

Brucelosis: Inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica) - Brucellosis: Immunity and vaccination (a review).



Estein, Silvia Marcela. Médico Veterinario. Laboratorio de Inmunología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Pinto 399. Tandil (7000). Buenos Aires. Argentina.
Email: silmares@vet.unicen.edu.ar

Resumen

En esta revisión se describe la estructura antigénica de *Brucella* y los mecanismos inmunitarios que activa este patógeno, dos puntos críticos para el desarrollo de nuevas vacunas. Se analizan los diferentes tipos de vacunas convencionales y de nueva generación

empleadas a campo y a nivel experimental y se discute acerca de las ventajas que acarrearía el empleo de estas nuevas alternativas.

Palabras clave: Brucelosis. Inmunidad. Vacunas convencionales. Nuevas vacunas.

Summary

This review describes the antigenic structure of *Brucella* and the immune mechanisms elicited in response to this pathogen. These issues are critical in the development of new vaccines against brucellosis. Moreover, this work analyzes

conventional and new generation vaccines employed in field and laboratory experimental designs, and discusses the advantages of these novel approaches.

Keywords: Brucellosis. Immunity. Conventional vaccines. New vaccines.

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de distribución mundial que afecta a especies animales domésticas, de vida silvestre y al hombre; cuyos agentes etiológicos son las bacterias del género *Brucella* (Alton *et al.*, 1988; Serre 1989). En el género se reconocen seis especies clásicas, cada una de las cuales tiene un hospedador principal: *B. abortus* (bovinos), *B. canis* (caninos), *B. melitensis* (caprinos), *B. neotomae* (rata del desierto), *B. ovis* (ovinos) y *B. suis* (porcinos) (Corbel & Bringley-Morgan, 1984). Recientemente, se han identificado nuevas variantes de *Brucella* aisladas de mamíferos marinos que se ha sugerido sean incorporadas como dos nuevas especies: *B. cetaceae* y *B. pinnipediae* (Moreno *et al.*, 2002; Cloeckert *et al.*, 2002).

Importancia de la brucelosis

La brucelosis es una enfermedad endémica en muchos países. Afecta la sanidad y la producción y además tiene una importante repercusión económica en el comercio internacional de animales y productos. Ocasiona significativas pérdidas en la producción pecuaria debido a que provoca abortos, metritis, infertilidad y el nacimiento de animales débiles. Por otro lado, constituye un importante problema para la salud pública ya que la mayoría de las bacterias del género son patógenas para el hombre quien adquiere la

- 1 -

infección por el consumo leche no pasteurizada y sus derivados, o por el contacto con material infeccioso (Olsen & Stoffregen, 2005).

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

A continuación se describirá la estructura antigénica de *Brucella*, los mecanismos inmunitarios involucrados en la defensa contra este patógeno para finalmente abordar los diferentes tipos de vacunas que se emplearon en el pasado y en la actualidad, a campo o a nivel experimental, contra la brucelosis.

Estructura antigénica de *Brucella*

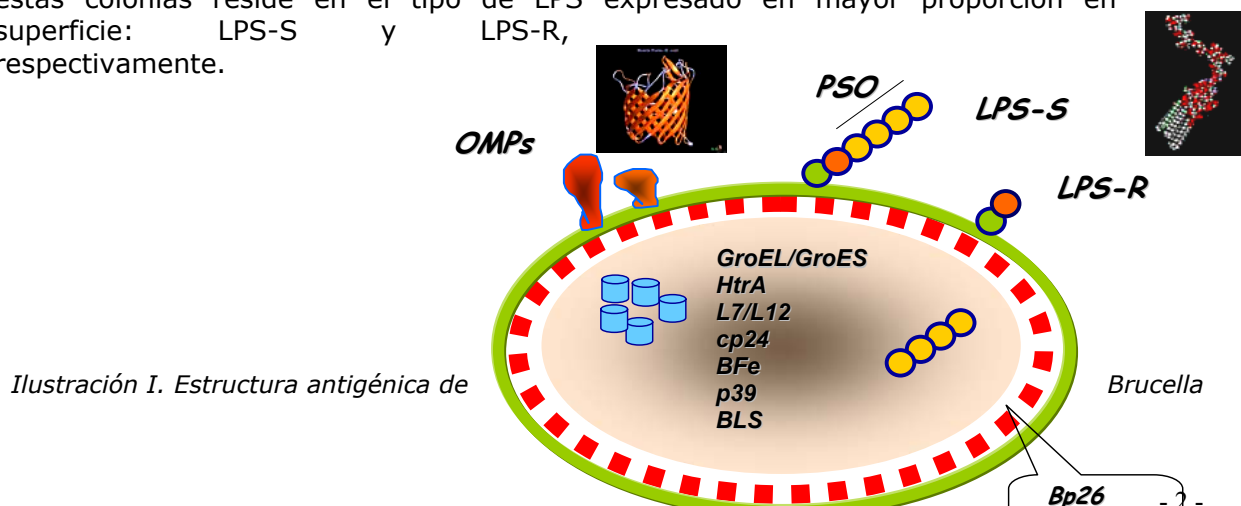
Los microorganismos del género *Brucella* son cocobacilos Gram negativos, no esporulados, acapsulados, carentes de pilis o flagelos. Poseen una envoltura celular característica: la membrana externa (ME), la membrana interna y un espacio periplásmico intermedio. En el periplasma hay proteínas y un gel glucopeptídico denominado peptidoglicano (PG) responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria. El citoplasma es rico en ADN, ARN, y proteínas citosólicas, algunas de ellas importantes desde el punto de vista del diagnóstico (Ilustración I).

Antígenos de la membrana externa

Los antígenos de la ME de *Brucella* han sido objeto de investigación desde el punto de vista del diagnóstico y de la inmunoprofilaxis; este interés es resaltado considerando que representan el punto de contacto inicial entre el patógeno y el hospedador (Robinson & Melling, 1993). Las moléculas mejor caracterizadas corresponden a dos grupos: el lipopolisacárido (LPS) y las proteínas de la membrana externa (OMPs: "outer membrane proteins").

- Lipopolisacárido (LPS)

Las especies de *Brucella* pueden ser clasificadas como "lisas" (smooth, S) o "rugosas" (rough, R) de acuerdo al aspecto de las colonias en medio sólido. El aspecto diferente de estas colonias reside en el tipo de LPS expresado en mayor proporción en superficie: LPS-S y LPS-R, respectivamente.



El LPS-S consta de una parte glicolípida (lípidos A), inserta en la membrana externa y otra polisacáridica expuesta hacia el exterior. Esta última se divide en dos secciones: el núcleo o "core", más interno y la cadena O (polisacárido O: PSO). Esta cadena es un homopolímero lineal de perosamina que se encuentra ausente en el LPS-R de las especies rugosas (*B. ovis* y *B. canis*) (Moreno *et al.*, 1984). El PSO es el antígeno (Ag) inmunodominante de superficie, capaz de inducir una respuesta serológica en la mayoría de los animales en contacto con especies lisas de *Brucella* (*B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*); además es la estructura antigénica más expuesta (Díaz y Léveux, 1972) y blanco de anticuerpos (Ac) protectores (Plommet, 1987a). Por otro lado, el PSO posee epitopes compartidos con otras especies bacterianas como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio cholerae*, *Salmonella landau*, *Escherichia coli* O:157 H7 responsables de reactividad cruzada en las pruebas serológicas que se basan en la detección de Ac hacia este Ag (Cherwonogrodzky *et al.*, 1990).

- Proteínas de la membrana externa (OMPs)

Las OMPs de *Brucella* se clasifican en mayores y menores de acuerdo con su abundancia relativa, hallándose ambas intercaladas en la membrana y estrechamente unidas al LPS por fuerzas hidrofóbicas (Moreno *et al.*, 1979). Muchas de estas OMPs han sido caracterizadas desde el punto de vista genético, inmunológico, estructural y funcional (Cloekaert *et al.*, 2002).

OMPs mayores

Las OMPs mayores son insolubles en disolventes acuosos y para su estudio ha sido necesario el empleo de detergentes u otros agentes surfactantes. En la década del 80, estas proteínas fueron identificadas por primera vez en *B. abortus* en una fracción insoluble en dodecilsulfato de sodio extraída a partir de la envoltura celular (SDS-I) (Dubray & Bézard, 1980; Dubray y Charriaut, 1983). Dicha fracción contiene dos de las OMPs mayores: una de 25-27 kDa y otra de 36-38 kDa y mostró tener actividad protectora parcial en el ratón (Dubray, 1987). Ambas OMPs también fueron identificadas por Verstraete *et al.* en 1982 mediante extracción con otros detergentes y designadas como grupo 3 y grupo 2, respectivamente. Actualmente, estas proteínas se denominan Omp25 (grupo 3) y Omp2b (grupo 2). Cuando la fracción SDS-I se obtuvo a partir de *B. melitensis* se identificó adicionalmente una proteína de 31-34 kDa (Cloekaert *et al.*, 1995a), hoy denominada Omp31 y ausente en *B. abortus* (Vizcaíno *et al.*, 1997).

En las especies rugosas, las OMPs se encuentran bien expuestas mientras que en las lisas los Ac no pueden acceder a los epitopes específicos posiblemente por el impedimento estérico ocasionado por las largas y/o abundantes cadenas del PSO (Bowden *et al.*, 1995a).

OMPs menores

Las OMPs menores son Omp1 y las lipoproteínas Omp10, Omp16, Omp19 que, a diferencia de las mayores, no se encuentran asociadas al PG (Cloekaert *et al.*, 1996c). Entre otras de las proteínas minoritarias, se ha descrito una lipoproteína de 8 kDa unida en forma covalente al PG que posee epitopes comunes con la lipoproteína Braun de *E. coli* (Gómez-Miguel y Moriyón, 1986; Gómez-Miguel *et al.*, 1987).

Antígenos internos

En *Brucella* han sido identificadas varias proteínas periplásmicas inmunogénicas cuyos genes han sido clonados, tales como la superóxido dismutasa (SOD) dependiente de Cu y Zn (Bricker *et al.*, 1990; Beck *et al.*, 1990), y BP26 o CP28 (CloECKaert *et al.*, 1996a; Rossetti *et al.*, 1996) y P39 (De Fays *et al.*, 1999).

Entre las proteínas citosólicas se han caracterizado las proteínas del estrés térmico: GroEL, GroES, DnaK, HtrA; las proteínas YajC, UvrA; la bacterioferritina (BFR), la gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y las proteínas ribosomales: L7/L12 y cp24. También se han identificado y purificado proteínas de actividad desconocida con pesos moleculares de 14 kDa, 22,9 kDa y 32,2 kDa. La actividad inmunogénica y protectora de estas proteínas recombinantes en el modelo murino figura en la Tabla I.

Interacción hospedador-*Brucella* y mecanismos inmunitarios

Brucella es un microorganismo intracelular facultativo capaz de sobrevivir y multiplicarse dentro de las células del sistema reticuloendotelial y que desencadena en el huésped susceptible una respuesta inmune innata y adaptativa.

Mecanismos de la inmunidad innata

Los mecanismos de la inmunidad innata son los primeros en activarse ante la entrada de los agentes infecciosos. La inmunidad innata reduce el número inicial de bacterias y prepara el ambiente para la activación de los mecanismos de la inmunidad adaptativa (Ko & Splitter, 2003).

- Células efectoras de la inmunidad innata

Las bacterias del género *Brucella* ingresan al hospedador susceptible por las vías oral, nasal, conjuntival o genital. Esta última vía es la principal para el contagio con *B. ovis*. Según sugieren algunos autores, luego de la infección, la bacteria es rápidamente fagocitada por los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMNN) en los que sobrevive y se multiplica (Enright, 1990). Los PMNN facilitan la diseminación de las bacterias por dos mecanismos: (i) sirviendo de protección frente a las actividades bactericidas de Ac y complemento; (ii) transportándolas hacia los tejidos linfoides y los órganos del sistema reticuloendotelial donde la bacteria infecta a los macrófagos y se multiplica en su interior. Diferentes autores (Spector *et al.*, 1973; Canning, 1990; Eze *et al.*, 2000) han demostrado que los macrófagos y los neutrófilos poseen la capacidad de destruir, aunque no completamente, a las brucelas fagocitadas. Los mecanismos activados para inhibir la multiplicación de *Brucella* o destruirla incluyen la estimulación del estallido respiratorio y la producción de radicales oxígeno libres en los PMNN (Canning *et al.*, 1988). Se ha demostrado que la ingestión y el estallido respiratorio dependen de la opsonización específica con Ac y/o inespecífica con C3b (Young *et al.*, 1985). Además, otros autores señalan que citoquinas como el interferón- γ (IFN- γ) y TNF- α influirían en el proceso de fagocitosis (Canning, 1990, Eze *et al.*, 2000).

Las células naturales asesinas (NK) no cumplen una función importante en el control de la infección aguda con *Brucella*, al menos en el modelo ratón (Fernandes *et al.*, 1995; Ko y Splitter, 2003).

Otras células de la inmunidad innata involucradas en la protección son los linfocitos T gamma/delta (cabe destacar que en los rumiantes y particularmente en los animales jóvenes, existe una alta proporción de LT circulantes (aproximadamente un 50%) (Wyckoff *et al.*, 2002), a diferencia de lo que ocurre en otras especies como humano o ratón, sin embargo el rol de estas células *in vivo* aún no ha sido caracterizado.

- El sistema de complemento

Entre los mecanismos humorales innatos, el complemento tiene un papel muy importante en la defensa contra *Brucella* cuando ésta se encuentra en el compartimiento extracelular y en bajo número. En efecto, estudios realizados en bovinos indican que *B. abortus* puede ser destruida por el complemento en ausencia de Ac específicos, o por suero obtenido en etapas tempranas de la infección. Mediante citometría de flujo se determinó además que las vías de activación del complemento involucradas en la lisis de *Brucella* fueron la vía clásica y la de las lectinas, esta última mediada por la proteína fijadora de manosa (MBP) (Fernández Prada *et al.*, 2001).

Mecanismos de la inmunidad adaptativa

La respuesta adaptativa contra *Brucella* involucra tres mecanismos principales, que actúan en diferentes etapas de la infección: i) la generación de una respuesta humoral con producción de Ac, ii) la activación de la función bactericida de los macrófagos por acción del IFN- γ producido por células T CD4⁺ y CD8⁺ y iii) la lisis de células infectadas por LT CD8⁺.

- Inmunidad humoral

Brucella spp., quizás en mayor grado que otros microorganismos intracelulares facultativos, inducen la producción de Ac. Estos pueden otorgar alguna protección en las etapas iniciales de la infección pero la fase bactericida coincide con el inicio de la inmunidad mediada por células (IMC). La participación de los Ac en la inmunidad contra *Brucella* se ha estudiado en animales de laboratorio, principalmente en el ratón (Sulitzeanu, 1955; Ralston & Elberg, 1969; Pardon, 1977, Bascoul *et al.*, 1978). En esta especie, el suero es capaz de limitar la infección por dos mecanismos: i) transferencia de las bacterias al hígado y fagocitosis por células de Kupffer o bien ii) bloqueo de la diseminación.

En rumiantes, la participación de los Ac en la protección es difícil de evaluar. Los animales en contacto con *Brucella* lisa responden con la producción de Ac dirigidos contra diferentes componentes del microorganismo, pero especialmente contra los antígenos superficiales, en particular contra el LPS-S (Díaz & Lévioux, 1972; Díaz & Moriyón, 1989). Estos Ac aparecen en los estadíos tempranos de la infección y suelen permanecer detectables en el suero durante años. Los Ac producidos colaboran en la lucha del huésped contra el patógeno pero no son suficientes para evitar la enfermedad. Sin embargo, la detección de Ac dirigidos contra el LPS es útil para el diagnóstico, pronóstico y curso de la infección (Díaz y Moriyón, 1989). Asimismo, se ha comprobado que la respuesta humoral a diferentes OMPs en bovinos y ovinos infectados naturalmente con *B. abortus* y *B. melitensis*, respectivamente es muy pobre y heterogénea (Zygmunt *et al.*, 1994). En ovinos, aunque no se ha evaluado el rol de los Ac en la protección, se ha demostrado que las proteínas del grupo 3: Omp25, Omp31, Omp16 y LPS-R son antígenos inmunodominantes en el curso de la infección por *B. ovis* (Kittelberger *et al.*,

1995b; Kittelberger *et al.*, 1998b).

- Inmunidad mediada por células (IMC)

La participación de los LT en la respuesta inmunitaria a *Brucella* ha sido estudiada principalmente en ratones. En el modelo murino, la transferencia de suero y células - linfocitos T- han mostrado que la protección es debida en parte a los anticuerpos y en parte a los linfocitos T (Araya & Winter, 1989), con efectos no aditivos (Plommet & Plommet, 1983). En infecciones por *Brucella* lisas los LT parecen pesar más que los Ac en la protección. Estudios posteriores realizados indican que ambas poblaciones de LT: Ly3T4 (CD4+) y LyT2 (CD8+) participan en la protección aunque existen controversias respecto de cual de las dos tiene el rol principal (Pavlov *et al.*, 1982; Mielke, 1991). Algunos autores han señalado que ambas subpoblaciones tienen una participación comparable en la protección contra *B. abortus* (Araya *et al.*, 1989). Las diferencias entre distintos autores pueden atribuirse a la utilización de cepas con distinta virulencia y/o ratones con diferentes haplotipos.

La resistencia a los patógenos intracelulares, como en el caso de *B. abortus* depende de la activación de la IMC (Zhan & Cheers, 1993). El principal activador de los macrófagos es el IFN-secretado por los LT CD4⁺ y CD8⁺ (Baldwin *et al.*, 1993). En efecto, *in vitro*, el tratamiento de macrófagos murinos con IFN-controla la multiplicación de *B. abortus* (Jiang *et al.*, 1993) y favorece su muerte activando la producción de intermediarios oxidativos y otras moléculas microbicidas (Jones *et al.*, 1992). Además, la inyección de IFN-recombinante en ratón favorece la resistencia a *Brucella* en macrófagos esplénicos y peritoneales (Stevens *et al.*, 1992), mientras que la inyección de AcM anti-IFN-exacerba la infección por *B. abortus* y favorece la esplenomegalia (concomitante con un mayor número de macrófagos), el principal signo patológico de la brucelosis en ratones y en el hombre (Zhan y Cheers, 1993). Asimismo, se ha demostrado la activación específica *in vitro* de LT de bovinos infectados o inmunizados con bacterias atenuadas o fracciones de *Brucella* y la producción de IL-2 e IFN-(Wyckoff *et al.*, 1993).

Los estudios realizados con *B. abortus* señalan que sólo estas bacterias vivas son capaces de inducir IMC. En efecto, *B. abortus* induce a las células Th1 a producir IFN- γ e IL-2 favoreciendo de este modo la síntesis de IgG2a y el fenómeno de hipersensibilidad retardada (HPSR) en ratón (Jiang & Baldwin, 1993). En contraposición, Zhan & Cheers en 1995 demostraron que la inyección de extractos de *Brucella* ricos en proteínas, o la bacteria muerta, estimulan la población Th2 con producción de IL-4 e IgG1. Sin embargo, recientemente, diferentes trabajos de otros autores, indican que *B. abortus* inactivada estimula la activación de células dendríticas, la secreción de IL-12 orientando la respuesta hacia un perfil Th1 y que además activa la población de LT citotóxicos (Golding *et al.*, 2001; Inoue *et al.*, 2005).

Varias citoquinas, y en especial el TNF- y la IL-12, juegan un rol principal *in vivo* e *in vitro* en la secreción de IFN- por LT CD4+ (Hsieh *et al.*, 1993). Estas citoquinas, secretadas por el macrófago, también participan en la activación de las células NK que, aunque tienen actividad inespecífica, contribuyen con los LT al control de la infección por microorganismos intracelulares.

Recientemente se ha estudiado el rol de las opsoninas en la interacción *B. melitensis*-macrófago (Eze *et al.*, 2000). Cuando *Brucella* es opsonizada por Ac o por el complemento, la activación del macrófago por el IFN-inhíbe la multiplicación de *Brucella* pero no la destruye. Estos estudios sugieren la necesidad de otros mecanismos celulares, como por ejemplo la acción citotóxica de los LTCD8+ (Eze *et al.*, 2000) que destruirían el

- 6 -

macrófago infectado liberando a las bacterias al medio extracelular donde serían blanco de los Ac o del complemento. Aunque ya se ha descrito que los LT CD8⁺ se activan en la infección con *Brucella* (Oliveira *et al.*, 1995; Kunkle *et al.*, 1995), en la actualidad se han caracterizado algunos antígenos o epitopes involucrados en la inducción de la respuesta citotóxica (Muñoz-Montesino *et al.*, 2004; Cassataro *et al.*, 2005a)

A diferencia de lo que ocurre con las especies lisas, la rama humoral del sistema inmunitario tendría un rol más importante que la celular en la protección contra *B. ovis*: la transferencia de suero de ratón convaleciente confirió una protección mayor a aquella obtenida por la transferencia de LT sensibilizados obtenidos a partir de bazo o ganglio linfático (Jiménez de Bagués *et al.*, 1994). Dado que la infección por *B. ovis* indujo principalmente los isotipos IgG2a e IgG3 sobre IgG1 se ha inferido que esta bacteria estimularía principalmente la población de linfocitos T colaboradores del tipo 1 (LTh1) productores de IFN- γ (Jiménez de Bagués *et al.*, 1994).

En conclusión, se ha demostrado que la inmunidad a *Brucella* spp. se debe a un efecto combinado y concertado de mecanismos humorales y celulares. De acuerdo a lo expresado, en el desarrollo de nuevas vacunas es necesaria la identificación de aquellos antígenos de *Brucella* capaces de inducir una respuesta humoral y celular, del tipo Th1 y citotóxica.

Vacunación en brucelosis

Vacunas tradicionales o convencionales

Las vacunas tradicionales en brucelosis han seguido dos líneas principales de desarrollo: las vacunas atenuadas vivas y las vacunas inactivadas o bacterinas (homólogas o heterólogas) (Crespo León, 1994), en ambos casos se trata de vacunas celulares (bacteria entera).

Vacunas celulares

- Vacunas vivas atenuadas aglutinógenas

El empleo de vacunas atenuadas asegura la inducción de una respuesta inmunitaria completa contra un gran número de componentes (Drabner & Guzmán, 2001) y una reestimulación del sistema inmune gracias a la replicación de la bacteria. Las cepas que actualmente se emplean en la mayoría de los países para el control de la brucelosis bovina y de pequeños rumiantes son: *B. abortus* S19 (*B. abortus* cepa 19) y *B. melitensis* Rev.1, respectivamente (Alton & Elberg 1967; Blasco, 1990; Nicoletti, 1990; Blasco, 2006). Estas cepas son capaces de establecer una infección limitada imitando el proceso de infección natural por cepas silvestres y confiriendo de esta manera protección contra el aborto y la infección. Sin embargo, el empleo de estas vacunas puede ocasionar abortos en las hembras gestantes e infertilidad por infección genital. Por otro lado, estas vacunas (también denominadas aglutinógenas) inducen Ac que interfieren con las pruebas serológicas de rutina, impidiendo la diferenciación entre animales infectados y vacunados. Al respecto, se han implementado modificaciones en la forma de administración: por un lado la reducción de la dosis inyectada, permitiendo vacunar animales púberes sin consecuencias serológicas duraderas (Deyoe *et al.*, 1979). Por otro lado, el uso de la vía conjuntival ha mostrado inducir buena inmunidad con una respuesta serológica de corta duración, permitiendo incluso la revacunación (Díaz-Aparicio *et al.*, 2004). Finalmente, la restricción etaria, (vacunación de animales prepúberes) con dosis

completa, permite la diferenciación de la mayoría de los animales vacunados, a partir de una cierta edad y mediante el uso de técnicas complementarias.

Las vacunas vivas son patógenas para el hombre. Esto impone, por un lado, precauciones particulares durante la manipulación de la vacuna, y por el otro, introduce un importante problema de salud pública (Muzny *et al.*, 1989; Blasco y Díaz, 1993b).

Aunque la cepa 19 presenta características muy estables, la cepa Rev.1, por su parte, puede derivar hacia formas o variantes indeseables, sea en razón de una disociación hacia el fenotipo rugoso, o hacia formas lisas de mayor virulencia (Bosserey, 1991). Por otro lado, Rev. 1 presenta la desventaja adicional de ser una cepa resistente a la estreptomycin, uno de los antibióticos de elección para el tratamiento de la brucelosis humana (Alton y Elberg, 1967; Nicoletti, 1990).

Una vacuna que se ha utilizado experimentalmente es la cepa lisa *B. suis* 2. Esta cepa desarrollada y aplicada en China ha sido preconizada para uso en diferentes especies, administrándose por vía oral, mediante el agua de bebida (Xin, 1986). Sin embargo, un Comité de evaluación internacional *ad-hoc*, designado por la O.M.S. ha determinado resultados pobres obtenidos en ratón y en ovejas. Aunque es estable y su virulencia no supera a la de la cepa 19, la protección que confiere a ovejas preñadas contra *B. melitensis* y a carneros contra *B. ovis* es escasa (Blasco *et al.*, 1993; Verger *et al.*, 1995).

- Vacunas vivas atenuadas no aglutinógenas

El uso de cepas rugosas (no aglutinógenas), con expresión limitada de PSO, fue abordado primeramente con la cepa 45/20 y en la actualidad con *B. abortus* RB51 (cepa resistente a la rifampicina) (Schurig *et al.*, 1991; Schurig *et al.*, 2002). La primera es una cepa poco estable, con capacidad de revertir a formas virulentas; por esta razón se usó como vacuna muerta. Los ensayos realizados mostraron que su poder protector era mediocre y que los lotes presentaban variaciones difíciles de controlar. La cepa RB51, usada actualmente en EE. UU, Chile, Colombia, Costa Rica, México y Uruguay para el control de la brucelosis bovina, no induce Ac anti-PSO. Sin embargo, en el bovino los datos de protección son contradictorios dependiendo de la vía de administración, la dosis, la edad del animal vacunado y la prevalencia de la enfermedad en el rodeo. Por otro lado, el empleo experimental de RB51 en pequeños rumiantes, ovinos y caprinos, no confiere protección (Moriyón *et al.*, 2004).

- Vacunas inactivadas

Las vacunas inactivadas que fueron producidas a gran escala y comercializadas durante varios años en algunos países son *B. melitensis* H38 (S) y *B. abortus* 45/20 (R) (Plommet, 1990). La primera bacteria induce niveles de protección contra la infección y el aborto similares a la vacunación con cepa 19, mientras que la segunda es una cepa poco inmunogénica e inestable con importantes variaciones en los lotes de producción. Asimismo, se ha demostrado que en ratones y en ovinos no existe diferencia en la protección conferida por *B. melitensis* H38 (S) y *B. melitensis* Rev. 1 contra el desafío con la especie homóloga (Renoux, 1957; Renoux, 1958). El empleo de estas vacunas inactivadas no ha tenido consenso debido a las reacciones locales en el punto de inyección por el adyuvante oleoso incorporado en ambas y a la seropositividad persistente generada por *B. melitensis* H38 (S) (Blasco, 1990).

Las desventajas en el empleo de las vacunas tradicionales han impulsado la búsqueda de nuevas alternativas que superen los inconvenientes mencionados. El diseño racional de vacunas implica la inducción de la respuesta inmune adaptativa hacia moléculas definidas operativamente como "antígenos protectores".

Identificación de antígenos o epitopes protectores

La fuerte asociación entre el LPS y las OMPs de *Brucella* impide que estas moléculas puedan ser purificadas a menos que se utilicen técnicas desnaturalizantes. Por ello se han empleado diferentes estrategias para la identificación de los antígenos y epitopes comprometidos en la protección mediada por Ac o por células: i) ensayos de protección pasiva, mediante la administración de AcM/sueros policlonales o transferencia adoptiva de linfocitos sensibilizados, respectivamente, ii) ensayos de linfoproliferación o pruebas de hipersensibilidad retardada con extractos citosólicos o proteínas purificadas e iii) inmunización activa con fracciones más o menos purificadas.

En brucelosis, la investigación de los antígenos que inducen inmunidad protectora se ha realizado en su mayoría a través de experimentos en el modelo ratón (Sulitzeanu, 1955). Este modelo ha sido empleado para dilucidar los complejos mecanismos inmunitarios y para estimar la protección, medida en términos de reducción significativa del número de unidades formadoras de colonia (UFC) de *Brucella* presentes en el bazo o hígado, respecto de un control no inmunizado. Cabe destacar que en el ratón, las bacterias del género *Brucella* replican en el bazo y en el hígado, provocando una infección crónica y asintomática. La actividad protectora en el ratón ha mostrado estar bien correlacionada con la observada en los animales destinatarios de las vacunas, y esto, tanto con las vacunas vivas (*B. abortus* B19, *B. melitensis* Rev.1, *B. suis* 2), como inactivadas (*B. melitensis* H38). El desarrollo de este modelo junto con el de vacunas "patrón" de referencia (Bossery y Plommet, 1984), ha permitido valorar la actividad no solo de vacunas celulares "completas" sino también de fracciones o "vacunas subcelulares".

Vacunas subcelulares

Las vacunas subcelulares (fracciones más o menos purificadas) reúnen importantes ventajas: a) son seguras e inocuas, ya que no existe posible reversión a la forma salvaje como en las vacunas vivas atenuadas, ni peligro de transmisión a animales sanos; b) son más específicas, ya que en su diseño deberían ser incluidos antígenos diferentes de los empleados en el serodiagnóstico para poder distinguir animales infectados de vacunados, c) son eficaces, debido a que sólo incluyen aquellos antígenos capaces de inducir inmunidad protectora y adyuvantes y/o citoquinas que mejoren su presentación, dirigiendo asimismo el impacto sobre el sistema inmunitario.

-Vacunas subcelulares obtenidas a partir de *Brucella* (no recombinantes)

- LPS y OMPs

En *B. abortus*, el LPS-S y más precisamente el PSO han sido identificados como importantes blancos de protección a través de la inmunización pasiva con suero policlonal (Plommet y Plommet, 1983) o AcM específicos (Limet *et al.*, 1987; Winter *et al.*, 1989; Jacques *et al.*, 1992); por inmunización con LPS-S purificado (Dubray y Bézard, 1980; Winter *et al.*, 1989) o bien PSO conjugado a seroalbúmina o a porinas de *Brucella*

- 9 -

(Jacques *et al.*, 1991; Winter y Rowe, 1988). Similares estudios realizados con *B. melitensis* señalan al LPS-S como principal antígeno protector (Cloeckart *et al.*, 1992b). Otros ensayos indican que la administración de AcM anti-OMPs no protegió o lo hizo en menor grado que el AcM anti-LPS-S contra cepas de *Brucella* en fase S (Jacques *et al.*, 1992). Del mismo modo, la administración de AcM anti-LPS-R de distintos isotipos no protegió con el mismo nivel que el AcM anti-PSO frente al desafío con una cepa virulenta de *B. abortus* (S) (Cloeckart *et al.*, 1993).

En contraste a lo que ocurre con las cepas lisas de *Brucella*, se ha observado que la administración de AcMs anti-OMPs y anti-LPS-R, inyectados en combinaciones, protegieron contra *B. ovis* (Bowden *et al.*, 1995b). En estos ensayos se han identificado algunas moléculas blanco de Ac protectores tales como las OMPs menores (Omp16 y Omp19), Omp25 y Omp31 y el LPS-R (Bowden *et al.*, 1995b; Bowden *et al.*, 2000). En particular, la administración de un AcM anti-Omp31 en forma individual tuvo una actividad protectora tan eficaz como el suero anti-HS (extracto salino: "hot saline") (Bowden *et al.*, 2000).

El rol del LPS-R en la protección del ratón contra *B. ovis* es controvertido. La inmunización pasiva con AcM específicos protegió moderadamente (Bowden *et al.*, 1995a; Bowden *et al.*, 2000). Asimismo, la inmunización con el LPS-R purificado de *B. ovis* indican que esta molécula es inmunogénica y protectora en el ratón en contraposición a los hallazgos obtenidos por otros autores (Jiménez de Bagués *et al.*, 1994; Estein *et al.*, 2003). Por otra parte, el LPS-R de *Brucella*, al combinarse físicamente con Omp25 purificada con SDS, es capaz de restituir su antigenicidad original (Cloeckart *et al.*, 1996). Esto ha planteado la necesidad de estudios en la formulación o diseño de potenciales vacunas que incluyan OMPs, en particular, cuando los Ac contra epítopes expuestos son relevantes para la protección (Bowden *et al.*, 1995).

- Fracción SDS-I

La fracción SDS-I contiene las OMPs mayores (50%), PG (30%) y LPS-S (1%) e induce una actividad protectora en ratón comparable a la de *B. melitensis* H38 (S) inactivada (Dubray y Bézard, 1980; Dubray, 1987; Winter y Rowe, 1988). Dado que el principal componente de este extracto son las proteínas, se atribuyó a las OMPs la capacidad de conferir protección. Esta hipótesis fue descartada cuando la fracción SDS-I, obtenida a partir de cepas rugosas, resultó menos protectora que la aislada a partir de cepas lisas, las cuales indujeron elevados títulos de Ac anti-LPS-S (Limet *et al.*, 1987).

En bovinos, la inmunogenicidad de la fracción SDS-I parece ser diferente de la observada en el ratón ya que su poder protector en vaquillonas gestantes es inferior al obtenido con *B. abortus* S19 (Saegerman *et al.*, 1994).

- Extracto HS (HS: "hot saline")

Este extracto obtenido a partir de *B. ovis* está esencialmente compuesto por OMPs del grupo 3 (55%) y por LPS-R (33%) (Riezu Boj *et al.*, 1986; Gamazo *et al.*, 1989) y muestra una eficacia próxima de la obtenida con la vacuna *B. melitensis* Rev.1 tanto en ratón como en ovinos (Blasco *et al.*, 1993a; Jiménez de Bagués *et al.*, 1994; Murillo *et al.*, 2001). La evaluación de la respuesta inmune contra este extracto demuestra que la transferencia de suero hiperinmune anti-HS (obtenido por la administración del extracto HS en una formulación con saponina (QS21)), confirió una protección mayor a aquella obtenida por la transferencia LT sensibilizados obtenidos a partir de bazo o ganglio

linfático (Jiménez de Bagués *et al.*, 1994).

En ensayos realizados con carneros se ha demostrado la actividad inmunogénica y protectora del extracto HS y de las OMPs que lo componen, aunque también se le atribuye al LPS-R un importante rol en la protección contra *B. ovis* (Blasco *et al.*, 1993a). Recientemente, se ha confirmado en ovinos la seguridad y eficacia del HS formulado en micropartículas respecto de *B. melitensis* Rev. 1 (Muñoz *et al.*, 2006).

Por otro lado, un extracto HS preparado a partir de *B. melitensis* en fase lisa, e incorporado en liposomas, protegió contra la especie homóloga (Vitas *et al.*, 1995). Es pues probable que este extracto contenga las OMPs mayores y el LPS-S y que, en este sentido se asemeje a la fracción SDS-I, con la diferencia fundamental de la ausencia de PG en el extracto HS. Además, recientemente, se ha demostrado que el extracto HS de *B. ovis* encapsulado en micropartículas confiere protección cruzada contra *B. melitensis* en ratón (Estevan *et al.*, 2006).

Dado que el empleo de vacunas subcelulares obtenidas a partir de *Brucella* no elimina el problema de la manipulación del agente patógeno se ha recurrido al desarrollo de nuevas vacunas o vacunas de nueva generación que incluyen desde la obtención de cepas atenuadas por mutación de genes hasta la elaboración de proteínas recombinantes e inclusive a ADN.

Vacunas de nueva generación

Los aportes de la biotecnología y la ingeniería genética a la inmunología han sido cruciales para el desarrollo de estas nuevas vacunas. Las vacunas de nueva generación se conciben a partir de un conocimiento detallado de los mecanismos de patogenicidad de los microorganismos y de la respuesta inmunitaria del huésped susceptible.

Vacunas a microorganismos vivos genéticamente atenuados

- Mutantes atenuadas a partir de cepas virulentas

Una estrategia en el desarrollo de nuevas vacunas implica la obtención de mutantes atenuadas a partir de mutaciones en genes de metabolismo o factores de virulencia presentes en cepas virulentas.

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

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

Las mutantes en el gen *omp25* de *B. abortus* (BA25), de *B. melitensis* (BM25□□□) y de *B. ovis* (BO25□□) resultaron atenuadas en ratones. La protección conferida por BM25 frente al desafío con *B. melitensis* patógena fue similar a la conferida por Rev. 1 en ratón y cabras (Edmonds *et al.*, 2002b). Por otro lado, esa mutante confirió mayor protección que Rev. 1 contra *B. ovis* en ratón (Edmonds *et al.*, 2002a).

- Mutantes en antígenos inmunodominantes a partir de cepas vacunales

Otra estrategia para el desarrollo de vacunas vivas consiste en eliminar de las cepas vacunales algún antígeno que pueda servir como marcador de infección (antígeno inmunodominante). Es decir, que disponiendo de una prueba serológica específica para detectar Ac contra el antígeno en cuestión, los infectados reaccionarían, en tanto que los vacunados no lo harían. En este contexto, se han desarrollado mutantes de la cepa 19 que presentan deleciones que actúan como marcadores de la cepa. La cepa *B. abortus* S19SOD sufrió la remoción del gen que codifica para SOD dependiente de Cu-Zn. La cepa S19□31KL posee una deleción del gen para una proteína de 31 kDa (BCSP31). Ambas cepas han sido evaluadas en ratones y en bovinos. En bovinos, han mostrado ser inmunogénicas y conferir protección contra el aborto tras infección experimental por la cepa *B. abortus* 2308 (Cheville *et al.*, 1993). Sin embargo, ni la SOD ni la BCSP31 resultan inmunodominantes tras la infección por dicha cepa.

La cepa 19 y la Rev.1, fueron modificadas por eliminación del gen para la proteína P39 (Tibor *et al.*, 1998). En otros ensayos ambas cepas fueron deleccionadas en BP26 (Boschioli *et al.*, 1995; Boschioli *et al.*, 1997; Cloeckert *et al.*, 2004). Ambas cepas mutantes presentaron virulencia residual y capacidad protectora similares a las cepas parentales en ratón y en el caso de la mutante en BP26, también en bovinos (Campos *et al.*, 2002).

Recientemente, mutantes de la cepa 19 en el gen *cgs* que codifica para la enzima que participa en la síntesis de glucanos cíclicos (Briones *et al.*, 2001) y *bmp18* (Cravero *et al.*, 1993; Campos *et al.*, 2002) resultaron más atenuadas que la cepa 19 y confirieron niveles de protección similares frente al desafío con *B. abortus* patógena en el modelo ratón y en bovinos.

Vacunas vectorizadas en virus

La utilización de virus como vectores de expresión *in vivo* de Ag protectores es un enfoque que reúne varias propiedades interesantes (Espósito y Murphy, 1989). En efecto, virus Pox tales como el de la vaccinia, pueden contener una apreciable cantidad de genoma foráneo, permitiendo subclonar secuencias relativamente largas o incluso varios genes diferentes; además por ser parásitos intracelulares obligados, pueden glicosilar aprovechando la biosíntesis de la célula huésped; además, la posibilidad que los Ag sean presentados por la vía endógena, y activen mecanismos de inmunidad mediada por células, resulta de especial interés en brucelosis.

Los genes de la superóxido-dismutasa dependiente de Cu y Zn (SOD Cu/Zn) y del equivalente de la proteína HtrA fueron expresados en virus vaccinia (Toth *et al.*, 1995). La inmunización de ratones con estos virus vivos recombinantes por separado indujo Ac contra solo una de las proteínas (HtrA). La inmunización con otras proteínas expresadas en este sistema (GroEL, L7/L12) (Baloglu *et al.*, 2000; Baloglu *et al.*, 2005) estimuló la respuesta humoral pero no protegió contra *B. abortus* en ratón.

- Vacunas recombinantes en Salmonella

La idea que señala a las vacunas vivas como inductoras de inmunidad de larga duración con un componente celular importante, unida a la concepción de la vacunación oral mediante bacterias capaces de estimular eficazmente al sistema inmunitario asociado a las mucosas ha llevado a ensayar Ag de *Brucella* expresados en vectores bacterianos como *Salmonella* (Schödel, 1992). Un gen que codifica para la proteína de 31 kDa (BCSP31) (Bricker *et al.*, 1988; Mayfield *et al.*, 1988) fue subclonado en una cepa auxotrófica de *Salmonella typhimurium*. La inmunogenicidad de esta construcción fue luego estudiada en el ratón (Stabel *et al.*, 1990). La inmunización por vía oral, si bien indujo respuesta mediada por Ac y por células contra el portador (*Salmonella*), fracasó en la inducción de respuesta celular contra BCSP31 pura. Igualmente, la respuesta en IgA secretoria intestinal fue pobre contra la proteína pero intensa contra el vector. La virulencia residual de la cepa fue escasa, desapareciendo de los tejidos a las tres semanas post-inoculación. La misma BCSP31 fue introducida en una cepa de *S. cholerae suis* que presenta una doble delección (gen de la adenilato ciclasa y gen *cdt*, probablemente implicado en la penetración transintestinal). Ensayada por vía oral en ratones y en el cerdo, los resultados fueron contrastantes. Mientras que en el ratón se obtuvieron Ac anti-BCSP31 en el suero y en intestino, en el cerdo la respuesta fue esencialmente celular, en ausencia de niveles significativos de Ac (Stabel *et al.*, 1993; Stabel *et al.*, 1994).

Vacunas a microorganismos recombinantes inactivados

La inmunización de ratones con AcM dirigidos contra antígenos de la membrana externa o la utilización de técnicas que detectan antígenos o epitopes que estimulan la respuesta celular, han permitido identificar moléculas blanco de efectores protectores. Cuando los antígenos protectores son proteínas se utilizan como vectores de expresión bacterias (principalmente *E. coli*), las levaduras o baculovirus. Estos microorganismos contienen genes heterólogos que codifican para el Ag inmunizante y además pueden codificar para otros agentes estimulantes (ejemplo: citoquinas).

En los últimos años se ha evaluado el rol de algunas OMPs clonadas en *E. coli*, libres así de otros componentes de *Brucella*. En el ratón, la inmunización con *E. coli* expresando Omp25 de *B. melitensis* en la membrana, protegió contra *B. melitensis*. Esta protección fue dependiente del grado de exposición de esta proteína en la cepa de desafío (Bowden *et al.*, 1998). En otro ensayo, la vacunación con Omp31 de *B. melitensis* expresada en *E. coli* indujo buenos niveles de Ac y respuesta celular aunque no protegió contra *B. melitensis* H38 (S), quizás debido a la presencia del PSO ocultando los epitopes de esta OMP (Guilloteau *et al.*, 1999). Por otro lado, la administración de la misma recombinante protegió contra *B. ovis* (resultados no publicados).

Otras proteínas como GroEL, GroES, SOD Cu-Zn, HtrA y YajC han sido clonadas y expresadas en virus vaccinia. Estas vacunas fueron inmunogénicas en ratón pero no protegieron contra *B. abortus* (Toth *et al.*, 1995).

Vacunas subcelulares recombinantes

Como ya ha sido mencionado, se han identificado en *Brucella* varias proteínas periplásmicas y citoplásmicas inmunogénicas cuyos genes ya han sido clonados y

expresados en vectores adecuados. Estas proteínas recombinantes purificadas formuladas con adyuvantes y/o citoquinas estimuladoras, potenciales inmunógenos vacunales, han sido estudiados en el modelo ratón. Entre ellas, una proteína cuya función y estructura ha sido caracterizada es: p18 o también denominada lumazina sintetasa de *Brucella* (BLS). Esta proteína decamérica constituye un excelente carrier para vacunas a subunidades ya que acepta la inserción de péptidos o proteínas en el extremo amino terminal de cada monómero sin alterar el plegamiento o la estabilidad de la quimera (Laplagne *et al.*, 2004; Sciutto *et al.*, 2005). Por otro lado, datos recientes indican que BLS es un potente estimulador de células presentadoras de Ag, siendo el principal blanco las células dendríticas (CD) (Berguer *et al.*, 2006).

Cabe destacar que hasta el momento, con los esquemas de inmunización empleados la protección lograda no alcanzó los niveles o duración despertados por las vacunas tradicionales. La evaluación de la actividad inmunogénica y de protección de las citadas proteínas recombinantes en ratones se muestra en la Tabla I.

Tabla I. Proteínas internas de *Brucella* ensayadas como vacunas recombinantes en el modelo murino

Proteína recombinante	Tipo de respuesta	Protección	Referencia
SOD CuZn	IMAC	No	Tabatabai y Pugh, 1994
HtrA	IMAC	No	Roop <i>et al.</i> , 1994
GroEL	IMC	No	Lin <i>et al.</i> , 1996
GroES	IMC	-	Oliveira <i>et al.</i> , 1996a
UvrA	IMC	-	Oliveira <i>et al.</i> , 1996a
L7/L12	IMC	Sí	Oliveira <i>et al.</i> , 1994; Oliveira <i>et al.</i> , 1996b
YajC	IMC	-	Vemulapalli <i>et al.</i> , 1998
22,9 kDa	IMC	Sí	Céspedes <i>et al.</i> , 2000
BFR	IMC	No	Al-Mariri <i>et al.</i> , 2001
P39+ CpG	IMAC e IMC	Sí	Al-Mariri <i>et al.</i> , 2001
cp24	IMC	No	Cassataro <i>et al.</i> , 2002
GAPDH + IL-12	IMC	Sí	Rosinha <i>et al.</i> , 2002
BLS	IMAC e IMC	Sí	Velikovskiy <i>et al.</i> , 2003
Omp31	IMAC e IMC	Sí	Cassataro <i>et al.</i> , 2005a

En la formulación de estas vacunas se han utilizado diferentes adyuvantes para potenciar la respuesta inmunitaria. Entre ellos pueden mencionarse el adyuvante de Freund incompleto (AFI), el dimicolato de trealosa (DMT), muramil dipéptido (MDP) y monofosforil lípido A (MPL), todos estimulantes de la respuesta Th1 (Schurig *et al.*, 2002). Con el mismo propósito se han empleado las proteínas asociadas a dinucleótidos CpG no metilados (Al-Mariri *et al.*, 2001a) de ADN bacteriano o genes que codifican para citoquinas estimuladoras como la IL-12 (Rosinha *et al.*, 2002).

Otras alternativas de inmunización se han basado en el empleo de extractos obtenidos a partir de bacterias recombinantes. Un extracto enriquecido en Omp31 de *B. melitensis* administrado solo o asociado al LPS-R purificado protegió contra *B. ovis* en el modelo

ratón (Estein *et al.*, 2003). Por otra parte, indujo la producción de Ac que median lisis por activación del complemento y una respuesta de hipersensibilidad retardada en ovinos (Estein *et al.*, 2004).

Vacunas peptídicas

La posibilidad de favorecer el desarrollo de una respuesta inmune celular mediante péptidos ha sido aún poco estudiada en brucelosis. Un péptido de 14 aminoácidos obtenido por síntesis a partir de la secuencia de la SOD de *B. abortus* dependiente de Cu y Zn fue capaz de reducir la infección esplénica en 1 log, en tanto que adyuvado con MPL, la reducción alcanzó 2 log (Tabatabai y Pugh, 1994). Recientemente, la inmunización con un péptido de 27 aminoácidos derivado de Omp31 en adyuvante indujo una respuesta Th1 y protegió en 1,15 log contra *B. melitensis* (Cassataro *et al.*, 2005a).

Sin embargo, la variabilidad haplotípica a nivel de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, hace poco probable que un solo péptido pequeño, cercano al tamaño que acomoda una molécula de clase II, pueda inmunizar poblaciones de individuos.

Vacunas de ADN

La inmunización con ácido desoxirribonucleico (ADN) representa un nuevo enfoque para el desarrollo de vacunas. En la inmunización genética el antígeno es naturalmente procesado y presentado por las vías endosómica y citosólica, promoviendo así respuestas mediadas por Ac y células (Tang *et al.*, 1992; Babiuk *et al.*, 1999). Al inyectar el ADN, las células del organismo vacunado son transfectadas con el plásmido *in vivo* e inician la síntesis del Ag en cuestión cuyo nivel de expresión está en el orden de los nanogramos y picogramos (Gurunathan *et al.*, 2000a; Gurunathan *et al.*, 2000b)

El empleo de estas vacunas tiene la ventaja de generar una respuesta específica contra la/s proteína/s codificadas por el ADN en la célula, eliminando por lo tanto el riesgo de infección; son muy estables y resistentes a los cambios de temperatura a diferencia de las vacunas convencionales. Finalmente, la producción a gran escala se puede efectuar por métodos estandarizados, relativamente simples y económicos (Donnelly *et al.*, 2000).

En brucelosis, el empleo experimental de este tipo de vacunas incluye estudios de protección en ratón con plásmidos codificando para L7/L12 (Kurar y Splitter, 1997), P39, BFR (Al Mariri *et al.*, 2001a; Al Mariri *et al.*, 2001b), SOD Cu/Zn (Oñate *et al.*, 2003) solo o asociado a IL-2 (González-Smith *et al.*, 2006), BLS (Velikovskiy *et al.*, 2002) y Omp31 (Cassataro *et al.*, 2005b). Aunque estas vacunas inducen una respuesta inmune de perfil Th1 no se han logrado los niveles de protección obtenidos con las vacunas vivas atenuadas (Schurig *et al.*, 2002). Por otro lado, BMP18 (Vemulapalli *et al.*, 2000), CP24 (Cassataro *et al.*, 2002) y la proteína del estrés térmico GroEL (Leclercq *et al.*, 2002) indujeron respuesta Th1 pero no protegieron. Recientemente, se ha identificado bp26 y una chaperona como interesantes candidatos para la inmunización plasmídica, al menos en el modelo murino (Yang *et al.*, 2005).

Conclusión

La vacunación es probablemente la medida de control más económica contra la brucelosis principalmente en países con alta prevalencia. En el desarrollo de nuevas vacunas hay dos líneas de investigación principales: las vacunas atenuadas y las subcelulares. Las vacunas subcelulares formuladas con antígenos que inducen una respuesta inmune protectora son más seguras ya que no entrañan riesgo de infección y su producción es más estandarizada. Por otro lado, el empleo estas vacunas inertes sería esencial en la etapa de erradicación de una enfermedad, asumiendo que esto implica la ausencia del agente del ecosistema, por lo que el uso de vacunas atenuadas se vería necesariamente suspendido en las etapas finales de aquella. La vacuna subcelular podría en, en cambio, continuar proveyendo inmunidad más allá de la desaparición virtual del agente.

Los aportes de la biotecnología a la inmunología han permitido el desarrollo de nuevas vacunas como proteínas recombinantes o vacunas a ADN. Algunas de estas vacunas son inmunogénicas y confieren protección en el ratón pero su seguridad y eficacia deberá ser evaluada a campo en el huésped susceptible.

Bibliografía

1. Al-Mariri, A.; Tibor, A.; Mertens, P.; De Bolle, X.; Michel, P.; Godefroid, J.; Walravens, K. y Letesson, J. J. (2001a). Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infect Immun.* 69, 4816-4822.
2. Al-Mariri A., Tibor A., Mertens P., De Bolle X., Michel P., Godfroid J., Walravens K., Letesson J.-J. (2001b). Induction of immune response in BALB/C mice with a DNA vaccine encoding bacterioferritin or P39 of *Brucella* spp. *Infect. Immun.* 69, 6264-6270. Al-Mariri et al., 2001
3. Alton G.G., Angus RM, Jones LM, Verger J.M. (1988). Laboratory techniques for the brucellosis laboratory, INRA, Paris.
4. Alton G.G., Elberg S.S. (1967). Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. A review of ten years of study. *Vet. Bull.* 37, 793-800.
5. Araya L.N., Winter A.J. (1990). Comparative protection of mice against virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* by passive transfer of immune T cells or serum. *Infect. Immun.* 58, 254-256.
6. Araya L.N., Elzer P.E., Rowe G., Enright F.M., Winter A.J. (1989). Temporal development of protective cell-mediated and humoral immunity in Balb/c mice infected with *Brucella abortus*. *J. Immunol.* 143, 3330-3337.
7. Babiuk L.A, Van Drunen Littel-Van Den Hurk, Babiuk S.L. (1999). Immunization of animals: from DNA to the dinner plate. Review. *Vet Immunol Immunopathol.* 72, 189-202.
8. Baldwin C.L., Jiang X., Fernandes D. (1993). Macrophage control of *Brucella abortus*: influence of cytokines and iron. *Trends Microbiol.* 1, 99-104.
9. Baloglu S, Toth TE, Schurig GG, Sriranganathan N, Boyle SM. (2000). Humoral immune response of BALB/c mice to a vaccinia virus recombinant expressing *Brucella abortus* GroEL does not correlate with protection against a *B. abortus* challenge. *Vet Microbiol.* 76, 193-199.
10. Baloglu S, Boyle SM, Vemulapalli R, Sriranganathan N, Schurig GG, Toth TE. (2005). Immune responses of mice to vaccinia virus recombinants expressing either *Listeria monocytogenes* partial listeriolysin or *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 protein.

Vet Microbiol. 109, 11-17

11. Beck B.L., Tabatabai L.B., Mayfiel J.E. (1990). A protein isolated from *Brucella abortus* is a Cu-Zn SOD. *Biochemistry.* 29, 372-376.
12. Berguer PM, Mundiñano J, Piazzon I, Goldbaum FA. (2006). A polymeric bacterial protein activates dendritic cells via TLR4. *J Immunol.* 176, 2366-72.
13. Blasco J.M. (1990). *Brucella ovis*. pp 351-378. In: Nielsen, K. y Duncan., J.R. (Eds.). Animal brucellosis. Boca Ratón. CRC press.
14. Blasco J.M., Gamazo C., Winter A.J., Jiménez de Bagués M. P., Marín C.M., Barberán M., Moriyón I., Alonso-Urmenet A. B., Díaz R. (1993a). Evaluation of whole cell and subcellular vaccines against *Brucella ovis* in rams. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 37, 257-270.
15. Blasco, J. M., R. Díaz. (1993b). *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine as a cause of human brucellosis. *Lancet.* 342, 805.
16. Blasco J.M. (2006). Existing and future vaccines against brucellosis in small ruminants. *Small Ruminant Research.* 62, 33-37
17. Boschiroli M.L., Cravero S.L., Arese A.I., Rossetti O.L. (1995). Construcción y caracterización de una mutante de *Brucella abortus* por inactivación de un gen que codifica para una mutante de de 26 kDa. *Arch. Vet. Med.* 26, 103-111
18. Boschiroli M.L., Cravero S.L., Arese A.I., Campos E., Rossetti O.L. (1997). Protection against infection in mice vaccinated with *Brucella abortus* mutant. *Infect. Immun.* 65, 798-800.
19. Plommet M, Bosseray N. (1984). Proposed general method of controlling the activity of *Brucella* vaccines. *Dev Biol Stand.* 56, 247-55.
20. Bosseray, N. (1991). *Brucella melitensis* Rev-1 living attenuated vaccine: stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. *Biologicals.* 19, 355-363.
21. Bowden R.A, Cloeckart A., Zygmunt M.S., Dubray G. (1995a). Outer membrane protein and rough lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies protect mice against *Brucella ovis*. *J. Med. Microbiol.* 43, 344-347.
22. Bowden, R.A., A. Cloeckart, M.S. Zygmunt., S. Bernard., G. Dubray. (1995b). Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect. Immun.* 63, 3945-3956.
23. Bowden R.A., Cloeckart A., Zygmunt M.S., Dubray G. (1998). Evaluation of immunogenicity and protective activity of the major 25 kDa outer membrane protein of *Brucella melitensis* expressed in *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 47, 39-48.
24. Bowden R.A., Estein S.M., Zygmunt M.S., Dubray G., Cloeckart A. (2000). Identification of protective outer membrane antigens of *Brucella ovis* by passive immunization of mice with monoclonal antibodies. *Microbes Infect.* 2, 481-488.
25. Bricker BJ, Tabatabai Lb, Judge BA, Deyoe B.L, Mayfield J.E. (1990). Cloning, expression, and occurrence of the *Brucella* Cu-Zn superoxide dismutase. *Infect. Immun.* 58, 2935-2939.
26. Briones G., Iñón de Iannino N., Roset M., Vigliocco A., Silva Paulo P., Ugalde R.A. (2001). *Brucella abortus* cyclic α _{1,2} glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect. Immun.* 69, 4528-4535.
27. Campos, E.; Cravero, S. L.; Delgui, L.; Mora, I.; Kahn, N.; Arese, A. I. y Rossetti, O. L. (2002). *Brucella abortus* INTA2, a novel strain 19 (Delta) *bp26::luc* (Delta) *bmp18* double mutant lacking drug resistance markers. *Vet Microbiol.* 87, 1-13.
28. Canning P. (1990). Phagocyte Function in Resistance to Brucellosis, pp. 151-163. In: L. Garry Adams (Ed.). Advances in Brucellosis Research. Texas A&M University Press, Texas.
29. Canning P.C., Deyoe B.L., Roth J.A. (1988). Opsonin dependent stimulation of

bovine neutrophil oxidative metabolism by *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 49, 160-162.

30. Cassataro J., Velikovskiy C.A., Giambartolomei G. H., Estein S.M., Bowden R. A., Bruno L., Spitz M., Fossati C. A. (2002). Immunogenicity of the *Brucella melitensis* recombinant ribosome recycling factor-homologous protein and its cDNA. *Vaccine.* 20, 1660-1669.

31. Cassataro J., Velikovskiy A., de la Barrera S., Estein S. M, Bruno L., Bowden R.A., Pasquevich K., Fossati C. A., Giambartolomei G.H. (2005a). A DNA vaccine coding for the *Brucella* outer membrane protein 31 confers protection against *B. melitensis* and *B. ovis* infection by eliciting a specific cytotoxic response. *Infect. Immun.* 73, 6537-6546.

32. Cassataro, J., Estein S., Pasquevich K., Velikovskiy C., de la Barrera S., Bowden R., Fossati C., Giambartolomei G. (2005b). Vaccination with the recombinant *Brucella* outer membrane protein 31 or a derived 27 amino acid synthetic peptide elicits a CD4+ T helper 1 response that protects against *B. melitensis* infection. *Infect. Immun.* 73: .

33. Céspedes S., Andrews E., Folch H., Oñate A. (2000). Identification and partial characterisation of a new protective antigen of *Brucella abortus*. *J Med Microbiol.* 49(2):165-70.

34. Cherwonogrodzky J.W., Dubray G., Moreno E., Mayer H. (1990). Antigens of *Brucella*, pp 19-64. In: Nielsen K. y Duncan J.R., (Eds.) Animal Brucellosis. CRC Press, Boca Raton.

35. Cheville N. F., Stevens M. G., Jensen A. E., Tatum F. M, Halling S. M. (1993). Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. *Am J Vet Res.* 54, 1591-1597.

36. Cheville N.F., Olsen S.C., Jensen A.E. (1996). Bacterial persistence and immunity in goats vaccinated with a *purE* deletion mutant or the parental 16M strain of *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.* 64, 2431-2439.

37. Cloeckaert A., Jacques I., de Wergifosse, G., Dubray G., Limet J.N. (1992). Protection against *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* in mice with immunoglobulin G (IgG), Ig and IgM monoclonal antibodies for a common epitope shared by the *Brucella* A and M smooth lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* 60, 312-315.

38. Cloeckaert A., Jacques I., Bowden R.A., Dubray G., Limet J.N. (1993). Monoclonal antibodies to rough lipopolysaccharide: characterization and evaluation of their protective effect against *Brucella abortus*. *Res. Microbiol.* 144, 475-484.

39. Cloeckaert, A., Jacques, I., Limet, J. N., Dubray, G. (1995a). Immunogenic properties of *Brucella melitensis* cell-wall fractions in BALB/c mice. *J Med. Microbiol.* 42, 200-208.

40. Cloeckaert A., Salih-Alj-Debbarth H., Saman E., Dubray G, Zygmunt M.S. (1996a). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* *bp26* gene coding for a protein immunogenic in infected sheep. *FEMS Microbiol. Lett.* 140, 139-144.

41. Cloeckaert A., Verger J.M., Grayon M., Zygmunt M.S., Vizcaíno N. (1996c). Minireview: Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *Fems Microbiol. Lett.* 145, 1-8.

42. Cloeckaert A., Vizcaino N., Paquet J-Y, Bowden R. A., Elzer P. H. (2002). Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present, and future. *Vet. Microbiol.* 90, 229-247.

43. Cloeckaert, A., Jacques, I., Grillo, M. J., Marin, C. M., Grayon, M., Blasco, J. M., Verger, J. M. (2004). Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single and double deletion mutants of the *bp26* and *omp31* genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. *Vaccine.* 22, 2827-2835.

44. Corbel M.J. y Bringley Morgan W.J. (1984). Genus *Brucella*. Pp 377-388. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Krieg N.R, Holt J.G. (Eds.), Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
45. Cravero S., Boschiroli L., Rossetti O. (1993). Inactivación and growth behavior in mice of *Brucella abortus bmp18* insertion mutant. 46th Annual Brucellosis Research Conference. Chicago, USA.
46. Crespo León F. (1994). Brucelosis ovina y caprina. Office International des Epizooties (OIE), Paris.
47. De Fays, K., Tibor, A., Lambert, C., Vinals, C., Denoel, P., De Bolle, X., Wouters, J., Letesson, J.-J., Depiereux, E. (1999). Structure and function prediction of the *Brucella abortus* P39 protein by comparative modeling with marginal sequence similarities. *Protein Eng.* 12, 217-223.
48. Deyoe BL, Dorsey TA, Meredith KB, Garrett L. (1979). Effect of reduced dosages of *Brucella abortus* strain 19 in cattle vaccinated as yearlings. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc.* 83, 92-104.
49. Diaz-Aparicio E, Hernandez L, Suarez-Guemes F. (2004). Protection against brucellosis in goats, five years after vaccination with reduced-dose *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine. *Trop Anim Health Prod.* 36, 117-121.
50. Díaz R., Léviex D. (1972). Rôle respectif en sérologie de la brucellose bovine des antigènes et de immunoglobulines G1 et G2 dans les tests d'agglutination, de Coombs et au Rose Bengale ainsi que dans le phénomène de zone. *C.R. Acad. Sci.* 274, 1503-1596. Díaz y Moriyón, 1989
51. Donnelly J.J, Liu M.A., Ulmer J.B. (2000). Antigen presentation and DNA vaccines. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, S190-S193.
52. Drabner, B., Guzman, C. A. (2001). Elicitation of predictable immune responses by using live bacterial vectors. *Biomol. Eng.* 17, 75-82.
53. Dubray G., Bézard G. (1980). Isolation of three protective cell-wall antigens of *Brucella abortus* in experimental brucellosis in mice. *Ann. Rech. Vét.* 11, 367-373.
54. Dubray G., Charriaut C. (1983). Evidence of three major polypeptide species and two major polysaccharide species on the *Brucella* outer membrane protein. *Ann. Rech. Vét.* 11, 367-373.
55. Dubray G. (1987). Protective antigens in brucellosis. *Ann. Inst.Pasteur Microbiol.* 138, 84-87.
56. Edmonds M.D., Cloeckaert A., Booth N.J. Elzer P.H. (2002a). *Brucella* species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*. *Vet. Microbiol.* 88, 205-221.
57. Edmonds M.D., Cloeckaert A., Hagius S.D., Samartino L.E., Fulton W.T., Walker J.V., Enright F.M., Booth N. J, Elzer P.H. (2002b). Pathogenicity and protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis* \square Omp25 deletion mutant. *Res. Vet. Sci.* 72, 235-239.
58. Elzer P.H., Enright F.M., MacQuiston J.R., Boyle S.M., Schurig G.G. (1998). Evaluation of a rough mutant of *Brucella melitensis* in pregnant goats. *Res Vet Sci.* 64, 259-260.
59. Enright FM. (1990). The pathogenesis and pathobiology of *Brucella* infection in domestic animals. In: Animal brucellosis, 301-320.
60. Espósito JJ, Murphy FA. (1989). Infectious recombinant vectored virus vaccines. *Adv Vet Sci Comp Med.* 33,195-247.
61. Estein S.M, Cassataro J., Vizcaino N., Zygmunt M.S., Cloeckaert A., Bowden R.A. (2003). The recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* alone or associated with rough lipopolysaccharide induces protection against *Brucella ovis* infection in BALB/c mice.

Microbes Infect. 5, 85-93.

62. Estein S.M., Cheves P.C., Fiorentino M. A., Cassataro J., Paolicchi F.A., Bowden R.A. (2004). Immunogenicity of recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* in rams and serum bactericidal activity against *B. ovis*. *Vet. Microbiol.* 102, 203-213.

63. Estevan M, Gamazo C, Grillo MJ, Del Barrio GG, Blasco JM, Irache JM. (2006). Experiments on a sub-unit vaccine encapsulated in microparticles and its efficacy against *Brucella melitensis* in mice. *Vaccine*. En prensa.

64. Eze M.O, Yuan L, Crawford R.M, Paranaivitana C.M, Hadfield T.L, BhattaCharjee A.K, Warren R.L, Hoover D.L. (2000). Effects of opsonization and gamma interferon on growth of *Brucella melitensis* 16M in mouse peritoneal macrophages *in vitro*. *Infect. Immun.* 68, 257-63.

65. Fernández, D. M.; Benson, R. y Baldwin, C. L. (1995). Lack of a role for natural killer cells in early control of *Brucella abortus* 2308 infections in mice. *Infect Immun.* 63, 4029-4033.

66. Fernández Prada C.M., Nikolich M., Vemulapalli R., Sriranganathan N., Boyle S.M., Schurig G.G., Hadfield T.L., Hoover D.L. (2001). Deletion of *who* enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.* 69, 4407-4416.

67. Gamazo, C., A.J. Winter, I. Moriyón, J.I. Riezu-Boj, J.M. Blasco., R. Díaz. (1989). Comparative analyses of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.* 57, 1419-1426.

68. Golding B, Scott DE, Scharf O, Huang LY, Zaitseva M, Lapham C, Eller N, Golding H. (2001). Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect.* 3, 43-48.

69. Gómez Miguel M.J., Moriyón I. (1986). Demonstration of a peptidoglycan-linked lipoprotein and characterization of its trypsin fragment in the outer membrane of *Brucella* spp. *Infect. Immun.* 53, 678-684.

70. Gómez-Miguel M.J., Moriyón I., López J. (1987). *Brucella* outer membrane lipoprotein shares antigenic determinants with *Escherichia coli* Braun lipoprotein and its exposed on the cell surface. *Infect Immun.* 55, 258-262.

71. Gonzalez-Smith A, Vemulapalli R, Andrews E, Onate A. (2006). Evaluation of *Brucella abortus* DNA vaccine by expression of Cu-Zn superoxide dismutase antigen fused to IL-2. *Immunobiology* 211, 65-74.

72. Guilloteau L.A., Laroucau K., Vizcaíno N., Jacques I., Dubray G. (1999). Immunogenicity of recombinant *Escherichia coli* expressing the *omp31* gene of *Brucella melitensis* in BALB/c mice. *Vaccine*. 17, 353-361.

73. Guranathan S, Klinman D.M, Seder RA. (2000a). DNA vaccines: immunology, application, and optimization. Review. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 927-74.

74. Guranathan S, Wu C.Y, Freidag B.L, Seder R.A. (2000b). DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. Review. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 442-7.

75. Hsieh CS, Macatonia SE, O-Garra A, Murphy KM. (1993). Pathogen-induced Th1 phenotype development in CD4+ alpha beta-TCR transgenic T cells is macrophage dependent. *Int. Immunol.* 5, 371-82.

76. Inoue S., Golding B., Scott D. (2005). Programming of CTL with heat-killed *Brucella abortus* and antigen allows soluble antigen alone to generate effective secondary CTL. *Vaccine*. 23, 1730-1738.

77. Izadjoo MJ, Bhattacharjee AK, Paranaivitana CM, Hadfield TL, Hoover DL. (2004). Oral vaccination with *Brucella melitensis* WR201 protects mice against intranasal challenge with virulent *Brucella melitensis* 16M. *Infect Immun.* 72, 4031-4039.

78. Jacques I., Olivier-Bernardin V., Dubray G. (1991). Induction of antibody and protective responses in mice by *Brucella* O-polysaccharide-BSA conjugate. *Vaccine*. 9,

896-900.

79. Jacques I., Cloeckaert A., Limet J.N., Dubray G. (1992). Protection conferred on mice by combinations of monoclonal antibodies directed against outer-membrane proteins or smooth lipopolysaccharide of *Brucella*. *J. Med. Microbiol.* 37,100-103.
80. Jiang X., Baldwin C.L. (1992). Effect of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 61, 124-129.
81. Jiang X.; Leonard, B., Benson R., Baldwin C. L. (1993). Macrophage control of *Brucella abortus*: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide. *Cell Immunol.* 151, 309-319.
82. Jiménez de Bagués M.P., Elzer P.H., Blasco J.M., Marín C.M., Gamazo C., Winter A.J. (1994). Protective immunity to *Brucella ovis* in Balb/c mice following recovery from primary infection or immunization with subcellular vaccines. *Infect. Immun.* 62, 632-638.
83. Jones S.M., Winter A.J. (1992). Survival of virulent and attenuated strains of *Brucella abortus* in normal and gamma interferon-activated murine peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 60, 3011-3014.
84. Kittelberger R., Hilbink F., Hansen M.F., Ross G.P., De Lisle G.W., Cloeckaert A., Bruyn J. (1995b). Identification and characterization of immunodominant antigens during the course of infection with *Brucella ovis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 210-218.
85. Kittelberger R., Diack D.S., Vizcaíno N., Zygmunt M.S., Cloeckaert A. (1998b). Characterization of an immuno-dominant antigen in *Brucella ovis* and evaluation of its use in an enzyme linked immunosorbent assay. *Vet. Microbiol.* 59, 2-3.
86. Ko, J., Splitter, G. A. (2003). Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 65-78.
87. Kunkle, R. A.; Steadham, E. M., Cheville, N. F. (1995). Morphometric analysis of CD4+, CD8+, and gamma/delta+ T-lymphocytes in lymph nodes of cattle vaccinated with *Brucella abortus* strains RB51 and 19. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 49, 271-279.
88. Kurar E., Splitter G. A. (1997). Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicits immune response. *Vaccine.* 15,1851-1857.
89. Laplagne, D. A., Zylberman, V., Ainciart, N., Steward, M. W., Sciutto, E., Fossati, C. A., Goldbaum, F. A. (2004). Engineering of a polymeric bacterial protein as a scaffold for the multiple display of peptides. *Proteins.* 57, 820-828.
90. Leclercq S., Harms J. S., Rosinha G. M., Azevedo, V. y Oliveira, S. C. (2002). Induction of a Th1-type of immune response but not protective immunity by intramuscular DNA immunisation with *Brucella abortus* GroEL heat-shock gene. *J Med Microbiol.* 51, 20-26.
91. Limet J.N., Plommet A.M. Dubray G., Plommet M. (1987). Immunity conferred upon mice by anti-LPS monoclonal antibodies in murine brucellosis. *Ann. Inst. Pasteur/ Immunol.* 138, 417-424.
92. Lin J., Adams L.G., Ficht T.A. (1996). Immunological response to the *Brucella abortus* GroEL homolog. *Infect. Immun.* 64, 4396-4400.
93. Mayfield JE, Bricker BJ, Godfrey H, Crosby RM, Knight DJ, Halling SM, Balinsky D, Tabatabai LB. (1988). The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein. *Gene.* 63,1-9.
94. Mielke, M.E.A. (1991). T-cell subsets on granulomatous inflammation and immunity to *L. monocytogenes* and *Brucella abortus*. *Behring Inst. Mitt.* 88, 99-111.
95. Minas A. (2006). Control and eradication of brucellosis in small ruminants. *Small Ruminant Research.* 62, 101-107
96. Moreno E., Pitt M.W., Jones L.M., Schurig G.G., Berman D.T. (1979). Purification and characterization of smooth and rough lipopolysaccharides from *Brucella abortus*. *J. Bacteriol.* 138, 361-369.

97. Moreno E., Berman D.T., Boettcher L.A. (1981). Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* 31, 362-370.
98. Moreno E., Jones L.M., Berman D.T. (1984). Immunochemical characterization of rough *Brucella* lipopolysaccharides. *Infect Immun.* 43, 779-82.
99. Moreno, E.; Cloeckert, A., Moriyon, I. (2002). *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.* 90, 209-227.
100. Moriyon, I., Grillo, M. J.; Monreal, D., Gonzalez, D., Marin, C., Lopez-Goni, I., Mainar-Jaime, R. C., Moreno, E., Blasco, J. M. (2004). Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet. Res.* 35, 1-38.
101. Muñoz PM, Estevan M, Marin CM, Jesus De Miguel M, Jesus Grillo M, Barberan M, Irache JM, Blasco JM, Gamazo C. (2005). *Brucella* outer membrane complex-loaded microparticles as a vaccine against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine, en prensa.*
102. Muñoz-Montesino, C., Andrews, E., Rivers, R., Gonzalez-Smith, A., Moraga-Cid, G., Folch, H., Cespedes, S., Oñate, A. A. (2004). Intraspleen delivery of a DNA vaccine coding for superoxide dismutase (SOD) of *Brucella abortus* induces SOD-specific CD4+ and CD8+ T cells. *Infect Immun.* 72, 2081-2087.
103. Murillo M., Grilló M.J., Reñé J., Marín C.M., Barberán M., Goñi M.M., Blasco J.M., Irache J.M., Gamazo C. (2001). A *Brucella ovis* antigenic complex bearing poly-caprolactone microparticles confers protection against experimental brucellosis en mice. *Vaccine.* 19, 4099-4106.
104. Nicoletti P. (1990). Vaccination against *Brucella*, pp. 147-168. In: Bacterial vaccines Alan Liss, Inc., New York.
105. Muzny DM, Ficht TA, Templeton JW, Adams LG. (1989). DNA homology of *Brucella abortus* strains 19 and 2308. *Am J Vet Res.* 50, 655-61.
106. Nicoletti, P. (1993). The eradication of brucellosis in animals. *Saudi Med. J.* 14, 288-292.
107. Oliveira, S. C.; Zhu, Y. y Splitter, G. A. (1994). Recombinant L7/L12 ribosomal protein and gamma-irradiated *Brucella abortus* induce a T-helper 1 subset response from murine CD4+ T cells. *Immunology.* 83, 659-664.
108. Oliveira, S. C., Splitter, G. A. (1995). CD8+ type 1 CD44hi CD45 RBlo T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice. *Eur J Immunol.* 25, 2551-2557.
109. Oliveira S.C. , Harms J.S., Banai M., Splitter G.A. (1996a). Recombinant *Brucella abortus* proteins that induce proliferation and gamma-interferon secretion by CD4/ T cells from *Brucella*-vaccinated mice and delayed-type hypersensitivity in sensitized guinea pigs. *Cell. Immunol.* 172, 262-268.
110. Oliveira S.C., Splitter G.A. (1996b). Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. *Vaccine.* 14, 959-962.
111. Olsen SC, Stoffregen WS. (2005). Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. *Expert Rev Vaccines.* 4, 915-928.
112. Oñate, A. A.; Cespedes, S.; Cabrera, A.; Rivers, R.; Gonzalez, A.; Munoz, C.; Folch, H., Andrews, E. (2003). A DNA vaccine encoding Cu,Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun.* 71, 4857-4861.
113. Pardon P. (1977). Resistance against subcutaneous *Brucella* challenge of mice immunized with living or dead *Brucella* or by transfer of immune serum. *Ann. Immunol. Inst. Pasteur.* 128C, 1025-1037.
114. Pavlov H., Hogart M.I., Mckenzie F.C., Cheers C. (1982). *In vivo* and *in vitro* effects of monoclonal antibody to Ly antigens on immunity to infection. *Cell Immunol.* 71,

127-138.

115. Bascoul S., Cannat A., Huguet M.F., Serre A. (1978). Studies on the immune protection to murine experimental brucellosis conferred by *Brucella* fractions. I. Positive role of immune serum. *Immunology*. 35, 213-221.

116. Plommet M., Plommet A.M. (1983). Immune serum mediated effects on brucellosis evolution in mice. *Infect. Immun.* 41, 97-105.

117. Plommet M. (1987a). Brucellosis and immunity: humoral and cellular components in mice. *Ann. Inst.Pasteur Microbiol.* 138, 105-109.

118. Plommet M., Serre A., Fensterbank R. (1987b). Vaccines, vaccination in brucellosis. *Ann. Inst.Pasteur Microbiol.* 138, 117-121.

119. Plommet M. (1990). Killed vaccines in cattle: current situation and perspectives, pp 215-227. *In: Advances in brucellosis research.* L.G. Adams (Ed.) Texas A & M University Press, College Station.

120. Ralston D.J., Elberg S.S. (1969). Serum-mediated immune cellular responses to *Brucella melitensis* Rev. 1. II restriction of *Brucella* by immune sera and macrophages. *J. Reticuloendothel. Soc.* 6, 109-139.

121. Renoux G. (1957). Etudes sur la brucellose ovine et caprine. XII Comparaison, chez le cobaye et la souris de vaccins contre l'infection par *B. melitensis*. *Arch Inst Pasteur Tunis.* 34, 19-27.

122. Renoux G. (1958). Etudes sur la brucellose ovine et caprine. XX Vaccination des brebis contre l'infection à *Brucella melitensis*. Comparaison de 3 vaccins. *Arch. Inst. Pasteur Tunis.* 35, 251-274.

123. Riezu Boj J.I., Moriyón I., Blasco J.M., Marín C.M., Díaz R. (1986). Comparison of lipopolysaccharide and outer membrane protein- lipopolysaccharide extracts in an enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection. *J. Clin. Microbiol.* 23, 938-942.

124. Robinson A., Melling J. (1993). Envelope structure and the development of new vaccines. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 43S-51S.

125. Roop R.M., Fletcher T.W., Sriraganathan S.M., Boyle S.M., Schurig G.G. (1994). Identification of an immunoreactive *Brucella abortus* HtrA stress response protein Homolog. *Infect. Immun.* 62, 1000-1007.

126. Rosinha, G. M.; Myioshi, A.; Azevedo, V.; Splitter, G. A. y Oliveira, S. C. (2002). Molecular and immunological characterisation of recombinant *Brucella abortus* glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, a T- and B-cell reactive protein that induces partial protection when co-administered with an interleukin-12-expressing plasmid in a DNA vaccine formulation. *J Med Microbiol.* 51, 661-671.

127. Rossetti O.L., Arese A.I., Boschiroli M.L., Cracero S.L. (1996). Cloning of *Brucella abortus* gene and characterization of expressed 26-kDa periplasmic protein: potential use for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 34, 165-169.

128. Saegerman C., Weynants V., Vo T.K-0., De Waele L., Tibor A., Denoel PH. A., Godfroid J., Michel P., Saman E., Letesson J-J., Limet J.N. (1994). Evaluation de l'activité protectrice de la fraction de la paroi de *Brucella* insoluble dans le SDS et identification d'antigènes de *Brucella* utilisables pour le diagnostic, pp. 221-233. *In: Biotechnologies du diagnostic é de la prevention des maladies animales.* AUPELF-URELF. John Libbey Eurotext. Paris.

129. Schödel, F. (1992). Recombinant avirulent *Salmonellae* as oral vaccine carriers. *Infection.* 20, 1-8.

130. Schurig, G. G., N. Sriranganathan, and M. J. Corbel. (2002). Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet. Microbiol.* 90, 479-496.

131. Schurig, G. G., Roop R.M., Bagchi T., Boyle S., Sriranganathan N. (1991).

Biological properties of RB51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* 28, 171-188.

132. Sciutto, E.; Toledo, A.; Cruz, C.; Rosas, G.; Meneses, G.; Laplagne, D.; Ainciart, N.; Cervantes, J.; Fragoso, G. y Goldbaum, F. A. (2005). *Brucella* spp. lumazine synthase: a novel antigen delivery system. *Vaccine.* 23, 2784-2790.

133. Serre A. (1989). Immunology and pathophysiology of human brucellosis, pp 85. *In: Brucellosis Clinical and Laboratory Aspects.* Young EJ y Corbel MJ. (Eds.). CRC Press.

134. Spector W.G., Reichhold N, Ryan G.B. (1973). Degradation of granuloma - inducing microorganisms by macrophages. *J. Pathol.* 103, 339.

135. Stabel TJ, Mayfield JE, Tabatabai LB, Wannemuehler MJ. (1990). Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium* containing a recombinant plasmid which codes for production of a 31-kilodalton protein of *Brucella abortus*. *Infect Immun.* 58, 2048-55.

136. Stabel TJ, Mayfield JE, Morfitt DC, Wannemuehler MJ. (1993). Oral immunization of mice and swine with an attenuated *Salmonella choleraesuis* [delta cya-12 delta(crp-cdt)19] mutant containing a recombinant plasmid. *Infect Immun.* 61, 610-618.

137. Stabel T. J., Sha Z. Mayfield J.E. (1994). Periplasmic location of *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase. *Vet. Microbiol.* 38, 307-314.

138. Stevens M.G., Pugh Jr. G.W., Tabatabai L.B. (1992). Effects of gamma interferon and indomethacin in preventing *Brucella abortus* infections in mice. *Infect. Immun.* 60, 4407-4409.

139. Sulitzeanu, D. (1955). Mechanism of immunity against *Brucella*. *Nature.* 205, 1086-1088.

140. Tabatabai L.B., Pugh G.W. (1994). Modulation of immune responses in BALB/c mice vaccinated with *Brucella abortus* Cu-Zn superoxide dismutase synthetic peptide vaccine. *Vaccine.* 12, 919-924.

141. Tang D.C., Devit M., Johnston S.A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 356, 152-154.

142. Toth, T. E.; Cobb, J. A.; Boyle, S. M.; Roop, R. M., Schurig, G. G. (1995). Selective humoral immune response of Balb/C mice to *Brucella abortus* proteins expressed by vaccinia virus recombinants. *Vet Microbiol.* 45, 171-183.

143. Ugalde J.E., Comerci D.J., Leguizamón M.S., Ugalde R.A. (2003). Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucomutase (*pgm*) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. *Infect Immun.* 2003 71, 6264-6269.

144. Velikovskiy, C. A., J. Cassataro, G. H. Giambartolomei, F. A. Goldbaum, Estein S.M., Bowden R. A., Bruno L., Fossati C. A., Spitz M.. (2002). A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun.* 70, 2507-2511.

145. Velikovskiy, C. A., F. A. Goldbaum, J. Cassataro, S. Estein, R. A. Bowden, L. Bruno, C. A. Fossati, and G. H. Giambartolomei. (2003). *Brucella* lumazine synthase elicits a mixed Th1-Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with *Brucella*. *Infect Immun.* 71, 5750-5755.

146. Vemulapalli R., Duncan A.J., Boyle S.M., Toth T.E., Shurig G.G. (1998). Cloning and sequencing of *yajC* and *secD* homologs of *Brucella abortus* and demonstration of immune responses to YajC in mice vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Infect. Immun.* 66, 5684-5691.

147. Vemulapalli, R., S. Cravero, C. L. Calvert, T. E. Toth, N. Sriranganathan, S. M. Boyle, O. L. Rossetti, G. G. Schurig. (2000). Characterization of specific immune responses of mice inoculated with recombinant vaccinia virus expressing an 18-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 7, 114-118.

148. Verger, J. M., Grayon, M., Zundel, E., Lechopier, P., Olivier-Bernardin V. (1995). Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against a *Brucella melitensis* experimental infection in pregnant ewes. *Vaccine*. 13, 191-196.
149. Verstrete D.R., Creasy M.T., Caveney N.T., Baldwin C.L., Blab M.W., Winter A.J. (1982). Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: Isolation and characterization. *Infect. Immun.* 35, 979-989.
150. Vitas, A. I.; Diaz, R., Gamazo, C. (1995). Protective effect of *Brucella* outer membrane complex-bearing liposomes against experimental murine brucellosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 130, 231-236.
151. Vizcaíno N., Verger J.M., Grayon M., Zygmunt M.S., Cloeckert A. (1997). DNA polymorphism at the *omp31* locus of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers. *Microbiology*. 143, 2913-2921.
152. Winter, A. J., G. E. Rowe. (1988). Comparative immune response to native cell envelope antigens and hot sodium dodecyl sulfate insoluble protein (PG) of *Brucella abortus* in cattle and mice. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 18, 149-163.
153. Winter AJ, Duncan JR, Santisteban CG, Douglas JT, Adams LG. (1989). Capacity of passively administered antibody to prevent establishment of *Brucella abortus* infection in mice. *Infect. Immun.* 57, 3438-3444.
154. Wyckoff J. H. 3rd, Howland J.L., Confer A.W. (1993). Comparison of *Brucella abortus* antigen preparations for in vitro stimulation of immune bovine T-lymphocyte cell lines. *Vet Immunol Immunopathol.* 36: 45-64.
155. Wyckoff, J. H., 3rd. (2002). Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet Microbiol.* 90, 395-415.
156. Xin, X. (1986). Orally administrable brucellosis vaccine: *Brucella suis* strain 2 vaccine. *Vaccine*. 4, 212-216.
157. Young E.J., Borchert M., Kretzertf L., Musher D.M. (1985). Phagocytosis and killing of *Brucella* by human polymorphonuclear leukocyte. *J. Infect. Dis.* 151, 682-688.
158. Zhan Y, Cheers C. (1993). Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect. Immun.* 61, 4899-4901.
159. Yang X, Hudson M, Walters N, Bargatze RF, Pascual DW. (2005). Selection of protective epitopes for *Brucella melitensis* by DNA vaccination. *Infect Immun.* 73, 7297-303.
160. Zhan Y, Cheers C. (1995). Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. *Infect Immun.* 63, 1387-1390.
161. Zygmunt, M. S., Debarh, H. S., Cloeckert, A. , Dubray G. (1994). Antibody response to *Brucella melitensis* outer membrane antigens in naturally infected and Rev1 vaccinated sheep. *Vet. Microbiol.* 39, 33-46.

Trabajo recibido el 23/02/2006, nº de referencia 050601_RED.VET. Enviado por su autor. Publicado en [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®](#), ISSN 1695-7504 el 01/05/06.

[Veterinaria.org®](#) - [Comunidad Virtual Veterinaria.org®](#) - Veterinaria Organización S.L.®

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con Veterinaria.org – <http://www.veterinaria.org/> y [REDVET®](#) <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y se cumplan los requisitos indicados en [Copyright](#) 1996 -2006