

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
“UNIDAD LAGUNA”**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**VACUNAS Y ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN BASADAS EN  
ÁCIDOS NUCLEICOS PARA LA BRUCELOSIS**

**POR**

**ROBERTO CÉSAR CHÁVEZ CABALLERO**

**MONOGRAFÍA**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**ASESOR**

**MVZ. FRANCISCO J CARRILLO MORALES**

**Co-Asesor**

**MVZ RODRIGO ISIDRO SIMON ALONSO**

**TORREÓN, COAHUILA.**

**MAYO 2010**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
“UNIDAD LAGUNA”**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**VACUNAS Y ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN BASADAS EN  
ÁCIDOS NUCLEICOS PARA LA BRUCELOSIS**

**POR**

**ROBERTO CÉSAR CHÁVEZ CABALLERO**

**MONOGRAFÍA**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

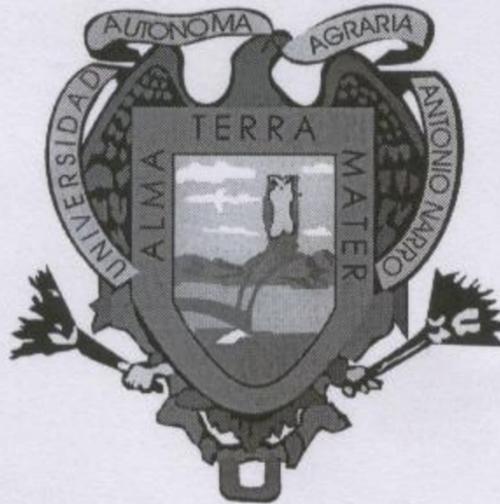
**TORREÓN, COAHUILA**

**MAYO 2010**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**VACUNAS Y ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN BASADAS EN ÁCIDOS  
NUCLEICOS PARA LA BRUCELOSIS**

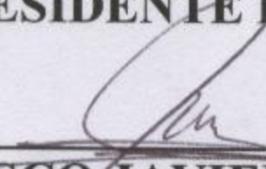
**POR**

**ROBERTO CESAR CHÁVEZ CABALLERO**

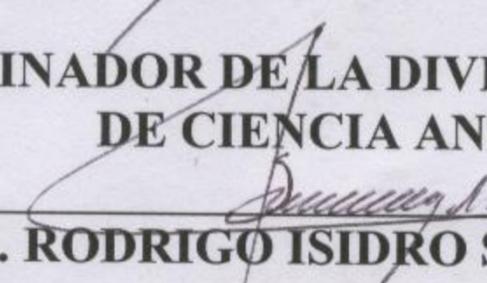
**MONOGRAFÍA**

**Aprobada por el**

**PRESIDENTE DEL JURADO**

  
\_\_\_\_\_  
**MVZ. FRANCISCO JAVIER CARRILLO MORALES**

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL  
DE CIENCIA ANIMAL**

  
\_\_\_\_\_  
**MVZ. RODRIGO ISIDRO SIMÓN ALONSO**

**TORREÓN, COAHUILA**



**ABRIL 2010**  
COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN  
REGIONAL  
CIENCIA ANIMAL

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

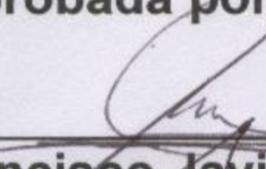
**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

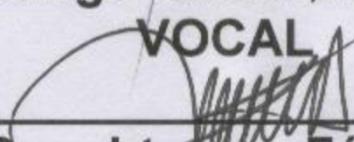


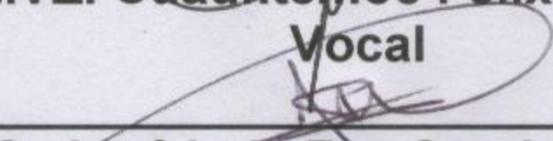
**VACUNAS Y ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN BASADAS EN ÁCIDOS  
NUCLEICOS PARA LA BRUCELOSIS**

**Monografía Aprobada por el H jurado examinador**

  
\_\_\_\_\_  
**MVZ. Francisco Javier Carrillo Morales**  
**PRESIDENTE**

  
\_\_\_\_\_  
**MVZ. Rodrigo Isidro Simon Alonso**  
**VOCAL**

  
\_\_\_\_\_  
**MVZ. Cuauhtémoc Félix Zorrilla**  
**Vocal**

  
\_\_\_\_\_  
**MC. José Luis Fco Sandoval Elías**  
**Vocal Suplente**

## **TÍTULO**

**Vacunas y estrategias de prevención basadas  
en ácidos nucleicos para la Brucelosis**

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN.....	iii
INTRODUCCIÓN.....	1
Sinonimias.....	2
ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	3
PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA.....	6
Genoma.....	7
Los determinantes antigénicos.....	7
PATOGENICIDAD.....	7
EPIDEMIOLOGÍA.....	7
Escenario mundial.....	10
ASPECTOS DE LA ENFERMEDAD.....	14
COMPLICACIONES.....	14
DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	16
PATOGENIA.....	16
GENÉTICA DE <i>BRUCELLA</i> .....	18
INMUNIDAD FRENTE A <i>BRUCELLA</i> .....	18
ANTIGENOS DE <i>BRUCELLA</i> .....	24
<i>Proteínas</i> .....	25
VACUNAS CONTRA <i>BRUCELLA ABORTUS</i> . ....	26
Bacterias atenuadas.....	26
<i>Brucella abortus</i> S 19.....	26
<i>Brucella abortus</i> 45/20.....	27
<i>Brucella abortus</i> RB51.....	27
<i>Vacunas subcelulares</i> .....	28
NUEVAS TENDENCIAS EN LA GENERACION DE VACUNAS PARA <i>BRUCELLA</i> .....	29
Vacunas ADN.....	29
<i>Mecanismos celulares de captura de ADN</i> . ....	29
<i>Mecanismos celulares involucrados en la respuesta inmune   Generada por inmunización genética</i> .....	30
<i>Vacunas ADN para B. abortus</i> . ....	30
Vacunas ARN. ....	31
<i>Virus Semliki Forest</i> . ....	31
<i>Entrada del virus a la célula hospedadora</i> . ....	32
<i>Elaboración de partículas virales suicidas del virus Semliki Forest</i> ....	32
VACUNAS ARN PARA <i>B. ABORTUS</i> .....	33
CONCLUSIONES.....	36
Referencias.....	37
ÍNDICE DE ESQUEMAS Y FIGURAS	
Esquema 1.....	5
Figura1.....	5
TABLA1. ....	15

## **AGRADECIMIENTOS**

**Primero antes que nada le doy toda la honra y la gloria a Dios, por haberme puesto justo en el tiempo y lugar en el que estoy, gracias a mi esposa que en todo momento de mi carrera estuvo conmigo apoyándome día a día en los momentos más difíciles de mi carrera, agradezco también a mis padres por darme la oportunidad, apoyó, confianza y sobre todo la solventación económica para terminar satisfactoriamente mi carrera de Médico Veterinario Zootecnista.**

**Agradezco también a mis asesores de este trabajo por su tiempo y dedicación para Concluir con este paso importante en mi carrera, al MVZ Francisco J Carrillo Morales y al MVZ Rodrigo I. Simón Alonso.**

## RESUMEN

La brucelosis es una zoonosis cuya incidencia y prevalencia varían de un país a otro. La infección causada por la especie *Brucella abortus* es la que más frecuentemente afecta al ganado bovino, causando esterilidad en machos y abortos en hembras preñadas, lo que conduce a graves pérdidas económicas en países en los que es endémica.

La infección por *Brucella*, sigue constituyendo un riesgo para la salud humana a nivel mundial pese a los avances en la erradicación de la enfermedad de los animales domésticos en algunos países. La brucelosis ha sido una enfermedad emergente desde el descubrimiento de la *Brucella melitensis* por Sir David Bruce en 1887. Aunque muchos países han erradicado la *B. abortus* en el ganado, en algunas zonas *B. melitensis* y *B. suis* han surgido como causas de esta infección en el ganado, dando lugar a infecciones humanas. *B. melitensis* en la actualidad sigue siendo la principal causa de brucelosis humana en todo el mundo. *Acha, P et al., 1986.*

El aislamiento reciente de cepas distintas de *Brucella* de mamíferos marinos, así como los seres humanos es un indicador de una enfermedad zoonótica emergente. Brucelosis endémica y en las regiones no endémicas sigue siendo un rompecabezas de diagnóstico debido a que no engañosa sobre aspectos específicos y el aumento de las presentaciones inusuales.

Si bien se cuenta con muchos métodos de diagnóstico y vacunas para la prevención y control es el tipo de explotación y la diversidad de hospedadores lo que hace que sea una de las principales zoonosis. Ya que como se sabe es la escasez de pastos lo que obliga a los ganaderos recurrir en la trashumancia haciendo difícil el monitoreo y vigilancia de los caprinos que son en gran parte una manera de difusión de la enfermedad.

En el ganado bovino la bacteria se ubica en la placenta y órganos reproductores por su afinidad por el eritritol. La respuesta inmune frente a *B. abortus*, patógeno intracelular facultativo, depende principalmente de la activación de la inmunidad mediada por células. con la participación de células T CD4+ de tipo Th1, que secretan interferón gama (INF- $\gamma$ ), citoquina que estimula una respuesta citotóxica de los linfocitos T CD8+.

En la actualidad las nuevas tendencias en investigación acerca de vacunas en base a moléculas de ácidos nucleicos, como las vacunas ADN y las vacunas ARN. Con este objetivo se han utilizado clásicamente cepas bacterianas atenuadas y componentes antigénicos propios de la *Brucella*. La habilidad de un antígeno específico para inducir en forma preferencial una respuesta Th1 es un aspecto importante a considerar en el desarrollo de vacunas contra *Brucella abortus* (Stevens y col 1994, Oliveira y col 1996).

Esta revisión recoge las experiencias y los métodos de prevención en base a la nueva generación de vacunas basadas en ácidos nucleicos y de tratamiento actualmente empleado en la lucha contra esta enfermedad.

**PALABRAS CLAVES;** *Brucelosis, Vacunas, ADN, Control, prevención*

## **Vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos para la Brucelosis**

### **Introducción.**

La brucelosis es una zoonosis cuya incidencia y prevalencia varían de un país a otro. La infección causada por la especie *Brucella abortus* es la que más frecuentemente afecta al ganado bovino, causando esterilidad en machos y abortos en hembras preñadas, lo que conduce a graves pérdidas económicas en países en los que es endémica. En países no desarrollados constituye además un problema sanitario para la población humana.

*B. abortus* es una bacteria Gram negativa con un lipopolisacárido (LPS) fuertemente inmunodominante, el que junto con la capacidad de sobrevivir en el interior de células fagocíticas constituyen sus principales factores de virulencia. La infección en humanos conduce a una enfermedad con tendencia a la cronicidad, con fiebre y malestar recurrentes que deterioran su calidad de vida y que además puede presentar complicaciones como artritis, meningitis, entre otras.

En el ganado bovino la bacteria se ubica en la placenta y órganos reproductores por su afinidad por el eritritol. La respuesta inmune frente a *B. abortus*, patógeno intracelular facultativo, depende principalmente de la activación de la inmunidad mediada por células, con la participación de células T CD4+ de tipo Th1, que secretan interferón gama (INF- $\gamma$ ), citoquina que estimula una respuesta citotóxica de los linfocitos T CD8+, estos últimos son capaces entonces de destruir células infectadas con *Brucella*.

En la actualidad las nuevas tendencias en investigación acerca de vacunas se están desarrollando en base a moléculas de ácidos nucleicos, como las vacunas ADN y las vacunas ARN. La prevención de la diseminación de la brucelosis se basa en la administración de vacunas adecuadas contra la infección por *B. abortus*. Con este objetivo se han utilizado clásicamente cepas bacterianas atenuadas y componentes antigénicos propios de la *Brucella*. La habilidad de un antígeno específico para inducir en forma preferencial una respuesta Th1 es un aspecto importante a considerar en el desarrollo de vacunas contra *Brucella abortus* (Stevens y col 1994, Oliveira y col 1996).

La identificación de proteínas con demostrada capacidad inmune, entre las que se ha identificado la superóxido dismutasa Cu/Zn de *B. abortus* (SOD), ha permitido diseñar estrategias de vacunación basadas en componentes subcelulares, ya que la prevención de la diseminación de la brucelosis, basada en la vacunación con bacterias atenuadas de *Brucella abortus* cepa 19, cepa RB51 y cepa 45/20, no ofrece garantías de seguridad en su administración, ni tampoco permite la completa erradicación del microorganismo patógeno.

## **Sinonimias**

Brucelosis. (*Brucella abortus*) es una enfermedad Bacteriana.

Denominaciones comunes: Enfermedad de Bang. Fiebre de Malta (en el hombre) Aborto contagioso Aborto infeccioso Fiebre ondulante (en el hombre)

La brucelosis, sin duda, ha evolucionado como una enfermedad desde que el hombre por primera vez domesticó a los animales. La brucelosis fue reconocida como una entidad clínica de los tiempos de la guerra de Crimea.

La enfermedad fue completamente aclarada por Sir David Bruce, Hughes, y Zammit trabajo en Malta. Bang descubrió *Brucella abortus*, la causa del aborto en el ganado y de la brucelosis (fiebre ondulante) en seres humanos. *B. suis* fue recuperado de porcinos por Traum e implicado como un agente de la brucelosis en el hombre por Huddleson. Evans demostró que *M. melitensis*, aislados de vacas y cerdos pertenecen a un género y *Brucella* nombre genérico en honor de Sir David Bruce sugerido. Buddle y Boyce descubrió *B. ovis*. Stoenner aislados y Lackman *neotomae B.* de rata. Carmicheal y Bruner descubrió *B. canis* de los perros. Las infecciones en humanos debido a *B. canis* son reportados. Pinnipediae *Brucella* y cetaceae han sido recientemente reconocido brucelas de mamíferos marinos que pueden también ser patógenos humanos (Sohn et al 2003; McDonald et al 2006). Estos datos hacen nuevamente hincapié en la preocupación de zoonosis por Brucelas a lo largo de la historia. *B. abortus* cepa 19 y RB51 son efectivas las vacunas vivas atenuadas contra la *B. abortus* la infección en el ganado. Eficaz la vacuna Rev 1 *B.* se ha desarrollado para las ovejas y

cabras. Basappa G Mantur and Satish K Amarnath. 2008. *J. Biosci.* 33(4), November 2008, 539–547.

Las Brucelas pertenecen a  $\alpha$ -2 subdivisión de Proteobacteria. Son Gram-negativas, parcialmente ácido rápido, aeróbica, cocobacilos facultative intracelular o barras cortas. Son oxidasa, catalasa, la nitrato reductasa y ureasa positivo. *B. abortus* infecta preferentemente ganado bovino, ovino y caprino *B. melitensis*, *B. suis* cerdos y *B. canis* perros. Por encima de infectar a los seres humanos con las especies *B. melitensis* siendo la más común.

### **Estructura y composición química**

Las brucelas son pequeños bacilos o cocobacilos gramnegativos, no esporulados, carentes de una verdadera cápsula, de flagelos o pili.

La estructura más característica de las bacterias gram-negativas es su envoltura celular, formada por una membrana citoplasmática, una membrana externa y un espacio periplásmico intermedio.

El **espacio periplásmico**. contiene enzimas, entre ellos muchos que detoxifican agentes nocivos procedentes del medio, proteínas relacionadas con el transporte de nutrientes, varias de las enzimas sobre las que actúan los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y, como componente estructuralmente más importante, un gel glucopéptidico (mureína o peptidoglicano) responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria. La membrana externa contiene, distribuidos asimétricamente, fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido (LPS). La asimetría en la distribución del LPS, junto con sus propiedades y las de las proteínas que actúan como poros en la membrana externa (porinas), hace que ésta actúe como una barrera de permeabilidad frente a muchos solutos hidrofílicos e hidrofóbicos.

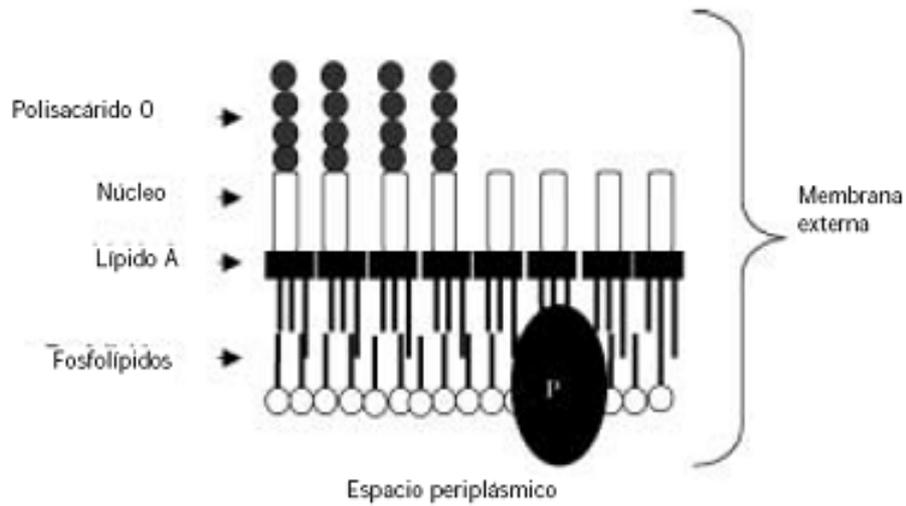
La **membrana externa** constituye la barrera física y funcional entre el interior de la célula bacteriana y su medio, además de ser, la primera estructura que entra en contacto con las células del sistema inmunológico del huésped, durante los estadios tempranos de la enfermedad, ya que no se han descrito componentes capsulares en *Brucella*. Por otro lado, la supervivencia de la bacteria ya sea en el medio ambiente o en el huésped, depende de la

integridad de su membrana externa ya que si ésta sufriera algún daño, la bacteria no sobreviviría por mucho tiempo.

La membrana externa de *Brucella* es rica en fosfatidilcolina a diferencia de la perteneciente a las enterobacterias relacionadas con ella, que es rica en fosfatidiletanolamina. Su componente más abundante y mejor estudiado es el LPS, que se conoce también con el nombre de endotoxina. En él se distinguen tres regiones: el lípido A, inserto en la hoja externa de la membrana, un oligosacárido intermedio, llamado núcleo, y el polisacárido O (PSO).

El lípido A de *Brucella* es químicamente diferente del de las gram-negativas clásicas y está formado por un disacárido de diaminoglucosa sustituido con betahidroxiácidos y otros ácidos grasos de cadena larga. A esta composición diferente se debe el que algunas de las actividades características de los LPS relacionadas con la endotoxicidad, como la pirogenicidad, sean diferentes en *Brucella*, lo que podría tener significación en la patogénesis. Como antígeno, el lípido A no parece tener relevancia diagnóstica.

Unida al lípido A se localiza la fracción polisacárida o antigénica, en la que se distingue una zona más interna o núcleo (glucosa, manosa y quinovosamina) y la cadena O dirigida hacia el exterior y representada por azúcares característicos (homopolímero de N-formil perosanina sin ramificaciones). Constituyen los epítomos o antígenos de superficie, responsables de las grandes respuestas humorales, de diferentes tipos, según el enlace de unión, y cuantitativamente más elevados, según las especies y biovariedades, siendo por tanto de ayuda en la identificación. En las especies *Brucella ovis* y *Brucella canis* contienen estos polisacáridos en la superficie externa de la bacteria cubriendo la mayor parte, por esto son llamadas cepas rugosas (LPS-R). *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. neotomae* son denominadas cepas lisas (LPS-S)



Esquema 1 simplificado de la membrana externa de la pared celular de *Brucella*.

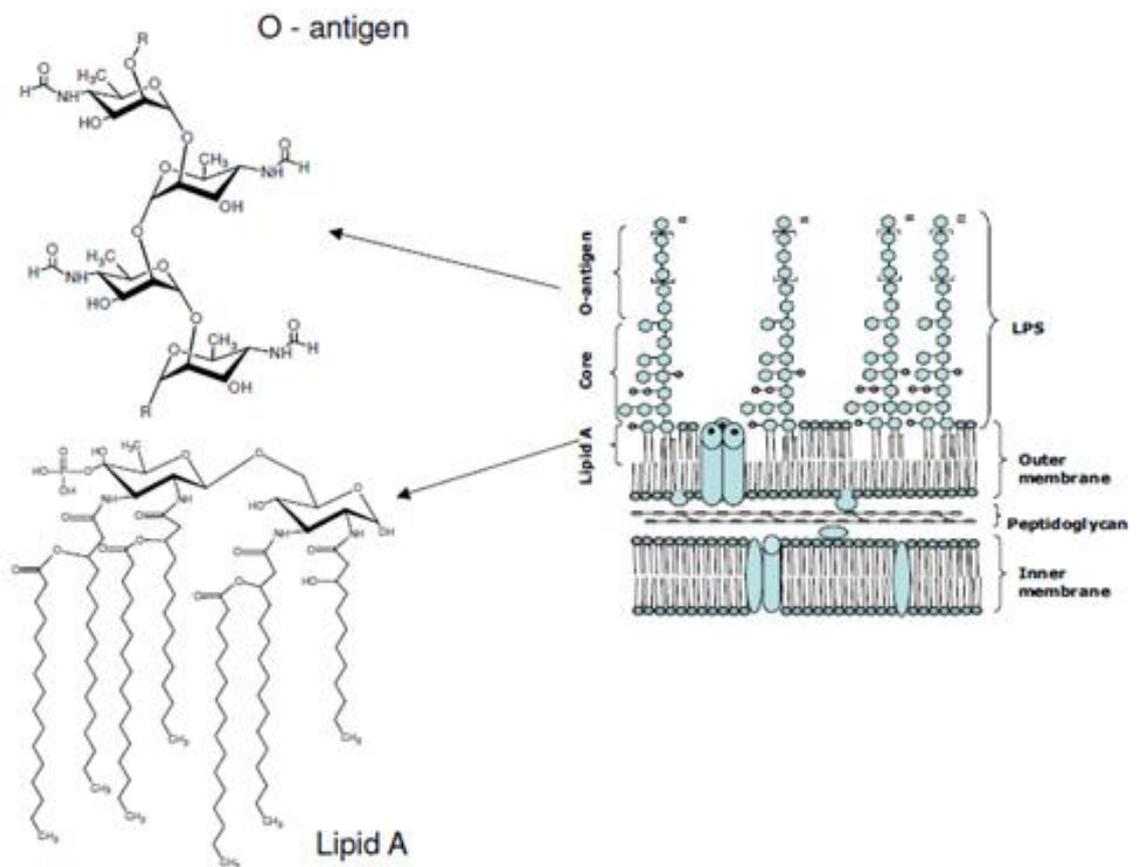


Figure 1  
Schematic structure of lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella* spp.

Figura1. Estructura de Lipopolosacaridos de *Brucella*.spp.

Los tres tipos básicos de epítomos, antígenos inmunodominantes de superficie, localizados en la cadena O del LPS son: A o *abortus*, M o *melitensis* y C o común. Aunque estos datos son útiles para entender el serotipado de las brucelas S, la generalidad de los anticuerpos producidos en la infección reconocen el epítomo C. Por esto, en el diagnóstico serológico, es irrelevante el origen (*abortus* o *melitensis*) del antígeno (suspensión celular o LPS-S) y no es posible distinguir el serotipo infectante.

En las cepas rugosas la cadena O está ausente o reducida, por lo que la especificidad frente a LPS-R viene determinada por polisacáridos centrales (Ag R) que aglutinan en pruebas de identificación frente a sueros mono-específicos anti-R.

### **Proteínas de membrana externa**

Las proteínas de membrana externa (PME u OMPs) se asocian estrechamente con los LPS, se las ha asociado con la protección. Dentro de éstas se encuentran las denominadas proteínas mayores, que se clasifican en tres grupos de acuerdo a sus pesos moleculares: grupo 1 (89-94 kDa), grupo 2 (36-38 kDa) y grupo 3 (25-27 y 31-34 kDa)

En la actualidad, como resultado de la clonación y secuenciación de los genes que codifican para estas OMPs, se les ha ido asignando otra nomenclatura: OMP25, OMP31 y OMP2b. Otras OMPs han sido, posteriormente identificadas por medio de anticuerpos monoclonales, por ser menos abundantes, se denominan proteínas menores y presentan masas moleculares de 10, 16.5, 19 y 89 kDa. Con base en estudios genéticos y de su secuencia de aminoácidos, las de 10, 16.5 y 19 kDa, se han identificado como lipoproteínas de membrana externa, denominándolas: OMP10, OMP16 y OMP19, respectivamente. La OMP 16, pertenece a la familia de lipoproteínas asociadas a la peptidoglicana presentes en bacterias Gram negativas.

La OMP1 de 89 kDa se encuentra expuesta en la superficie de la célula. Finalmente, se ha puesto de manifiesto la existencia de acuaporinas en la ME, que son proteínas transmembranales con canales para agua y que pertenecen a la familia de las proteínas intrínsecas mayores.

Las OMP mayores o principales se encuentran expuestas en la superficie de la membrana externa, sin embargo, estarían menos accesibles en las cepas lisas que en las rugosas, debido al impedimento estérico que causan las largas y abundantes cadenas O del LPS en las cepas lisas.

Otras proteínas han sido descritas: la periplásmica BP26; de entre las internas se tiene: el componente A2, que es una glicoproteína resistente al calor, empleada en el diagnóstico de bovinos; las de 16 a 18 kDa usadas como antígenos en reacciones intradérmicas; la proteína citoplásmica de 18 kDa, con secuencia descrita.

Numerosas proteínas de membrana externa, interna, periplásmicas y citoplásmicas han sido caracterizadas. Algunas son reconocidas por el sistema inmune, durante la infección y solo se han reportado en *Brucella*, por lo que serían de gran utilidad en futuras pruebas diagnósticas o para ser consideradas en las nuevas vacunas.

### **Genoma.**

El genoma contiene dos cromosomas circulares de 2,1 Mb y 1,5 Mb, excepto biovar B.suis 3, que tiene un solo cromosoma de 3,1 MB.

### **Los determinantes antigénicos.**

Hay dos tipos de lipopolisacárido liso (SLP) antígenos de superficie, denominados A y M. antígeno predomina en la B. abortus y B. suis, mientras que M es el antígeno importante en la B. melitensis. De la membrana externa e interna numerosos, citoplasmática y proteínas periplásmico también se han caracterizado.

### **PATOGENICIDAD.**

La patogenicidad de la brucelosis humana se atribuye a factores como el LPS, la adenina y el monofosfato de guanina, virb, 24 kDa, y la enzima ureasa. Brucelas pueden entrar en la de acogida a través de la ingestión o inhalación a través de la conjuntiva o abrasiones de la piel. Las Brucelas colonizan en diferentes órganos, con predilección por el sistema linforreticular.

### **EPIDEMIOLOGÍA.**

La brucelosis es la zoonosis más frecuente en el mundo, lo que representa la ocurrencia anual de más de 500.000 casos (Pappas et al 2006).

A pesar de la brucelosis y sus medios de transmisión se descubrieron más de 100 años, la enfermedad sigue siendo un problema en todo el mundo, sobre todo para los países en desarrollo. Desde el descubrimiento de *B. melitensis* por Bruce, la brucelosis ha sido una enfermedad emergente.

La transmisión de la infección por *Brucella* y su prevalencia en una región depende de varios factores, como hábitos alimenticios, los métodos de transformación de leche y productos lácteos, las costumbres sociales, las prácticas pecuarias, las condiciones climáticas, socioeconómicas estado y la higiene medio ambiente. El saneamiento ambiental es especialmente importante en el contexto de la transmisión de aire.

La brucelosis es casi siempre se transmite al hombre por animales domésticos infectados. Sin embargo, se ha documentado fuera de toda duda, la posibilidad de transmisión de humano a humano de la infección por *Brucella* (Naparstek et al, 1982; Lubani et al 1988; Mantur et al 1996; Tikare et al 2008). Brucelosis humana alguna vez se pensó que se transmite predominantemente por contacto con animales. Sin embargo, ahora se dio cuenta de que cada vez más productos de origen animal como la leche y los productos cárnicos también desempeñan un papel importante en la transmisión de la enfermedad. Leche y productos lácteos elaborados con leche cruda como los quesos blandos, yogures, helados y pueden contener altas concentraciones de las bacterias y el consumo de estos es una causa importante y es la forma más común de transmisión para *B.melitensis*, *B.abortus* y las infecciones en la población general.

La leche de camella es también considerada como la más importante fuente de la infección en los países del Medio Oriente y Mongolia. Carga bacteriana en los animales los tejidos musculares es baja, pero el consumo de platos cocidos tradicionales, como el hígado se ha implicado en la infección humana. Algunos hábitos de comida en particular, tales como comer feto abortado visto en Ecuador, pueden estar implicados en la causa de la brucelosis humana. Aplastamiento del cordón umbilical de los corderos recién nacidos y los niños con los dientes es otro hábito de riesgo.

El consumo de leche de cabra fresco, combinado con extractos de hierbas para obtener alivio de enfermedades crónicas se informa, es uno más hábito de riesgo. Skinning corderos nacidos muertos y los niños y abortado los fetos, que pueden estar altamente contaminadas con *Brucella* spp., también presenta un alto riesgo de brucelosis (Awad 1998).

Otros medios de infección incluyen abrasiones de la piel o la inhalación de partículas en el aire de estiércol de los animales. La contaminación de las heridas de la piel puede ser un problema para las personas que trabajan en los mataderos o plantas empacadoras de carne o de los veterinarios.

Los cazadores pueden ser infectados a través de heridas en la piel o por ingerir accidentalmente las bacterias después de venado, alce, reno, o los cerdos salvajes que han asesinado. La inhalación es a menudo responsable de un porcentaje significativo de casos en los empleados de matadero (Reyes et al 1993). Además, el laboratorio adquirió la infección por *Brucella*, debido a la ingestión accidental, inhalación y contacto con las mucosas o la piel es un peligro para la salud de la de los trabajadores de laboratorio que las culturas de las cepas virulentas o atenuadas. La enfermedad ha sido reconocida como uno de los laboratorios comunes de las infecciones de transmisión y se ha informado de que se produzca en clínicas, de investigación y laboratorios de producción (Bouza et al 2005, el Centro para el Control y la Prevención de [CDC] 2008).

El aumento de negocios y de ocio viajes a países endémicos han dado lugar a dificultades diagnósticas en las zonas donde la brucelosis es poco común. Aunque las cuentas de *B. melitensis* en la mayoría de los casos registrados, de *B. abortus* y la *B. suis* causa de morbilidad en los países en los que persisten en los animales domésticos, especialmente en Asia y América Latina.

*B. canis* rara vez causa enfermedad en el hombre manifiesta, y *neotomae* *B.* y *B. ovis* no han sido identifi ed como causas de la infección en seres humanos. La presencia de la brucelosis en los

animales salvajes, con un potencial para la transferencia continua a los animales domésticos y de ellos a los seres humanos es otra epidemiológica (cuestión Cutler et al 2005). Aquellos con un riesgo profesional de adquirir la infección son los productores de ganado, trabajadores de mataderos, pastores, agricultores, veterinarios y personal de laboratorio.

La brucelosis es común en las zonas rurales, porque los agricultores viven en estrecho contacto con sus animales y con frecuencia consumen frescos productos lácteos no pasteurizados. Sin embargo, la venta de los productos lácteos también puede traer la enfermedad a zonas urbanas. La brucelosis tiene una distribución en todo el mundo, pero hoy en día la enfermedad es rara en los Estados Unidos de América y en muchas otras naciones industrializadas debido a la detección de rutina de los animales domésticos y la vacunación de los animales programada.

## **ESCENARIO MUNDIAL.**

La brucelosis sigue siendo una enfermedad debilitante importante. Es más prevalente en las partes occidentales de Asia, India, Oriente Medio, Del sur de Europa, y los países de América Latina. La brucelosis en humanos se encontró con presencia más significativa en las zonas rurales, las comunidades nómadas donde las personas viven en estrecha asociación con los animales. EN todo el mundo se informa de la incidencia de humanos.

La brucelosis en áreas endémicas de la enfermedad varía ampliamente, desde  $<0,01$  y  $> 200$  por 100.000 habitantes. Por ejemplo, Egipto, la República Islámica del Irán, Jordania, Omán, Arabia Saudita, y República Árabe, Siria informó de un combinado anual de total de más de 90.000 casos de brucelosis humana en 1990 (Awad 1998).

La baja incidencia reportada conocida, de la brucelosis en zonas endémicas pueden reflejar la ausencia o la baja en los niveles de vigilancia y presentación de informes (McDermott y Arimi 2002). La verdadera incidencia de brucelosis humana sin embargo, es desconocida para la mayoría de países, entre ellos México. La brucelosis en Humanos no se considera una enfermedad

altamente contagiosa. Por lo tanto, la agrupación podría resultar de los brotes de origen común o en el tiempo-espacio de la agrupación de los factores que aumentan el riesgo de infección (Chomel et al, 1994; Fosgate et al 2002). Las especies que pueden infectar al hombre son *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, y *B. canis*. *B. melitensis* coloniza ovino y caprinos y es la causa frecuente de la brucelosis, a nivel mundial en los seres humanos. Reciente reaparición en Malta y Omán indica la dificultad de la erradicación de esta infección (Amato-Gauci, 1995).

Ovinos y caprinos y sus productos son las principales fuentes de la infección por *B. melitensis* en humanos, pero la infección por *B. melitensis* en el ganado se está convirtiendo en un problema potencial en algunos países del sur de Europa, Israel, Kuwait, y Arabia Saudita. La infección por *B. melitensis* es particularmente problemática de *B. abortus*, porque las vacunas no protegen eficaz contra la infección por *B. melitensis*, la *B. melitensis*

La vacuna Rev 1 no ha sido plenamente evaluado para su uso en el ganado. En algunos países de Sudamérica, especialmente Brasil y de Colombia *B. suis* biovar 1 se ha establecido en el ganado bovino dando lugar a infecciones humanas. La importancia de la detección de los miembros de la familia de los casos de brucelosis aguda en áreas endémicas recientemente ha puesto de relieve (Almuneef et al 2004; Mantur et al 2006).

Esto es un importante paso epidemiológico. y debe ser tenido en cuenta por la familia y los médicos, de modo que el diagnóstico oportuno y el suministro de la terapia den, resultandos en una menor morbilidad. El aislamiento de los últimos cepas distintivas de los mamíferos marinos y los seres humanos ha amplió la gama ecológica del género y, potencialmente su ámbito de aplicación como una zoonosis. Ya que las cepas que pueden surgir nuevas y los tipos existentes adaptarse a los cambios sociales y a las prácticas agrícolas, el panorama sigue siendo incompleto. Los varones se ven afectados con más frecuencia que las mujeres que puede ser debido al riesgo de exposición ocupacional. Aunque afecta a la brucelosis humana todos los grupos de edad, se dice que es poco frecuente en la infancia. Sin embargo, en las zonas, donde *B. melitensis* es endémica, los casos pediátricos son visto (Caksen et al 2002; Mantur et al 2004a).

La brucelosis es un significativo problema de salud pública en la India, con un incremento de veterinarios. En la India el 80% de la población vive en aldeas y aproximadamente 575.000 miles de pequeñas ciudades; tienen contacto cercano con animales silvestres, debido a su ocupación. Por lo tanto, la población humana tiene un mayor riesgo de adquirir las enfermedades zoonóticas como la brucelosis. La enfermedad tiene una mayor importancia en países como la India, donde las condiciones son propicias para la extendida infección humana por causa de condiciones de insalubridad y la pobreza. Especies de preocupación en la India son *B.melitensis* y *B. abortus*. *B. melitensis* es la cepa más virulenta y común para el hombre y causa graves problemas clínicos y una prolongada enfermedad con un riesgo de discapacidad. *B. abortus* es la especie dominante en el ganado.

La brucelosis bovina está muy extendida en la India y parece estar en aumento en los últimos tiempos, quizás debido al aumento del comercio y el movimiento rápido de los animales (Renukaradhya et al 2002). La preponderancia de los servicios de toro natural en la India rural, especialmente en Búfalo, es quizás otro factor importante en el mantenimiento y la propagación de la infección. El pastoreo libre y el movimiento con frecuencia, de animales, la mezcla de ovejas y cabras en el pastoreo, también contribuyen a la amplia distribución de la brucelosis en los animales. Chahota et al (2003) han informado de un brote severo de la brucelosis en una granja lechera organizada con abortos, retención de placenta y aún con nacimiento de crías muertas en las vacas.

El diagnóstico fue confirmado mediante serología empleando rosa de Bengala prueba de aglutinación en placa (RBPT) y el test de aglutinación estándar de tubo (SAT) y confirmada por el aislamiento de *B. abortus* biotype1. La presencia de la brucelosis en la India fue establecida a principios del siglo pasado y desde entonces ha sido reportada en casi todos los estados. (Sehgal y Bhatia 1990; Renukaradhya et al 2002), pero la situación de la brucelosis varía ampliamente entre los Estados. Varios de los informes publicados, incluyendo los más recientes indican que en los humanos la brucelosis es una tranquila enfermedad muy común en la India. Mathur (1964) informó 8,5% sero-prevalencia de la brucelosis entre los productos lácteos y el personal en

contacto con animales infectados. En otro estudio realizado por Mathur (1968) en Haryana, concluyó que las cabras y las ovejas son la fuentes de infección humana por el aislamiento de *B. melitensis* como una cepa predominante de humano en sangre, así como muestras de leche de cabras y ovejas.

El estudio realizado por Thakur y Thapliyal (2002), reveló una tasa de prevalencia de 4,97% en muestras obtenidas de las personas expuestas a los animales. La tasa de seroprevalencia más alto también se ha observado en los grupos específicos de riesgo tales como de trabajadores de los mataderos (Barbuddhe et al 2000; Chadda et al 2004). Estas observaciones confirman los factores de riesgo ocupacional. Algunos trabajadores han presentado fiebre de origen desconocido (PUO) del inglés. Handa et al (1998), identificaron 4 (3,3%) casos de brucelosis aguda en un grupo de 121 pacientes con PUO. Sen et al (2002), identificaron 28 (6,8%) casos seropositivos en un grupo de 414 pacientes con PUO y Kadri et al (2000), identificaron 28 (0,8%) casos seropositivos en un grupo de 3.532 pacientes con PUO. del Inglés (pyrexia of unknown origin).

Una prevalencia del 3% se observó en los pacientes asistidos en Karnataka Medical College, Hubli (Mantur 1988). Un estudio realizado por Mantur et al (2004a) informó de 93 niños con la brucelosis en Bijapur, con una prevalencia del 1,6% por el SAT ( $\geq 1:160$ ). Una publicación de Mantur et al (2006) informó de 495 pacientes adultos en Bijapur con la prevalencia del 1,8%. La continuación del estudio afecta en Bijapur, 111 casos fueron adicionales fueron reportados (Mantur et al, 2007a, 2008a, b; Tikare et al 2008). En un estudio separado de Mantur y sus colegas identificaron 63 casos en el Instituto de Belgaum Ciencias Médicas, Belgaum, India., (ManturBG y sus colegas, datos proporcionados por el Instituto.

Kochar et al (2007) informó de 175 casos de brucelosis en Bikaner. Sin embargo, los datos epidemiológicos sobre esta enfermedad son a menudo incompletos. Esto en parte explica que es por la falta de instalaciones de un laboratorio adecuado, la falta de conciencia de endemidad, en virtud de la presentación de informes, así como la escasa cooperación y el intercambio de información entre los servicios veterinarios y de salud.

## **ASPECTOS DE LA ENFERMEDAD.**

La brucelosis humana es conocida por presentar diversas manifestaciones (Mantur et al 2004a, 2006) (tabla1). Sin embargo, la mayoría de los síntomas comunes es la fiebre. Los síntomas y los signos más comunes son fiebre, fatiga, malestar, escalofríos, sudoración, cefalea, mialgia, artralgia, y el peso pérdida (Kochar et al 2007; Mantur et al 2007b). Brucelosis es invariablemente infradiagnosticada, probablemente a causa de la publicidad engañosa cuadro clínico (Corbel, 1997).

Estos pacientes febriles puede se refiere a que los pacientes con PUO o los síntomas y los signos se confunden con los de otras enfermedades. Así, para un médico que desconoce, el diagnóstico clínico se convierte en un problema desafiante.

## **Complicaciones**

Las complicaciones pueden ser muy diversas, dependiendo del lugar específico de la infección. La infección ósea y la de las articulaciones es la complicación más frecuente de la brucelosis (Mousa et al 1987), y la epididimoorquitis es la complicación más frecuente en forma genitourinaria en los hombres.

La brucelosis durante el embarazo supone un riesgo importante de aborto espontáneo o la transmisión intrauterina de la infección al bebé. Se reportan tres casos que sufren de brucelosis durante el embarazo y están bajo tratamiento. La invasión del sistema nervioso central se produce en aproximadamente el 5-7% de los casos de infección por *B. melitensis*. Endocarditis por *Brucella* ocurre en menos del 2% de los casos, pero *representa la mayoría de las muertes. Basappa G Mantur y Satish K Amarnath J. Biosci. 33 (4), noviembre de 2008.*

Las complicaciones en la piel, aunque raros, son reportadas. Complicaciones del tracto respiratorio puede verse en los trabajadores de mataderos. Los informes recientes (Pappas et al 2003; Mantur et al 2006) indican que la afectación pulmonar no es una rareza. Los informes de manifestaciones inusuales, con lesiones atípicas están en alza. Tsolia et al (2002) han observado complicaciones inusuales en dos niños. En nuestra

serie, nos informó de complicaciones (artritis no incluidos) en el 9,4% (tabla 2) de los pacientes con manifestaciones inusuales, como la corea, hidrocele, síndrome de Stevens-Johnson, infección del tracto urinario (Mantur et al 2004a, 2006). Recientemente, paniculitis aguda como inusual la presentación de la brucelosis se ha informado (Tanyel et al 2008). Se han identificado en lesiones atípicas como hemorrágicas epidídimo-orquitis, celulitis, anemia severa, la parálisis facial con hemiplejía y la infertilidad (cuadro 2).

**Table1. Hallazgos clínicos en 792\* pacientes infectados con *B. melitensis***  
**Síntomas / Signos No. De pacientes (%)**

Dolor en las articulaciones	183 (23.1)
Dolor de espalda bajo	118 (14.8)
Sudores nocturnos	31 (3.9)
Tos, disnea, hemoptisis	28 (3.5)
	20 (2.5)
Dolor testicular, escrotal hinchazón, ardor miccional	16 (2)
Dolor en el abdomen, náuseas,	26 (3.2)
Fiebre (> 37.5oC)	625. (78.9) %
vómitos, anorexia, ictericia,	2 (0.25)
Dolor de cabeza	20(2.5)
Fatiga	14(1.7)
** Pápulas, úlceras en la boca	11 (1.38)
Convulsiones	2(0.25)
Esplenomegalia	147 (18.5)
Hepatomegalia	90 (11.3)
Hepatoesplenomegalia	121 (15.2)
Linfadenopatía	23 (2.9)
Los movimientos bruscos de las extremidades	1 (0.1)
Grabación de los pies	1(0.1)
Inflamación de la mano	2(0.25)

La pérdida de peso	8(1.0)

Datos de Instituciones donde los casos fueron identificados  
 \*\*asociado con nódulos Subcutáneos

## **DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.**

La brucelosis tiene una distribución geográfica limitada, siendo un problema importante en el Mediterráneo, el oeste de Asia y algunas zonas de África y Latinoamérica, especialmente en países con bajos recursos económicos (Corbel 1997, Moreno y Moriyón 2002). En el centro y norte de Europa y en Australia la infección por *B. abortus* ha sido prácticamente erradicada. En Norteamérica, la brucelosis es especialmente prevalente en las zonas agrícolas del norte y centro de México (Gándara y col 2001), mientras que en Canadá y Estados Unidos ha disminuido considerablemente en los últimos años. *B. abortus* está presente en todos los países de América Central, siendo la prevalencia de un 4 a un 8% (Moreno 2002). En Sudamérica se encuentra en varios países, donde en muchos casos es endémica y un problema sanitario importante (Corbel 1997, Lucero y col 1999, Rodríguez y col 2001). En Chile, la Décima Región de Los Lagos es la que comprende la mayor área productora de leche y, además, tiene la mayor concentración de ganado infectado (Ramírez y Sigal 2002, Rivera y col 2002).

## **PATOGENIA.**

La mayoría de los animales se infectan directamente a través de la mucosa oro nasal, por ingestión de alimentos contaminados o por inhalación de polvo de los establos con microorganismos que los animales han secretado con la leche o los exudados vaginales después del aborto (Rodríguez y col 2001). *B. abortus*, además de infectar al ganado bovino, puede infectar a otras especies como búfalos, bisontes, alces, jabalíes, zorros, renos, camellos y animales marinos (Mandell 1995, Cloeckert y col 2000). Inmediatamente después de la penetración e independientemente de la vía de entrada, las bacterias son transportadas, libres o en el interior de células fagocíticas, hasta los ganglios linfáticos más próximos al lugar de entrada. Si las bacterias no son destruidas, pueden sobrevivir largos períodos de tiempo en el interior de las células fagocíticas (Iharmon y col 1988). Los ganglios linfáticos responden a la agresión

por medio de una hiperplasia reticuloendotelial y linfática, que puede tardar varias semanas en producirse y persistir durante meses (Rodríguez y col 2001). En los fagosomas de los macrófagos, *Brucella* sobrevive y se multiplica, inhibiendo la fusión del fagosoma que contiene la bacteria y el lisosoma, mediante la acidificación rápida del medio (Pizarro-Cerda y col 1998, Celli y col 2003, Ko y Splitter 2003). En células fagocíticas no profesionales, la internalización de *B. abortus* se asocia al dominio extracelular de la proteína tirosina quinasa y la activación de una serie de pequeñas GTPasas (Guzmán-Berri y col 2001), tendiendo a localizarse dentro del retículo endoplásmico rugoso (Corbel 1997). En infecciones experimentales, en ratones, se ha observado que la infección tiene dos fases: durante las primeras dos semanas la bacteria se multiplica rápidamente; en la segunda fase, el número de bacterias se estabiliza hacia la quinta o sexta semana y luego decrece lentamente hasta desaparecer (Hong y col 2000). La especial afinidad que estas bacterias tienen por el endometrio grávido y por la placenta fetal de bovinos hace que estas bacterias también proliferen extensamente en trofoblastos de la placenta que rodean al feto (Meador y Deyoe 1989), lo que condiciona que la principal manifestación clínica de la infección aguda en los animales sea el aborto durante el último tercio de la gestación, o el nacimiento de animales prematuros poco viables (Ficht 2003). En bovinos machos provoca alteraciones testiculares y una disminución de la fertilidad, acompañadas algunas veces por abscesos en testículos y epidídimo (Hausler y Koontz 1974).

En humanos la infección se produce a través del contacto con secreciones de animales infectados o consumo de leche cruda o queso contaminado. El consumo de carne no es una fuente de contaminación (Mandell 1995). *Brucella* puede ingresar al organismo a través de lesiones de la piel, mientras se manipulan animales infectados o sus desechos (Mandell 1995, Sauret y Vilissova 2002). En países en que la infección por *Brucella* es endémica en la población animal, la infección por *Brucella* en humanos es frecuente (Roop II y col 1994, Yagupsky 1999), sin embargo, la transmisión persona a persona es extremadamente inusual (Fiori y col 2000). La enfermedad puede ser adquirida por exposición ocupacional de los trabajadores de mataderos, carniceros y veterinarios, al inhalar aerosoles

contaminados o en viajes a lugares donde la infección es endémica (Yagupsky 1999). Las infecciones asociadas al trabajo de laboratorio representan el 2% de los casos y se ha informado que el período de incubación de la brucelosis adquirida por accidente en el laboratorio puede variar entre seis semanas a cinco meses (Fiori y col 2000).

### **GENETICA DE *BRUCELLA*.**

El ADN de *Brucella* contiene un 58-59% de G + C (guanina y citosina) y el tamaño total del genoma se ha estimado en aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  pares de bases (Allardent-Servent y col 1988); este tamaño es menor al de *Escherichia coli* ( $4,7 \times 10^6$  pares de bases). Dos características genéticas de *Brucella* llaman especialmente la atención, en primer lugar, la existencia de dos cromosomas circulares en la mayoría de las especies y biotipos, y en segundo lugar, la ausencia de plásmidos. Esta última característica refleja probablemente la adaptación a un nicho ecológico (el ambiente intracelular) estable y sin competencia microbiana, en el que no es necesaria la plasticidad genética que se deriva de los plásmidos y que es propia de ambientes con gran cantidad de microbios (intestino, tierra, etc.). El género *Brucella* tiene seis especies reconocidas, las que exhiben distintas preferencias por su huésped y muestran más de 94% de homología en su genoma (Halling y col 2005), lo que apoya la proposición de que las especies clásicas de *Brucella* son cepas de *Brucella melitensis* (Verger y col 1995). Sin embargo, se ha encontrado polimorfismo en determinadas secuencias genómicas que coinciden con las especies clásicas e incluso con las biovariedades. Se estima, además, que el 8% del genoma de *Brucella* se destina a funciones necesarias para la sobrevivencia y la virulencia, en comparación al estimado para *Salmonella* que es sólo el 3-4% (Hong y col 2000).

### **INMUNIDAD FRENTE A *BRUCELLA***

***Inmunidad natural.*** En estados tempranos de la infección por *Brucella*, el rol de la respuesta innata es reducir el número inicial de bacterias promoviendo una respuesta Th1 en el huésped (Ko y Splitter 2003). Los macrófagos, los neutrófilos, las células Natural Killer (NK) y el complemento

juegan un rol clave en esta fase temprana de la respuesta a la invasión frente a este microorganismo (Golding y col 2001).

**Macrófagos.** Los macrófagos juegan un rol central en la respuesta inmune frente a *Brucella*, ya que actúan como células fagocíticas profesionales y como células presentadoras de antígenos. Procesan antígenos en sus compartimentos intracelulares y los presentan en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) a linfocitos T, promoviendo de esta manera la respuesta inmune adaptativa (Forestier y col 2000). En este sentido, se ha encontrado que el LPS de *Brucella* interfiere con la vía de presentación de antígenos por MHC clase II (Murphy y col 2002). Las funciones bactericidas de los macrófagos frente a *Brucellase* encuentran centradas en la actividad de las especies reactivas de oxígeno (Oliveira y col 2002) y las especies reactivas de nitrógeno, las cuales son inducidas por IFN- $\gamma$  y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Ko y Splitter 2003).

Los receptores Toll-like (TLR) juegan un rol importante en el inicio de la respuesta inmune innata. Estos receptores presentes en células fagocíticas profesionales reconocen productos microbianos uniéndose directamente a ellos e inducen señales intracelulares que activan factores de transcripción (como NF- $\kappa$ B) que modulan la producción de citoquinas. Estos receptores pueden ser activados por diversos productos microbianos; el receptor Toll-like 4 (TLR4) es activado por LPS, el TLR9 por ADN bacteriano, el TLR2 por productos de la pared celular de bacterias Gram positivas y TLR5 por flagelina (Vasselon y Detmers 2002).

**Neutrófilos.** Los neutrófilos están implicados en el desarrollo de una defensa temprana frente a una infección por *Brucella* mediante la fagocitosis y posterior destrucción del microorganismo. En primer lugar, los neutrófilos son atraídos al sitio de la infección por estímulos químicos originados o derivados del microorganismo (Wilkinson 1980, Birmingham y col 1982), para posteriormente fagocitar la bacteria, preferentemente opsonizada (Young y col 1985). Una vez que el patógeno es fagocitado, se desarrolla una serie de mecanismos destructivos en el neutrófilo, con el fin de eliminar la bacteria, mediante el aumento del consumo de oxígeno que lleva a la aparición de radical superóxido, peróxido de hidrógeno y otros radicales derivados del

oxígeno, junto con la activación de la enzima mieloperoxidasa y la fusión del lisosoma con los fagosomas que contienen la bacteria, liberándose hidrolasa ácida, glicosidasa, proteasa y lipasa. Sin embargo, la bacteria ingerida puede sobrevivir al mecanismo destructivo de los fagocitos (Smith y Fritzgeorge 1964), gracias a moléculas de bajo peso molecular que inhiben el sistema antibacteriano mieloperoxidasa-peróxido de hidrógeno-haluro (Canning y col 1985). Por ello, aunque los neutrófilos son las primeras células relacionadas con la eliminación de patógenos extraños, ellos son considerados de baja eficiencia contra *Brucella*, ya que esta bacteria puede crecer y sobrevivir en su interior y además es diseminada a través de estos leucocitos a órganos y diferentes localizaciones, desarrollándose una infección persistente.

**Células Natural Killer.** Las células NK forman parte de la primera línea de defensa contra *Brucella* y una vez que son activadas pueden eliminar células infectadas. *B. abortus* puede activar la actividad lítica de las células NK, estimulando la producción de interleuquina- 12 (IL-12) por parte de las células presentadoras de antígenos. IL-12 además estimula a las células NK a secretar IFN- $\gamma$  (Fernández y col 1995; Golding y col 2001).

**Complemento.** Uno de los primeros eventos que ocurren después de la entrada de la *Brucella* al organismo es la activación del complemento por la vía alterna; sin embargo, se ha demostrado que esta vía es incapaz de eliminar la cepa virulenta de *Brucella abortus* 2308 (Eisenschenk y col 1999). Por lo tanto, la lisis de *Brucella* estaría mediada principalmente por la vía clásica del complemento, la cual es dependiente de anticuerpos (Fernández y col 2001).

**Inmunidad adaptativa.** Está ampliamente aceptado que la inmunidad mediada por células es el mecanismo efector más relevante en la protección frente a *Brucella* debido a que es un parásito intracelular (Oliveira y col 1996). Las citoquinas son moléculas clave para una adecuada respuesta inmune mediada por células (Oliveira y col., 1996). La exposición prolongada de un animal a *Brucella* cambiaría la naturaleza de la respuesta inmune, desde una inmunidad mediada por células hacia una respuesta humoral (caracterizada por la producción de IgM e IgG1), respuesta que se relaciona con una disminución en la actividad de las células T ayudadoras tipo 1, con una baja en la producción de INF- $\gamma$ , favoreciéndose de esta forma un incremento de la

actividad de las células T ayudadoras de tipo 2, disminuyendo la respuesta inmune celular, lo que favorecería de esta forma el establecimiento de la enfermedad crónica (Oñate y col 2000). Las funciones de la respuesta inmune adaptativa en la brucelosis se basan principalmente en tres mecanismos. Primero, la producción de IFN- $\gamma$  por células T CD4+, CD8+, y células T  $\gamma\delta$ , que activa la función bactericida en macrófagos. Segundo, la citotoxicidad de células T CD8+ y células T  $\gamma\delta$  que eliminan macrófagos infectados. Y tercero, isotipos de anticuerpos Th1, tales como IgG2a que opsonizan al patógeno para facilitar su fagocitosis (Ko y Splitter 2003).

En general, se considera que los anticuerpos bloqueadores no son efectivos en la respuesta inmune contra *Brucella* (Corbeil y col 1988). Sin embargo, los animales infectados con *Brucella* producen anticuerpos contra varios componentes bacterianos (Tabatabai y Hennager 1994) que interfieren en la eliminación del patógeno, especialmente aquellos anticuerpos específicos para el antígeno O y algunas porinas. En este sentido, los anticuerpos serían importantes en bloquear la liberación de cantidades demasiado elevadas de *Brucella* al medio extracelular.

*Linfocitos T CD4+ y CD8+*. Después de la activación de los macrófagos, las células T inmaduras (Th0) se diferencian de células efectoras y de memoria, que están programadas para secretar distintos patrones de citoquinas (Golding y col 2001). Las células Th1 secretan interleuquina-2 (IL-2) e INF- $\gamma$ , mientras que los linfocitos Th2 producen interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-5 (IL-5) e interleuquina-10 (IL-10) (Zhan y col 1995). La generación de células Th1 de memoria sólo puede realizarse si la respuesta inicial al estímulo se asocia a la producción de IL-12 e IFN- $\gamma$  (Scharf y col 2001).

El rol principal de la secreción de IFN-  $\gamma$  por las células Th1 en la inmunidad contra *Brucella* es activar la función bactericida de los macrófagos y linfocitos T CD8+ citotóxicos, así como la estimulación de la secreción de IgG2a (Scharf y col 2001; Ko y Splitter 2003). En términos numéricos, la población celular predominante es la de linfocitos T CD4+ productores de IFN- $\gamma$  (Ko y Splitter 2003), responsables de la activación de macrófagos y la atracción de células inflamatorias efectoras, de ahí su importancia en promover la

respuesta celular adquirida contra *Brucella* (Bae y col 2002, Wyckoff 2002). Además, el IFN- $\gamma$  inhibe la acción de IL-4 sobre las células T (Scharf y col 2001).

Las células citotóxicas T CD8<sup>+</sup> pueden actuar como células efectoras y eliminar macrófagos infectados con *Brucella* directamente (Oliveira y col 2002; Wyckoff 2002). Las células blanco son reconocidas por las células citotóxicas en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC I) y son eliminadas por la acción de perforinas y granzimas (Golding y col 2001).

**Linfocitos T  $\gamma\delta$  y b.** Las células T  $\gamma\delta$  y b representan una pequeña población de linfocitos, con un patrón único de reconocimiento de antígenos (Dieli y col 2003). En humanos, las células T  $\gamma\delta$  controlan el aumento en el número de microorganismos ya que secretan TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , después de ser activadas por antígenos no peptídicos, en su mayoría fosfoantígenos, los cuales no son presentados en el contexto del MHC (Giambartolomei y col 2002, Baldwin y col 2002, Ko y Splitter 2003). Mediante la secreción de estas citoquinas, activan la función bactericida de los macrófagos y, además, son capaces de lisar células infectadas por citotoxicidad directa *in vitro*. El rol de estas células *in vivo* aún no ha sido determinado (Ko y Splitter 2003), aunque se cree que son parte de la inmunidad innata (Wyckoff 2002). En bovinos menores de un año, la población celular predominante es la de células T  $\gamma\delta$  y no la de células T  $\alpha\beta$ , lo que sugiere que el rol de este tipo celular es más significativo en la infección del ganado con brucelosis (Ko y Splitter 2003). De todas maneras, en bovinos, la producción de IFN- $\gamma$  por estas células es menor que la producida por las células CD4<sup>+</sup> (Baldwin y col 2002).

**Linfocitos B.** Las células B son estimuladas directamente por las células T a través de la interacción de moléculas coestimuladoras como CD40 y su ligando CD40L presente en la célula T, lo cual, junto a las citoquinas liberadas, son importantes en promover el cambio de isotipo de IgM a IgG (Golding y col 2001). Con respecto al rol que cumplirían los anticuerpos durante la infección por *Brucella*, se ha visto que tanto IgM como IgG, en bajas concentraciones, son capaces de promover la lisis de *Brucella* a través de la vía clásica del complemento (Corbeil y col 1988). También se han encontrado títulos elevados de IgG anti-SOD Cu/Zn en animales infectados, pero aún no se

determina si estos anticuerpos juegan un rol importante en la inmunidad contra *Brucella* (Tabatabai y Hennager 1994). La opsonización acoplada al aumento de muerte de *Brucella* intracelular podría ser considerada como el principal rol de los anticuerpos contra la infección con *Brucella* (Ko y Splitter 2003). Aunque paradójicamente en brucelosis bovina la alta concentración de IgG durante la infección activa previene la lisis extracelular de la bacteria mediada por complemento y promueve la fagocitosis bacteriana, aumentando la localización intracelular de la bacteria y la extensión de la enfermedad (Ko y Splitter 2003).

*Citoquinas.* Las citoquinas son moléculas clave en el control de la brucelosis, ya que permiten dirigir las respuestas hacia una respuesta inmune celular o humoral. *B. abortus* estimularía a las células presentadoras de antígenos para que secreten IL-12, la que induce a los linfocitos Th0 a diferenciarse en linfocitos Th1, secretores de IFN- $\gamma$  (Splitter y col 1996, Oliveira y col 2002, Ko y Splitter 2003). Sin embargo, otros autores señalan que *Brucellano* es un inductor potente de la secreción de IL-12 (Pasquali y col 2001). IFN- $\gamma$  participa en la regulación de los mecanismos defensivos de los macrófagos y es considerado un factor crucial para el desarrollo de la protección contra la infección por *Brucella* (Oliveira y col 1996).

Interleuquina-18 (IL-18) citoquina sintetizada por macrófagos activados, también estimula la producción de IFN- $\gamma$ , por lo que actúa sinérgicamente con IL-12 sobre las células T en la estimulación de la respuesta mediada por células contra *Brucella* (Pasquali y col 2002).

TNF- $\alpha$  contribuye a la resistencia frente a *Brucella* por una vía independiente de IFN- $\gamma$ , estimula el flujo de fagocitos al sitio de infección y participa en la activación de los macrófagos (Zhan y col 1996).

IL-10, producida por linfocitos CD4<sup>+</sup> Th2, macrófagos activados y algunas poblaciones de células B, inhibe la respuesta Th1, ya que disminuye la capacidad de presentar antígenos de los macrófagos e inhibe la secreción de IFN- $\gamma$ , por lo tanto, aumenta la susceptibilidad a la infección por *Brucella* (Fernández y Baldwin 1995, Giambartolomei y col 2002).

## **ANTIGENOS DE *BRUCELLA*.**

Desde un punto de vista antigénico en *Brucella* existen dos componentes fundamentales: el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas (Hinsdill y Berman 1967).

*Lipopolisacárido.* El LPS es diferente entre cepas rugosas o lisas de *Brucella* (Mandell 1995). Se ha descrito que el LPS de cepa lisa, que contiene polisacárido O, probablemente juega un rol importante en la sobrevivencia intracelular, en comparación con una cepa rugosa que no tiene o tiene muy poca cadena O (Corbell 1997). La falta de una definición genética sobre cepas rugosas naturales, que son patogénicas para su hospedadores, como *Brucella ovis* y *Brucella canis*, confunde tal interpretación. Sin embargo, se ha descrito en *B. ovis* y *B. canis* la presencia de LPS que es idéntico al encontrado en cepas mutantes *lps* de *B. abortus*, mutantes que no tienen cadena O, pero tienen diferente capacidad de sobrevivencia dentro de los macrófagos (Allen y col 1998).

La cadena O del LPS es la estructura antigénica más expuesta de esta bacteria, un homopolímero de aproximadamente 100 residuos de 4-formamido-4,6-didesoximannosa (Caroff y col 1984, Corbel 1997, Cloeckert y col 2002), componente inmunodominante en cepas lisas de *B. abortus*, provocando que animales infectados produzcan anticuerpos específicos contra este antígeno. Los anticuerpos producidos en ratones son principalmente de isotipos IgG2a e IgG3, con baja producción de IgM (Vemulapalli y col 2000a). Estos anticuerpos representan un componente importante dentro de la inmunidad protectora contra *Brucella*, complementando la respuesta inmune mediada por células (Montaraz y col 1986).

La avidéz del LPS para unirse al receptor CD14 de los fagocitos mononucleares se debe al lípido A; esta interacción estimula en estas células la producción del TNF- $\alpha$ , interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-8 (IL-8), los cuales son mediadores de la mayoría de los síntomas de choque séptico (Aréstegui y col 2001).

El LPS de *Brucella* se diferencia en estructura química y actividad biológica al LPS de bacterias enteropatógenas comunes, ya que no está

estabilizado por cationes divalentes; contiene una menor carga negativa y menor cantidad de ácido 2-ceto-3-deoxioctanoico que el LPS de otras bacterias, disminuyendo así su susceptibilidad a la acción de péptidos catiónicos bactericidas (Folch y Oñate 1995). Las moléculas de manosa que presenta el extremo terminal del LPS de *Brucella* (cepa lisa) favorecen la adherencia a los fagocitos mononucleares del huésped, ya que éstos tienen los receptores de manosa (Pontow y col 1992). Además de los fagocitos mononucleares, las células de la placenta contienen gran cantidad de receptores de manosa, lo que sumado al tropismo de estas bacterias por el eritritol placentario de bovino, aumenta las probabilidades de abortos en estos animales, debido a la presencia de la bacteria en ese tejido (Aréstegui y col 2001).

**Proteínas.** En estudios sobre componentes estructurales proteicos de relevancia en *Brucella* se han descrito proteínas de membrana externa, proteínas de ubicación citoplasmática y proteínas de choque térmico.

Las proteínas de membrana externa han sido clasificadas en tres grupos: el Grupo I se relaciona con la biosíntesis de la propia envoltura celular y tienen un peso molecular entre 88 a 94 kDa; el Grupo II es equivalente a las porinas de otras bacterias Gram negativas, como Omp 2, OmpC y OmpF y tienen un peso molecular entre 35 a 40 kDa, finalmente, el Grupo III con peso molecular entre 25 a 30 kDa que interacciona fuertemente con el LPS (Verstreatte y col 1982, Santos y col 1984, Douglas y col 1984, Verstreatte y Winter 1984, Ficht y col 1989). Estos tres grupos de proteínas de membrana externa son reconocidos por el sistema inmune durante el curso de la infección (Bae 1999).

Entre las proteínas citoplasmáticas de importancia destacan la proteína superóxido dismutasa Cu/Zn (SOD) y la catalasa. La SOD Cu/Zn forma parte del sistema de defensa antioxidante de *Brucella*, el cual protege a la bacteria de los efectos tóxicos de los intermediarios reactivos del oxígeno, ya que transforma los radicales superóxido ( $O_2^-$ ) en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno gaseoso ( $O_2$ ), contribuyendo a la sobrevivencia intracelular de *Brucella* (Ko y Splitter 2003). La proteína SOD Cu/Zn pertenece a la familia de metaloproteínas, clasificada en tres tipos (SOD Cu/Zn, SOD Mn y SOD Fe)

dependiendo del metal que se encuentre en el sitio activo. La enzima catalasa ayuda a la proteína SOD Cu/Zn a detoxificar el ambiente bacteriano, actuando sobre el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) generado al interior del macrófago después de la fagocitosis de la bacteria, transformándolo en agua y oxígeno (Aréstegui y col 2001). La expresión de estas enzimas favorecería la permanencia de *Brucella* en el interior del fagocito.

El rol de las proteínas de choque térmico en la patogénesis de *Brucella* es incierto. Se ha observado que en bacterias intracelulares se expresan niveles elevados de proteínas de choque térmico en el ambiente intracelular (Roop II y col 1994, Ko y Splitter 2003, Bae y col 2002). Entre estas se encuentran GroEL (60 kDa), GroES (10 kDa) y HtrA (60 kDa). Las proteínas GroEL y GroES son chaperonas relacionadas con el plegamiento correcto de proteínas, mientras que HtrA (High temperature requirement A stress response protein) es una proteasa que degrada proteínas dañadas oxidativamente (Bae y col 2002). HtrA protege a la bacteria intracelular del daño oxidativo y contribuye a la resistencia de *Brucella* a la destrucción por los fagocitos (Elzer y col 1996). La enzima UvrA repara las lesiones del ADN después del daño oxidativo, como mecanismo de protección bacteriano (Oliveira y col 1996).

### **VACUNAS CONTRA *BRUCELLA ABORTUS*.**

La prevención de la diseminación de la brucelosis se basa en la administración de vacunas adecuadas contra la infección por *B. abortus*. Con este objetivo se han utilizado clásicamente cepas bacterianas atenuadas y componentes antigénicos propios de la *Brucella*. La habilidad de un antígeno específico para inducir en forma preferencial una respuesta Th1 es un aspecto importante a considerar en el desarrollo de vacunas contra *Brucella abortus* (Stevens y col 1994, Oliveira y col 1996).

#### **Bacterias atenuadas**

***Brucella abortus* S19.** La cepa 19 de *Brucella abortus* es una cepa lisa que posee la cadena O del LPS, por ello, en animales inmunizados con esta cepa se pueden observar anticuerpos específicos contra este antígeno del tipo IgG1, IgG2b e IgM (Vemulapalli y col 2000a). El defecto genético que permite la atenuación de esta cepa aún no ha sido definido, pero hace que pierda un

mecanismo de virulencia esencial (Briones y col 2001). Su efectividad en el ganado bovino depende de variables como la edad de vacunación, dosis, ruta de administración y de la prevalencia de la brucelosis en el rebaño vacunado (Schurig y col 2002). Los anticuerpos inducidos por la vacunación con esta cepa interfieren con el diagnóstico tradicional de bovinos infectados con cepas silvestres de *B. abortus*, por lo que tiene un uso limitado en la vacunación del ganado; esta cepa puede también inducir aborto en hembras preñadas y es patógena para la especie humana (WHO 1997, Oliveira y Splitter 1996, Olsen 2000).

***Brucella abortus* 45/20.** La cepa 45/20 es una cepa rugosa, fue desarrollada por 20 pasajes repetidos de *Brucella abortus* 45 en cobayos (Corbeil y col 1988). A pesar de que no induce anticuerpos contra la cadena O del LPS e induce una protección significativa contra la infección por *Brucella abortus* (WHO 1997), no es muy utilizada porque es inestable y puede revertir a su forma virulenta *in vivo* (Corbeil y col 1988). La cepa 45/20 también ha sido utilizada en forma inactiva, pero adicionada junto a un adyuvante oleoso, la que ha demostrado una relativa efectividad, pero provoca una reacción inflamatoria local en el sitio de la inyección (McDonel 1990).

***Brucella abortus* RB51.** *Brucella abortus* RB51 es una cepa rugosa, resistente a rifampicina, que ha sido derivada de la cepa virulenta *Brucella abortus* 2308 (Schurig y col 1991, Schurig y col 2002). Esta cepa es utilizada desde 1996 contra la brucelosis bovina en Estados Unidos y en otros países, como Chile. Es administrada en dosis que fluctúan entre 1x10<sup>10</sup> y 4x10<sup>10</sup> UFC por mililitro (Unidades Formadoras de Colonias) en bovinos no menores de 4 meses de edad (Olsen 2000, Vemulapalli y col 2000a). La protección que proporciona la vacunación con esta cepa se debe a la activación de linfocitos T (Stevens y Olsen 1996, Vemulapalli y col 2000<sup>a</sup>, Olsen 2000). La vacunación induce altos niveles de IFN- $\gamma$ , lo cual es fundamental en las etapas primarias de la infección (Pasquali y col 2001). La inoculación intraperitoneal de *B. abortus* RB51 en ratones resulta en una colonización del bazo que desaparece luego de cuatro semanas postinmunización (Schurig y col 1991). La vacunación del ganado permite la diferenciación entre bovinos vacunados y aquellos infectados con cepas silvestres debido a que no induce anticuerpos contra la

cadena O del lipopolisacárido (Pasquali y col 2001). Sin embargo, se ha determinado que puede causar placentitis, endometritis e infección fetal, en vaquillas adultas que han sido vacunadas durante la preñez (Lopetegui 1998, Van Metre y col 1999, Olsen, 2000).

Basándose en reportes sobre la efectividad de la proteína SOD Cu/Zn de *B. abortus* expresada en *E. coli* DH5 $\alpha$  en proteger a ratones vacunados del desafío con la cepa patogénica de *B. abortus* 2308 (Oñate y col 1999), Schurig y col desarrollaron una nueva cepa de *B. abortus* RB51, que sobreexpresa la proteína SOD Cu/Zn de *Brucella* (*B. abortus* RB51-SOD) (Vemulapalli y col 2002). La inmunidad protectora proporcionada por la cepa *B. abortus* RB51-SOD contra *Brucella* es superior a la de *B. abortus* RB51, cepa parental, sin alterar las características de atenuación de la vacuna (Vemulapalli y col 2000c).

**Vacunas subcelulares.** Se han probado distintos antígenos de *Brucella* en su capacidad de inducir respuesta inmune mediada por células. Estos antígenos forman parte de la estructura de la bacteria, como la lipoproteína de 18 kDa presente en la superficie de *Brucella* (Vemulapalli y col 2000b), la proteína periplásmica P39, la proteína bacterioferritina (Al-Mariri y col 2001b) y la proteína ribosomal L7/L12, que produce una protección equivalente a la alcanzada con la cepa 19 de *B. abortus* en ratones, con activación de células T CD4+ que secretan niveles significativos de IFN- $\gamma$  (Oliveira y col 1994, Oliveira y col 2002, Ko y Splitter 2003). Las proteínas bacterioferritina y P39 no producen niveles significativos de protección contra *Brucella*, aunque se utilicen adyuvantes como CpG en su administración (Al-Mariri y col 2001a). También se han probado proteínas de choque térmico, como las proteínas UvrA, GroEL, GroES y HtrA de *B. abortus* (Oliveira y col 1996), ya que se ha encontrado que éstas son altamente inmunogénicas en el curso de la infección con *Brucella*, estimulando tanto la inmunidad celular como la inmunidad humoral en el huésped infectado (Roop II y col 1994); sin embargo, no son capaces de estimular una respuesta inmune protectora eficiente frente a la infección con *Brucella* (Bae y col 2002). A partir del extracto de proteínas totales de *B. abortus* RB51 se purificaron dos proteínas: una de 22,9 y otra de 32,2 kDa, de las cuales sólo la proteína de 22,9 kDa demostró ser capaz de otorgar cierto grado de protección (Céspedes y col 2000). Los mejores resultados se han

obtenido con la proteína de 18,5 kDa, SOD Cu/Zn de *B. abortus*, que es capaz de inducir una respuesta celular de tipo Th1, con inducción de la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2, pero no de IL-4 (Oñate y Folch 1995) y además la capacidad de inducir una respuesta inmune protectora (Oñate y col 1999).

## **NUEVAS TENDENCIAS EN LA GENERACION DE VACUNAS PARA BRUCELLA.**

En los últimos años han surgido dos nuevas estrategias de inmunización altamente efectivas, basadas en la vacunación con moléculas de ácidos nucleicos, generándose la aparición de las vacunas de tercera generación, que son las vacunas ADN y las ARN, aplicándose este tipo de estrategia para la infección por *Brucella*.

**Vacunas ADN.** La inmunización con vectores de expresión plasmidial se basa en las expresiones in vivo de algún antígeno seleccionado, que induciría una respuesta inmune protectora, y tienen algunas de las ventajas que presenta el uso de los patógenos vivos o atenuados, pero sin el riesgo de la infección (Tang y col 1992). En principio, el método de vacunación con ácidos nucleicos se basa en el uso de un plásmido bacteriano que tiene un promotor viral fuerte capaz de expresarse en células eucariontes, un gen que codifica para un antígeno seleccionado y una secuencia de término de la transcripción o poliadenilación. El plásmido se replica en una bacteria (*E. coli*), se purifica y luego se inyecta por una vía determinada en el huésped. Las células del huésped son capaces de sintetizar, procesar y presentar el antígeno a los linfocitos, originando eventualmente una respuesta de células T y B específicas para el antígeno seleccionado. El plásmido es fabricado sin su origen de replicación funcional en células eucariontes, por lo tanto nunca se replica en una célula huésped de mamífero, ni se integra al ADN cromosomal del hospedador (Donnelly y col 1997).

**Mecanismos celulares de captura de ADN.** Un paso crucial en el desarrollo de la terapia génica por medio de la inyección de ADN desnudo, es la translocación del ADN a través de la membrana plasmática, esto es importante para determinar el mecanismo real de captura de ADN desnudo por células en tejido animal (Satkauskas y col 2001). Estudios en el sitio de inyección con

heparina, una molécula policatiónica que inhibe la captación de ADN, indican que la inhibición es dosis dependiente y compatible con la unión al receptor o al sitio de unión específico, asumiendo que el mecanismo de captación de ADN plasmidial es la endocitosis mediada por receptores (Satkauskas y col., 2001). Sin embargo, los últimos estudios en keratinocitos humanos muestran que el mecanismo de captación de ADN es a través de diferentes vías, principalmente por macropinocitosis, y se han identificado las proteínas CD44 e ICAM-1 involucradas en la unión y el tráfico de ADN (Basner-Tschakarjan y col 2004).

***Mecanismos celulares involucrados en la respuesta inmune generada por la inmunización genética.***

Algunas de las cualidades de las vacunas ADN son: expresar antígenos de proteínas nativas *in vivo* para reconocimiento de células B y presentación por moléculas MHC clase I y II para estimular células T ayudadoras, linfocitos T citotóxicos. Así, el modo preciso de estimulación inmune de las vacunas ADN se reduce a una combinación de tres mecanismos por los que las proteínas codificadas por el ADN plasmidial son presentadas y procesadas para generar respuesta inmune: a) estimulación directa por células somáticas (miocitos, keratinocitos, o cualquier célula MHC clase II negativa), b) transfección directa de células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales (Ej. células dendríticas) y c) presentación cruzada (crosspriming) en la cual el plásmido ADN transfecta una célula somática y/o CPA profesional y la proteína secretada es tomada por otra célula CPA profesional y presentada a células T (Donnelly y col 2000, Gurunathan y col 2000).

***Vacunas ADN para B. abortus.*** Se ha demostrado que vacunas ADN que contienen el gen para la proteína L7/L12 (Kurar y Splitter 1997) y lumazina sintetasa (Velikovskiy y col 2002) inducen un significativo nivel de protección contra brucelosis en el modelo ratón. Por otro lado, ratones BALB/c vacunados con un plásmido ADN que tiene el gen (*sodC*) que codifica para la proteína SOD Cu/Zn de *Brucella abortus* (pcDNA-SOD), desarrollan anticuerpos específicos contra la proteína SOD recombinante (SODr), exhibiendo una dominancia de inmunoglobulinas de tipo IgG2a sobre IgG1, lo que induce una respuesta proliferativa por parte de células T, con la producción INF- $\gamma$  pero no de IL-10 o IL-4, demostrando de esta forma que la inoculación con pcDNASOD

induce los anticuerpos adecuados y una respuesta inmune celular de tipo Th1, respuesta que es protectora frente al desafío con la cepa patógena de *Brucella* (Oñate y col 2003). Además, se ha demostrado en el modelo murino que la inmunización intraesplénica con pcDNASOD induce una eficiente respuesta inmune tipo Th1 protectora y que la producción de IFN- $\gamma$  es realizada por células T CD4+ y la inducción de actividad citotóxica, importante para la eliminación de bacterias facultativamente intracelulares como *Brucella*, es realizada por las células T CD8+ (Muñoz y col 2004).

En bovinos, actualmente el único trabajo que ha estudiado la utilización de una vacuna ADN para *Brucella* describe que la inmunización con pcDNA-SOD es capaz de estimular una respuesta inmune celular y una eficiente estimulación de células T citotóxicas, respuestas clave en la inducción de protección frente a *Brucella*. Lo que además destaca el trabajo, es la gran variabilidad de respuesta observada en el ganado bovino, lo que podría atribuirse a la constitución genética de la especie bovina con la cual se trabajó, especies que no son 100% genéticamente puras (Guzmán y col 2004).

**Vacunas ARN.** Además de los vectores plasmidiales existen otros vectores de expresión como los basados en el virus Semliki Forest (SFV). Estos vectores son partículas virales suicidas del virus Semliki Forest, cuyo genoma corresponde a un ARN desnudo autorreplicable, cuya secuencia contiene inserto el gen de interés que codifica para la proteína con capacidad inmune. Experimentos previos han demostrado la alta eficiencia de estos sistemas de expresión para expresar proteínas heterólogas en células eucariotas, así como también la capacidad para conferir excelentes niveles de protección en animales inmunizados con estos sistemas de expresión, superando incluso a las vacunas ADN (Andersson y col 2001, Fleeton y col 1999).

**Virus Semliki Forest.** El virus Semliki Forest es un Alfavirus que pertenece a la familia Togaviridae. Este virus se transmite principalmente a través de mosquitos y es capaz de infectar al ser humano causándole fiebre, artritis y encefalitis (Willems y col 1979.). El virus Semliki Forest es un virus ARN que puede infectar una gran variedad de hospedadores y se replica de manera efectiva en células en cultivo. Este virus se ha utilizado en el estudio de

la biología molecular de los virus ARN y además se ha investigado su uso como instrumento en la expresión de proteínas recombinantes (Olkonen y col 1993, Lundström y col 1994).

***Entrada del virus a la célula hospedadora.*** El virus Semliki Forest entra a la célula hospedadora por endocitosis mediada por receptores (probablemente antígenos de histocompatibilidad), que fijan la partícula viral a la membrana plasmática (Helenius y col 1978); estos receptores se concentran principalmente en invaginaciones de la membrana plasmática, recubiertas en su cara citosólica por una red de la proteína clatrina (DeTulleo y Kirchhausen 1998). En el citoplasma, la vesícula endocítica se fusiona con un endosoma, dentro del cual el pH es ácido, lo cual induce la disociación de la proteína estructural del virus E1E2, lo cual genera la formación del homotrímero E1E1E1, el que facilita la fusión de la membrana viral con el endosoma, liberándose la nucleocápside al citoplasma de la célula. Finalmente, las proteínas de la cápside liberan el genoma viral, mediante una reacción gatillada por ribosomas que se unen a algunos aminoácidos de esta proteína (residuos 94 al 106), los cuales están directamente implicados en la unión de la cápside con la molécula de ARN (Singh y Helenius 1992).

### ***Elaboración de partículas virales suicidas del virus Semliki Forest.***

A partir del virus Semliki Forest, Smerdou y Liljeström el año 1999 elaboraron una partícula viral recombinante que tiene la capacidad de infectar una célula eucariota animal y liberar su genoma en su interior. Esta partícula viral contiene en su interior un segmento de ARN mensajero, el cual puede ser traducido por la célula hospedera (Smerdou y Liljeström 1999). Para la construcción del virus se separó su genoma en tres plásmidos (pSFV4.2, pSFV-Helper-Capsid y pSFVHelper- Spike), plásmidos que son transcritos *in vitro* (transcrito ARNm), utilizándolos luego para transfectar una línea celular eucariota, obteniendo de esta forma partículas virales que son empaquetadas y liberadas al medio de cultivo. Durante el proceso de elaboración de las partículas virales *in vitro*, sólo el ARNm transcrito a partir del plásmido pSFV4.2 contiene la información necesaria para ser empaquetado al interior de la partícula viral, por ende, sólo éste ARNm formará parte del genoma viral (Smerdou y Liljeström 1999). El plásmido que codifica este transcrito contiene

un gen que codifica para la replicasa viral y un sitio de multiclonaje, en el cual se puede insertar un gen que codifique una proteína heteróloga (Frolov y col 1996). Estas características le confieren una alta bioseguridad al sistema, debido a que permiten elaborar partículas virales con un genoma incompleto, el cual no puede replicarse (partículas virales suicidas), funcionando como un simple pero eficiente vector de expresión de proteínas heterólogas (Smerdou y Liljeström 1999).

**Vacunas ARN para *B. abortus*.** Se ha evaluado en un modelo murino la inducción de respuesta inmune y protección, por un ARN recombinante que codifica la proteína SOD Cu/Zn de *B. abortus* empaquetado en el interior de partículas suicidas del virus Semliki Forest (VSF-SOD). Describiéndose que la inmunización con VSF-SOD estimula preferentemente una respuesta inmune de tipo Th1, con la inducción de proliferación de linfocitos T antígeno específica y activación de células T citotóxicas. Respuesta que fue protectora frente al desafío con una cepa patógena, indicándose su potencial uso como vacuna para *Brucella* (Oñate y col 2005).

Bandara, AB et al. en el 2009, en el Centro de Medicina Molecular y Enfermedades Infecciosas de la Facultad Regional de Virginia-Maryland de Medicina Veterinaria, Instituto Politécnico de Virginia y Universidad Estatal de Washington, en su experimento investigan la posibilidad de expresar un antígeno homólogo y un antígeno heterólogo de forma simultánea en una cepa atenuada de *Brucella melitensis*. El gen que codifica una *Brucella wboA* manosiltransferasa implicadas en la biosíntesis del lipopolisacárido antígeno O, y *Bacillus anthracis* la *pag* gen que codifica el antígeno protector (PA) se clonaron en el plásmido pBBR4MCS. El plásmido resultante se introdujo en el antígeno O deficientes de *B. melitensis* cepa WRRP1 para producir WRSPA. Colar WRSPA producido O-antígeno y una serie de productos PA, la protección inducida en ratones Balb / c frente al desafío con la cepa *B. melitensis* 16M, se dio pero no protegió a los ratones j frente al desafío con *B. anthracis* cepa Sterne. *Clin Vaccine Immunol.* 2009 Apr;16(4):535-40. Epub 2009 Jan 28.

Rajasekaran, P, et al., del. Departamento de Ciencias Biomédicas y Patobiología y el Centro de Medicina Molecular y Enfermedades Infecciosas de la Facultad Regional de Virginia-Maryland de la medicina veterinaria, Blacksburg, EE.UU. en el 2009, en su artículo. *Brucella abortus* strain RB51 leucine auxotroph as an environmentally safe vaccine for plasmid maintenance and antigen overexpression. (*Brucella abortus* cepa RB51 auxotroph leucina como una vacuna seguro en medio ambiente para el mantenimiento del plásmido y la sobreexpresión del antígeno). Inducen una respuesta para evitar la propagación de potenciar un marcador de resistencia a los antibióticos, un plásmido que expresa un gen leuB y un antígeno heterólogo, la proteína verde fluorescente (GFP), se demostró que un complemento de leucina auxotroph de ganado cepa de la vacuna *Brucella abortus* RB51, protegía a los ratones CD1 de cepas virulentas de *B. abortus* 2308 y produjo anticuerpos GFP. Proteína verde fluorescente. *Vet Microbiol.* 2009 Feb 2; 133(4):387-93. Resultados y la respuesta inmune después de la infección de *Brucella abortus* en ratones adultos jóvenes y ancianos.

Alto, KP, et al., de la Sección de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Medicina Interna, Wake Forest Escuela Universitaria de Medicina, Winston Salem, EE.UU. en 2007, publican y dan a conocer en su artículo, Outcome and immune responses after *Brucella abortus* infection in young adult and aged mice. (*Consecuencia y la respuesta inmune después de la infección de Brucella abortus* en ratones adultos jóvenes y ancianos). Que el envejecimiento en los resultados de una disminución general de la inmunidad y mayor susceptibilidad a muchos patógenos intracelulares. Sin embargo, en algunos casos, el envejecimiento va acompañado de las respuestas inmunitarias alternativa que puede ser igual, o incluso más eficaces que los de los adultos jóvenes. *Brucella* spp. es una bacteria intracelular e importantes patógenos humanos y animales, pero no hay datos sobre el efecto de la edad en la defensa del huésped en la brucelosis. Jóvenes o viejos ratones adultos (DBA / 2 o BALB / c) estaban infectados con una cepa atenuada o bien *B. abortus* que la sobre-expresó la superóxido dismutasa *Brucella* (cepa RB51-SOD) o una cepa virulenta plenamente (cepa 2308). Survival, la carga organismo en el bazo, y las respuestas inmunitarias fueron evaluados. Todos

los adultos jóvenes y los ratones viejos sobrevivieron la infección con RB51-SOD (hasta  $6 \times 10^8$  ufc) o la cepa 2308 (hasta  $8 \times 10^8$  ufc). Los ratones viejos tuvieron una carga inferior en el bazo que los ratones adultos jóvenes de cinco o más semanas después de la infección. La respuesta a anticuerpos y de citoquinas Th1 fueron centrados en ratones adultos jóvenes, pero Th mixto en ratones más viejos, incluidas las pruebas de la nueva definición de la respuesta Th17 subtipo inmunológico. La inmunización con la cepa RB51-SOD brindó protección contra la cepa desafío en 2308 los jóvenes y los ancianos BALB / c, pero sólo los ratones adultos jóvenes DBA / 2. Por lo tanto, los resultados clínicos de la infección por Brucella en animales viejos, son iguales o superiores a las de los ratones adultos jóvenes; la respuesta inmune en ratones más viejos son menos-Th1 específicas que existen formas alternativas puede contribuir a la defensa del huésped frente a Brucella en ratones de edad avanzada. *Biogerontology*. 2007 Oct; 8(5):583-93.

## CONCLUSIONES

1. Brucelosis es una zoonosis que no ha podido ser erradicada en la gran mayoría de los países, a pesar de la aplicación de agresivos programas de vacunación con vacunas basadas en bacterias vivas atenuadas.
2. Debido al potencial epidémico de *Brucella* y la eficiencia de la infección por aerosoles, este patógeno es considerado un agente potencial que puede ser utilizado como arma biológica liberado en bombas o a la forma de aerosoles secos.
3. La citotoxicidad es crucial en la erradicación de bacterias intracelulares. Linfocitos T CD8+ pueden actuar como células efectoras y eliminar células infectadas con *Brucella* directamente lisándolas, por esto es fundamental determinar la especificidad de clones de linfocitos TCD8+útiles en la protección frente a *Brucella*.
4. Algunas proteínas purificadas de *Brucella* ofrecen buenos niveles de protección individualmente; posiblemente una vacuna compuesta por varias subunidades de proteínas antigénicas de *Brucella* proporcionaría una protección superior.
5. La reciente generación de vacunas genéticas basadas en ácidos nucleicos ADN y ARN ofrecerían nuevas oportunidades de llegar a controlar las infecciones intracelulares.

## Referencias

- Abdoel TH, Smits HL. Rapid latex agglutination test for the serodiagnosis of human brucellosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57:123-8.
- Allardet-Servent A, Bourg G, Ramuz M, Pages M, Bellis M, Roizes G. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *J Bacteriol* 1988;170: 4603-7.
- Al-Mofada SM, Al-Eissa YA, Saeed ES, Kambal AM. Isolation of *Brucella melitensis* from human milk. *J Infect* 1993; 26:346-8.
- Almuneef M, Memish ZA. Persistence of *Brucella* antibodies after successful treatment of acute brucellosis in an area of endemicity. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2313.
- Almuneef M, Memish ZA. Prevalence of *Brucella* antibodies after acute brucellosis. *J Chemother* 2003; 15:148-51.
- Almuneef MA, Memish ZA, Balkhy HH, Alotaibi B, Algoda S, Abbas M, et al. Importance of screening household members of acute brucellosis cases in endemic areas. *Epidemiol Infect* 2004; 132:533-40.
- Al-Shamahy HA, Wright SG. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Brucella* antigen detection in human sera. *J Med Microbiol* 1998; 47 :169-72.
- Amato Gauci AJ. The return of brucellosis. *Maltese Med J* 1995; 7:7-8.
- Andres Morist A, Burzako Sanchez A, Montero Gato V, Franco Vicario R. *Brucella* endocarditis: Two cases with medical treatment and successful outcome. *Med Clin (Barc)* 2003; 120 :477 (Article in Spanish).
- Araj GF. Enzyme-linked immunosorbent assay, not agglutination, is the test of choice for the diagnosis of neurobrucellosis. *Clin Infect Dis* 1997; 25 :942.
- Ariza J, Gudiol F, Pallares R, Rufi G, Fernandez-Viladrich P. Comparative trial of rifampin-doxycycline versus tetracycline-streptomycin in the therapy of human brucellosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28: 548-51.
- Arlett PR. A case of laboratory acquired brucellosis. *BMJ* 1996;313:1130-2. [Erratum in: *BMJ* 1997; 314:134].
- Arroyo Carrera I, Lopez Rodriguez MJ, Sapina AM, Lopez Lafuente A, Sacristan AR. Probable transmission of brucellosis by breast milk. *J Trop Pediatr* 2006; 52:380-1.
- Bachrach G, Banai M, Bardenstein S, Hoida G, Genizi A, Bercovier H. *Brucella* ribosomal protein L7/L12 is a major component in the antigenicity of brucellin INRA for delayed -type hypersensitivity in *Brucella* -sensitized guineapigs. *Infect Immun* 1994; 62:5361-6.

Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg* 1992;95:271-5.

Bannatyne RM, Jackson MC, Memish Z. Rapid diagnosis of *Brucella* bacteremia by using the BACTEC 9240 system. *J Clin Microbiol* 1997; 35 : 2673-4.

Bandara AB, Poff-Reichow SA, Nikolich M, Hoover DL, Sriranganathan N, Schurig GG, Dobrean V, Boyle SM. *Clin Vaccine Immunol*. 2009 Apr;16(4):535-40.

Barbuddhe SB, Kumar P, Malika SV, Singh DK, Gupta LK. Seropositivity for intracellular bacterial infections among abattoir associated personnels. *J Commun Dis* 2000; 32:295-9.

Barroso Garcia P, Rodriguez-Contreras Pelayo R, Gil Extremera B, Maldonado Martin A, Guijarro Huertas G, Martin Salguero A, et al. Study of 1,595 brucellosis cases in the Almeria province (1972-1998) based on epidemiological data from disease reporting. *Rev Clin Esp* 2002; 202:577-82..

Bingol A, Togay-Isikay C. Neurobrucellosis as an exceptional cause of transient ischemic attacks. *Eur J Neurol* 2006; 13:544-8.

Bodur H, Balaban N, Aksaray S, Yetener V, Akinci E, Colpan A, et al. Biotypes and antimicrobial susceptibilities of *Brucella* isolates. *Scand J Infect Dis* 2003; 35:337-8.

Boschioli ML, Foulongne V, O'Callaghan D. Brucellosis: A worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol* 2001;4 58-64.

Bosilkovski M, Krteva L, Caparoska S, Dimzova M. Hip arthritis in brucellosis: A study of 33 cases in the Republic of Macedonia (FYROM). *Int J Clin Pract* 2004; 58 :1023-7.

Buchanan TM, Faber LC, Feldman RA. Brucellosis in the United States, 1960-1972. An abattoir-associated disease. Part I. Clinical features and therapy. *Medicine (Baltimore)* 1974; 53:403-13.

Buchanan TM, Faber LC. 2-mercaptoethanol *Brucella* agglutination test: Usefulness for predicting recovery from brucellosis. *J Clin Microbiol* 1980;11 :691-3.

Busch LA, Parker RL. Brucellosis in the United States. *J Infect Dis* 1972;125 :289-94.

Caksen H, Arslan S, Oner AF, Cesur Y, Ceylan A, Atas B, et al. Childhood brucellosis is still a severe problem in the eastern region of Turkey. *Trop Doct* 2002; 32:91-2.

Canning PC, Roth JA, Deyoe BL. Release of 5'-guanosine monophosphate and adenine by *Brucella abortus* and their role in the intracellular survival of the bacteria. *J Infect Dis* 1986; 154:464-70.

Caron E, Peyrard T, Kohler S, Cabane S, Liautard JP, Dornand J. Live *Brucella* spp. fail to induce tumor necrosis factor alpha excretion upon infection of U937-derived phagocytes. *Infect Immun* 1994; 62:5267-74.

Casao MA, Smits HL, Navarro E, Solera J. Clinical utility of a dipstick assay in patients with brucellosis: Correlation with the period of evolution of the disease. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9:301-5.

Cellier MF, Teyssier J, Nicolas M, Liautard JP, Marti J, Sri Widada J. Cloning and characterization of the *Brucella ovis* heat shock protein DnaK functionally expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1992;174:8036-42.

Chadda VS, Soni PK, Gupta A, Gupta BK, Chadda S, Nayak KC. Incidence of brucellosis in arthritis and chronic low back pain in high risk group. *J Assoc Physicians India* 2004; 52:338.

Chauhan RS. Brucellosis in India and its impact on export of buffalo meat. *Indian J Ani Prod* 1999;31:316-7.

Ciftci E, Ince E, Dogru U. Pyrexia of unknown origin in children: A review of 102 patients from Turkey. *Ann Trop Paediatr* 2003; 23:259-63.

Cisneros JM, Pachon J, Cuello JA, Martinez A. *Brucella* endocarditis cured by medical treatment. *J Infect Dis* 1989; 160:907.

Cloekaert A, Verger JM, Grayon M, Grepinet O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology* 1995;141:2111-21.

Cloekaert A, Vizcaino N, Paquet JY, Bowden RA, Elzer PH. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: Past, present and future. *Vet Microbiol* 2002; 90:229-47.

Colmenero JD, Reguera JM, Martos F, Sanchez-De-Mora D, Delgado M, Causse M, et al. Complications associated with *Brucella melitensis* infection: A study of 530 cases. *Medicine (Baltimore)* 1996; 75:195-211. [Erratum, in: *Medicine (Baltimore)* 1997; 76:139.].

Corbel MJ. Brucellosis: An overview. *Emerg Infect Dis* 1997; 3 :213-21.

Corbel MJ. The immunogenic activity of ribosomal fractions derived from *Brucella abortus*. *J Hyg (Lond)* 1976;76:65-74.

Dames S, Tonnerre C, Saint S, Jones SR. Clinical problem solving. Don't know much about history. *N Engl J Med* 2005; 352:2338-42.

De Ley J, Mannheim W, Segers P, Lievens A. Ribosomal ribonucleic acid cistron similarities and taxonomic neighborhood of *Brucella* and CDC Group Vd. *Int J Syst Bacteriol* 1987;37:35-42.

DeLVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, et al. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:443-8.

Dokuzoguz B, Ergonul O, Baykam N, Esener H, Kilic S, Celikbas A, et al. Characteristics of *B. melitensis* versus *B. abortus* bacteraemias. *J Infect* 2005; 50 :41-5.

Dubray G. Protective antigens in brucellosis. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1987;138:84-7.

Eckman MR. Brucellosis linked to Mexican cheese. *JAMA* 1975; 232: 636-7.

Ficht TA, Bearden SW, Sowa BA, Adams LG. DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 1989;57:3281-91.

Ficht TA, Hussein HS, Derr J, Bearden SW. Species-specific sequences at the *omp2* locus of *Brucella* type strains. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46:329-31.

Gazapo E, Gonzalez Lahoz J, Subiza JL, Baquero M, Gil J, de la Concha EG. Changes in IgM and IgG antibody concentrations in brucellosis over time: Importance for diagnosis and follow-up. *J Infect Dis* 1989; 159:219-25.

Gee JE, De BK, Levett PN, Whitney AM, Novak RT, Popovic T. Use of 16S r RNA gene sequencing for rapid confirmatory identification of *Brucella* isolates. *J Clin Microbiol* 2004; 42:3649-54.

Georghiou PR, Young EJ. Prolonged incubation in brucellosis. *Lancet* 1991; 337 :1543.

Giannacopoulos I, Eliopoulou MI, Ziambaras T, Papanastasiou DA. Transplacentally transmitted congenital brucellosis due to *Brucella abortus*. *J Infect* 2002; 45:209-10.

Glass WI. Brucellosis as an occupational disease in New Zealand. *N Z Med J* 1964; 63:301-8.

Goldbaum FA, Leoni J, Wallach JC, Fossati CA. Characterization of an 18-kilodalton *Brucella* cytoplasmic protein which appears to be a serological marker of active infection of both human and bovine brucellosis. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2141-5.

Gotuzzo E, Carrillo C, Guerra J, Llosa L. An evaluation of diagnostic methods for brucellosis the value of bone marrow culture. *J Infect Dis* 1986; 153:122-5.

Grammont-Cupillard M, Berthet-Badetti L, Dellamonica P. Brucellosis from sniffing bacteriological cultures. *Lancet* 1996; 348:1733-4.

Hall WH. Modern chemotherapy for brucellosis in humans. *Rev Infect Dis* 1990; 12:1060-99.

Handa R, Singh S, Singh N, Wali JP. Brucellosis in north India: Results of a prospective study. *J Commun Dis* 1998;30:85-7.

Hasanjani Roushan MR, Mohrez M, Smailnejad Gangi SM, Soleimani Amiri MJ, Hajiahmadi M. Epidemiological features and clinical manifestations in 469 adult patients with brucellosis in Babol, Northern Iran. *Epidemiol Infect* 2004; 132:1109-14.

Hemashettar BM, Patil CS. Brucellosis among practicing veterinarians. *Indian J Med Microbiol* 1991;9:45-7.

High KP, Prasad R, Marion CR, Schurig GG, Boyle SM, Sriranganathan N. Outcome and immune responses after *Brucella abortus* infection in young adult and aged mice. *Biogerontology*. 2007 Oct;8(5):583-93.

Iseri S, Bulut C, Yetkin MA, Kinikli S, Demiroz AP, Tulek N. Comparison of the diagnostic value of blood and bone marrow cultures in brucellosis. *Mikrobiyol Bul* 2006; 40:201-6.

Jubier-Maurin V, Boigegrain RA, Cloeckaert A, Gross A, Alvarez-Martinez MT, Terraza A, et al. Major outer membrane protein Omp25 of *Brucella suis* is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of human macrophages. *Infect Immun* 2001;69: 4823-30.

Jumas-Bilak E, Maugard C, Michaux-Charachon S, Allardet-Servent A, Perrin A, O'Callaghan D, et al. Study of the organization of the genomes of *Escherichia coli*, *Brucella melitensis* and *Agrobacterium tumefaciens* by insertion of a unique restriction site. *Microbiology* 1995;141: 2425-32.

Kadri SM, Rukhsana A, Laharwal MA, Tanvir M. Seroprevalence of brucellosis in Kashmir (India) among patients with pyrexia of unknown origin. *J Indian Med Assoc* 2000; 98:170-1.

Karabay O, Sencan I, Kayas D, Sahin I. Ofloxacin plus rifampicin versus doxycycline plus rifampicin in the treatment of brucellosis: A randomized clinical trial [ISRCTN11871179]. *BMC Infect Dis* 2004; 4:18.

Karimi A, Alborzi A, Rasooli M, Kadivar MR, Nateghian AR. Prevalence of antibody to *Brucella* species in butchers, slaughterers and others. *East Mediterr Health J* 2003; 9:178-84.

Khan MY, Mah MW, Memish ZA. Brucellosis in pregnant women. *Clin Infect Dis* 2001; 32:1172-7.

- Kiel FW, Khan MY. Analysis of 506 consecutive positive serologic tests for brucellosis in Saudi Arabia. *J Clin Microbiol* 1987; 25:1384-7.
- Kocak I, Dundar M, Culhaci N, Unsal A. Relapse of brucellosis simulating testis tumor. *Int J Urol* 2004; 11:683-5.
- Lopez Merino A. Brucellosis in Latin America. Young EJ, Corbel MJ, editors. *Brucellosis: Clinical and laboratory aspects*. CRC Press Inc: Boca Raton; 1989. p. 151-61.
- Lucero NE, Escobar GI, Ayala SM, Silva Paulo P, Nielsen K. Fluorescence polarization assay for diagnosis of human brucellosis. *J Med Microbiol* 2003;52:883-7.
- Lulu AR, Araj GF, Khateeb MI, Mustafa MY, Yusuf AR, Fenech FF. Human brucellosis in Kuwait: A prospective study of 400 cases. *Q J Med* 1988; 66:39-54.
- Madkour MM. Epidemiologic aspects. In: Madkour MM, editor. *Madkour's brucellosis*. Springer: New York; 2001. p. 21-32.
- Magill GB, Killough JH, Said SI. Cortisone and combined antibiotic therapy of acute brucellosis melitensis. *Am J Med* 1954; 16:810-7.
- Malik GM. A clinical study of brucellosis in adults in the Asir region of southern Saudi Arabia. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56:375-7.
- Mantur BG, Akki AS, Mangalgi SS, Patil SV, Gobbur RH, Peerapur BV. Childhood brucellosis - a microbiological, epidemiological and clinical study. *J Trop Pediatr* 2004; 50:153-7. [PUBMED] [FULLTEXT]
- Mantur BG, Biradar MS, Bidri RC, Mulimani MS, Veerappa, Kariholu P, et al. Protean clinical manifestations and diagnostic challenges of human brucellosis in adults: 16 years' experience in an endemic area. *J Med Microbiol* 2006;55:897-903.
- Mantur BG, Mangalgi SS. Evaluation of conventional Castaneda and lysis centrifugation blood culture techniques for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42:4327-8.
- Mantur BG, Mulimani MS, Mangalgi SS, Patil AV. Brucellar epididymo-orchitis-report of five cases. *Indian J Med Microbiol* 2001; 19:208-11.
- Mantur BG. Prevalence of brucellosis in north Karnataka: A serological and cultural study. MD. Thesis submitted to Karnataka University, Dharwad; 1988.
- Mathur TN. *Brucella* strains isolated from cows, buffaloes, goats, sheep and human beings at Karnal: Their significance with regard to the epidemiology of brucellosis. *Indian J Med Res* 1964; 52:1231-40.

- McLean DR, Russell N, Khan MY. Neurobrucellosis: Clinical and therapeutic features. *Clin Infect Dis* 1992; 15:582-90.
- Michaux S, Paillisson J, Carles-Nurit MJ, Bourg G, Allardet-Servent A, Ramuz M. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *J Bacteriol* 1993; 175:701-5.
- Moreno S, Arijia J, Espinosa FJ, Podzaczner D, Miro JM, Rivero A, et al. Brucellosis in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17:319-26.
- Mousa AR, Muhtaseb SA, Almudallal DS, Khodeir SM, Marafie AA. Osteoarticular complications of brucellosis: A study of 169 cases. *Rev Infect Dis* 1987; 9:531-43.
- Navarro E, Casao MA, Solera J. Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4:115-23.
- Naparstek E, Block CS, Slavin S. Transmission of brucellosis by bone marrow transplantation. *Lancet* 1982; 1:574-5.
- Navarro E, Escribano J, Fernandez J, Solera J. Comparison of three different PCR methods for detection of *Brucella* spp in human blood samples. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 34:147-51.
- Navarro-Martinez A, Solera J, Corredoira J, Beato JL, Martinez-Alfaro E, Atienzar M, et al. Epididymo-orchitis due to *Brucella melitensis*: A retrospective study of 59 patients. *Clin Infect Dis* 2001; 33:2017-22.
- Nicoletti P. Control, eradication and prevention. In: Madkour MM, editor. *Madkour's brucellosis*. Springer: New York; 2001. p. 280-5.
- Noviello S, Gallo R, Kelly M, Limberger RJ, De Angelis K, Cain L, et al. Laboratory-acquired brucellosis. *Emerg Infect Dis* 2004; 10:1848-50.
- Oliveira S, Splitter GA. Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. *Vaccine* 1996; 14:959-62.
- Orduna A, Almaraz A, Prado A, Gutierrez MP, Garcia-Pascual A, Duenas A, et al. Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38 :4000-5.
- Ozbay K, Inanmis RA. Successful treatment of brucellosis in a twin pregnancy. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2006; 33:61-2.
- Ozkurt Z, Erol S, Tasyaran MA, Kaya A. Detection of *Brucella melitensis* by the Bact/Alert automated system and *Brucella* broth culture. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8:749-52.

Palanduz A, Palanduz S, Guler K, Guler N. Brucellosis in a mother and her young infant: Probable transmission by breast milk. *Int J Infect Dis* 2000; 4:55-6.

Panjarathinam R, Jhala CI. Brucellosis in Gujarat state. *Indian J Pathol Microbiol* 1986; 29: 53-60.

Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E. Brucellosis. *N Engl J Med* 2005; 352 :2325-36.

Pappas G, Bosilkovski M, Akritidis N, Mastora M, Krteva L, Tsianos E. Brucellosis and the respiratory system. *Clin Infect Dis* 2003; 37 :e95-9.

Pappas G, Christou L, Akritidis N, Tsianos EV. Quinolones for brucellosis: Treating old diseases with new drugs. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12 :823-5.

Paton NI, Teu NW, Vu CF, Teo TP. Brucellosis due to blood transfusion. *Clin Infect Dis* 2001; 32:1248.

Paul J, Gilks C, Batchelor B, Ojoo J, Amir M, Selkon JB. Serological responses to brucellosis in HIV- seropositive patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89:228-30.

Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD, et al. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:13148-53.

Pedro-Botet J, Coll J, Auguet T, Rubies-Prat J. Brucellosis and HIV infection: A casual association? *AIDS* 1992; 6:1039-40.

Perry MB, Bundle DR. Lipopolysaccharide antigens and carbohydrates of *Brucella*. In: Adams LG, editor. *Advances in brucellosis research*. Austin, Texas A and M University; 1990. p. 76-88.

Pizarro-Cerda J, Moreno E, Sanguedolce V, Mege JL, Gorvel JP. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect Immun* 1998; 66:2387-92.

Probert WS, Schrader KN, Khuong NY, Bystrom SL, Graves MH. Real-time multiplex PCR assay for detection of *Brucella* spp, *B. abortus* and *B. melitensis*. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1290-3.

Queipo-Ortuno MI, Colmenero JD, Munoz N, Baeza G, Clavijo E, Morata P. Rapid diagnosis of *Brucella* epididymo-orchitis by real time polymerase chain reaction assay in urine samples. *J Urol* 2006; 176:2290-3.

Rajasekaran P, Seleem MN, Contreras A, Purwantini E, Schurig GG, Sriranganathan N, Boyle SMI. *Brucella abortus* strain RB51 leucine auxotroph

as an environmentally safe vaccine for plasmid maintenance and antigen overexpression. *App Environ Microbiol.* 2008 Nov; 74(22):7051-5.

Radolf JD. Southwestern Internal Medicine Conference: Brucellosis: Don't let it get your goat!. *Am J Med Sci* 1994; 307:64-75.

Randhawa AS, Kalra DS, Kapur MP. Some sero-epidemiologic observations on brucellosis in humans and animals. *Indian J Med Sci* 1974; 28:133-8.

Redkar R, Rose S, Bricker B, DelVecchio V. Real-time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Mol Cell Probes* 2001; 15 :43-52.

Reguera JM, Alarcon A, Miralles F, Pachon J, Juarez C, Colmenero JD. *Brucella endocarditis: Clinical, diagnostic and therapeutic approach.* *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22 :647-50.

Renukaradhya GJ, Isloor S, Rajasekhar M. Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in India. *Vet Microbiol* 2002; 90:183-95.

Rigby CE, Fraser AD. Plasmid transfer and plasmid-mediated genetic exchange in *Brucella abortus*. *Can J Vet Res* 1989; 53:326-30.

Rijpens NP, Jannes G, Van Asbroeck M, Rossau R, Herman LM. Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62 :1683-8.

Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez-Goni I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33:615-7.

Ruiz-Mesa JD, Sanchez-Gonzalez J, Reguera JM, Martin L, Lopez-Palmero S, Colmenero JD. Rose Bengal test: Diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11 :221-5.

Sanchez DO, Zandomeni RO, Cravero S, Verdun RE, Pierrou E, Faccio P, et al. Gene discovery through genomic sequencing of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 2001;69:865-8.

Sangari FJ, Garcia-Lobo JM, Aguero J. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiol Lett* 1994;121:337-42.

Sangari FJ, Seoane A, Rodriguez MC, Aguero J, Garcia Lobo JM. Characterization of the urease operon of *Brucella abortus* and assessment of its role in virulence of the bacterium. *Infect Immun* 2007; 75 :774-80.

Sehgal S, Bhatia R. Zoonoses in India. *J Commun Dis* 1990; 22 :227-35.

- Sen MR, Shukla BN, Goyal RK. Seroprevalence of brucellosis in and around Varanasi. *J Commun Dis* 2002; 34:226-7.
- Shakir RA, Al-Din AS, Araj GF, Lulu AR, Mousa AR, Saadah MA. Clinical categories of neurobrucellosis: A report on 19 cases. *Brain* 1987; 110 :213-23.
- Shehabi A, Shakir K, el-Khateeb M, Qubain H, Fararjeh N, Shamat AR. Diagnosis and treatment of 106 cases of human brucellosis. *J Infect* 1990;20 :5-10.
- Smits HL, Abdoel TH, Solera J, Clavijo E, Diaz R. Immunochromatographic Brucella-specific immunoglobulin M and G lateral flow assays for rapid serodiagnosis of human brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10:1141-6.
- Smits HL, Kadri SM. Brucellosis in India: A deceptive infectious disease. *Indian J Med Res* 2005; 122 :375-84.
- Solera J, Martinez-Alfaro E, Espinosa A, Castillejos ML, Geijo P, Rodriguez-Zapata M. Multivariate model for predicting relapse in human brucellosis. *J Infect* 1998; 36 :85-92.
- Solera J, Martinez-Alfaro E, Espinosa A. Recognition and optimum treatment of brucellosis. *Drugs* 1997; 53 :245-56.
- Thakur SD, Thapliyal DC. Seroprevalence of brucellosis in man. *J Commun Dis* 2002; 34:106-9.
- Tsolia M, Drakonaki S, Messaritaki A, Farmakakis T, Kostaki M, Tsapra H, et al. Clinical features, complications and treatment outcome of childhood brucellosis in central Greece. *J Infect* 2002; 44 :257-62.
- WHO. The development of new improved brucellosis vaccine. Joint FAO/WHO expert committee. 1997; WHO/EMC/ ZD1/98.14.
- Williams E. Brucellosis and the British public. *Lancet* 1970;1:1220-2.
- Wise RI. Brucellosis in the United States. Past, present and future. *JAMA* 1980; 244 : 2318-22.
- Yagupsky P, Baron EJ. Laboratory exposures to Brucellae and implications for bioterrorism. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:1180-5.
- Young EJ. Brucellosis: Clinical and laboratory aspects. In: Corbel MJ, editor. CRC Press Inc: Florida, USA; 1989.
- Young EJ. Clinical manifestations of human brucellosis. In: Young EJ, Corbel MJ, editors. Brucellosis: Clinical and laboratory aspects. CRC press: Boca Raton (FL); 1989. p. 97-126.
- Young EJ. Human brucellosis. *Rev Infect Dis* 1983; 5 :821-42.

Young EJ. Serologic diagnosis of human brucellosis: Analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. *Rev Infect Dis* 1991; 13:359-72.

Zhan Y, Kelso A, Cheers C. Differential activation of Brucella reactive CD4 + T cells by Brucella infection or immunization with antigenic extracts. *Infect Immun* 1995 ; 63:969-75.