



Diversidade genética em *Brucella canis*: aplicação no desenvolvimento de vacinas

Diversidad genética en Brucella canis: aplicación en el desarrollo de vacunas

C. Borie¹, N. Galarce^{1,4}, B. Escobar¹, J. Dorner², P. Dettleff³, V. Martínez²

¹Laboratorio de Bacteriología. ²Laboratorio FAVET-INBIOGEN. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. ³Escuela de Medicina Veterinaria, Facultades de Agronomía e Ingeniería Forestal, de Ciencias Biológicas y de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. ⁴Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias de la Vida, Universidad Andrés Bello. Santiago-Chile

Resumen

La prevalencia de la brucelosis canina por *B. canis*, está aumentando a nivel mundial, al igual que los reportes en personas. La ausencia de vacunas y de programas de control, permiten predecir una rápida expansión de la enfermedad, con el consecuente impacto en la reproducción canina y en la Salud Pública. Por lo anterior, es urgente analizar candidatos vacunales que consideren las características genómicas de las cepas circulantes a nivel mundial, toda vez que se ha comprobado variabilidad genética, particularmente en genes asociados a factores de virulencia tales como proteínas de membrana externa y sistema de secreción tipo IV. La presencia de un conglomerado genético de cepas Latinoamericanas de *B. canis* debe ser considerado en estudios futuros de tal manera de generar productos vacunales sin limitaciones geográficas.

Palabras clave: *B. canis*, brucelosis, vacunas, infertilidad.

Resumo

A prevalência da brucelose canina por *B. canis* está aumentando em todo o mundo, assim como os relatos em humanos. A falta de vacinas e programas de controle prevêem uma rápida disseminação da doença, com conseqüente impacto sobre a reprodução canina e a saúde pública. Portanto, é urgente analisar os candidatos a vacina que consideram as características genômicas das cepas que circulam pelo mundo, uma vez que a variabilidade genética foi comprovada, particularmente nos genes associados a fatores de virulência, como as proteínas da membrana externa e o sistema de secreção tipo IV. A presença de um grupo genético de linhagens latino-americanas de *B. canis* deve ser considerada em estudos futuros a fim de gerar produtos vacinais sem limitações geográficas.

Palavras-chave: *B. canis*, brucelose, vacinas, infertilidade.

Introducción

Brucella canis causa la brucelosis en los perros y accidentalmente afecta al hombre, existiendo múltiples reportes a nivel mundial (Santos et al., 2021). Es la principal causa infecciosa de fallas reproductivas que genera grandes pérdidas económicas en criaderos de perros, con seroprevalencias mundiales entre 6% a 57%, considerándose endémica en Sudamérica (Kauffman et al., 2019; Santos et al., 2021). En el hombre, las seroprevalencias en grupos específicos de personas va entre 0,2 a 9% y la enfermedad se presenta con síntomas leves e inespecíficos, preferentemente en laboratoristas, personas que trabajan con perros, niños y pacientes inmunocomprometidos (Hensel et al., 2018).

La facilidad de la transmisión (sexual, transplacentaria, conjuntival y oronasal), la ausencia de terapia efectiva, la adopción de mascotas sin certificación de salud y la ausencia de programas de control, permiten proyectar la rápida progresión de la enfermedad, que aún no cuenta con vacunas comerciales. Por ello, es prioritario que se analice el genoma de las cepas circulantes buscando marcadores moleculares específicos para optimizar el diagnóstico, apoyar la trazabilidad, analizar la virulencia, caracterizar la interacción hospedero-patógeno, e identificar candidatos vacunales relevantes basados en la patogenia molecular de *B. canis* (Vidal et al., 2018; Lopes et al., 2022).

En la genómica del género *Brucella* spp., llama la atención que aun cuando existe elevado grado de similitud entre especies (aprox. 97%), ellas presentan importantes diferencias tales como i) especificidad de hospedero, ii) riesgo para la salud pública y, iii) factores de virulencia. Estas diferencias sugieren que la

diversidad genómica podría dar cuenta de aspectos fundamentales de interacción hospedero-patógeno y de mecanismos de virulencia, debidas a reducción de genoma, polimosfismos de nucleótidos simples y, elementos genéticos móviles, entre otros. En la especie *Brucella canis*, los estudios son relativamente recientes y menores en comparación con las especies de *Brucella* tradicionales.

Los estudios de variabilidad genética de *B. canis* han utilizado herramientas de secuenciación de profagos (Kaden et al., 2014), caracterización de mutaciones en factores de virulencia (Lopes et al., 2022), secuencia de genoma completo (Wang et al., 2018) y MLVA (Di et al., 2014), siendo estos dos últimos los de mayor poder de discriminación. Así, en China, se demostró una baja variabilidad genética y la presencia de una mutación en el gen *omp25*, similar a cepas de Alemania y Sudáfrica. Al ser comparadas con cepas de otros países se determinó una elevada variabilidad (Di et al., 2014). En Suecia, Kaden et al. (2014), describen que la cepa de referencia *B. canis* SVA 13, presenta el mismo contenido de profagos que cepas Americanas, Africanas y Europeas pero no con la cepa de referencia Colombiana, *B. canis* Oliveri. En Latinoamérica, tempranamente se identificó al genotipo 2 como característico en perros de criaderos de Medellín, Colombia (Ortiz et al., 2012), demostrándose además la proximidad filogenética de la cepa de referencia con la cepa Americana (ATCC 23365) y Coreana (HSK A52141) (Sánchez-Jiménez et al., 2015). En Brasil, Ferreira Vicente et al. (2018) determinaron la existencia de dos linajes, el primero agrupó cepas de Europa, Asia y USA, mientras que el segundo incluyó a todas las cepas Sudamericanas (Argentina, Colombia, Brasil y Chile). Se concluyó la circulación de un clon dominante en criaderos de Brasil, sugiriendo la llegada de una cepa Argentina y de cepas desde USA y/o México a Colombia, seguido de diseminación a Brasil, Argentina y Chile. Resultados similares obtuvieron Lopes et al. (2022), quienes agruparon las cepas Latinoamericanas en un conglomerado único, de acuerdo a un SNP del gen *omp25*. Nuestro grupo de investigación caracterizó el genoma de la cepa de referencia Chilena, *B. canis* SCL, corroborando la hipótesis de la ruta de transmisión sugerida en Brasil. Detectamos SNP en los genes del operón *Ure*, *omp25*, *omp31* y operón *virB*, mutaciones que podrían tener un impacto en virulencia y adaptación al hospedero. La mutación del gen *omp31* afecta la longitud de la proteína (cambio a codon stop) y es solo compartida con las cepas Sudamericanas (Borie et al., 2021). Finalmente, es importante destacar que las mutaciones en genes *omp 25/31* y operón *virB* deben ser valoradas en su funcionalidad y en estudios vacunales ya que, por ser considerados factores de virulencia, son utilizados frecuentemente como candidatos (Tabla 1).

Clausse et al. (2017) analizaron la vacuna recombinante BLSOmp31 en 5 perros. El producto contiene una porción del sitio activo de la proteína Omp31, covalentemente unida a la proteína citosólica Lumasina sintetasa (BL) adsorbida en gel de Hidróxido de Aluminio (HA). La vacuna se inyectó vía SC a 4 perros de cinco meses de edad, considerando en algunos, tres booster cada tres semanas, más un booster anual. Determinaron elevados niveles de IgG hasta la 13 semana post vacunación, a diferencia del perro control ($p < 0.001$). Luego, los niveles bajaron y permanecieron estables al menos hasta la semana 45. El booster siguió la misma cinética que la primovacuna. Los anticuerpos no interfirieron con técnica de aglutinación RSAT y la vacuna indujo una respuesta Th2, algo diferente a lo observado en modelo murino donde desarrollaron una respuesta Th1/Th2. Además, la vacuna indujo respuesta humoral de mucosas (IgA e IgG) en saliva, secreción prepuccial y lágrimas. Finalmente, los autores señalan que la actividad bactericida del suero y la actividad opsonizante de los anticuerpos inducidos por la vacuna podrían tener un rol protector en la etapa inicial de bacteremia, impidiendo entrar a *B. canis* en tejidos blancos.

Recientemente, Eckstein et al. (2020) utilizaron una cepa de *Brucella ovis* mutante en un transportador ABC para un estudio protectoro contra *B. canis* en modelo murino y en macrófagos de perros; sus buenos resultados los llevaron a demostrar la seguridad del preparado al ser inoculado en perros no infectados. Para ello, inyectaron la vacuna previamente encapsulada en alginato, vía SC en 5 perros de 1-2 años de edad y los evaluaron clínicamente a los 1,2,3,5, y 9 días. Luego, cada dos semanas se evaluaron parámetros clínicos, hematológicos, de aislamiento y detección por PCR. A las 21 semanas los animales recibieron eutanasia, obteniendo diferentes tejidos y secreciones para detección bacteriológica por cultivo y PCR y, para análisis histopatológicos. Se concluyó que la vacuna es segura ya que no produjo signos clínicos, solo una reacción local en el punto de inoculación que regresó a las 4 semanas post inyección. Los perros controles (5) que solo recibieron una inyección con cápsula de alginato, no desarrollaron alteraciones en el punto de inoculación. En los 10 perros no hubo cambios en parámetros hematológicos ni bioquímicos ni cambios a nivel genital. No se detectó la cepa vacunal en tejidos, excepto en linfonodos del punto de inoculación en dos perros inmunizados. Se detectó seroconversión contra *Brucella* rugosas en 80% de los perros (4/5) a la cuarta semana postinmunización.

Finalmente, la variabilidad genética observada entre cepas de los conglomerados Asiático, Europeo, Americano (USA) y Sudamericano, sostiene que el estudio de candidatos vacunales sea mediante análisis genómico de las cepas circulantes, de tal manera de ofrecer vacunas efectivas sin limitaciones

geográficas. Si bien, las propuestas vacunales hasta la fecha son variadas (Tabla 1) en cuanto a tipo de vacuna, cepa, dosis, protección y modelo experimental, aún no hay un preparado comercial que permita detener la expansión de la brucelosis canina considerando la variabilidad genética respecto a factores de virulencia.

Tabla 1. Candidatos para vacunas contra *B. canis*.

Candidato	Tipo de vacuna	Modelo	Índice de Protección	Referencia
<i>B. canis</i>	Bacterina	Murino	3.48	Clausse et al. 2014
rOmp31	Vacuna ADN	Murino	1.86	Clausse et al. 2014
BLSOmp31	Vacuna ADN	Perros	Seroconversión, respuesta Th2	Clausse et al. 2017
<i>B. canis</i> “ghost”	Bacterina sin citoplasma ni genoma	Murino	2.37	Quian et al. 2017
<i>B. canis</i> ΔvirB10	Viva atenuada	Murino	1.91	Palomares-Resendiz et al. 2012
<i>B. canis</i> ΔvjbR	Viva atenuada	Murino	4.14	Stranahan et al. 2020
<i>B. ovis</i> ΔabcBA	Viva encapsulada	Murino Perros	1.5 Seroconversión y ausencia de signos	Eckstein et al. 2020

Fuente: Adaptada de Stranahan et al., 2020.

Referencias

- Borie C, Bravo C, Dettleff P, Galarce N, Dorner J, Martínez V.** First genome sequence of Chilean *Brucella canis* SCL strain provides insights on the epidemiology and virulence factors, explaining differences between geographical origins. *Electron J Biotechnol.* v.49, p.1–4, 2021.
- Clausse M, Díaz AG, Ibañez AE, Cassataro J, Giambartolomei GH, Estein SM.** Evaluation of the efficacy of outer membrane protein 31 vaccine formulations for protection against *Brucella canis* in BALB/c mice. *Clin Vaccine Immunol.* v.21, p.1689–1694, 2014.
- Clausse M, Díaz AG, Pardo RP, Zylberman V, Goldbaum FA, Estein SM.** Polymeric antigen BLSOmp31 in aluminium hydroxide induces serum bactericidal and opsonic antibodies against *Brucella canis* in dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* v.184, p.36-41, 2017.
- Di D, Cui B, Wang H, Zhao H, Piao D, Tian L, Tian G, Kang J, Mao X, Zhang X.** Genetic polymorphism characteristics of *Brucella canis* isolated in China. *Plos One,* v.9, p.e84862, 2014.
- Eckstein C, Mol J, Costa F, Nunes P, Lima P, Melo M, Carvlho T, Santos D, Silva M, Carvalho T, Costa L, Melo Junior O, Giunchette R, Paixao T, Santos R.** *Brucella ovis* mutant in ABC transporter protects against *Brucella canis* infection in mice and it is safe for dogs. *Plos One,* v.15, p.e0231893, 2020.
- FerreiraVicente A, Girault G, Corde Y, Mioni, MSR, Keid LB, Jay M, Megid J, Mick V.** New insights into phylogeography of worldwide *Brucella canis* isolates by comparative genomics-based approaches: Focus on Brazil. *BMC Genom.* v.19, p. 1-7, 2018.
- Hensel ME, Negron M, Arenas-Gamboa AM.** Brucellosis in dogs and public health risk. *Emerg Infect Dis.* v.24, p.1401–1406, 2018.
- Kaden R, Agren J, Ferrari S, Lindberg M, Backman S, Wahab T.** Whole genome sequence of *Brucella canis* strain SVA13, isolated from an infected dog. *Genome Announc.* v.2, p. e00700-14, 2014.
- Kauffman LK, Petersen CA.** Canine brucellosis: Old foe and reemerging scourge. *Vet Clin N Am Small Anim Pract.* v.49, p.763–779, 2019.
- Lopes C, De Carli S, Feltes B, Pinto E, Sala F, Dorn M, Siqueira F.** Genetic and molecular Omp 25 analyses from worldwide *Brucella canis* strains: Possible mutational influences in protein function. *Gene,* v.817, p.146175, 2022.
- Ortiz L, Muskus C, Sánchez_Jiménez M, Olivera-Angel M.** Identification of *Brucella canis* Group 2 in colombian kennels. *Rev Colom Cs Vet.* v.25, p. 615-619, 2012.
- Palomares-Resendiz G, Arellano B, Hernandez, R, Tenorio V, Salas E, Suarez F, Diaz E.** Immunogenic response of *Brucella canis* virB10 and virB11 mutants in a murine model. *Front Cell Infect Microbiol.* v.2, p.1–5, 2012.
- Qian J, Bu Z, Lang X, Yan G, Yang Y, Wang X.** A safe and molecular-tagged *Brucella canis* ghosts confers protection against virulent challenge in mice. *Vet Microbiol.* v.204, p.121–128, 2017.
- Sánchez-Jiménez MM, Isaza JP, Alzate JF, Olivera-Angel M.** Comparison of *Brucella canis* genomes

isolated from different countries shows multiple variable regions. *Genomics*, v.106, p.43–51, 2015.

Santos R, Souza T, Mol J, Eckstein C, Paixao T. Canine Brucellosis: An Update. *Frontiers Vet Sci.* v.8, p. 1-17, 2021.

Stranahan L, Chaki S, García-González D, Khalaf O, Arenas-Gamboa A. Evaluation of the efficacy of the *Brucella canis* RM6/66 Δ vjbR vaccine candidate for protection against *B. canis* infection in mice. *mSphere*, v.5, p.1-17, 2020.

Wang L, Cui J, Misner M, Zhang Y. Sequencing and phylogenetic characterization of *Brucella canis* isolates, Ohio, 2016. *Transbound Emerg Dis.* v. 65, p.944–948, 2018.
