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Rev Sci Tech.* 32(1):105-15.
- Pospíšilová M, Polásek M, Jokl V. 1998. Separation and determination of sorbitol and xylitol in multi-component pharmaceutical formulations by capillary isotachopheresis. *J Pharm Biomed.* 17:387-392.
- Pospíšilová M, Polásek M, Safra J, Petriska I. 2007. Determination of mannitol and sorbitol in infusion solutions by capillary zone electrophoresis using on-

column complexation with borate and indirect spectrophotometric detectio. J Chromatogr. 1143: 258-263.

- Raetz CR, Whitfield C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. Annu. Rev Biochem. 71: 635-700.
- Rajashekara G, Glasner JD, Glover DA, Splitter GA. 2004. Comparative wholegenome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. J Bacteriol. 186: 5040-5051.
- Robles C, Bernard O, Zenocrati L, Marcellino R. 2007. Encuesta serológica sobre brucelosis en caprinos de la provincia de Mendoza. Vet Arg. XXIV: 172-85.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural). 2013. Evaluación de la calidad en la canal caprina. Libro técnico No. 4. ISBN: 978-607-37-0027-6.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural). Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/412565/Caprino_2017.pdf acceso 09 de agosto del 2019.
- Samartino LE y Enright FM .1993. Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. *Comp Immunol Microbiol infect Dis.* 16 (2): 95–101
- Sangari F y Agüero J. 1991. Mutagenesis of *Brucella abortus*: comparative efficiency of three transposon delivery systems. *Microb Pathog.* 11(6): 443-446.
- 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* 121:337342
- SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Disponible en: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-brucelosis-en-mexico> consultado el día 03 de mayo de 2019.
- SIAP-SADER. 2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Disponible en:

http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecAvanceProd.jsp

Consultado 03 septiembre de 2019.

- Scholz HC, Hubalek Z, Sedlacek I, Verognaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kampf P, Neubauer H, Cloeckert A, et al. 2008. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58: 375-382.
- Sözmen MSD, Erginsoy O, Genç E, Beytut KÖzcan. 2004. Immunohistochemical and Microbiological Detection of *Brucella Abortus* Antigens in Aborted Bovine Fetuses. *Acta Vet Brno.* 73: 465-472.
- SSA (Secretaría de Salud). 2012. Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de la brucelosis. Dirección General de Epidemiología.
- Tolari F, Salvi G. 1980. Segnalazione di un caso di orchite bilaterale in un capretto in sequito a vaccinazione con Rev 1. Estrato dagli Anm Faculta Med Vet :33.
- Valvano MA, Furlong SE, Patel KB, Knirel YA. 2011. Bacterial lipopolysaccharides. Western Ontario, London. Edi. Springer-Verlag.
- Vega-López CA, Ariza-Adraca R, Rodríguez-Weber FL. 2008. Brucelosis. Una infección vigente. *Acta Med.* 6: 158-65.
- West DM, Johnstone AC, Bruere AN, and Chapman HM. 1978. Epiphysitis in rams following vaccination against *Brucella ovis* infection. *NZ Vet. J.* 26:133-134.
- Wyatt HV. 2005. "How Themistocles Zammit found Malta Fever (brucellosis) to be transmitted by the milk of goats, *J R Soc of Med.* 98(10): 451-454.
- Zammit T. 1905. A preliminary note on the susceptibility of goats to Malta Fever. *Proc R Soc* 76B: 377-378. Also, *J R Army Med.* 5:341-3422.