

Inmunobiología de la infección por *Brucella spp*: Fundamentos para una estrategia vacunal.

Omar A. Saldarriaga¹, MV,MS y María T. Rugeles¹, Bact, MS, Ph.D.

¹Grupo de Inmunovirología- BIOGENESIS, Facultad de Medicina,
Universidad de Antioquía, A.A. 1226, Medellín, Colombia*.
mtruigel@catios.udea.edu.co

(Recibido: 13 julio, 2001; aceptado: 31 mayo, 2002)

Resumen

Las especies de Brucella causan enfermedades en animales domésticos y salvajes incluyendo bovinos, ovinos, caprinos, suinos, caninos. Esta bacteria representa un serio problema económico para la ganadería mundial; en Colombia por ejemplo, se calculan pérdidas anuales por 28 mil millones de pesos representados en la incapacidad de incursionar en los mercados internacionales, los trastornos reproductivos y los abortos que sufren los animales infectados. Además, esta bacteria representa un gran peligro para la salud pública ya que produce una enfermedad zoonótica. Aunque varios modelos para el control han sido llevados a cabo, como los sacrificios de los animales infectados y los tratamientos con antimicrobianos, varios países en el mundo como Colombia han mantenido un programa de vacunación como estrategia de control. La cepa 19 de B. abortus, viva atenuada, es la vacuna más utilizada actualmente e induce una amplia protección en varios modelos animales. Sin embargo, su similitud antigénica con cepas de campo impide la discriminación entre animales vacunados e infectados naturalmente. Para obviar estos inconvenientes se han diseñado varias vacunas utilizando diferentes estrategias, entre ellas la delección de genes que codifican proteínas inmunodominantes de la B. abortus, que no afectan la respuesta inmune protectora como, vacunas de polisacáridos, vacunas de ácidos nucleicos y la expresión de proteínas foráneas en las cepas vacunales. La cepa rugosa RB51, carente de LPS, hasta el momento una de las cepas utilizadas con más éxito ya que no induce respuesta humoral, por lo que no interfiere con el diagnóstico de la infección por las cepas de campo. Además, esta cepa ofrece gran seguridad en los animales vacunados e induce una inmunidad esencialmente celular, donde las citoquinas producidas por los linfocitos, han mostrado ser de gran importancia en la resistencia a la infección por esta bacteria.

Palabras Clave: *Brucelosis, respuesta Inmune, vacunas.*

Introducción

La brucelosis es una de las mayores enfermedades zoonóticas, ampliamente distribuidas en humanos y animales, especialmente en países en vía de desarrollo. Las especies de *Brucella*, entre ellas *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. suis*, y *B. neotomae* infectan una gran variedad de especies animales domésticas y salvajes, como el ganado bovino caprino y

ovino; los caninos, los suinos y los roedores, respectivamente (16). El agente causal de la brucelosis bovina, la *B. abortus*, es un patógeno intracelular facultativo capaz de sobrevivir dentro de fagocitos, particularmente dentro del macrófago (23). En bovinos, esta bacteria induce una infección crónica que frecuentemente resulta en aborto, infertilidad, disminución en la producción de leche; generando de esta manera grandes pérdidas económicas para la ganadería mundial.

* Dirección para solicitar reimpresos

Ya que las especies de *Brucella* han sido identificadas casi desde un siglo atrás, se han diseñado varios métodos para la eliminación de hatos bovinos infectados, los cuales son inadecuados; por ejemplo, la infección puede ser eliminada sacrificando el hospedero lo cual resulta bastante costoso. Otra opción sería la terapia antibiótica la cual con frecuencia no es efectiva debido a las recaídas de la infección después del tratamiento. Los antibióticos encapsulados en liposomas, aunque son más efectivos, también resultan muy costosos. El uso de bacteriófagos (virus que infectan bacterias), como el WB1 ha mostrado ser contraproducente, ya que en vez de eliminar la bacteria en ratones infectados, aumenta su virulencia (3). De esta manera, para el control de la infección por brucelosis bovina especialmente en países con alta población ganadera y con alta frecuencia de la infección se han sugerido medidas preventivas como la vacunación.

Algunas de las características ideales de una vacuna contra *Brucella* son (39):

- No debe inducir anticuerpos que interfieran con el serodiagnóstico de la infección de campo.
- No debe producir enfermedad ni infección persistente en los animales inmunizados; además no debería ser patogénica para los humanos.
- Una dosis vacunal debe inducir una protección a largo término contra infecciones uterinas, sistémicas y prevenir el aborto. La vacuna no debería causar aborto si se administra a animales preñados.
- Debe ser estable y no producir reversiones virulentas *in vivo* o *in vitro*.
- Debe tener un bajo costo de producción.
- Además, la vacuna no debería contaminar la carne ni productos lácteos y debe ser estable biológicamente, es decir, libre de reversión *in vitro* e *in vivo*. Según la OMS (32), una vacuna viva ideal debería tener marcadores fenotípicos o genéticos específicos que permitieran diferenciar las cepas vacunales de las cepas de campo.

Epidemiología

El riesgo de transmisión de estos microorganismos esta determinado por el número de abortos que ocurren, la presencia y sobrevivencia de la bacteria en los tejidos infectados y la exposición de un hospedero susceptible. Aunque la brucelosis es una enfermedad que se puede

transmitir sexualmente, la principal ruta de infección es a través de la ingestión de leche contaminada, no pasteurizada. La transmisión también ocurre cuando un animal susceptible tiene contacto directo con fetos abortados, membranas placentarias, fluidos uterinos o descargas vaginales derivadas de animales infectados. La brucelosis bovina, causada por la *B. abortus*, fue erradicada del Canadá, Japón, norte de Europa y Australia. Aunque entre 1993 y 1998 se ha aumentado el número de animales libres de la enfermedad en toda América (87.616.295), entre 1994 y 1998 se reportaron 249.077 casos. América del sur, que cuenta con el 64% de la población ganadera del continente, es la región con mayor número de animales seropositivos (179.525).

Aunque las *B. suis* y la *B. canis* pueden infectar al humano, la *B. melitensis* y la *B. abortus* representan unas de las fuentes más importantes de brucelosis humana. Esta enfermedad ha sido ampliamente relacionada con la ocupación; de esta manera, los trabajadores de alto riesgo como los veterinarios y los ordeñadores se infectan principalmente por el contacto con secreciones vaginales, animales parturientos y leches contaminadas. Además, esta enfermedad representa un gran riesgo para la salud pública ya que el consumo de leches no pasteurizadas o subproductos lácteos, como quesos y mantequillas contaminadas pueden ser fuente de infección (11). En humanos, también se han reportado casos de infección por inoculación accidental con cepas vacunales (2). Entre 1994 y 1998, 29.132 casos de brucelosis en humanos fueron registrados en América. Las especies de *Brucella* de mayor importancia, pueden causar infecciones en personal de laboratorio que tengan un contacto directo con este patógeno; la diseminación de la infección persona a persona es poco frecuente. La *B. ovis* y la *B. neotomae* no afectan al humano (8).

Inmunidad

La *Brucella* está clasificada como un cocobacilo Gram negativo, que mide aproximadamente de 0.6 a 1.5 μm de longitud x 0.5 a 0.7 μm de diámetro (8), posee una envoltura celular conformada por una membrana externa compuesta por lipopolisacáridos (LPS) (47), proteínas y fosfolípidos; un espacio periplásmico que contiene peptidoglicanos y una membrana citoplasmática. Dentro del grupo de proteínas más estudiadas como antígenos se encuentran las proteínas de membrana externa tipo II

(OMP2), que actúan como porinas (26) y otras proteínas como la superóxido dismutasa SOD Cu/Zn, la cual actúa como antioxidante; ambas prometen ser inmunógenos importantes que protegen contra la *Brucella* patógena (33). Además, se han clonado genes de *Brucella* que codifican otras proteínas inmunodominantes en bovinos (37).

El estudio de la inmunidad protectora contra la infección inducida por las especies de *Brucella* han sido realizadas en diferentes modelos animales mamíferos como los ratones (42), cobayos (25), bovinos (18) y humanos (30, 6). El criterio utilizado para medir la protección de animales inmunizados con diferentes cepas virulentas, es el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de la bacteria, recuperadas de algunos órganos como el bazo (42).

La célula blanco de la infección es el macrófago. De la interacción entre los patógenos y el macrófago depende en gran parte la patogénesis de la infección. Los macrófagos son células fagocíticas, presentadoras de antígenos (CPA) y tienen gran capacidad de modular el sistema inmune, ya que secretan una amplia variedad de citoquinas (23). Durante el desarrollo de la inmunidad innata se ha visto que la degranulación de gránulos primarios y secundarios de polimorfonucleares es inhibida por esta bacteria (35).

El LPS es el primer antígeno frente al cual aparecen anticuerpos (48,19) de tipo Ig M e IgG, postinfecciosos y postvacunales (cepa 19). Los anticuerpos pueden opsonizar cepas lisas e inmunopotenciar la infección de las células fagocíticas (20). También se ha demostrado la producción de anticuerpos contra proteínas de membrana; si bien es cierto que la respuesta humoral contra estas proteínas no es tan fuerte como la observada contra los LPS es muy relevante para el diagnóstico cuando se utilicen cepas vacunales rugosas (40).

Ya que esta bacteria es capaz de replicarse en el medio ambiente intracelular se asume que una respuesta inmune celular es de vital importancia para eliminar o proteger el huésped de la infección por este microorganismo. Los linfocitos T, juegan el papel más importante en el control y la resolución de esta infección (29). La producción rápida de IL-12 durante la infección con *B. abortus*, también es de vital importancia para activar las células Th1 productoras de interferón gamma (IFN γ) y de esta manera

contribuir a la inducción de la resistencia celular adquirida (53, 50). De igual manera el factor de necrosis tumoral (TNF α) producido durante la infección intracelular, participa en el desarrollo de la resistencia a la *B. abortus*, probablemente mediante una acción directa sobre las células efectoras, y no mediada por el interferón, ya que la delección de esta citoquina no causa una disminución en la producción de IFN γ (54).

Se ha propuesto la hipótesis que las células TCD8+ antibrucella, pueden inhibir la producción de IL-10 (30), citoquina que está involucrada en la regulación negativa de la respuesta inmune protectora, inhibiendo el patrón Th1 (producción de IFN γ) o bloqueando las citoquinas inducidas por la activación del macrófago (17,15).

Ya que los linfocitos T derivados de diferentes hospederos como humanos, ratones y bovinos proliferan, mostrando un perfil de citoquinas Th1, de manera análoga en respuesta a la infección por *Brucella* (30), las vacunas deberían preferencialmente inducir un patrón Th1 para generar una óptima resistencia contra la infección inducida por esta bacteria. La inducción de una respuesta TH2 parece ser contraproducente para el control de la infección causada por estas bacterias.

Cepas vacunales utilizadas convencionalmente en animales

Inicialmente con la intención de desarrollar métodos eficaces de inmunización se utilizaron cepas vivas aisladas en el campo, las cuales permitían una infección permanente y cepas muertas con poca capacidad inmunogénica.

Cepas vacunales lisas

Cepa 19

Derivación. Aislada de leche derivada de una hembra infectada.

Seguridad, inmunogenecidad y eficacia. Esta cepa ha mostrado ser efectiva contra la la infección por *B. abortus* en ganado (27) Sin embargo, la vacunación con esta cepa 19 tiene una gran desventaja; existe similitud antigénica de la cepa 19 con las cepas de campo, por ejemplo en el antígeno lipopolisacárido (LPS), lo cual impide la discriminación entre animales vacunados e infectados naturalmente. Además esta cepa vacunal es relativamente virulenta

ya que puede inducir aborto e infecciones persistentes en algunos de los animales vacunados (51). Por lo anterior se ha optado por disminuir la dosis (52). En la actualidad, en la mayoría de los países los programas de inmunización se basan en el uso de la vacuna cepa 19 de acuerdo al grado de protección que confiere, la cual puede durar hasta 5 gestaciones.

Cepa REV-1

Derivación. Esta cepa fue aislada de una placenta de un aborto de una oveja.

Seguridad, inmunogenicidad y eficacia. La vacuna viva de *B. melitensis* Rev-1 ha sido considerada como la mejor vacuna disponible para la profilaxis de la infección por *B. melitensis* en pequeños rumiantes como cabras y ovejas (14). Cuando la erradicación es el objetivo final de los programas de control, la vacunación conjuntival de los animales de reemplazo es ideal para la profilaxis de la infección, ya que la inmunidad conferida es similar a la inducida por la vacunación subcutánea estándar (1×10^9 UFC), pero la respuesta serológica se disminuye significativamente (32). En sitios donde la infección con *B. melitensis* en cabras y ovejas es ampliamente diseminada, los bovinos pueden también infectarse con estas especies de bacterias, de esta manera, Rev 1 ha sido evaluada para la vacunación de ganado donde se ha mostrado que esta cepa vacunal induce inmunidad al reto con *B. melitensis* igual o superior a la inmunidad inducida por *B. abortus* cepa 19. A pesar de estos resultados el uso de *B. melitensis* Rev1 ha sido muy limitado en ganadería ya que esta vacuna puede causar abortos en animales preñados y puede ser patógena para humanos; además, induce la producción de anticuerpos específicos contra el LPS los cuales dificultan el serodiagnóstico de la infección natural (28). Para este problema es importante tener en cuenta que la vacunación conjuntival (1×10^8 UFC) es más segura que la vacunación subcutánea pero al aplicarse debe tenerse en cuenta el estado de preñez, ya que a los 55 días de preñez, se presentan más abortos y hay mayor eliminación de la cepa vacunal que a los 120 días. Alternativamente se recomienda vacuna en los períodos de cría o durante la lactación para la prevención de los abortos (3).

Cepa S2

Derivación. Para la brucelosis porcina también se han diseñado varias vacunas las cuales han mostrado ser capaces de inducir algún grado de

resistencia. La cepa lisa, viva atenuada de *B. suis*, Cepa S2, diseñada por los chinos mediante pasaje seriado de la cepa *B. suis* biovar 1, de origen suino, ha sido ampliamente usada en ese país para la inmunización de ovejas y cabras (en agua de bebida) (49).

Seguridad, inmunogenicidad y eficacia. Esta cepa es estable y su virulencia es semejante a la *B. abortus* Cepa 19. Esta cepa protege los cerdos contra el reto conjuntival pero no contra la infección inducida por el cruce con un macho infectado que excreta la *B. suis* en su semen (49, 1). Aunque esta cepa S2 protege satisfactoriamente el ganado (27), su eficacia contra la infección experimental realizada con *B. ovis* en carneros fue inferior a la observada con la vacuna *B. melitensis* REV1 (2).

Cepas Vacunales Rugosas

Cepa RB51

Derivación. Con el fin de cumplir las características ideales para la vacuna contra la Brucella, el Dr. G. Schurig del Virginia Tech, USA, empezó la búsqueda de una mutante de *B. abortus*, principalmente una mutante que tuviera una deficiencia en la cadena- O (ósea una cepa rugosa), con el fin de evitar la seroconversión y además una cepa que sobreviviera pocas semanas después de la inoculación, lo que podría permitir la inducción de una inmunidad amplia y protectora mediada por células. Una mutante natural denominada RB51, desprovista de cadenas – O (rugosa), atenuada y estable fue obtenida por pasaje de la cepa virulenta 2308 de *B. abortus* (38).

Seguridad, inmunogenicidad y Eficacia. Esta cepa puede utilizarse como una vacuna viva atenuada, como lo han indicado estudio en ratones, bovinos y cobayos, en donde la bacteria es eliminada en un período de tiempo relativamente corto sin mostrar un efecto significativo sobre la preñez (21, 40, 25). Esta cepa vacunal puede aplicarse múltiples veces y a cualquier edad utilizando diferentes rutas de administración (39). Varios estudios han demostrado que independientemente de la ruta de inoculación, no se presenta respuesta de anticuerpos a antígenos de superficie (40) y por lo tanto no interfiere con el diagnóstico de la infección natural. Se ha demostrado que esta cepa vacunal protege ratones infectados con cepas virulentas de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. ovis* (21). Después de la vacunación oral se observó persistencia de la bacteria en los nódulos linfoides

parotídeos y no fue detectable en el bazo durante 12 semanas post-infección, lo que sugiere una baja invasividad cuando es administrada por esta vía (42).

En ganado vacunado subcutáneamente con la cepa RB51 se ha observado que la bacteria coloniza y estimula la respuesta inmune en los ganglios linfáticos (40). La vacunación oral aunque es efectiva para inducir protección contra la infección con la cepa virulenta 2308, la inmunidad protectora es menor y menos persistente que la inducida por la vacunación intraperitoneal quizás por la baja producción de IFN- γ en respuesta a la cepa 2308. Ambas vías de inoculación inducen similar producción del TNF- α (42).

En los cobayos vacunados con esta cepa no se detecta la infección en hembras preñadas, ni en útero ni en el feto; además, no se transmite a animales centinelas (25). La respuesta inmune humoral y celular ha sido estudiada en esta especie, después de inmunizar con antígenos proteicos derivados de la membrana externa de la *B. abortus* cepa RB51, como lo es la OMPII la cual confiere igual capacidad de protección con respecto a las cepas vacunales RB51 y cepa 19 donde no se detectó replicación bacteriana en el bazo después del reto. Además, el uso combinado de la OMPII acoplada con cBSA (albumina sérica bovina), mantiene la capacidad protectora y además, potencia la producción de anticuerpos apoyando la capacidad de utilizarlas como vacunas (46).

Se ha establecido que la inmunidad conferida en bovinos por esta cepa vacunal es esencialmente mediada por células, en un ensayo linfoproliferativo utilizando antígenos derivados de la *B. abortus* 2308 y RB51 (41,18). Esta capacidad protectora puede ser debida a la activación primaria de una población de linfocitos T ayudadores encargada de antagonizar la subpoblación Th2, responsable de inducción de la respuesta inmune humoral.

La vacunación de cerdos con esta cepa ha protegido eficientemente al reto con *B. suis* bajo condiciones de campo (24).

Hasta el momento más de 5 millones de terneros han sido vacunados subcutáneamente con la dosis recomendada ($1-3.4 \times 10^{10}$ UFC), sin mostrar efectos adversos. Estos animales deberían ser vacunados a partir de los cuatro meses. Las hembras preñadas

pueden ser vacunadas con 10^9 UFC sin el riesgo de sufrir aborto o placentitis (32). Algunos estudios demuestran que la cepa vacunal no ha sido aislada de las secreciones vaginales ni de la leche derivados de animales vacunados (34), aunque en terneros vacunados se ha observado una reacción positiva en piel después del reto al antígeno donde se ha evidenciado un gran infiltrado mononuclear (18). La investigación de varias inoculaciones accidentales con esta cepa vacunal, sugieren que la cepa no es patogénica para humanos y por esta razón podría servir como una cepa viva vacunal.

La cepa RB51 ha sido aprobada para su uso como vacuna oficial en los estados unidos, reemplazando la cepa 19; además, su uso ha sido implementado en otros países como México, Chile, Colombia, Venezuela y Argentina; y puede ser diferenciada de aislamientos de campo de *B. abortus* por medio de técnicas moleculares como electroforesis de campo pulsado y PCR.

Cepa M111.

Derivación. La cepa M111, desarrollada en china en los años 80's para usar como vacuna viva, fue obtenida de una cepa lisa de *B. melitensis*, mediante la selección de colonias no aglutinantes. Esta cepa conserva las mismas características bioquímicas y de cultivo de la cepa *B. melitensis* biotipo -1, pero es rugosa.

Seguridad, inmunogenecidad y eficacia. Esta cepa es menos virulenta que la *B. suis* S2, no produce reversión, no produce lesiones ni en cabras ni ovejas y no induce abortos en hembras preñadas. Además, produce una inmunidad efectiva contra el reto con *B. melitensis* en cobayos, ovejas y cabras. En cabras y ovejas esta cepa indujo una eficacia protectora del 78% y 84% respectivamente. Esta vacuna puede ser aplicada vía parenteral y oral. En el norte de china esta cepa redujo los porcentajes de aborto desde un 50% a 0% en un período de dos años. Ya que esta cepa no induce producción de anticuerpos que interfieran con las pruebas serológicas convencionales puede ser utilizada para el control de la brucelosis (32).

Cepa 45/20

Derivación, inmunogenecidad, seguridad y eficacia. La cepa *B. abortus* 45/20 es una cepa rugosa con poca habilidad para inducir anticuerpos anti antígeno O del LPS. Esta cepa fue originalmente desarrollada

como una vacuna viva, pero fue abandonada por su tendencia para revertir hacia la virulencia. Luego fue utilizada como una vacuna muerta con adyuvante oleoso y mostró ser efectiva.

Cepa 19 Vs RB-51

Se ha demostrado que después de la vacunación de ratones con la cepa 19, la cepa RB51 y el antígeno O del LPS y un posterior reto con la cepa virulenta 2308 de *B. abortus* el nivel de colonización de esta cepa virulenta en los hígados de estos ratones es menor en los vacunados con la cepa 19. La vacuna viva atenuada expresa un mayor grado de constituyentes celulares desencadenando así una respuesta protectora tanto de tipo celular como humoral. El mayor recuento de bacterias encontrado cuando se vacunó con la RB51 puede ser atribuido a la carencia de la cadena O, el cual se ha postulado como un homopolímero inductor de anticuerpos que en el ratón cumpliría un papel protector, aunque este no sea el caso para los biungulados en donde el papel protector sería prácticamente nulo (36).

La preñez en bovinos representa un estado de alta vulnerabilidad a la infección con la *B. abortus*. Se ha demostrado que las hormonas de una vaca en estado de gravidez aumentan el crecimiento de la *B. abortus*. Aunque la infección por la bacteria pueda diseminarse al feto, los anticuerpos protectores maternos no cruzan la barrera placentaria. De esta manera durante la vacunación en bovinos preñados, el feto sería incapaz de defenderse por sí mismo contra una cepa vacunal aunque su madre tenga la capacidad de hacerlo. Aunque las vacas preñadas vacunadas con la cepa 19 seroconvirtieron, se ha demostrado que esta cepa vacunal puede causar aborto. Por el contrario, las hembras preñadas vacunadas con RB51 y sus terneros no seroconvirtieron no presentaron abortos ni causaron infección persistente (51), como también ha sido demostrado en otros estudios vacunando animales adultos, en donde además se ha demostrado que la revacunación no cambia el estado serológico convencional indicando que múltiples vacunaciones con la cepa RB51 de adultos normales o hembras preñadas puede ser llevado a cabo, aumentando la inmunidad sin afectar el resultado serológico (34); aunque estos resultados no son concluyentes ya que se necesitan estudios que tengan una muestra más representativa de la población, se genera conocimiento que debería ser considerado en las estrategias de vacunación de una población.

Estrategias utilizadas para el mejoramiento de la cepa vacunal

Dadas las limitaciones en el uso de estas cepas vacunales, particularmente, la interferencia con el diagnóstico, se han diseñado diferentes estrategias para la búsqueda de nuevas vacunas que cumplan los estándares requeridos. Una de las alternativas propuestas para inducir una respuesta inmune que permita discriminar entre animales vacunados de los infectados naturalmente, es la expresión de proteínas foráneas en la *B. abortus* cepa 19, de tal forma que la vacuna lleve una señal inmunológica que la haga distinguible. Una de estas proteínas utilizadas como reportera, es un antígeno repetitivo de *T. cruzi*, el cual fue transportado eficientemente al espacio periplásmico de la *Brucella* cepa 19 transfectada. Esta preparación fue inmunogénica en el curso de una infección experimental y no alteró la respuesta serológica contra el antígeno inmunodominante de la *Brucella*, de tal forma que sería posible expresar epítopes protectores contra otros patógenos del ganado en la cepa vacunal (7). La eliminación de proteínas como la Superóxido Dismutasa SOD Cu/Zn en la cepa 19 de *B. abortus*, confiere inmunidad protectora, contra la *B. abortus* en ganado, similar a la inducida por la cepa parental (10). Esta misma proteína, que hace parte del sistema antioxidante de la *B. abortus*, promete ser un importante inmunógeno ya que induce una respuesta inmune celular contra la *Brucella* patógena (33). Además, se ha demostrado que la expresión de los genes que codifican para esta proteína en virus de vaccinia recombinante puede estimular la respuesta inmune humoral en ratones Balb/c (45).

Debido a que las vacunas vivas atenuadas pueden estar asociadas con otros problemas tales como la posibilidad de reversión a una forma virulenta, diseminación natural por contacto y labilidad y que las vacunas muertas aunque son más seguras y más estables que las vacunas vivas atenuadas requieren de administraciones repetidas con alta concentración de antígeno para generar niveles protectores de inmunidad se han generado nuevas metodologías. Por ejemplo, se ha utilizado la ingeniería genética para realizar la eliminación de genes inmunodominantes en las infecciones por *Brucella* como lo es el gen P39 (44). Este gen codifica para una proteína denominada Brucelina, derivada de una cepa rugosa de *B. melitensis* B115, la cual ha sido utilizada en forma pura en vacas para pruebas de hipersensibilidad retardada (DTH) y

para inducir una respuesta proliferativa de células T utilizadas para la identificación de ganado infectado (12). Cepas de ratones vacunadas con las cepas vacunales parentales 19 y Rev1 y con estas mismas cepas pero mutadas para P39 fueron protegidas contra el reto con la cepa virulenta de *B. abortus* 544. Además, las cepas mutadas no indujeron una respuesta inmune a la P39 por lo que se propone el uso de la P39 como un antígeno para diferenciar animales vacunados de los infectados naturalmente (44).

De igual manera, la cepa mutada de *B. abortus* M-1, cepa incapaz de expresar una proteína periplásmica de 26 KDa, la cual es detectada en pruebas inmunoenzimáticas utilizando suero derivado de animales infectados y vacunados con la cepa 19, protegió ratones contra el reto con la cepa virulenta 2308 de *B. abortus*, sugiriendo que la ausencia de la BP26 no afecta la inducción de respuesta inmune protectora ejercida por la cepa 19 vacunal. Además, la invasión bacteriana y el crecimiento o replicación de las bacterias en el bazo es similar al obtenido con la cepa 19 indicando que esta cepa mutada es atenuada. La gran ventaja de utilizar esta cepa M-1 mutada como cepa vacunal es que el suero derivado de animales vacunados con esta cepa puede ser diferenciado de los animales infectados debido a la ausencia de anticuerpos contra la BP26 (4,5).

Se han construido varias cepas rugosas como la *B. abortus* VTRA1, *B. melitensis* VTRM1 y *B. suis* VTRS1 eliminando el gen *rfaU*, el cual codifica para la mannosyl transferasa, enzima necesaria para el ensamblaje de la cadena O de la Brucella. Aunque las cepas VTRM1 y VTRS1 mostraron una menor virulencia que las cepas parentales después de ser inoculadas en ratones, no fueron tan atenuadas como la cepa RB51 indicando que este gen *rfaU* está involucrado en virulencia y que otros genes, probablemente no involucrados en la síntesis de los componentes del LPS, juegan un papel importante en la atenuación (32). Estas mismas cepas rugosas inducen una inmunidad efectiva en el modelo murino contra la infección producida por *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. ovis*. En varias ocasiones esta protección fue superior a la inducida por la cepa RB51 probablemente, porque estas se replican más eficientemente y permanecen durante más tiempo en el hospedero que la cepa RB51. Estas características pueden inducir una fuerte respuesta inmune celular sin que haya producción de anticuerpos contra el antígeno O del LPS.

La cepa Δ purE201 de *B. melitensis* construida por recombinación homóloga tiene eliminado el operón (purEK) que codifica dos enzimas que intervienen en la vía de síntesis de purinas de novo. Esta mutación inhibe la capacidad de la *B. melitensis* para crecer en monocitos humanos (13). Se ha demostrado respuesta linfoproliferativa de ovejas infectadas con esta cepa mutada y con la cepa silvestre (31), lo que sugiere que antígenos proteicos pueden ser conservados entre las especies de Brucella; de aquí, que se haya demostrado que la vacuna RB51 en el modelo murino induce una significativa protección contra el reto con la cepa *B. melitensis* 16 M(4). La cepa 16M Δ purEK también ha protegido exitosamente ratones contra el reto con *B. melitensis* en donde se ha demostrado la producción de anticuerpos.

Usando la metodología de vacunas de ácidos nucleicos se diseñó una vacuna contra la brucelosis utilizando el vector pcDNA3 donde se clonó el gen L7/L12 que codifica una proteína ribosomal inmunodominante de la *B. abortus*. La inyección intramuscular de este vector resulta en la expresión intracelular de esta proteína, facilitándose una presentación de antígeno directa al sistema inmune y estableciéndose una respuesta de células T y de anticuerpos específicos que protegen significativamente contra la cepa 2308 virulenta de *B. abortus*, demostrando la eficacia de este sistema (22).

La *B. ovis*, a diferencia de las cepas lisas de *B. abortus*, no contiene el antígeno O del LPS, por lo tanto las proteínas de membrana externa son más accesibles a los anticuerpos. De esta manera la proteína de membrana externa recombinante OMP31, la cual ha protegido ratones contra la infección por *B. ovis*, podría ser utilizada como una posible vacuna (32).

La *Brucella abortus* inactivada, también indujo altos niveles de expresión de las moléculas coestimuladoras B7.1, B7.2 y de la molécula de adhesión intercelular -1 (ICAM-1), de tal forma que esta bacteria puede aumentar las interacciones de las células presentadoras de antígeno (CPA) con las células T, sugiriendo el potencial uso de esta cepa inactivada como una vacuna que favorece una amplia respuesta inmune celular (50).

La respuesta inmune celular y humoral puede ser aumentada por la adición de adyuvantes apropiados. En el modelo murino se ha demostrado que la

respuesta inmune celular aumenta cuando se inmuniza con antígenos de brucella mezclados con liposomas. De esta manera, se ha demostrado que el grupo monofosforil del lípido A puede regular la respuesta inmune celular hacia un patrón Th1, cuando se vacunan ratones con LPS derivados de *B. abortus* (43).

Conclusiones

Ya que los linfocitos T derivados de diferentes hospederos como humanos, ratones y bovinos proliferan mostrando un perfil de citoquinas Th1, de manera análoga en respuesta a la infección por *Brucella* (30), las vacunas deberían preferencialmente inducir un patrón Th1 para generar una óptima resistencia contra la infección inducida por esta bacteria. Hasta ahora las vacunas vivas han mostrado ser superiores a las vacunas inactivadas en prevenir la brucelosis en animales, pues ellas son más eficaces, de bajo costo e inducen una inmunidad más persistente. Aunque la cepa 19 y la REV-1 confieren protección contra *B. abortus* en ganado y *B. melitensis* en ovejas y cabras respectivamente, es claro que ambas vacunas

tienen la desventaja de inducir aborto, inducir anticuerpos que interfieren con el diagnóstico y son patógenas para humanos. La capacidad de las cepas rugosas (M111, RB51, 45/20, rfbK) para inducir protección contra cepas virulentas en varios modelos animales, indica que estos organismos pueden ser utilizados para inducir una respuesta inmune protectora, evitando de esta manera los problemas de diagnóstico encontrados cuando se utilizan cepas lisas (S2, Cepa 19, Rev-1). La *B. abortus* cepa 19 y la cepa RB51, vacunas actualmente utilizadas para la profilaxis de la *B. abortus* en ganado y la cepa vacunal REV-1 utilizada para el control de la brucelosis en pequeños rumiantes, deberían seguir siendo consideradas como vacuna de elección, al menos hasta que nuevas vacunas de *B. abortus* y *B. melitensis* sean evaluadas como eficaces. Adicionalmente, se sugiere que el clonaje de genes que codifiquen proteínas inmunológicamente activas y la identificación de antígenos protectores, podrían servir para el diseño de una nueva generación de vacunas efectivas y seguras para el uso en animales y humanos.

Summary

Immunobiology of infection by Brucella spp: Fundamental principles for a vaccine strategy.

The species of Brucella cause illnesses in wild and domestic animals such bovine, ovine, caprine, suin, canine and also in humans. This worldwide distributed bacterium represents a great danger for public health due to the zoonotic potencial and to the economic impact. In Colombia, annual losses are calculated in 28 thousand million pesos represented in the restrictions for participating in the international markets, in abortions and, other the reproductive dysfunctions induced by these bacterias. Although several models for the control have been ported such as the slaughter of infected animals and the treatments with antimicrobials, several countries in the world, like Colombia, have maintained a vaccination program as the axis of a strategy. The live attenuated strain 19 of B. abortus is the most used vaccine at the moment and it induces a hight protection. However, the antigenic similarity of the vaccine strain with wild strains make it impossible to discriminate between vaccinees and naturally infected animals. To obviate these inconveniences new vaccines have been designed using different strategies: deletion of genes that code immunodominant proteins of B. abortus, polysaccharides vaccines, nucleic acid vaccines and the expression of foreign protein in the vaccine strain. At the moment the rough strain RB51, lacking LPS, is one of the most used vaccines since it induces a protective responses but does not interfere with the diagnosis of the infection induced by the wild strain. This strain also offers great safety in the vaccinated animals and induces a essentially cellular immunity, in which the citokines produced by lymphocytes have shown to be of great importance in resistance infection.

Key words: brucelosis, immune response, vaccines

Referencias

1. Alton GG. Porcine Brucellosis as a World problem. En : Networking in Brucellosis research. The United Nations University Press, 1991.
2. Blasco JM, Marin C, Jimenez de Bagues MP, and Barberan M. Efficacy of *Brucella suis* strain 2 vaccine against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*. 1993a; 11:1291-94.
3. Blasco JM. A Review of the use of *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine in adults sheep and goats. *Preventive Veterinary Medicine*. 1997; 31:275-283.

4. Boschirolini LM, Cravero SL, Arese AI, Campos E, and Rossetti OL. Construcción y caracterización de una mutante de *B. abortus* por inactivación de un gen codifica una proteína de 26 Kda. Arch. Med. Vet. XXVII, No. Extraordinario, 1995.
5. Boschirolini LM, Cravero SL, Arese AI, Campos E, and Rossetti OL. Protection against infection in mice vaccinated with a *Brucella abortus* mutant. Infect. Immun. 1997; 65: 798-800
6. Caron E, Gross A, Liautard JP, and Dornand J. *Brucella* species release a specific, protease sensitive, inhibitor of TNF α expression, active on human macrophage-like cells. The Journal of Immunology. 1996; 2885-93.
7. Comerci DJ, Pollevick GD, Vigliocco AM, Frasch AC, and Ugalde R. Vector development for the expression of foreign proteins in the vaccine strain *Brucella abortus* S19. Infection and Immunity. 1998; 66(8): 3862-3866.
8. Corbel JM, and Brinley-Morgan WJ. Genus *Brucella*. In Krieg NR. and Holt JG. eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1976; 1:377-388.
9. Cherwonogrodzky JW. Therapies for bovine brucellosis. Arch. Med. Vet. XXVII, No. Extraordinario. Chile, 1995.
10. Cheville NF, Stevens MG, Jensen AE, Tatum FM, and Halling SM. Immune response and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *B. abortus*. Am J Vet Res. 1993; 54:1591-1597.
11. Chomel BB, De Bess EE, and Mangiamale DM. Changing trends in the epidemiology of human brucellosis in California from 1973 to 1992: a shift toward foodborne transmission. J. Infect. Dis. 1994; 170:1216-23.
12. Denoel PA, Vo TK, Tibor A., Weynants VE, Trunde JM, Dubray G, Limet JN, and Letesson JJ. Characterization, occurrence, and molecular cloning of a 39 Kilodalton *Brucella abortus* cytoplasmic protein immunodominant in cattle. Infect. Immun. 1997; 65: 495-502.
13. Drazek ES, Houg HS, Crawford RM, Hadfield TL, Hooveer DL, and Warren RL. Deletion of *purE* attenuates *Brucella melitensis* 16M for growth in human monocyte-derived macrophages. Infect. Immun. 1995; 63:3297-3301.
14. Elberg S. Rev-1 *Brucella Melitensis* vaccine. Part III. 1981-1995. Veterinary Bulletin. 1996; 66: 1193-1200.
15. Fernandes DM, and Baldwin CL. Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. Infection and Immunity. 1995; 63(3):1130-1133.
16. Ficht TA, Bearden SW, Sowa BA, and Marquis H. Genetic variation at the *omp2* porin locus of the brucellae: species-specific markers. Molecular Microbiology 1990; 4(7): 1135-1142.
17. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, and O-Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cell. Journal of Immunology. 1991; 146:3444-3451.
18. Folch H, Rojas X, Oñate A, Alonso O, Leyan V, and Jara U. Humoral and cellular response in calves vaccinated with *Brucella abortus* RB51. Arch. Med. Vet. XXVII, No. Extraordinario, 1995
19. Gallego MI, Mariño OC, García-Carrillo C. Interpretación del diagnóstico serológico en brucelosis bovina. Acovez. 1993.
20. Hoffmann EM, and Houle JJ. Failure of *Brucella abortus* lipopolysaccharide (LPS) to activate the alternative pathway of complement, Vet Immunol Immunopathol. 1983; 5(1):65-76.
21. Jiménez de Bagues MP, Elzher PH, Jones SM, Blasco JM, Enright FM, Schurig GG, and Winter AJ. Vaccination with *Brucella abortus* rough mutant RB51 protects BALB/c mice against virulent strains of *B. abortus*, *B. Melitensis* y *B. ovis*. Infect. Immun. 1994; 62: 4990-4996.
22. Kurar E, and Splitter GA. Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicits immune response. Vaccine. 1997; 15: 1851-1857.
23. Liautard JP, Gross A, Dornand J, and Kohler S. Interactions between professional phagocytes and *Brucella* spp. Microbiologia SEM 12. 1996; 197-206.
24. Lord VR, Cherwonogrodzky JW, Schurig GG, Lord RD, Marcano LJ and Melendez GE. Venezuelan field trials of vaccines against brucellosis in swine. Am. J. Vet. Res. 1998; 59(5):546-551.
25. Mariño OC, Gallego IM, Rueda E, Sedano L and Schurig G. Evaluation of a potential vaccine: *Brucella abortus* RB51 susceptibility and protection in guinea pigs. In: Networking in Brucellosis Research II: Proceedings of the UNU/BIOLAC Brucellosis Workshop. The United Nations University Press, Tokyo, Japan, 1998.
26. Marquist H, and Ficht TA. The *OMP2* gene locus of *Brucella abortus* encodes two homologous outer membrane proteins with properties characteristic of bacterial porins. Infection and Immunity. 1993; 61(9): 3785-3790.
27. Nicoletti P. Vaccination against *Brucella*. Advances in Biotechnology processes. 1990a; 13 :147-68.
28. Nicoletti P. Vaccination. In: Nielsen IK and Duncan JR (eds). Animal Brucellosis. CRC press, Inc., BocaRaton, Fla., 1990b; 283-299
29. Oliveira SC, And Splitter GA. CD8+ type 1 CD44^{hi}CD45Rb^{lo} T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II deficient mice. European Journal of Immunology. 1996; 25: 2551-57.
30. Oliveira SC, Harms JS, Rech EL, Rodarte RS, Bocca AL, Goes AM, and Splitter GA. The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 1998; 31:77-84.
31. Olsen SC, Cheville NF, Stevens MG, Houg HH, Drazek ES, Hadfield TL, Warren RL, and Hoover DL. Linfocyte

- linfoproliferative responses of goats vaccinated with *Brucella melitensis* 16M or a DpurE201 strain. *Infect. Immun.* 1997; 65: 2987-2991.
32. OMS. The development of new/improved brucellosis vaccines: report of WHO meeting. Geneva, Switzerland. 11-12 Dec. 1997.
 33. Oñate A, and Folch H. Proteína de 18.5 KDa: un antígeno interesante en *Brucella*. En: *Arch. Med. Vet.* XXVII, No extraordinario, 1995.
 34. Poester FP, Ramos ET, Gomes MP, Chiminazzo C, and Schurig GG. The serological response of adult cattle after vaccination with *Brucella abortus* strain 19 and RB51. In *Networking in Brucellosis Research II: Proceedings of the UNU/BIOLAC Brucellosis Workshop*. The United Nations University Press, Tokyo, Japan, 1998.
 35. Riley LK, and Robertson DC. Ingestion and intracellular survival of *Brucella abortus* in human and bovine polymorphonuclear leukocytes. *Infect. And Immun.* 1984; 46: 224-230.
 36. Rojas X, Alonso O, and Jorquera A. Respuesta inmune humoral y protectora en ratones inmunizados con *Brucella abortus* cepa 19, RB51 y cadena O. In *Networking in Brucellosis Research II: Proceedings of the UNU/BIOLAC Brucellosis Workshop*. The United Nations University Press, Tokyo, Japan, 1998.
 37. Rossetti OL, Rosi SG, Oszlak PA, Rosemblyt N, and Cravero SL. Cloning of *Brucella* genes coding for proteins immunologically active in cows. In: *Networking in Brucellosis research*. The United Nations University Press, 1991
 38. Schurig GG, Roop RM, Bagchi T, Boyle S, Buhrman D, and Sriranganathan N. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *B. abortus*. *Veterinary Microbiology.* 1991; 28:171-188.
 39. Schurig G, Boyle S, and Sriranganathan N. *Brucella abortus* vaccine strain RB51: a brief review. *Arch. Med. Vet.* XXVII, No. Extraordinario, 1995.
 40. Stevens MG, and Steven CO. Antibody responses to *Brucella abortus* 2308 in cattle vaccinated with *B. abortus* RB51. *Infection and Immunity.* 1996b; 64(3):1030-1034.
 41. Stevens MG, Olsen SC, and Pugh GW. Lymphocyte proliferation in response to *Brucella abortus* RB51 and 2308-proteins in RB51-vaccinated or 2308 cattle infected. *Infect. Immun.* 1996c; 64: 1007-1010.
 42. Stevens MG, Olsen SC, Palmer MV, and Pugh G. Immune response and resistance to brucellosis in mice vaccinated orally with *Brucella abortus* RB51. *Infection and Immunity.* 1996a; 64: 4534-4541.
 43. Tabatabai LB. Pugh GW, Stevens MG, Phillips M, and Mac Donald TJ. Monophosphoryl lipid A- induced immune enhancement of *B. abortus* salt extractable protein and lipopolisaccharide vaccines in BALB/c mice. *American Journal Veterinary Research.* 1992; 53:1900-1907
 44. Tibor A, Jacques I, Guilloteau L, Verguer JM, Grayon M, Wansard V, and Letesson JJ. Effect of P39 gene deletion in live *Brucella* vaccine strains on residual virulence and protective activity in mice. *Infect. Immun.* 1998; 66: 5561-5564.
 45. Toth TE, Cobb JA, Boyle SM, Roop MP, and Schurig GG. Selective humoral immune response of Balb/C mice to *Brucella abortus* proteins expressed by vaccinia virus recombinants. *Veterinary Microbiology.* 1995; 45:171-183.
 46. Villamil M, Rueda E, Gallego I, Mariño OC, and Gutiérrez A. Respuesta inmune humoral y celular en cobayos inmunizados con proteínas de membrana externa de *Brucella abortus* cepa RB51. En: *Arch. Med. Vet.* XXVII, No extraordinario, 1995.
 47. Walker S.T. *Microbiology*. Philadelphia, USA, 1998.
 48. Winter AJ, Duncan JR, Santisteban CG, Douglas JT, and Adams LG. Capacity of passively administered antibody to prevent establishment of *Brucella abortus* infection in mice. *Infect. Immun.* 1989; 57: 3438-3444.
 49. Xie Xin. Orally administrable brucellosis vaccine: *Brucella suis* strain 2 vaccine. *Vaccine.* 1986; 4: 212-216.
 50. Zaitseva M, Golding H, Manischewitz J, Webb D, and Golding B. *Brucella abortus* as a potential vaccine candidate: induction of interleukin-12 secretion and enhanced B7.1 and B7.2 and intercellular adhesion molecule 1 surface expression in elutriated human monocytes stimulated by heat-inactivated *B. abortus*. *Infection and Immunity.* 1996; 64: 3109-3117.
 51. Zambrano AJ. Villava FM, Schurig GG, And Cherwonogrodzky JW. Preliminary results for the vaccination of pregnant cattle with *Brucella abortus* strain 19 or *B. abortus* RB51. *Arch. Med. Vet.* XXVII, No. Extraordinario, 1995.
 52. Zambrano JA, Chiriguayo B, Villalva FM, And Loo KA. Eficacia de dosis reducidas en la vacunación de adultos de hatos vacunos infectados con brucelosis. In: *Networking in Brucellosis research*. The United Nations University Press, 1991
 53. Zhan Y, and Cheers CH. Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infection and Immunity.* 1995; 63(4):1387-1390.
 54. Zhan Y, Liu Z, and Cheers CH. Tumor necrosis factor alpha and Interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. *Infection and Immunity.* 1996; 64(7): 2782-86.