

CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO MURINO PARA EL ESTUDIO DE LA INFECCIÓN POR *Brucella microti*

Jiménez de Bagüés M.P.¹, Mitjana O.¹ y Köhler S.²

¹Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Avda. Montañana, 930, 50059, Zaragoza. mpjimenezdebagues@aragon.es. ²Centre d'Etudes d'Agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (CPBS) ; UMR 5236 Université de Montpellier III Pl. E. Bataillon cc110. 34095 Montpellier (Francia).

INTRODUCCIÓN

Brucella microti fue aislada por primera vez en el año 2000 durante el estudio de un episodio epizootico llevado a cabo en la especie *microtus arvalis* (campañol común europeo) en Moravia del Sur en la república checa (Hubalek et al., 2007). Sin embargo, no fue denominada como tal hasta 2008 tras un exhaustivo estudio taxonómico (Scholz et al., 2008). Este microorganismo se caracteriza por un crecimiento rápido en medios estándar y un perfil bioquímico similar al de *Ochrobactum anthropi* (Scholz et al., 2008). La patogenicidad de esta nueva cepa de *Brucella* había sido estudiada por Hubalek et al. (2007) en ratones ICR en unas experiencias llevadas a cabo con muy pocos animales por lo que no ha podido ser establecida de forma rigurosa. El objetivo del presente trabajo es la puesta a punto de un modelo murino para el estudio de la virulencia de *B. microti* y su posible patogenicidad en este hospedador natural.

MATERIAL Y MÉTODOS

CEPAS UTILIZADAS: *Brucella microti* 4915S, *B. abortus* 2308 y *B. melitensis* 16M y *Brucella suis* 1330 se cultivaron en Blood Agar Base (BAB) a 37°C durante 18-24h. Las bacterias se recogieron en PBS, la suspensión se ajusto espectrofotométricamente a 10⁹ organismos/ml y se diluyó al décimo hasta alcanzar la concentración deseada. La dosis real se verificó posteriormente mediante dilución y recuento en placas de BAB.

Curva de crecimiento *in vitro* en Trypticase Soja Broth (TSB): se observó la densidad óptica medida como absorbancia a 600nm y la correspondiente concentración bacteriana de cultivos líquidos de diferentes cepas de *Brucella* en TSB durante 28 ó 32 horas.

ANIMALES: Experiencia dosis respuesta: Hembras Balb/c de 7-9 semanas de edad inoculadas con 10³ ó 10⁴ de *B. microti* por vía intraperitoneal (IP) y hembras CD1 de 7-9 semanas inoculadas IP con dosis desde 10⁵ a 10⁸ de *B. microti*. **Multiplificación *in vivo*:** hembras Balb/c, de 7-9 semanas de edad inoculadas con diferentes dosis de *B. microti* por vía IP. **Virulencia residual:** lotes de 32 hembras CD1 de 7 semanas se inocularon con 10⁸ ufc de *B. microti* por vía subcutánea. En este último experimento se sacrificaron 8 animales de cada lote a las 3, 6, 9 y 12 semanas o a los 5, 10, 15 y 20 días postinoculación, y se extrajo el bazo para la determinación de la presencia de *Brucella* siguiendo la metodología descrita por Bosseray et al. 1991. En las experiencias de multiplicación *in vivo* en el momento del sacrificio se extrajo asépticamente el bazo e hígado para el recuento de *Brucella* en los mismos siguiendo la metodología descrita por Jiménez de Bagüés et al. 1994 y en la de dosis respuesta se observo el número de animales muertos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la curva de crecimiento *in vitro* de las especies de *Brucella* estudiadas muestran una multiplicación mucho más rápida en medio líquido de *Brucella microti* respecto a *B. suis*, *melitensis* o *abortus* (Figura 1). *B. microti* tiene un tiempo de generación treinta minutos (dobla su numero cada 30 minutos) en plena fase logarítmica y alcanza su fase estacionaria o de meseta en 8-10 horas mientras que cepas más lentas como *B. melitensis* o *B. abortus* necesitan más de 24 horas para alcanzar dicha meseta. Este hecho es fundamental para comprender la dinámica de las curvas de multiplicación de *B. microti* en los órganos diana de elección en el animal de experimentación. En una primera experiencia se inocularon 33 hembras Balb/c con 10⁵ cfu de *B. microti* por vía IP, esta dosis es

considerada como inocua cuando se inoculan otras especies de *Brucella* como *B. suis* (Loisel-Meyer et al., 2006) en esta raza de animales. El 82% de los animales murió entre los días 3 y 7 postinoculación. Los animales presentaban inicialmente síntomas de fiebre, anorexia, decaimiento, y finalmente hipotermia y convulsiones antes de morir. Se realizó entonces una segunda experiencia para determinar la dosis subletal de *B. microti* en Balb/c. Lotes de hembras Balb/c se inocularon IP con 10^3 ó 10^4 cfu. Todos los animales sobrevivieron al experimento por lo que se determinó la utilización de 10^4 como dosis subletal en los experimentos de multiplicación en Balb/c. La curva de multiplicación esplénica y hepática de *B. microti* se muestra en la Figura 2 donde se observa como se multiplica rápidamente alcanzando, tanto en bazo como en hígado, un pico, máximo en el día 3 y una eliminación rápida a partir de dicha fecha, desapareciendo de ambos órganos en el día 21. Las especies clásicas de *Brucella*, presentan su máximo de multiplicación a partir de los 7 días, y una meseta posterior de varias semanas en la que los valores de *Brucella* en bazo se mantienen elevados, pudiéndose encontrar todavía microorganismos hasta 12 ó 18 semanas después de la inoculación (Edmonds et al., 2002). *B. microti* muestra, por lo tanto, un comportamiento radicalmente diferente al de otras especies de *Brucella* en este modelo. Posteriormente para testar una posible diferencia de susceptibilidad entre razas de ratones a la infección por *B. microti* se realizó una experiencia para determinar la dosis letal de dicha cepa en CD1 y para ello se inocularon lotes de 6 hembras CD1 con dosis desde 10^4 hasta 10^8 y se contabilizó el número de animales muertos. Una dosis de 10^6 causó un 83% de muertos mientras que 10^5 no causó ninguno. Existe por tanto una susceptibilidad mayor en ratones Balb/c que en CD1 a la infección por *Brucella microti*, 10^5 vs 10^6 reflejando una posible diferencia de sensibilidad en la naturaleza entre diferentes razas de roedores salvajes como el campañol, el ratón común, etc, todas ellas susceptibles a priori de ser infectadas por esta bacteria. Otro método para determinar la virulencia de una cepa de *Brucella* es la determinación de la virulencia residual o tiempo de recuperación 50, que mide el tiempo en el que un lote de animales infectados elimina *Brucella* de su bazo. En el caso de *B. microti* a las 3 semanas, primer punto del protocolo de la OIE para este tipo de experimento, todos los animales habían eliminado la bacteria de sus bazos, con lo que hubo que ajustar los intervalos de sacrificio a períodos más cortos: 5, 10, 15 y 20 días. Así pues la virulencia residual de *B. microti* fue de 17,5 días con un límite de confianza superior de 19,74 e inferior de 15,05 días, mientras que el RT50 para otras cepas de *Brucella* referenciadas es de 25,44 semanas para *B. abortus* 2308 y 7,78 semanas para *B. abortus* B19 (Sangari et al., 1998) o de 7,9 semanas para Rev1 (Bosserey et al., 1991). Estos resultados muestran que a pesar de la alta tasa de multiplicación y de la potencial virulencia exhibida en su hospedador natural, éste es capaz de eliminar la bacteria muy rápidamente, demostrando una adaptación innata de los roedores a este patógeno.

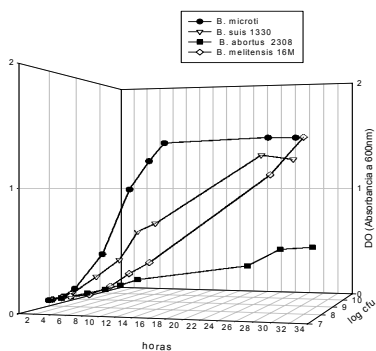


Figura 1: Curvas de multiplicación in vitro de *B. microti*, *B. suis* 1330, *B. abortus* 2308 y *B. melitensis* 16M en TSB y recuento bacteriano correspondiente.

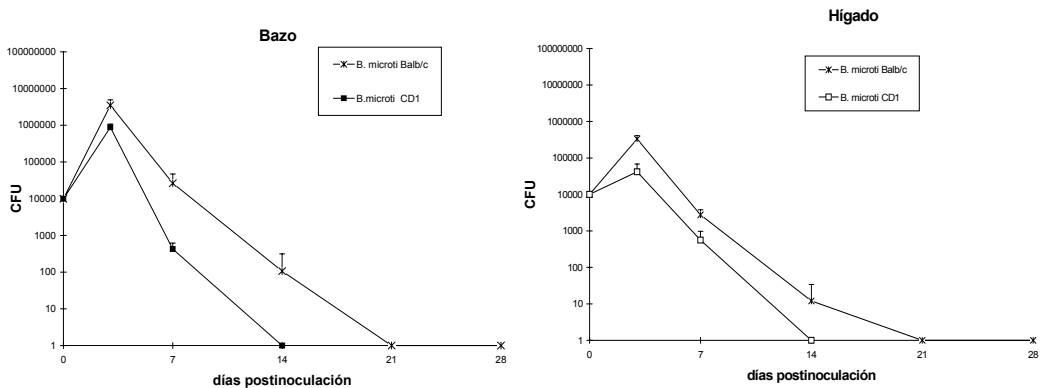


Figura 2. Curvas de multiplicación esplénica y hepática de *B. microti* en ratones *Balb/c* y *CD1*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

●Bossery N. 1991. *Biolo.* 19: 355-363. ●Hubálek, Z.; Scholz, H. C.; Sedlacek, I.; Melzer, F.; Sanogo, Y. O.; Nesvadbova, J. 2007. *Vector-Borne Zoonot Dis.* 4: 679-687. ●Edmonds, M. D.; Cloeckart, A.; Elzer, P. H. *Vet Microbiol.* 88: 205-221. ●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. ●Loisel-Meyer, S.; Jimenez de Bagues, M. P.; Basseres, E.; Dornand, J.; Kohler, S.; Liautard, J. P.; Jubier-Maurin, V. 2006. *Infect and Immun.* 74: 1973-1976. ●Sangari, F. J.; Grilló, M. J.; Jiménez de Bagüés, M. P.; González-Carreró, M. I.; García-Lobo, J. M.; Blasco, J. M.; Agüero, J. 1998. *Vaccine* 19: 1640-1645. ●Scholz, Holger C.; Hubalek, Zdenek; Sedlacek, Ivo; Vergnaud, Gilles; Tomaso, Herbert; Al Dahouk, Sascha; Melzer, Falk; Kampfer, Peter; Neubauer, Heinrich; Cloeckart, Axel; Maquart, Marianne; Zygmunt, Michel S.; Whatmore, Adrian M.; Falsen, Enevold; Bahn, Peter; Gollner, Cornelia; Pfeffer, Martin; Huber, Birgit; Busse, Hans-Jürgen; Nockler, Karsten. 2008. *Int J Syst Evol Microbiol.* 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., 2008. *Emerging Infect Dis.* 8: 1316-1317.

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

CHARACTERIZATION OF A MURINE MODEL FOR THE STUDY OF *B. microti* INFECTION

ABSTRACT: The aim of this work was to study the infection of *B. microti* in a murine model. *B. microti* at a dose of 10^5 cfu/animal caused death when injected in *Balb/c* while did not when injected in *CD1* mice. Moreover the lethal dose of *B. microti* for *CD1* mice was 10^6 , showing a significant difference on susceptibility to these bacteria between mice strains. The splenic and hepatic curves of *B. microti* in *Balb/c* and *CD1* mice showed a peak of multiplication at day 3 followed by a sharp descent until day 21 in which no bacteria were found. RT50 (recovery time 50) for *B. microti* was 17, 5 days, demonstrating a significant reduced persistency of *B. microti* in the host when compared with other *Brucella* species. The results showed here demonstrated the pathogenicity of *B. microti* in mice and the capacity of the natural host for dealing with the bacteria independently on the strain of rodent.

Keywords: *Brucella*, *microti*, pathogenicity, virulence.