

Evaluación de un modelo de infección murino para la evaluación de vacunas homólogas y heterólogas contra *Brucella canis*

Evaluation of a mouse infection model to evaluate homologue and heterologue vaccines against *Brucella canis* in mouse model

Clausse, M.^{1,2}; Estein, S.M.^{1,3}

¹Laboratorio de Inmunología, Departamento de Sanidad Animal y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Pinto 399 (7000) Tandil, Buenos Aires, Argentina, ²Becaria ANPCYT, ³Investigador Adjunto CONICET.

RESUMEN

La brucelosis canina es una enfermedad zoonótica que afecta a los caninos y provoca importantes pérdidas económicas en criaderos. En la actualidad, no existe una vacuna para la prevención de esta enfermedad. Una limitante en el desarrollo de una vacuna eficaz es la falta de un modelo experimental que permita evaluar la infección con *Brucella canis*. En este trabajo, se desarrolló un modelo ratón para evaluar la infección esplénica por *B. canis* empleando distintas dosis, tiempos de sacrificio y vías de inoculación. Además, se ensayaron inmunógenos homólogos (*B. canis* inactivada) y heterólogos (*B. ovis* inactivada y viva) como potenciales vacunas control. Las bacterinas fueron formuladas en Marcol 52, Montanide o Quil A. La inoculación de 10^6 - 10^7 UFC (unidades formadoras de colonias) de *B. canis* por las vías intraperitoneal o intravenosa no mostró diferencias en la carga bacteriana esplénica. El recuento de UFC en bazo fue similar cuando los ratones se sacrificaron a 14, 21 o 30 días post-inoculación. *B. ovis* PA76250 viva confirió el mejor nivel de protección contra *B. canis* mientras que una protección menor, pero significativa, fue obtenida cuando se administró la bacterina *B. canis* M- formulada en Marcol 52 o Montanide. Los resultados obtenidos indican que el modelo ratón es adecuado para evaluar, en el futuro, la eficacia de potenciales inmunógenos contra la brucelosis canina.

Palabras clave: (*Brucella canis*), (modelo ratón), (vacunas controles), (brucelosis canina).

Correspondencia e-mail: Silvia M. Estein silmares@vet.unicen.edu.ar

Recibido: 11-09-2011

Aceptado: 23-11-2011

SUMMARY

The development of an effective vaccine against brucellosis is a research area of much interest since there is no available vaccine against canine brucellosis. One limitation in testing any immunization strategy is the lack of a suitable laboratory animal that is permissive to the infection. In this work, a mouse model was developed to study splenic *B. canis* RM6/66 infection using different doses, times of sacrifice and inoculation routes. In addition, homologous (*B. canis* M- bacterin) and heterologous (live or *B. ovis* bacterin) rough whole cell vaccines were evaluated as potential control vaccines. Bacterins were formulated in Marcol 52, Montanide or Quil A. The evolution of *B. canis* infection in the spleen of mice inoculated by i.p. or i.v. route was similar when 10^6 - 10^7 CFU (colony forming unit) were administered. Using these doses and routes, similar spleen bacterial burden was found in mice sacrificed at 14, 21 and 30 days after inoculation. The best protection was conferred by live *B. ovis* while a lower but significant protection was observed in groups vaccinated with *B. canis* M- bacterin formulated in Marcol 52 or Montanide. These results indicate that mouse model is adequate to evaluate potential vaccines against canine brucellosis.

Key words: (*Brucella canis*), (mouse model), (control vaccines), (canine brucellosis).

INTRODUCCIÓN

Brucella canis (*B. canis*) es el agente etiológico específico de la brucelosis canina, enfermedad reproductiva que provoca infertilidad en los caninos machos y abortos en las hembras, además de trastornos osteoarticulares. Esta enfermedad está ampliamente distribuida a nivel mundial y ocasiona importantes pérdidas económicas en criaderos⁸. Además, desde el punto de vista de la Salud Pública, constituye una zoonosis importante. En efecto, en Argentina, el 1% de los aislamientos en humanos corresponden a *B. canis*¹⁰.

El control sanitario se ve dificultado por el curso asintomático de esta enfermedad y por la falta de implementación del diagnóstico serológico pre-servicio como rutina. Actualmente, el control de la brucelosis canina se apoya en la detección de los animales infectados mediante el examen clínico, el serodiagnóstico y el cultivo bacteriológico para confirmar la infección. Desafortunadamente, el diagnóstico definitivo no siempre es factible y un resultado negativo no confirma la ausencia de infección¹¹. El animal infectado debe castrarse, tratarse con antibióticos y controlarse mediante una evaluación serológica periódica,

ya que el tratamiento no asegura la eliminación completa de la bacteria⁴. Por otro lado, la terapia es prolongada, costosa y no evita la esterilización, con la consecuente pérdida de reproductores de raza de alto valor económico¹³.

No existe hasta el momento una vacuna disponible contra la brucelosis canina y la inmunoprevención de esta enfermedad es un área temática que no ha sido suficientemente explorada⁶. En la situación epidemiológica actual, sería interesante contar con una vacuna que induzca una inmunidad protectora sin provocar respuestas serológicas que interfieran en el diagnóstico serológico. En caninos, se ha descrito el empleo de la cepa atenuada *B. canis* escasamente mucoide (M-) la cual no confirió una protección significativa y además, indujo una respuesta serológica indistinguible de la infección con la cepa salvaje⁴. Por otro lado, esta cepa es patógena para el humano¹² y puede generar una bacteriemia persistente en caninos⁴.

Dado que una de las limitantes para la evaluación de vacunas contra *B. canis* ha sido la falta de un modelo experimental de laboratorio para esta especie, el objetivo principal del presente estudio fue evaluar la infección con *B. canis* en el modelo ratón y la protección conferida por inmunógenos elaborados con

cepas rugosas homólogas y heterólogas contra *B. canis* para su potencial empleo como vacunas control en futuros ensayos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se emplearon ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad provenientes del Bioterio de la Universidad de Buenos Aires. Los animales se distribuyeron al azar en los distintos grupos de experimentación una semana antes de la inoculación o inmunización y permanecieron alojados en una unidad ventilada con aire filtrado y presión negativa aislada del exterior, bajo condiciones de luz y temperatura controladas recibiendo agua y alimentación *ad libitum* (Bioterio, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires). Todos los protocolos experimentales se realizaron bajo las normas de cuidado y bienestar establecidas por la Comisión de Bioética y Bioseguridad de la F.C.V., U.N.C.P.B.A (Acta 087/02, F.C.V., U.N.C.P.B.A, Tandil, Argentina; <http://www.vet.unicen.edu.ar>).

Bacterias

Se utilizaron las cepas de referencia de *B. canis* y *B. ovis* pertenecientes a nuestra colección. *B. canis* RM6/66 fue empleada como cepa desafío mientras que la cepa *B. canis* menos mucoide (M-), *B. ovis* REO198 y *B. ovis* PA76250 se utilizaron para la preparación de los inmunógenos.

Las cepas de *B. canis* se cultivaron en agar Brucella (BD, Francia) durante 48 h. a 37°C. *B. ovis* REO198 se cultivó en Agar Tripteína Soya suplementado con 0,5 % de extracto de levadura (TSAYE) (Britania, Argentina) y 5% de suero equino durante 72 h. a 37°C. El cultivo de *B. ovis* PA76250 se realizó en el mismo medio y tiempo de incubación en presencia de 5% de CO₂ ².

Los cultivos de cada bacteria fueron cosechados con solución salina estéril (SSE) y las suspensiones se ajustaron espectrofotométricamente a la

concentración deseada teniendo en cuenta que una absorbancia de 0,165 a $\lambda=600$ nm equivale aproximadamente a 10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml. La dosis exacta inyectada o inoculada fue determinada por recuento retrospectivo de las colonias mediante diluciones y diseminación en medio de cultivo adecuado⁵.

Para incrementar la virulencia de *B. canis* RM6/66, se realizaron dos pasajes seriados de la cepa por ratón con la posterior recuperación de la misma a partir del bazo. La cepa reaislada fue empleada en todos los experimentos desarrollados⁵.

Inmunógenos y adyuvantes

Para la obtención de las bacterinas, las suspensiones de las cepas de *B. canis* y *B. ovis* REO 198 se ajustaron a una concentración de 10¹⁰ UFC/ml y se inactivaron a 60°C durante 60 min. Cada bacterina fue emulsificada en Marcol 52 (gentilmente cedido por Biogénesis, Argentina) suplementado con 10% de Arlacel (Sigma, EEUU), con Montanide IMS3012 VGPR (Seppic, Francia) coo QUIL A (Brenntag Biosector, Dinamarca) mediante el empleo de vórtex. La cepa *B. ovis* PA76250 viva fue empleada como inmunógeno en una concentración de 10⁹ UFC/ml.

Cuantificación del número de bacterias en el bazo

Los ratones fueron sacrificados en los tiempos señalados para cada experimento mediante intoxicación con anestesia. Los bazos fueron extirpados quirúrgicamente, colocados en sendas bolsas de polipropileno estériles y conservados a -20°C hasta su procesamiento. El número de UFC se estimó realizando diluciones seriadas de cada homogenato y sembrando en medio adecuado⁵. El recuento de UFC se efectuó a los 3 y 5 días de incubación para *B. canis* o *B. ovis*, respectivamente. Cuando no hubo desarrollo de colonias se consideró un número de 5 bacterias por placa⁷. Los resultados fueron expresados como la media \pm desvío estándar por grupo normalizando los datos según la expresión

$x = \log(x/\log x)$ para su análisis por pruebas paramétricas.

En el ensayo de protección, para diferenciar la cepa desafío *B. canis* RM6/66 de *B. ovis* PA76250 (empleada como inmunógeno) se realizó el recuento diferencial en medio de cultivo en presencia o ausencia de CO₂, condiciones en las que crecen ambas cepas o sólo *B. ovis* PA76250, respectivamente.

Diseño experimental

Experimento I. Para comparar el nivel de infección esplénica obtenido se distribuyeron 36 ratones en 6 grupos (n=6) y se inocularon intraperitonealmente (i.p.) con 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶ y 10⁷ UFC de *B. canis* RM6/66 (0,2 ml/ratón). Los ratones fueron sacrificados a los 30 días post-inoculación (p.i.) y los bazos se procesaron como se describió anteriormente.

Experimento II. Se emplearon 18 ratones separados en 3 grupos (n=6) para comparar el grado de infección esplénica obtenido utilizando tres dosis de inoculación de *B. canis* RM6/66 (10⁵, 10⁶ y 10⁷ UFC en 0,2 ml/ratón) utilizando dos vías de inoculación distintas (i.p. e i.v.).

Experimento III. Se distribuyeron 24 ratones en 2 grupos (n=12) para determinar el tiempo de sacrificio más adecuado a emplear en el ensayo de protección. Cada grupo fue inoculado con 10⁶ o 10⁷ UFC (0,2 ml/ratón) de *B. canis* RM6/66 por la vía i.p. Tres ratones de cada grupo fueron sacrificados a los 7, 14, 21 y 30 días p.i. El número de UFC/bazo fue calculado como se describió previamente.

Experimento IV. Cuarenta ratones fueron distribuidos en 8 grupos (n=5) para evaluar la protección conferida por los inmunógenos homólogos y heterólogos contra *B. canis* RM6/66. Seis grupos fueron inmunizados por la vía subcutánea (s.c.) con las bacterinas *B. canis* (1,5 x 10⁹ UFC) o *B. ovis* REO198 (1,0 x 10⁹ UFC) formuladas en cada uno de los tres adyuvantes mencionados. Las bacterinas se administraron en dos oportunidades separadas por un intervalo de 30 días. *B. ovis* PA76250 (inmunógeno vivo) fue administrada vía s.c.

(1x10⁹UFC/0,2ml/ratón) en una ocasión. Además, se incluyó un grupo no inmunizado inyectado con SSE (control negativo). Treinta días post-última inmunización todos los ratones fueron desafiados vía i.p con 10⁶ UFC de *B. canis* RM6/66 (0,2 ml/ratón). Treinta días post-desafío los ratones fueron sacrificados y sus bazos procesados como ya se ha descrito.

Análisis estadístico

Los valores de UFC fueron normalizados por transformación logarítmica y los resultados expresados como el promedio de los logaritmos de las UFC ± DE/grupo. Para el ensayo de protección se realizó ANOVA seguido del test de Dunnett. Se empleó el programa estadístico del GraphPad Prism (versión 5.0, GraphPad, San Diego, CA).

RESULTADOS

Efecto dosis de inoculación -infección esplénica

Los resultados obtenidos cuando los ratones fueron inoculados vía i.p. con diferentes dosis de *B. canis* mostraron que el número de bacterias/bazo aumentó cuando la dosis empleada fue superior a 1,2 x 10⁴ UFC (Figura 1). En las dosis más altas (1,2 x 10⁵, 1,2 x 10⁶, 1,2 x 10⁷) el recuento de UFC entre los grupos se mantuvo constante y homogéneo, mientras que no se aislaron colonias al administrarse la dosis más baja (1,2 x 10²). Por el contrario, se registró una gran disparidad en la carga bacteriana cuando se inocularon dosis de 1,2 x 10³ a 1,2 x 10⁵ UFC. En efecto, dentro de estos grupos hubo animales que no se infectaron mientras que otros mostraron un nivel de infección esplénica similar al de los grupos inoculados con las dosis mayores (Figura 1).

Los bazos de los ratones inoculados con las dosis más altas (1,2 x 10⁶ o 1,2 x 10⁷ UFC) registraron el doble del peso respecto de los grupos infectados con las dosis más bajas.

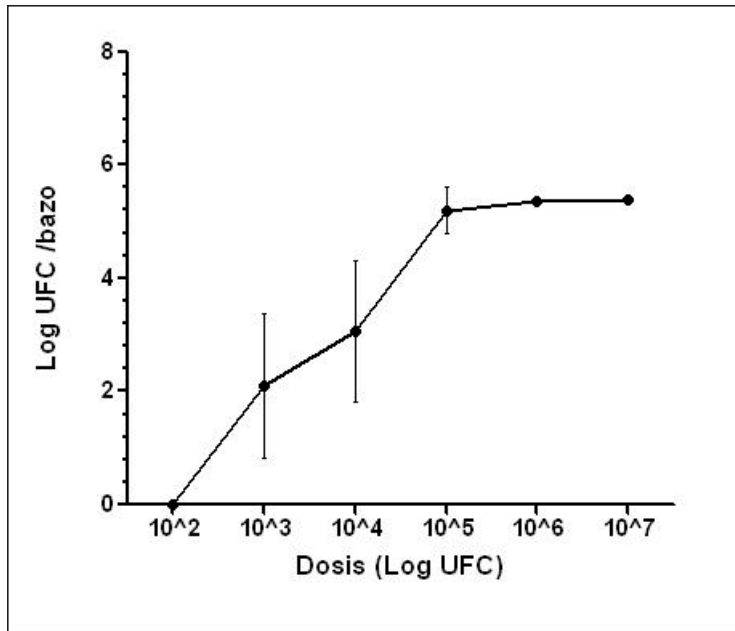


Figura 1. Carga bacteriana en bazo de ratones BALB/c luego de la infección intraperitoneal con distintas dosis de *B. canis* RM6/66 y sacrificados a los 30 días postinfección.

Efecto vía de la inoculación – infección esplénica

No se observaron diferencias significativas en la carga bacteriana esplénica a los 30 días p.i. cuando los ratones fueron inoculados con distintas dosis (10⁵, 10⁶, 10⁷) y empleando las vías i.p. o i.v. (datos no mostrados).

Efecto tiempo de sacrificio- infección esplénica

La evolución de la infección tras la inoculación por cualquiera de las dos vías se observa en la Figura 2. No se aislaron UFC del bazo a los 7 días, mientras que el recuento de UFC aumentó significativamente a los 14 días y se mantuvo constante en los otros puntos evaluados (21 y 30 días).

Ensayo de protección

Se evaluó el grado de protección conferido por los inmunógenos homólogos y heterólogos contra *B. canis* RM6/66. La protección fue definida como la diferencia entre el número de

bacterias en cada uno de los grupos inmunizados y el control no inmunizado. La eficacia de la vacunas se expresó en unidades logarítmicas de protección.

Los resultados obtenidos mostraron que la cepa viva *B. ovis* PA76250 confirió el mayor nivel de protección respecto del grupo no inmunizado (2,08 log de protección; $P < 0,001$). Por otro lado, la bacterina *B. canis* M- formulada en Marcol 52 o en Montanide IMS3012 VG PR redujo significativamente el n° de UFC aunque en menor nivel que *B. ovis* PA76250 (1,31 y 1,19 log, respectivamente). En contraposición, esta bacterina formulada en Quil A y *B. ovis* REO 198 inactivada no protegieron (Tabla 1).

Respecto del peso de los bazos, la infección del grupo control con *B. canis* produjo una esplenomegalia moderada (promedio = 0,24 g) a pesar de la alta carga bacteriana (5,29 ± 0,28 log₁₀ UFC). Sólo los grupos inmunizados con *B. ovis* PA76250 o *B. canis* M- en Marcol 52 presentaron bazos de menor tamaño comparados con el grupo control no inmunizado (0,17 g y 0,21 g, respectivamente).

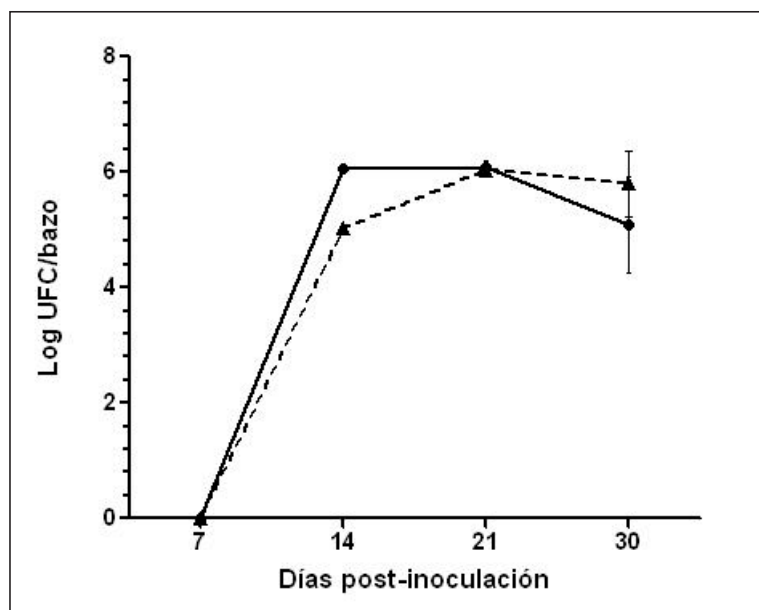


Figura 2. Carga bacteriana en bazo de ratones BALB/c infectados por vía intraperitoneal con *B. canis* RM6/66 con distintas dosis (— $\times 10^6$ y --- 10^7 UFC en 0,2 ml) sacrificados a los 7, 14, 21 y 30 días post-inoculación.

Tabla 1. Protección conferida por vacunas homólogas y heterólogas contra *B. canis* en el ratón BALB/c.

Inmunógeno (n=5)	Adyuvante	Peso del bazo (g) (media \pm DE) ^b	Infección esplénica Log ₁₀ UFC/bazo (media \pm DE) ^a	Protección promedio (log) ^b
Bacterina <i>B. canis</i> M-	Marcol 52	0,21 \pm 0,08 *	3,98 \pm 0,12	1,31 **
Bacterina <i>B. canis</i> M-	Montanide	0,25 \pm 0,05	4,10 \pm 0,08	1,19 *
Bacterina <i>B. canis</i> M-	Quil A	0,25 \pm 0,04	4,66 \pm 0,80	0,63
Bacterina <i>B. ovis</i> REO 168	Marcol 52	0,27 \pm 0,04	4,85 \pm 0,44	0,44
Bacterina <i>B. ovis</i> REO 168	Montanide	0,31 \pm 0,02	5,12 \pm 0,61	0,17
Bacterina <i>B. ovis</i> REO 168	Quil A	0,25 \pm 0,09	4,79 \pm 1,00	0,50
<i>B. ovis</i> PA76250 (viva)	-	0,17 \pm 0,02 **	3,21 \pm 0,79	2,08 ***
SSE (control negativo)	-	0,32 \pm 0,03	5,29 \pm 0,28	0,00

^a Número de bacterias en los bazos: media del log¹⁰ de las UFC \pm DE /grupo.

^b Diferencias significativas respecto del grupo no inmunizado (SSE) estimados por la prueba de Dunnett *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

DISCUSIÓN

El modelo murino es el más difundido para estudiar factores de virulencia, caracterizar la respuesta inmunitaria y evaluar agentes terapéuticos y vacunas en brucelosis^{5,7,9}. Los ensayos con ratones ofrecen ventajas para el desarrollo de estudios preliminares respecto del empleo de las especies susceptibles dado que permiten acortar los tiempos de estudio y son más económicos. En lo que a nuestro conocimiento respecta, no se han desarrollado trabajos en este modelo que evalúen la infección por *B. canis* o la protección conferida por vacunas contra esta bacteria.

De acuerdo a nuestros resultados, y en concordancia con los obtenidos con otros autores, la inoculación de este patógeno por las vías i.p. o i.v. en dosis de 10⁵ a 10⁷ permite establecer una infección persistente con *Brucella* spp., ya que asegura una rápida distribución sistémica del microorganismo y una alta carga bacteriana en el bazo cuando los animales se sacrifican a las 3 o 4 semanas post-infección.

El desarrollo de estrategias vacunales para proteger caninos contra la infección por *B. canis* constituye un área temática poco explorada. En la actualidad, no existe una vacuna contra este patógeno. En este trabajo, en base a la información obtenida de nuestros ensayos de infección, evaluamos diferentes vacunas contra *B. canis*, elaboradas a partir de esta especie y de *B. ovis*, la otra especie rugosa del género. La cepa *B. ovis* PA76250 viva confirió la mejor protección, tal vez debido a su naturaleza replicativa y a la presencia de determinantes antigénicos compartidos con *B. canis*. Este hallazgo resulta interesante, teniendo en cuenta que *B. ovis* no infecta al canino, dada su naturaleza huésped específica, y además no se transmite al humano. Por otro lado, la bacterina homóloga formulada en cualquiera de los adyuvantes oleosos, Marcol 52 y Montanide, protegió contra *B. canis*. En contraposición al Marcol, el Montanide se emplea en vacunas de aplicación en caninos, se caracteriza por no generar reacciones colaterales y por inducir una respuesta humoral y celular persistente, importante en la respuesta protectora

contra *Brucella* spp. Los motivos expuestos indican que este adyuvante podría seleccionarse para la formulación de vacunas inertes contra *B. canis* en futuros ensayos en ratones y caninos.

CONCLUSIÓN

El modelo ratón es útil para evaluar la eficacia de potenciales vacunas contra *B. canis*.

AGRADECIMIENTOS

A S. Islas (C.I.C, Bs. As., Argentina) y F. Amaya (U.N.C.P.B.A, Argentina) por el cuidado de los animales. Este trabajo fue subsidiado por el PICT 2007-01189 (ANPCyT, Argentina).

BIBLIOGRAFÍA

1. Bosseray N., Plommet M., De Ricke J. (1982) Evolution de l'infection de la souris par *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* et *Brucella suis* vers l'état chronique et la guérison. *Ann Rech Vet.* 13:153-161.
2. Bowden RA, Estein SM, Zygmunt MS; *et al* (2000) Identification of protective outer membrane antigens of *Brucella ovis* by passive immunization of mice with monoclonal antibodies. *Microbes Infect* 2:481-488.
3. Carmichael LE, Zoha SJ, Flores Castro R (1984) Biological properties and dog response to a variant (M-) strain of *Brucella canis*. *Develop Biol Standard* 56:649-656.
4. Carmichael LE, Shin SJ (1996) Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma. *Semin Vet Med Surg (Small Animal)* 11:161-165.
5. Estein SM, Cassataro J, Vizcaino N, *et al* (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.
6. Estein SM (2006) Brucellosis: Immunity and vaccination (a review). *Red Vet* 7 <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050506.html>. Accessed May 2006.
7. Jiménez de Bagués MP, Marín CM, *et al* (1993) Evaluation of vaccines and of antigen therapy in a mouse model for *Brucella*. *Vaccine* 11:61-66.

8. OIE (2007) Canine Brucellosis: *Brucella canis*. Contagious Abortion, Undulant Fever. Center for Food Security & Public Health in cooperation with the Institute for International Cooperation in Animal Biologics, OIE.
9. Pardon P (1975) Development of splenic infection in the mouse following intravenous inoculation of various species of *Brucella* (S) or rough (R) phases. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 281:81-84.
10. Scheftel, J (2003) *Brucella canis*: Potential for zoonotic transmission. *Compendium* 25: 846-853.
11. Shin SJ, Carmichael LE (1999) Canine brucellosis caused by *Brucella canis*. In: Carmichael LE, editor. Recent advances in canine infectious diseases. International Veterinary Information Service (www.ivis.org). Accessed Nov 1999. A0101.1199.
12. Wallach JC, Giambartolomei GH, Baldi PC, et al (2004) Infection with M- strain of *Brucella canis*. *Emerg Infect Dis* 10:146-148.
13. Wanke MM (2004) Canine brucellosis. *Animal Reproduction Science*. 82-83:195-207.