RESISTENCIA A LA REINFECCION POR *Brucella microti* EN UN MODELO MURINO

Jiménez de Bagüés M.P.[1], Mitjana O.[1]
[1]Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Avda. Montañana, 930, 50059, Zaragoza. mpjimenezdebagues@aragon.es.

INTRODUCCIÓN

Brucella microti es un microorganismo recientemente descrito y caracterizado por primera vez (Hubalek et al., 2007; Sholz et al., 2008a) cuyo hospedador natural es un roedor salvaje llamado *Microtus arvalis* o campañol común europeo. A diferencia de otras especies "clásicas" de *Brucella*, *B. microti* se caracteriza por una multiplicación rápida en medios estándar (Jiménez de Bagües et al., 2009) y por un perfil bioquímico similar al de *Ochrobactrum anthropi*, un microorganismo filogenéticamente próximo a *Brucella* (Scholz et al., 2008). En 2007 *B. microti* fue aislada de los ganglios maxilares de dos zorros rojos en la región de la Baja Austria distante 130 Km del lugar donde se aisló *B. microti* por primera vez en el año 2000 (Scholz et al., 2008c). Además esta cepa se aisló de muestras de suelo de la misma zona donde fue aislada del campañol 7 años antes (Scholz et al., 2008b). Este hecho puede implicar, por un lado, la supervivencia y persistencia de la cepa en la naturaleza, incluso en condiciones extremas, pudiendo ser el suelo considerado como un reservorio natural de esta cepa y por otro lado, que los zorros, depredadores habituales de estos roedores, pueden haberse infectado al ingerir campañoles infectados demostrando así, que la zona prevalencia de *B. microti* comprende un amplia área desde Moravia del sur a la baja Austria. En las condiciones descritas, una especie susceptible de ser infectada sería el jabalí puesto que tiene por costumbre excavar y hurgar el suelo con su hocico. Otros depredadores posibles del campañol sano o enfermo son las aves rapaces, los felinos y canidos salvajes y los mustélidos, como comadrejas, hurones y nutrias. Los mecanismos de infección y transmisión horizontal de *B. microti* no han sido estudiados todavía, si bien, algunos autores sugieren la posibilidad de que existan otros vectores de infección como los nemátodos, las garrapatas, o anélidos, que funcionen como reservorios. Un modelo murino para el estudio de esta infección ha sido establecido (Jiménez de Bagüés et al., 2009) demostrando una elevada patogenicidad de la cepa en los animales estudiados, así como una diferencia de susceptibilidad a la infección dependiendo de la raza de animal utilizado en el estudio y de la dosis infectante. Los animales muertos son, a veces, devorados por sus congéneres sanos pudiéndose generar una infección o reinfección. De igual forma la practica usual del acicalamiento propio o de otros miembros de la colonia, y la ingestión de heces propias o ajenas así como los encuentros agresivos entre machos adultos puede llevar consigo una infección o reinfección debido a la alta patogenicidad de la cepa que implica, por un lado, una fuerte carga bacteriana del animal enfermo y por otro la posibilidad de dosis infectivas bajas. Todo ello sugiere que una población de campañoles puede estar sometida a constantes exposiciones a la bacteria. Se desconoce si un animal curado o convaleciente de una infección por B. *microti* es resistente a una reinfección posterior. El objetivo del presente trabajo, por tanto, es determinar si un animal infectado una primera vez por *B. microti* queda protegido frente a una reinfección con la misma cepa.

MATERIAL Y MÉTODOS

CEPAS: *Brucella*. microti 4915S, se cultivo en Blood Agar Base (BAB) a 37ºC durante 18-24h. Las bacterias se recogieron en PBS, la suspensión se ajusto espectrofotométricamente a 10^9 organismos/ml y se diluyo al décimo hasta alcanzar la concentración deseada. La dosis real se verificó posteriormente mediante dilución y recuento en placas de BAB.
ANIMALES: **Resistencia a la reinfección en Balb/c**: Experiencia 1: un lote de 6 hembras Balb/c de 7-9 semanas de edad supervivientes de una primera infección con una dosis letal de 10^5 cfu de *B. microti* inoculada por via intraperitoneal (IP) fueron reinfectadas 6 semanas más tarde con 10^4 cfu de *B. microti* por vía IP, un lote control de igual número de animales recibió PBS como primera inoculación y 10^4 cfu como segunda, vía IP. Tres días más tarde

se sacrificaron todos los animales y se extrajo asépticamente el bazo para el recuento de *Brucella* en los mismos siguiendo la metodología descrita por Jiménez de Bagüés et al. (1994). Experiencia 2: lotes de 6 ó 8 hembras Balb/c fueron inoculadas inicialmente con 10^4 cfu de *B. microti*, via IP, 2 lotes de igual número de animales fueron simultáneamente inoculados con PBS. Seis semanas más tarde los grupos de 6 animales fueron reinfectados con 10^4, mientras que los de 8 animales lo fueron con 10^6 cfu vía IP. Los dos primeros lotes fueron sacrificados 3 días más tarde para el recuento de *Brucella* en sus bazos mientras que en los lotes inoculados con 10^5 se observó el número de animales muertos en los primeros 14 días tras la reinfección. **Resistencia a la reinfección en CD1**. Experiencia 3: dos lotes de 8 hembras CD1, de 7-9 semanas de edad fueron inoculadas con 10^8 por vía subcutánea, y 2 lotes del mismo número de animales fue inyectado con PBS. 8 semanas más tarde se realizó una segunda infección con 10^5 ó 10^6 por via IP. Tres días mas tarde se sacrificaron todos los animales para el recuento de *B. microti* en sus bazos. Experiencia 4: lotes de 6 hembras CD1 de la misma edad que las anteriores se inocularon con dosis de 10^5 cfu de *B. microti* por vía IP o con PBS. Seis semanas más tarde todos los animales se inocularon con 10^7 cfu de la misma cepa por via IP. Se contabilizo el número de animales muertos en las dos primeras semanas tras la reinfección. Los lotes infectados+reinfectados se compararon con su respectivo lote control mediante un tes t Student.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los experimentos de resistencia a la reinfección llevados a cabo en la raza Balb/c, la más susceptible a *B. microti* (Jiménez de Bagüés et al., 2009) se muestran en la Tabla 1. Los animales supervivientes de una dosis letal o los que han sido infectados con dosis subletales presentan una elevada resistencia a una reinfección, 6 semanas más tarde, con una dosis no letal, ya que en los bazos de estos animales no se encontró *B. microti* mientras que en los de los animales control la carga bacteriana era superior a los dos millones de colonias. De igual modo una infección inicial con una dosis subletal protegió al 100% de los animales frente a una segunda infección, llevada a cabo 6 semanas más tarde con una dosis letal, ya que ningún animal del lote reinfectado murió frente al 100% de mortalidad en el lote control. Los resultados obtenidos en la raza CD1, animales naturalmente más resistentes a la infección por *B. microti* se presentan en la Tabla 2. Los animales infectados inicialmente por vía subcutánea con 10^8 y reinfectados con 10^5 o 10^6CFU de *B. microti* por vía IP muestran una protección elevada frente a una segunda infección con la misma cepa llevada a cabo 8 semanas más tarde. De igual forma, animales CD1 inoculados IP con una dosis subletal de 10^5 quedaron completamente protegidos frente a una infección posterior con una dosis que mató al 100% de los animales controles. Estos resultados muestran que los roedores afectados por *Brucella microti* quedan protegidos de forma natural frente a posteriores reinfecciones, lo que puede tener un importante significado epidemiológico en la diseminación de la infección en la población. Las condiciones de experimentación utilizadas en este trabajo implican la utilización de razas de ratones de laboratorio de diferente susceptibilidad a la infección por *B. microti,* ya que no se ha podido trabajar con poblaciones de campañoles. La transmisión de *B. microti* al hombre no ha sido establecida, pero no puede descartarse, ya que se ha descrito en Sibera un tipo de campañol que almacena hasta 20 kilos de raíces en su madriguera, raíces muy apreciadas que sirven de condimento alimenticio a los campesinos del lugar. Igualmente la carne de esta especie de roedor es ampliamente utilizada en restaurantes en China.

Tabla 1. *Resistencia a la reinfección por* B. microti *en Balb/c tras una primera infección con la misma cepa realizada 6 semanas antes.*

Lote	Dosis 1ª Infección IP 100µl	Nº animales	Dosis 2ª Infección IP 100µl	CFU /bazo (media ±SD)	% mortalidad
1	10^5	6	10^4	0 [a]	0
2	PBS	6	10^4	$2{,}37x10^6$±391.126	0
3	10^4	6	10^4	0 [a]	0
4	PBS	6	10^4	$2{,}88x10^6$± 574.223	0
5	10^4	8	10^6	ND	0
6	PBS	8	10^6	ND	100

a: en comparación con el correspondiente grupo control P<0,001, ND: no determinado

Tabla 2. *Resistencia a la reinfeción por* B. microt*i en CD1 tras una primera infección subcutánea o peritoneal con la misma cepa realizada 8 ó 6 semanas antes .*

Lote	Dosis 1ª Infección [a,b] 100µl	Nº animales	Dosis 2ª Infección IP 100µl	CFU /bazo (media ±SD)	% mortalidad
1	10^{8a}	8	10^5	1.241,25±2194[c]	0
2	PBS	8	10^5	$3{,}71x10^6$±1.779.653	0
3	$10^{8\,a}$	8	10^6	5.626,25±4685 [c]	0
4	PBS	6	10^6	$1{,}66x10^7$±12.601.183	0
5	$10^{5\,b}$	6	10^7	ND	0
6	PBS	6	10^7	ND	100

a: subcutánea 8 semanas antes, b: intraperitoneal 6 semanas antes
c: en comparación con el correspondiente grupo control P<0,001, ND: no determinado

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

●Hubálek, Z.; Scholz, H. C.; Sedlacek, I.; Melzer, F.; Sanogo, Y. O.; Nesvadbova, J. 2007. *Vector-Borne Zoonot. Dis.* 4: 679-687. ●Jiménez de Bagüés, M.P.; Elzer, P. H.; Blasco, J. M.; Marín, C. M.; Gamazo, C.; Winter, A. J. 1994. *Infect. and Immun.* 62: 632-638. ●Jiménez de Bagüés, M.P . Mitjana, O. Kohler S. 2009. *Proceedings de XIII Jornadas Producción Animal*. ● Scholz, et al. 2008a. *Int. J. Syst. Evol. Microbioli*. 75: 375-382. ● Scholz, H. C.Hubalek, Z. Nesvadbova, J. Tomaso, H. Vergnaud, G. Le Fleche, P. Whatmore, A.M. Al Dahouk, S. Kruger, M. Lodri, C. Pfeffer, M., 2008b. *Emerging. Infect. Dis.* 8: 1316-1317. ● Scholz, H. Hofer E., Vergnaud, G., Le Fleche, P. , Whatmore, A.M. , Al Dahouk, S., Pfeffer, M. , Kruger, M., Cloeckaert A., Tomaso, H. 2008c. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 8: 1316-1317.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA RTA2006-0070-0000

RESISTENCE TO REINFECTION WITH *B.microti* IN A MURINE MODEL OF INFECTION

ABSTRACT: The aim of this work was to determine whether an animal recovered from a primary infection with *B. microti* was protected against a re-infection with the same strain in the murine model. After an initial infection with B. microti, Balb/c mice displayed a high level of resistance to re-infection with lethal or non lethal doses of B. microti. CD1 mice primed subcutaneously with high doses of *B. microti* were protected against an IP challenge of 10^5 or 10^6 cfu/animal 8 weeks later. In addition, all CD1 mice exposed initially with 10^5 cfu/animal IP and re-infected 6 weeks later by the same route with a lethal dose survived compared to a 100% mortality in the controls.
Keywords: *Brucella, microti, protection, immunity.*