



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Departamento de Microbiología y Genética

Desarrollo de vacunas recombinantes específicas frente a infecciones producidas por *Brucella ovis*

Memoria presentada por Pilar Sancho García
para optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca

Salamanca, 2014

El Dr. **Luis Román Fernández Lago**, Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICA:

Que la tesis titulada **“Desarrollo de vacunas recombinantes específicas frente a infecciones producidas por *Brucella ovis*”**, presentada por Dña. Pilar Sancho García para optar al grado de Doctora en Biología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección la Dra. Nieves Vizcaíno Santiso, el Dr. Luis R. Fernández Lago, y la Dra. M^a Carmen Tejedor Gil en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido y firmo la presente certificación en Salamanca a 20 de febrero de 2014.

Fdo. Luis Román Fernández Lago

La **Dra. Nieves Vizcaíno Santiso**, el **Dr. Luis R. Fernández Lago**, y la **Dra. M^a Carmen Tejedor Gil** Profesores del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca

CERTIFICAN:

Que la tesis titulada: **“Desarrollo de vacunas recombinantes específicas frente a infecciones producidas por *Brucella ovis*”**, presentada por Dña. Pilar Sancho García para optar al grado de Doctora en Biología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para **autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente**, extienden el presente certificado en Salamanca, a 20 de febrero de 2014

Fdo. Dra. Nieves Vizcaíno Santiso

Fdo. Dr. Luis R. Fernández Lago

Fdo. Dra. M^a Carmen Tejedor Gil

El presente trabajo de investigación ha sido financiado por los proyectos AGL2008-04514-C03-02/GAN y AGL2011-30453-C04-02 del Ministerio de Economía y Competitividad.

Agradecimientos

A la Dra. Nieves Vizcáino Santiso por la oportunidad que me brindó de trabajar con ella y porque ha sido una maestra excepcional, ejemplo de compromiso y dedicación, con quién compartir estos últimos años.

Al Dr. Luis R. Fernández Lago por la amabilidad con que me acogió en su laboratorio y por las horas dedicadas a la enseñanza y discusión sobre inmunología.

A la Dra. Carmen Tejedor Gil porque, no sólo me animó a realizar este trabajo sino porque, desde que llegué al departamento, ha sido una maestra, amiga y compañera que me ha apoyado y aconsejado siempre sin condiciones.

A mis compañeras de laboratorio, Ana y Rebeca, por su ayuda, su comprensión y por todos los buenos momentos que hemos compartido.

A los grupos de brucelosis del departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Navarra, de la Unidad de Salud Animal del Instituto de Agrobiotecnología CSIC-UPNA del Gobierno de Navarra y de la Unidad de Sanidad Animal del CITA del Gobierno de Aragón por su colaboración en la realización de esta tesis doctoral.

A D. Andrés por ser el mayor ejemplo de trabajo, humildad, dedicación y constancia. Nadie como él me ha enseñado tanto con solo tomar un café. A Teresa porque conversar con ella cada mañana es uno de los momentos más enriquecedores del día. A Huesca, Chus y Ricardo porque sin vosotros el equipo estaría incompleto; gracias por el gran apoyo que me habéis ofrecido en todo momento.

A todos los compañeros/as del Departamento de Microbiología por su gran ayuda durante todos estos años y porque siempre me he sentido muy querida desde el primer día que llegué.

Al personal del Servicio de Experimentación Animal y del Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca por su disposición y amabilidad a la hora de prestar sus servicios.

A mis niñas porque han sido muchísimos los momentos geniales - una tarde en el depósito de los Pinos, Vetonía, Los Caños de Meca, Extremo, los disfraces, la resbalina... - y seguro que serán muchos más; os quiero mucho. A todos los demás; gracias a por vuestra amistad incondicional.

A mis padres y hermano, porque son mi ejemplo a seguir; gracias porque sin vuestro apoyo constante no hubiera conseguido llegar hasta aquí.

En especial, gracias a Ricardo por estar siempre a mi lado.

*A mis Padres
Alejandrino y M^a del Pilar*

Índice

INTRODUCCIÓN

1. Aspectos generales del género <i>Brucella</i>	1
2. La membrana externa de <i>Brucella</i>	3
2.1. Fosfolípidos	4
2.2. Lipopolisacárido	4
2.3. Proteínas de membrana externa	6
2.4. Propiedades específicas relacionadas con la membrana externa	7
3. Aspectos relevantes para este trabajo de la infección y la inmunidad inducida por <i>Brucella</i>	8
3.1. El curso de la infección	8
3.2. Supervivencia dentro de las células hospedadoras	9
3.3. Respuesta inmune	12
4. Factores de virulencia de <i>Brucella</i> de interés en este trabajo	17
4.1. Proteínas de membrana externa	17
4.1.1. Proteínas de la familia Omp25/Omp31	17
4.1.2. Lipoproteínas Omp10, Omp16 y Omp19	20
4.2. Sistema de secreción tipo IV	21
4.3. Regulador transcripcional VjbR	23
4.4. Sistema regulador de dos componentes BvrR/BvrS	24
4.5. Glucanos cíclicos	26
4.6. La proteína transportadora BacA	27
5. Brucelosis ovina causada por <i>Brucella ovis</i>	28
5.1. La enfermedad	28
5.2. Diagnóstico	29
5.3. Control de la enfermedad	30

OBJETIVOS

Objetivos	35
-----------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.	39
1.1. Género <i>Brucella</i>	39
1.2. <i>Escherichia coli</i>	40
2. Procedimientos generales de experimentación animal	40
2.1. Animales e inoculación	40
2.2. Extracción de bazo y muestras de sangre	41

3. Técnicas generales de manipulación de ácidos nucleicos	41
3.1. Vectores de clonación	41
3.2. Digestiones enzimáticas y ligaciones	43
3.3. Reacción en cadena de la polimerasa	43
3.4. Electroforesis de fragmentos de ADN en geles de agarosa	44
3.5. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	44
3.6. Secuenciación de ADN	45
3.7. Hibridación de ácidos nucleicos	45
3.8. Extracción de ADN	46
3.8.1. Extracción de ADN plásmidico de <i>E. coli</i>	46
3.8.2. Extracción de ADN cromosómico de <i>Brucella</i>	46
3.9. Métodos de transformación de bacterias	47
3.9.1. Transformación de <i>E. coli</i>	47
3.9.2. Transformación de <i>B. ovis</i>	47
4. Obtención de mutantes de <i>B. ovis</i> PA	48
4.1. Obtención de mutantes simples	48
4.1.1. Inactivación de los genes de interés mediante PCR de solapamiento	48
4.1.2. Clonación en plásmidos de los genes inactivados	49
4.1.3. Sustitución de los genes silvestres por los genes inactivados en <i>B. ovis</i> PA	58
4.2. Obtención del doble mutante $\Delta bacA/\Delta omp31$	59
5. Caracterización de las cepas obtenidas	59
5.1. Caracterización genotípica	59
5.2. Análisis del crecimiento <i>in vitro</i>	60
5.2.1. Preparación de los cultivos	60
5.2.2. Recuento en medio sólido	60
5.2.3. Crecimiento en medio líquido	60
5.3. Estudio de las propiedades relacionadas con la membrana externa	60
5.3.1. Autoaglutinación en medio líquido	60
5.3.2. Sensibilidad a polimixina B y desoxicolato sódico	61
5.3.3. Sensibilidad a peróxido de hidrógeno	61

5.4. Comportamiento en macrófagos J774.A1	62
5.4.1. Línea celular, medio y condiciones de cultivo	62
5.4.2. Análisis de la penetración y supervivencia de los mutantes en macrófagos J774.A1	62
5.5. Análisis de la virulencia en modelo murino	63
6. Estudio, en modelo murino, de la utilidad de los mutantes $\Delta omp25d$, $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$, $\Delta virB2$ y Δcgs de <i>B. ovis</i> PA como vacunas vivas atenuadas	64
6.1 Persistencia de los mutantes	64
6.1.1. Evaluación preliminar de la colonización esplénica	64
6.1.2. Mutante Δcgs	64
6.1.3. Mutantes $\Delta omp25d$, $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$ y $\Delta virB2$	64
6.2. Análisis de citocinas endógenas en bazo	65
6.3. Evolución en suero de anticuerpos frente a células enteras de <i>B. ovis</i>	65
6.4. Ensayo de protección frente a una infección experimental por <i>B. ovis</i>	66
6.4.1. Inmunización	66
6.4.2. Infección experimental y evaluación de la colonización esplénica	67
6.5. Análisis de citocinas producidas por esplenocitos murinos tras un segundo estímulo <i>in vitro</i> con <i>B. ovis</i> PA	67
7. Métodos estadísticos empleados	68

RESULTADOS

1. Análisis de la implicación en la virulencia de <i>B. ovis</i> de distintos genes relacionados con la ME y la virulencia de cepas lisas de <i>Brucella</i> spp.	71
1.1. Construcción de cepas mutantes de <i>B. ovis</i> PA	71
1.2. Caracterización inicial de las cepas mutantes de <i>B. ovis</i> PA	72
1.2.1. Verificación genotípica	72
1.2.2. Análisis del crecimiento en medio sólido y líquido	77
1.2.3. Estudio de las propiedades de la membrana externa	80
1.3. Análisis de la capacidad infectiva y de multiplicación intracelular en cultivos de macrófagos murinos de las cepas mutantes de <i>B. ovis</i> PA	83
1.4. Estudio de la virulencia en ratones BALB/c de las cepas mutantes de <i>B. ovis</i> PA	84

2. Estudio, en modelo murino, de mutantes atenuados de <i>B. ovis</i> PA como vacunas vivas frente a infecciones producidas por <i>B. ovis</i>	87
2.1. Evaluación preliminar de la colonización esplénica de los mutantes atenuados de <i>B. ovis</i> PA en la dosis seleccionada	87
2.2. Análisis de la persistencia de los mutantes atenuados de <i>B. ovis</i> PA en la dosis de vacunación seleccionada	89
2.3. Evolución de los anticuerpos capaces de reaccionar con células enteras de <i>B. ovis</i> en el suero de los animales vacunados	93
2.4. Evolución de la producción de citocinas endógenas en el bazo de los animales inmunizados	94
2.5. Estudio de protección frente a una infección experimental con <i>B. ovis</i> PA	103
2.6. Evaluación de la respuesta inmune celular inducida tras un segundo estímulo <i>in vitro</i> con <i>B. ovis</i> PA	104

DISCUSIÓN

1. Implicación en la virulencia de <i>B. ovis</i> de distintos genes relacionados con la ME y la virulencia de cepas lisas de <i>Brucella</i> spp.	109
1.1. Genes <i>bvrR</i> y <i>bvrS</i>	109
1.2. Genes <i>omp10</i> , <i>omp16</i> y <i>omp19</i>	109
1.3. Mutantes $\Delta bacA$, $\Delta omp31$ y $\Delta bacA/\Delta omp31$	116
2. Mutantes atenuados de <i>B. ovis</i> PA como vacunas vivas frente a infecciones producidas por <i>B. ovis</i>	119

CONCLUSIONES

Conclusiones	133
--------------	-----

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía	137
--------------	-----

APÉNDICES

I. Abreviaturas, Acrónimos y Siglas	I
-------------------------------------	---

Introducción

1. Aspectos generales del género *Brucella*

El género *Brucella* fue descrito por primera vez por Meyer y Shaw en 1920 (Meyer & Shaw, 1920; Corbel & Brinley-Morgan, 1984) y debe su nombre al médico militar David Bruce quien, en 1887, fue el primero en aislar uno de los microbios que componen este género a partir de bazos de soldados británicos fallecidos en la isla de Malta. Este género está formado por bacterias Gram negativas con morfología cocobacilar (de 0,5 – 0,7 μm de ancho y de 0,6 – 1,5 μm de largo), no móviles y no encapsulados. Son microorganismos aerobios y algunas especies (como *B. ovis*) requieren una atmósfera con un 5-10 % de CO_2 para su crecimiento. Su temperatura óptima de crecimiento es de 36-38 $^{\circ}\text{C}$, pero pueden crecer en un intervalo de entre 20 y 40 $^{\circ}\text{C}$. El genoma de las especies del género *Brucella* presenta un porcentaje Guanina-Citosina del 58 – 59 % y, excepto *B. suis* biovar 3, está organizado en dos cromosomas con un tamaño aproximado de 2,2 Mb (Cromosoma I) y 1,1 Mb (Cromosoma II) (Cloeckaert & Vizcaíno, 2005).

Los microorganismos del género *Brucella* son parásitos intracelulares facultativos que infectan una gran variedad de mamíferos, produciendo aborto epizootico en animales y una enfermedad febril septicémica en el hombre denominada brucelosis (también fiebre de Malta o fiebre ondulante), una de las zoonosis de mayor distribución e importancia mundial.

El género *Brucella* pertenece a la familia *Brucellaceae*, incluida dentro del orden *Rhizobiales*, clase *Alphaproteobacteria* (Scholz *et al.*, 2012). Esta clase es una de las más grandes y con los grupos mas diversos dentro del filo *Proteobacteria*. Entre sus miembros se incluyen patógenos y simbioses de plantas, como *Agrobacterium* y *Rhizobium*, y patógenos de animales, como *Bartonella* y *Rickettsia*. En la familia *Brucellaceae*, se reconocen actualmente siete géneros: *Brucella*, *Crabtreeella*, *Daeguia*, *Mycoplana*, *Ochrobactrum*, *Paenochrobactrum* y *Pseudochrobactrum* (Scholz *et al.*, 2012). De ellos, el género más cercano filogenéticamente a *Brucella* es *Ochrobactrum*, que está constituido por especies saprófitas que ocasionalmente infectan a humanos (Holmes *et al.*, 1988).

Inicialmente, en el género *Brucella* se incluyeron dos especies, *B. melitensis*, patógeno de cabras y ovejas y *B. abortus*, principalmente patógeno de ganado bovino (Meyer & Shaw, 1920). En 1929 se añadió *B. suis* (Huddleson, 1929), patógeno de ganado porcino, y posteriormente *B. ovis* (Buddle, 1956), patógeno de ganado ovino, *B. neotomae* (Stoenner & Lackman, 1957), aislado de una rata del desierto y *B. canis* en 1968 (Carmichael & Bruner, 1968), patógeno de perros. Esta clasificación se basaba esencialmente en el hospedador preferente y estas seis especies se conocen, aún a día de hoy, como especies “clásicas” de *Brucella*. Posteriormente, estudios de hibridación de ADN-ADN demostraron un alto grado

2 Introducción

de homología (>90 % de identidad) entre estas especies, lo que llevó a considerar que este género estaba formado por una única especie, *B. melitensis*, y diferentes biovariedades (Verger *et al.*, 1987). Aunque esta nueva clasificación fue adoptada por algunos bancos de datos y colecciones de cultivo, la primera clasificación no llegó a ser realmente abandonada por la comunidad científica debido a su gran difusión y utilidad epidemiológica y, en 2006, atendiendo a las diferencias fenotípicas y genotípicas existentes entre las distintas especies, el Comité de Taxonomía de *Brucella* propuso volver a la antigua clasificación (Osterman & Moriyón, 2006). Después, el género *Brucella* permaneció inamovible hasta el año 2007, momento a partir del cual se han ido describiendo especies aisladas de hospedadores no convencionales; *B. ceti* y *B. pinnipedialis* (Cloeckert *et al.*, 2001; Jacques *et al.*, 2007), aisladas de mamíferos marinos, *B. microti* (Hubálek *et al.*, 2007; Scholz *et al.*, 2008), aislada del topillo común y *B. inopinata* (De *et al.*, 2008; Scholz *et al.*, 2010), aislada de una prótesis mamaria.

La clasificación de estas nuevas especies se basó, además de en la preferencia de hospedador y en las pruebas fenotípicas clásicas - actividad ureasa, crecimiento en presencia de colorantes tionina y fucsina, susceptibilidad a bacteriófagos y aglutinación con sueros monoespecíficos - en métodos moleculares de análisis del polimorfismo del ADN. Este enfoque múltiple se ha propuesto como método estandarizado para la clasificación de nuevas especies de *Brucella* (Tindall *et al.*, 2010).

Cada especie del género *Brucella* presenta una marcada preferencia de hospedador (hospedador primario), aunque también pueden infectar a otros hospedadores (hospedador secundario) y se han aislado cepas de *Brucella* spp. tanto en animales domésticos como en animales de la fauna silvestre (bisontes, ciervos, zorros, liebres, búfalos africanos, jabalíes y caribúes) (Davis & Elzer, 2002; Godfroid *et al.*, 2013). Así, aunque el hombre no es un hospedador primario, la mayoría de las especies (menos *B. ovis*, *B. neotomae* y *B. microti*) se han aislado de humanos. Sin embargo, no todas las especies presentan la misma virulencia y facilidad de transmisión (Moreno & Moriyón, 2002) siendo *B. melitensis* la más frecuentemente aislada y la que provoca las infecciones de mayor gravedad en humanos. La brucelosis humana, se caracteriza por la aparición de episodios recurrentes de fiebre, escalofríos, sudoración, pérdida de peso, cefalea, artralgias, esplenomegalia y linfadenopatías (Corbel, 1990; Dornand *et al.*, 2002), y raramente causa la muerte. Dicha enfermedad se suele contraer por contacto directo con el animal infectado o a través de la ingesta de alimentos contaminados, como leche o queso sin pasteurizar.

En animales, la brucelosis afecta principalmente al aparato reproductor de machos y hembras, provocando aborto y problemas de fertilidad por lo que causa grandes pérdidas económicas dentro del sector ganadero dedicado a la explotación del ganado bovino, ovino, porcino o caprino. Entre las medidas de prevención y control de la brucelosis animal

2.1. Fosfolípidos

Los PLs son lípidos iónicos polares compuestos de 1,2-diacilglicerol y un enlace fosfodiéster que une el esqueleto del glicerol a alguna base, generalmente nitrogenada, como la colina o la etanolamina. La composición de PLs de la ME de *Brucella* no ha sido determinada específicamente pero, en *B. melitensis* y *B. abortus*, el análisis de células enteras reveló que los principales PLs en estas dos especies son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, difosfatidilglicerol y fosfatidilglicerol (Vizcaíno & Cloeckert, 2012). La fosfatidilcolina es un PL mayoritario en células eucariotas y poco frecuente en procariotas, aunque cada vez se detecta en un mayor número de bacterias, principalmente las que mantienen una asociación simbiote o parásita con células eucariotas (Sohlenkamp *et al.*, 2003; Aktas *et al.*, 2010), que proporciona más estabilidad a la bicapa lipídica de las membranas bacterianas (Goldfine, 1984). En *B. abortus* se ha demostrado que tanto la síntesis de fosfatidilcolina (Comerci *et al.*, 2006; Conde-Álvarez *et al.*, 2006) como la síntesis de fosfatidiletanolamina (Bukata *et al.*, 2008), son necesarias para que la bacteria muestre una correcta virulencia.

Además, la ME de *Brucella* difiere de la ME de la mayoría de los patógenos animales por tener lípidos de ornitina. Estos, normalmente co-extraídos con el LPS, se piensa que están localizados en la capa externa de la ME y que, con su carga positiva, podrían neutralizar la baja cantidad de grupos aniónicos del lípido A (Moriyón & López-Goñi, 1998). Sin embargo, cabe destacar que, Palacios-Claves *et al.* en 2011 demostraron que estos lípidos de ornitina, a pesar de ser cuantitativamente importantes en la composición de la ME, no son elementos imprescindibles ni para la virulencia de *B. abortus* ni para desencadenar la respuesta inmune innata en el hospedador (Palacios-Chaves *et al.*, 2011).

2.2. Lipopolisacárido

El LPS es uno de los constituyentes mayoritarios de la ME de *Brucella* y presenta propiedades que lo diferencian del LPS de otras bacterias Gram negativas, como las enterobacterias. Entre estas propiedades destacan una baja endotoxicidad, una alta resistencia a la degradación por macrófagos y protección frente a la respuesta inmune del hospedador (Moreno *et al.*, 1981; Forestier *et al.*, 2000; Lapaque *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2006).

La molécula de LPS está formada por una parte glucolípida e hidrofóbica, el denominado lípido A, insertada en la ME y no expuesta en la superficie de la bacteria y otra parte, totalmente sacarídica, dirigida hacia el exterior. Esta última, a su vez, se divide en dos secciones: el núcleo (la parte mas interna) y las cadenas polisacáridicas O. Además, el LPS de *Brucella* spp. puede hallarse en fase lisa (S-LPS) o en fase rugosa (R-LPS) según la

presencia o ausencia de cadenas polisacáridicas *O* en su estructura, respectivamente. *B. ovis* y *B. canis* son especies naturalmente rugosas mientras que el resto de especies están constituidas mayoritariamente por cepas lisas (Vizcaíno & Cloeckert, 2012).

El lípido A del LPS del género *Brucella* es químicamente diferente al de la típica bacteria Gram negativa y está formado por un esqueleto disacárido de diaminoglucosa [2,3-diamino-2,3-didesoxi-D-glucosa unidos mediante enlace β (1-6)]. Este disacárido existe tanto mono como bifosforilado en las posiciones 1' ó 1' + 4,' respectivamente (Rojas *et al.*, 1994; Iriarte *et al.*, 2005). Por otra parte, a este esqueleto se encuentran unidos, mediante enlaces éster y amida, β -hidroxiácidos [3-OH-C_{12:0} hasta ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFAs; *Very Long Chain Fatty Acid*) como 27-OH-C_{28:0} ó 29-OH-C_{30:0}] y otros ácidos grasos de cadena larga (C_{16:0} a C_{18:0}) (Moreno *et al.*, 1990; Bhat *et al.*, 1991) que tienen la capacidad de atravesar la ME mostrando el grupo hidroxilo terminal en el espacio periplásmico, lo cual probablemente favorece el fuerte anclaje del LPS y la integridad de la ME (Velasco *et al.*, 2000; Iriarte *et al.*, 2005; Barquero-Calvo *et al.*, 2009). A diferencia de lo que sucede en otras bacterias Gram negativas, hasta el momento no se ha detectado ni etanolamina ni otros azúcares neutros formando parte de la composición del lípido A de *Brucella* (Moreno *et al.*, 1990; Freer *et al.*, 1995). En las enterobacterias, el grado de heterogeneidad que presenta el lípido A es mayor debido a las diferentes combinaciones en las que se pueden vincular los ácidos grasos, los grupos fosfato, los azúcares neutros, la etanolamina y los diferentes tipos de azúcares que conforman la molécula. En cambio, en el género *Brucella*, existen menos variantes de lípido A ya que la heterogeneidad que presenta deriva del número de ácidos grasos unidos y de las posibles diferencias que puedan existir entre ellos debidas prácticamente a la presencia de 1 ó 2 grupos fosfato en las posiciones 1' y 4' (Freer *et al.*, 1995; Iriarte *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2006). El lípido A de la especie *B. abortus*, aunque es químicamente diferente al de bacterias Gram negativas clásicas, posee una estructura que está presente también en algunos géneros de las α -2 proteobacterias relacionados filogenéticamente con *Brucella* spp., como por ejemplo, *Ochrobactrum* y *Mesorhizobium* (Moreno *et al.*, 1990).

El núcleo oligosacárido del LPS de *B. abortus* está constituido por ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico (KDO; *2-keto-3-deoxyoctulosonic acid*), 2-amino-2-desoxiglucosa (glucosamina), 2-amino-2,6-didesoxi-D-glucosa (quinovosamina), glucosa y manosa. No se han observado en su estructura otros componentes comúnmente encontrados en el núcleo de otras α -proteobacterias, como heptosa, fosfatos o ácido galacturónico (Iriarte *et al.*, 2005).

Las cadenas polisacáridicas *O*, ligadas al núcleo y proyectadas hacia el exterior de la bacteria en las cepas lisas de *Brucella*, son homopolímeros sin ramificaciones de N-formilperosamina (4,6 dideoxi-4-formamido- α -D-manopiranososa) en uniones α (1-2) o

$\alpha(1-3)$. La proporción de enlaces $\alpha(1-2)$ y $\alpha(1-3)$ entre los residuos de perosamina varía dependiendo de la especie y cepa de *Brucella*, y diversos estudios con anticuerpos monoclonales han demostrado que esta variabilidad en las uniones genera tres tipos básicos de epítomos específicos del género *Brucella* (el epítomo A, el epítomo M y el epítomo C o común), y un cuarto epítomo, denominado C/Y, que muestra reacciones serológicas cruzadas con otras bacterias, de las cuales la más importante es *Yersinia enterocolitica* 0:9 (Douglas & Palmer, 1988; Bundle *et al.*, 1989; Meikle *et al.*, 1989; Palmer & Douglas, 1989; Vizcaíno *et al.*, 1991; Cloeckert *et al.*, 1993; Cloeckert *et al.*, 1998; Weynants *et al.*, 1997). Las cadenas polisacáridicas O del S-LPS se consideran esenciales para la virulencia de las cepas lisas de *Brucella* spp., ya que se ha comprobado que los mutantes rugosos obtenidos *in vitro* a partir de cepas naturalmente lisas presentan atenuación en modelos animales (Allen *et al.*, 1998; Godfroid *et al.*, 1998; McQuiston *et al.*, 1999; Foulongne *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2000; González *et al.*, 2008; Paixão *et al.*, 2009; Lacerda *et al.*, 2010). Sin embargo, las especies naturalmente rugosas *B. ovis* y *B. canis*, que carecen de cadenas polisacáridicas O, son virulentas en sus hospedadores preferentes (carnero y perro, respectivamente) y en modelos de experimentación animal (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2011; Barkha *et al.*, 2011; Martín-Martín *et al.*, 2012; Palomares-Resendiz *et al.*, 2012; Vizcaíno & Cloeckert, 2012).

Además del LPS, la ME de las estirpes lisas de *Brucella* contiene otro polisacárido que se denomina hapteno nativo. Este tiene una composición idéntica a la de las cadenas polisacáridicas O del S-LPS (Aragón *et al.*, 1996) y su existencia, como molécula independiente, ha sido cuestionada durante algún tiempo ya que algunos autores consideraban que esta molécula era un artefacto del protocolo de extracción de las cadenas polisacáridicas O durante la hidrólisis del S-LPS (Zygmunt *et al.*, 1988). Sin embargo, otros trabajos han demostrado que la hidrólisis ácida del S-LPS da lugar a cadenas polisacáridicas O que contienen KDO, mientras que el hapteno nativo purificado carece de este azúcar (Aragón *et al.*, 1996).

2.3. Proteínas de membrana externa

Las proteínas de membrana externa (PMEs), de acuerdo a su abundancia relativa, se han clasificado en proteínas mayoritarias y proteínas minoritarias (Vizcaíno & Cloeckert, 2012).

Dentro de las PMEs se han descrito como mayoritarias la proteína conocida como Omp2b con actividad porina y las proteínas Omp25 y Omp31 de la familia de proteínas homólogas Omp25/Omp31. Estas PME mayoritarias están fuertemente asociadas al peptidoglucano (PG) de la pared celular, lo que se cree que es una de las características que

proporciona estabilidad a la ME. Entre las proteínas minoritarias se encuentran, entre otras, el resto de las proteínas de la familia Omp25/Omp31, las lipoproteínas Omp10, Omp16 y Omp19 y las proteínas que componen la estructura flagelar y la estructura del sistema de secreción tipo IV (Vizcaíno & Cloeckaert, 2012).

Por reactividad con anticuerpos monoclonales se ha comprobado que muchas de estas PME se encuentran expuestas en la superficie de las cepas rugosas del género *Brucella*, mientras que en las cepas lisas, las cadenas polisacáridicas O del S-LPS las enmascaran (Cloeckaert *et al.*, 1990; Bowden *et al.*, 1995a).

Por su interés en este trabajo, las proteínas de la familia Omp25/Omp31, las lipoproteínas Omp10, Omp16 y Omp19 y el sistema de secreción tipo IV, se describen detalladamente en el Capítulo 4 de esta Introducción.

2.4. Propiedades específicas relacionadas con la membrana externa

La integridad de muchas bacterias Gram negativas depende de la fuerte carga negativa de su ME estabilizada por cationes divalentes y poliaminas, que convierten la ME en una barrera de permeabilidad selectiva (Hancock, 1997; Nikaido, 2003). Sin embargo, la ME de *Brucella* tiene una reducida carga negativa, por lo que, se cree que la estabilidad de su ME está relacionada con algunas de las características particulares (Vizcaíno & Cloeckaert, 2012) que acabamos de citar, entre las que destacan :

- El PL mas abundante (37%) en *B. melitensis* y *B. abortus* es la fosfatidilcolina (Thiele & Schwinn, 1973).
- Existen lípidos de ornitina cargados positivamente (Moriyón & López-Goñi, 1998).
- Las PME están fuertemente asociadas al LPS y al PG (Dubray & Bézard, 1980; Winter, 1987; Cloeckaert *et al.*, 1992b; Vizcaíno *et al.*, 1996).
- Existen VLCFAs en el lípido A del LPS (Moreno *et al.*, 1990; Bhat *et al.*, 1991; Velasco *et al.*, 2000).

Además, la ME dota a las especies de *Brucella* de unas propiedades particulares demostradas por el comportamiento en presencia de péptidos catiónicos (lisozima, lactoferrina, defensinas o catelicidinas), detergentes, EDTA, suero no inmune y compuestos catiónicos (Martín-Martín *et al.*, 2011; Vizcaíno & Cloeckaert, 2012).

Los péptidos catiónicos son parte del mecanismo bactericida oxígeno independiente de las células fagocíticas; están presentes en células de mamíferos y fluidos corporales y se cree que juegan un papel importante en la defensa del hospedador frente al patógeno (Jenssen *et al.*, 2006). La polimixina B es un péptido catiónico que ejerce su actividad antimicrobiana al permeabilizar la membrana citoplasmática, provocando la fuga de componentes citoplasmáticos, tras una interacción inicial con la ME (Vaara, 1992). *Brucella*

spp. muestra resistencia a este compuesto, característica que ha sido atribuida tanto a la reducida carga negativa de su ME, ya que se cree que la interacción entre péptidos catiónicos y bacterias Gram negativas ocurre a través de la unión con componentes de la ME cargados negativamente (Vaara, 1992; Nikaido, 2003), como al impedimento estérico causado por las cadenas polisacarídicas O y el núcleo del LPS que dificultan el acceso del péptido catiónico a los componentes con carga negativa de la ME (Moriyón & López-Goñi, 1998; Velasco *et al.*, 2000; Iriarte *et al.*, 2005).

La reducida carga negativa también se ha considerado la responsable de la resistencia observada en *Brucella* spp. al agente quelante EDTA. Esto contrasta con la alta sensibilidad de otras bacterias Gram negativas que necesitan cationes divalentes para estabilizar la ME (Moriyón & Berman, 1982; Freer *et al.*, 1996).

Las distintas especies del género *Brucella* también muestran resistencia a los componentes del suero humano no inmune, otro mecanismo de defensa del hospedador frente al patógeno cuando éste se localiza extracelularmente. Varios estudios han considerado que las cadenas polisacarídicas O del LPS de las estirpes lisas son importantes para esta resistencia ya que los mutantes rugosos de *B. melitensis* y *B. abortus*, que carecen de esta cadenas, son más sensibles (Corbeil *et al.*, 1988; Allen *et al.*, 1998; Eisenschenk *et al.*, 1999; Fernandez-Prada *et al.*, 2001; González *et al.*, 2008). Sin embargo, las cepas naturalmente rugosas (*B. canis* y *B. ovis*), que también carecen de cadenas polisacarídicas O, son incluso más resistentes al suero humano no inmune que algunas cepas lisas (Martín-Martín *et al.*, 2011). Por lo tanto, deben existir otras características bacterianas, probablemente relacionadas con la ME, responsables de esta resistencia.

3. Aspectos relevantes para este trabajo de la infección y la inmunidad inducida por

Brucella

3.1. El curso de la infección

El curso de la infección en la brucelosis puede dividirse en tres fases, cuya duración puede variar dependiendo del hospedador (Martirosyan *et al.*, 2011; Grilló *et al.*, 2011):

(i) el **inicio de la infección** (o período de incubación) corresponde al período desde que *Brucella* invade al hospedador hasta que, en este, se evidencian los primeros síntomas clínicos.

(ii) la **fase aguda** corresponde al período en el que las bacterias se replican activamente en los diferentes órganos diana del hospedador, principalmente los órganos del sistema

reticuloendotelial (sistema fagocítico mononuclear) y del sistema reproductivo.

(iii) la **fase crónica** corresponde al período en el que los síntomas clínicos observados son intermitentes y las señales patológicas visibles en varios órganos.

En hospedadores naturales, como vacas, ovejas y cabras, se ha descrito que, tras la infección experimental con cepas virulentas de *Brucella* spp., primero se produce la colonización de los ganglios linfáticos regionales cercanos al sitio de la inoculación y a partir de ahí las bacterias se distribuyen por todo el sistema reticuloendotelial (Anderson & Cheville, 1986; Muñoz *et al.*, 2008). En las hembras gestantes, la bacteria invade la placenta y, posteriormente, el feto, causando aborto sobre todo durante el último tercio del período de gestación. Sin embargo, las hembras ingravidas pueden permanecer asintomáticas pero eliminar la bacteria a través de las secreciones (Tobias *et al.*, 1993). En los machos, *Brucella* puede invadir los testículos y causar epididimitis y orquitis (Anderson & Cheville, 1986; Chand *et al.*, 2002).

Los ratones, aunque no son hospedadores naturales de *Brucella* spp., se usan como modelo experimental. En ellos, el curso de la brucelosis, cuyos principales órganos diana son el bazo y el hígado, depende de la virulencia de la cepa bacteriana, la dosis y la vía de inoculación, así como de la raza, los antecedentes genéticos, la edad y el sexo de los animales (Grilló *et al.*, 2011). Durante el curso de la brucelosis murina el recuento de bacterias en el bazo proporciona perfiles de colonización altamente reproducibles (Grilló *et al.*, 2011). Así, en las cepas virulentas el inicio de la infección se corresponde con la colonización del bazo durante los primeros 2-3 días p.i., la fase aguda abarca desde el tercer día hasta que se alcanzan los recuentos esplénicos máximos (2-3 semanas p.i.), en la fase crónica constante se produce una meseta en los recuentos esplénicos (hasta las semanas 8-11 p.i.), y en la fase crónica de declive los recuentos esplénicos comienzan a disminuir (puede durar mas allá de 36 semanas) (Plommet & Plommet, 1988). Este patrón es sensible a pequeñas variaciones de la virulencia lo que hace posible evaluar la atenuación de cepas mutantes frente a la parental (Grilló *et al.*, 2011).

3.2. Supervivencia dentro de las células hospedadoras

Una característica destacable de las especies del género *Brucella* es la capacidad que presentan para entrar, sobrevivir y multiplicarse tanto en células fagocíticas no profesionales, como trofoblastos de la placenta (Meador & Deyoe, 1989; Samartino & Enright, 1993) y células epiteliales (Shepard, 1959; Detilleux *et al.*, 1990; Pizarro-Cerdá *et al.*, 2000; Ferrero *et al.*, 2009), como en células fagocíticas profesionales; células dendríticas (CDs) y macrófagos (Roop *et al.*, 2004; Billard *et al.*, 2005). La consecución de un nicho replicativo en las células fagocíticas le va a proporcionar protección frente al complemento

y a los anticuerpos durante su diseminación por el hospedador y, además, la capacidad para mantenerse durante largos periodos de tiempo en el organismo afectado, con la consiguiente cronificación de la infección (Barquero-Calvo *et al.*, 2007). Esta habilidad implica un proceso complejo, en el cual este patógeno interfiere con las funciones propias de la célula hospedadora, llegando incluso a controlar su propio tráfico intracelular (**Figura 2**).

Una vez que la bacteria es fagocitada se localiza en unos compartimentos membranosos denominados BCVs (BCV; *Brucella-Containing Vacuole*). Dichas vacuolas interactúan, durante los primeros minutos después de la invasión, con endosomas tempranos (EEC; *Early Endosomal Compartments*) de la ruta endocítica adquiriendo en su membrana los marcadores EEA1 y Rab5 (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998; Chaves-Olarte *et al.*, 2002; Celli *et al.*, 2003; Bargen *et al.*, 2012). A continuación, hasta 12 horas post-infección (p.i.), las BCVs interactúan con endosomas tardíos y lisosomas, acumulando en su membrana la glicoproteína Lamp-1 y otros marcadores como Rab7 y RILP, y produciéndose además su acidificación (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998; Porte *et al.*, 1999; Arenas *et al.*, 2000; Celli *et al.*, 2003; Starr *et al.*, 2008)

Posteriormente, la maduración de las BCVs se caracteriza por una pérdida progresiva de la proteína Lamp-1 de la membrana de la vacuola, la cual probablemente se inicia cuando las BCVs interceptan la ruta secretora de la célula mediante interacción con dominios de salida especializados del retículo endoplasmático (ERES; *Endoplasmic Reticulum Exit Sites*) (Celli *et al.*, 2003; Celli *et al.*, 2005). A medida que disminuye la presencia de la proteína Lamp-1, las BCVs se fusionan con el retículo endoplasmático (RE) adquiriendo marcadores de este, tales como calreticulina, calnexina y sec61 β (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998; Celli *et al.*, 2001; Celli *et al.*, 2005).

La fusión con el RE conduce a la generación de un orgánulo con condiciones permisivas para la replicación de *Brucella*, llamado fagosoma replicativo o BCV replicativa (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998; Celli *et al.*, 2003). Se ha observado que esta fusión es dependiente de la actividad de una pequeña GTPasa (Sar1) y del complejo COPII (Aridor *et al.*, 2001; Celli *et al.*, 2005). En este punto de la ruta, se cree que la supervivencia de la bacteria se ve favorecida porque se generan más fagosomas replicativos debido a la fisión de una BCV en dos vacuolas hijas, mediada por un aporte membranosos por parte del RE (Celli, 2006).

Además del beneficio obvio que obtiene *Brucella* spp. de la alteración de la ruta endocítica intracelular, minimizando la fusión de la vacuola que la transporta con lisosomas, se ha observado que las interacciones que realizan las BCVs con el RE proporcionan una fuente de hierro a la bacteria que provienen de la degradación de los grupos hemo realizada en los macrófagos. De esta forma, a pesar de estar sometida a un

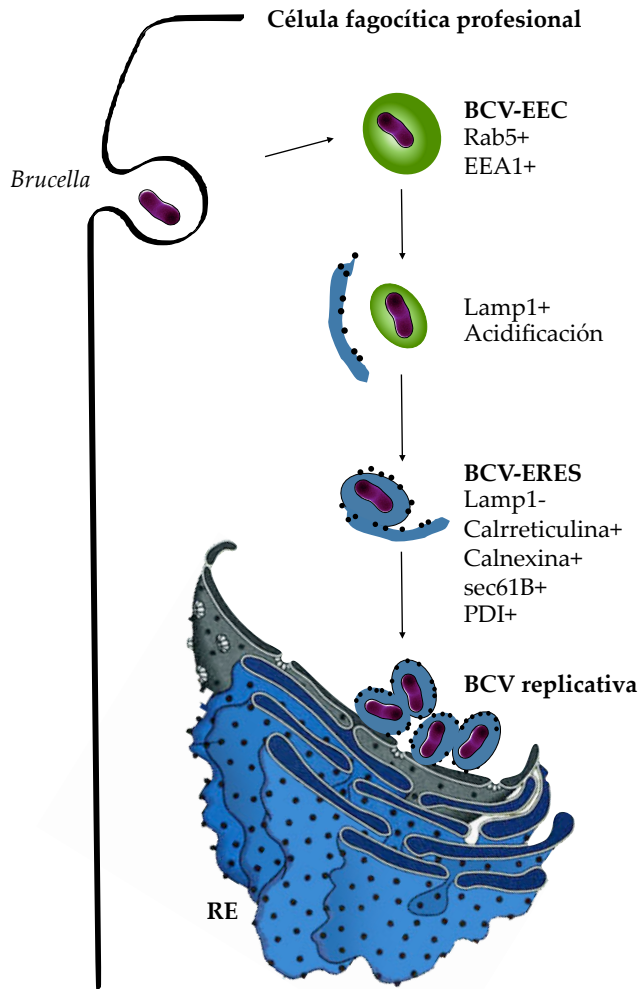


Figura 2. Esquema de la ruta endocítica intracelular seguida por *Brucella* en las células fagocíticas profesionales. Una vez que la bacteria penetra en la célula fagocítica se localiza en las BCVs. Durante su tránsito intracelular, las BCVs sufren interacciones con diferentes componentes líticos, acidificándose y adquiriendo en sus membranas diversos marcadores. Dichos cambios son imprescindibles para que las BCVs no se fusionen con los lisosomas y consigan interceptar la ruta de secreción de la célula a través de los dominios ERES del RE. Esto conduce finalmente a la generación de la denominada BCV replicativa que posee unas condiciones óptimas para la supervivencia y multiplicación intracelular de la bacteria.

células sin secretar ninguna sustancia tóxica para la célula invadida .

Finalmente, la BVC se convierte en un compartimento con características autofágicas (aBVC) lo que permite la propagación de la bacteria a otras células (Starr *et al.*, 2012).

fuerte grado de estrés nutricional durante su tránsito intracelular, *Brucella* spp. satisface sus necesidades de este micronutriente, el cual le es esencial para llevar a cabo la replicación dentro del macrófago (Roop *et al.*, 2009).

Por otro lado, parece que *Brucella* spp. es capaz de interferir en el proceso de apoptosis de las células hospedadoras (Galdiero *et al.*, 2000; Gross *et al.*, 2000; Fernandez-Prada *et al.*, 2003; Pei & Ficht, 2004). Se ha observado que, mientras que los mutantes rugosos obtenidos a partir de cepas lisas tienen un efecto citotóxico (Fernandez-Prada *et al.*, 2003; Pei & Ficht, 2004; Pei *et al.*, 2006; Qin *et al.*, 2008), las cepas lisas parentales, así como las estirpes naturalmente rugosas *B. ovis* y *B. canis* no lo tienen (Lamontagne *et al.*, 2009; Martín-Martín *et al.*, 2008). Esto les permite adaptarse a los distintos ambientes que se van encontrando en el interior de las

3.3. Respuesta inmune

El organismo hospedador posee mecanismos de defensa que reconocen y responden de forma genérica frente a la infección. Las células fagocíticas expresan en su superficie celular varios receptores para el reconocimiento de patógenos como son los receptores de lectina tipo C y los receptores tipo Toll (TLRs; *Toll-Like Receptor*). Estos receptores reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs; *Pathogen-Associated Molecular Pattern*). Cuando el organismo hospedador detecta los PAMPs, las defensas inmunitarias innatas actúan inmediatamente produciendo una respuesta pro-inflamatoria. Durante la respuesta pro-inflamatoria, la célula fagocítica se activa y sufre importantes cambios morfológicos y bioquímicos, entre los que se encuentra la secreción de citocinas y la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC; *Major Histocompatibility Complex*) clase II. Esta activación de las células fagocíticas, que se conoce como maduración, es necesaria para desarrollar una correcta respuesta inmune adaptativa que permita eliminar al patógeno. Sin embargo, algunos patógenos muestran PAMPs alterados que evitan su detección por las defensas innatas del hospedador. Uno de los mejores ejemplos de PAMP alterado es el LPS de *Brucella* spp. que, al contrario que el LPS de otras bacterias Gram negativas como *Salmonella* o *E. coli*, es un débil inductor de la inmunidad innata (Moreno *et al.*, 1981; Lapaque *et al.*, 2005; Barquero-Calvo *et al.*, 2007; Salcedo *et al.*, 2008; Martirosyan *et al.*, 2011).

Como se ha mencionado, los TLRs reconocen compuestos específicos de los microorganismos y desencadenan la respuesta inmune innata. Las rutas de señalización TLR se originan en el receptor citoplasmático Toll/IL1 (TIR; *Toll/IL1 Receptor*). Este receptor TIR tiene adaptadores como MyD88, TRIF, TIRAP y TRAM que juegan un papel importante en las rutas de señalización. Existen más de 10 TLRs, pero son el TLR2 y el TLR4 los que reconocen una gran variedad de productos microbianos, principalmente lipoproteínas anfífilas y glicolípidos, y el más importante, el LPS de las bacterias Gram negativas (Takeda *et al.*, 2003). El resultado de este reconocimiento es la expresión de las moléculas pro-inflamatorias Factor de Necrosis Tumoral alpha (TNF α ; *Tumor Necrosis Factor alpha*), IL6 e IL12, importantes para que se desarrolle una respuesta inmune efectiva. El MyD88 es una molécula adaptadora que participa en todas las rutas TLR conocidas, menos la TLR 3, es esencial para la producción de citocinas pro-inflamatorias y también tiene funciones como receptor de señalización de IL1 e IL18 (Takeda & Akira, 2003; Takeda, 2005).

Brucella es reconocida por los receptores TLR 2, TLR 4 y TLR9, los cuales identifican el LPS, las lipoproteínas y el ADN bacteriano, respectivamente (Oliveira *et al.*, 2008). Además un estudio reciente indica que también el TLR6 es necesario para desencadenar la

respuesta inmune innata contra *B. abortus* ya que está implicado en la activación de las CDs que conlleva la producción de citocinas pro-inflamatorias (Oliveira *et al.*, 2012; de Almeida *et al.*, 2013).

Respecto al papel de los receptores TLR 2 y TLR 4 en la inmunidad frente a *Brucella* spp., aún existe controversia. Algunos autores han visto que en ratones *knockout* (KO) TLR 2, el curso de la brucelosis experimental con *B. abortus* no se ve alterado (Campos *et al.*, 2003; Weiss *et al.*, 2005; Copin *et al.*, 2007). Sin embargo, otros autores han descrito a las lipoproteínas de *Brucella* como potentes estimuladores de la secreción de citocinas pro-inflamatorias a través del receptor TLR 2 (Giambartolomei *et al.*, 2004). Además, algunos autores han descrito que *B. abortus* se multiplica más en ratones KO TLR 4 (Campos *et al.*, 2003; Copin *et al.*, 2007), mientras que otros no han encontrado diferencias en la multiplicación bacteriana en ratones *wild type* (WT) frente a ratones KO TLR 4 (Weiss *et al.*, 2005). En cuanto a la infección por *B. ovis* en modelo murino, se ha observado que los receptores TLR 2 y TLR 4 no son necesarios para el control de la infección (Vieira *et al.*, 2012).

Respecto al receptor TLR 9 y la molécula MyD88, se ha demostrado que juegan un importante papel durante la fase aguda de la infección por *B. ovis* (día 7 p.i.) siendo requeridos para el control temprano de la infección (Vieira *et al.*, 2012). También se ha observado que juegan un importante papel en el control de la infección por *B. abortus* en ratón (Weiss *et al.*, 2005; Macedo *et al.*, 2008). Además *B. abortus* inactivada por calor, induce la liberación de IL12 por CDs, lo cual está parcialmente mediado por TLR 9 y MyD88 (Huang *et al.*, 2005).

En algunas especies de *Brucella* se han descrito dos proteínas que contienen dominio TIR, la BtpA (también llamada Btp1 o TcpB) (Salcedo *et al.*, 2008; Cirl *et al.*, 2008) y la BtpB (Salcedo *et al.*, 2013), capaces de inhibir la señalización de los receptores TLR modulando la respuesta inflamatoria del hospedador durante la infección.

En contraste con otros patógenos intracelulares, como se ha mencionado, las cepas virulentas del género *Brucella* penetran en las células hospedadoras (macrófagos, CDs o células epiteliales) sin provocar alteraciones significativas ni daño celular, y sin inducir apenas la activación de dichas células hospedadoras (Barquero-Calvo *et al.*, 2007; Guzmán-Verri *et al.*, 2001; Anderson & Cheville, 1986). La baja activación de las células hospedadoras está caracterizada por un bajo número de marcadores celulares MHC clase II y una baja secreción de citocinas pro-inflamatorias (Salcedo *et al.*, 2008) lo que influye negativamente en la presentación de antígenos y favorece el establecimiento de la infección (Billard *et al.*, 2007; Salcedo *et al.*, 2008). Tras la infección *in vitro* de macrófagos murinos y CDs con *Brucella* spp. se observa una mínima secreción de citocinas pro-inflamatorias

(Weiss *et al.*, 2005; Salcedo *et al.*, 2008; Martín-Martín *et al.*, 2010). Además, tras la infección con *B. abortus* 2308, en el suero de los ratones, se observaron niveles prácticamente indetectables de IL1, IL6 y TNF α si se comparan con los niveles observados tras la infección con *Salmonella* (Barquero-Calvo *et al.*, 2007). El hecho de que *Brucella* spp. interfiera en el desarrollo de un correcto patrón de citocinas durante los primeros estadios del proceso infeccioso desencadena, por un lado, que la respuesta inmune innata no sea lo suficientemente eficiente y, por otro lado, que la respuesta inmune adaptativa no se establezca adecuadamente ya que ésta depende de las primeras señales emitidas por el hospedador tras detectar al microorganismo patógeno (Ko & Splitter, 2003).

Además de esto, en el inicio de la infección por *B. abortus*, también se han descrito otros signos asociados a la evasión de la respuesta innata como, recuentos normales de células sanguíneas y plaquetas, falta de reclutamiento de células pro-inflamatorias en el sitio de la infección (Barquero-Calvo *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2008), ausencia de síntesis y degradación de fibrinógeno y coagulopatías (Barquero-Calvo *et al.*, 2007).

La respuesta inmune adaptativa, además de eliminar al patógeno cuando éste ha evadido los mecanismos de la inmunidad innata, confiere protección contra la re-infección por el mismo agente. Los linfocitos T colaboradores (Th; *T helper*) CD4+ son los encargados de coordinar la respuesta inmune adaptativa frente al patógeno y se clasifican en, al menos, dos subtipos Th1 y Th2 (Mosmann *et al.*, 1986). Los linfocitos del subtipo Th1 generan una respuesta inmune mediada por células que depende de los linfocitos T citotóxicos CD8+ y de la activación de macrófagos mediante IFN γ . Además inducen la producción de inmunoglobulinas (Ig) de las subclases IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃ (Finkelman *et al.*, 1990; Snapper & Paul, 1987; Snapper *et al.*, 1992). Los linfocitos del subtipo Th2 son generalmente considerados responsables de la inducción y el mantenimiento de la respuesta inmune humoral asociada a la producción de anticuerpos de la subclase IgG₁ (Finkelman *et al.*, 1990) y segregan principalmente IL4, IL5 e IL10 (Mosmann *et al.*, 1986) (**Figura 3**).

En la brucelosis murina, las citocinas que se considera que juegan un papel más relevante son la IL12, el IFN γ y el TNF α (Ko & Splitter, 2003). La IL12 es producida, entre otras células del sistema inmune, por los macrófagos y polariza la respuesta inmune del hospedador hacia Th1. Los linfocitos T polarizados a Th1 producen IFN γ , un potente inductor de la actividad bactericida de los macrófagos y los linfocitos T citotóxicos CD8+. La función bactericida de los macrófagos puede ser maximizada tratando los animales con TNF α (Zhan *et al.*, 1993; Zhan & Cheers, 1995; Zhan *et al.*, 1996). Tras la infección de ratones BALB/c con *B. abortus*, durante la primera semana de la fase aguda, se detectan niveles significativos de IFN γ e IL12 en el suero de los animales. Posteriormente, estas citocinas van disminuyendo progresivamente hasta que, en la semana 6 p.i. aproximadamente, se

detectan niveles basales (Fernández-Lago *et al.*, 1996; Hort *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2008; Cha *et al.*, 2010). Sin embargo, el $\text{IFN}\gamma$ secretado de forma endógena por las células esplénicas, alcanza los niveles máximos durante las dos primeras semanas de la fase aguda y, posteriormente, se detecta hasta 8 semanas después, correspondiendo a la fase crónica (Pasquali *et al.*, 2001; Hort *et al.*, 2003). Estas diferencias entre los niveles de $\text{IFN}\gamma$ detectados en suero y los niveles de $\text{IFN}\gamma$ secretados por esplenocitos sugieren que este podría permanecer como reservorio dentro de las células y no liberarse a la circulación (Sathiyaseelan *et al.*, 2006). Algunos autores han descrito en ratones BALB/c un paréntesis en la producción de $\text{IFN}\gamma$ desde la semana 3 p.i. hasta el inicio de la fase crónica relacionado con que en este período de tiempo hay un descenso en la expresión del receptor-2 de la IL12 (Sathiyaseelan *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 1996). Por otra parte, se ha

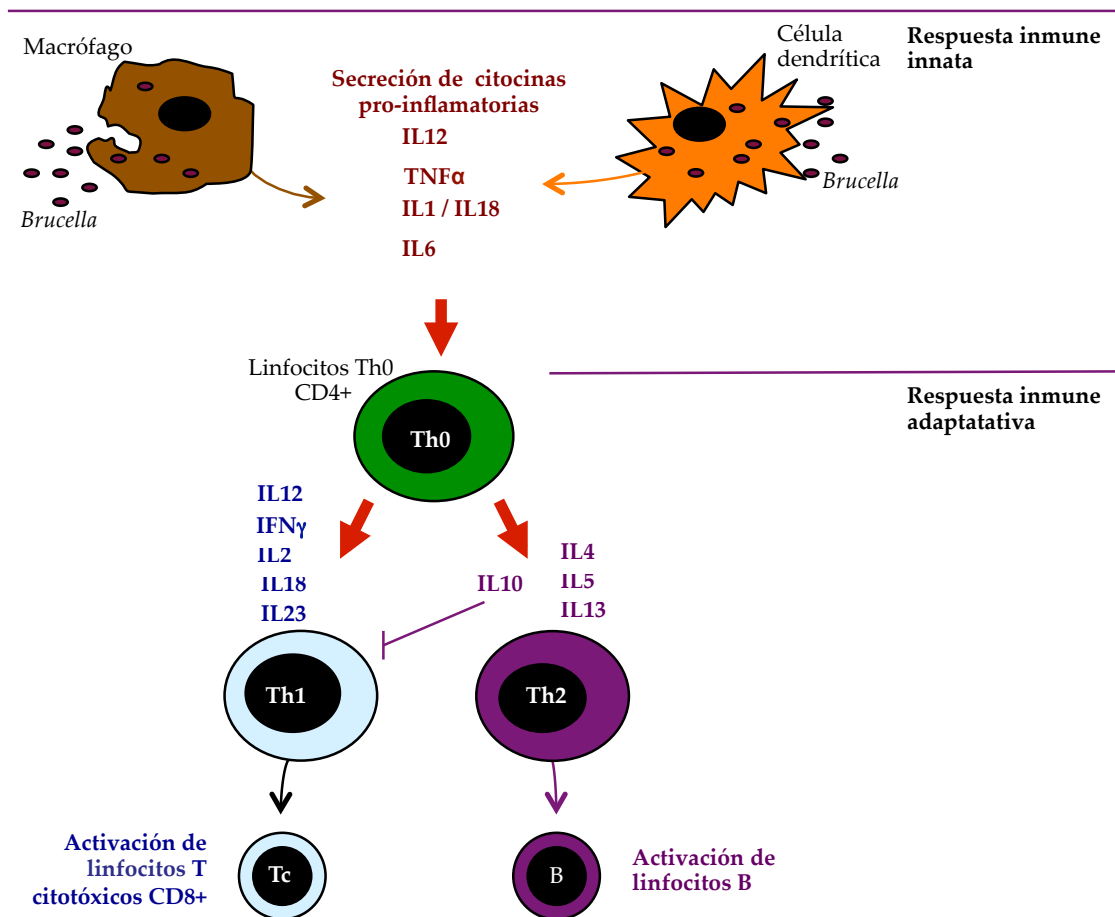


Figura 3. Esquema de las principales citocinas secretadas en respuesta a una infección por *Brucella* spp. en relación con este trabajo. Tras producirse una infección por *Brucella* spp., se desencadena una débil respuesta inmune innata que se pone de manifiesto por la baja cantidad de citocinas pro-inflamatorias secretadas por las células fagocíticas (marrón). Entre estas citocinas destaca la producción de IL12, responsable de dirigir al sistema inmune hacia una respuesta adaptativa principalmente celular Th1 (azul) y no humoral Th2 (morado) y el TNF α . Ya en la respuesta inmune adaptativa, destaca el IFN γ que potencia la función citotóxica ejercida por los linfocitos T CD8+ con el fin de eliminar todas aquellas células infectadas por el patógeno.

observado que la producción de IFN γ por esplenocitos depende de la virulencia de la cepa, ya que se ha observado que los niveles de IFN γ disminuyen más rápidamente después de la inoculación con la cepa atenuada *B. abortus* S19 que después de la inoculación con la cepa virulenta *B. abortus* 2308 (Hort *et al.*, 2003; Cha *et al.*, 2010). Parece demostrado que la producción de IFN γ , tras la infección por *Brucella* spp. en modelo murino, está principalmente impulsada por los linfocitos CD4⁺ (Hort *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 1996). Durante la fase aguda de la brucelosis murina la producción de IL18, que regula la IL12 para producir IFN γ , está reprimida, aunque se ha demostrado que este hecho no afecta a la producción de IFN γ endógeno secretado por esplenocitos una vez establecida la infección (Fernández-Lago *et al.*, 1999).

En el curso de la brucelosis murina existen otras IL de interés como la IL1 y la IL10. Se ha demostrado que tratando a ratones con IL1 recombinante antes de la infección se reducen los recuentos de *B. abortus* en el bazo (Zhan *et al.*, 1991). Aunque el papel de la IL pro-inflamatoria IL1 durante el curso de la brucelosis murina aún se desconoce, se ha especulado que dicho papel fuese inducir el factor de estimulación de colonias e incrementar el número de neutrófilos y macrófagos en el bazo (Doyle, 1992). La IL10 es una citocina inmunorreguladora de la que se ha sugerido que, al actuar sobre las células presentadoras de antígeno tales como macrófagos, puede inhibir el desarrollo de respuestas de tipo Th1. Además se piensa que el hospedador utiliza IL10 para controlar las respuestas inmunitarias potentes frente a los microorganismos patógenos con el fin de limitar el daño tisular (Saraiva & O'Garra, 2010). Tras la infección de ratones con *B. abortus*, se detectan pequeñas cantidades de IL10 durante la primera semana de la fase aguda que desaparecen durante la fase crónica (Fernandes & Baldwin, 1995; Fernández-Lago *et al.*, 1996; Fernández-Lago *et al.*, 2005). También, se ha visto que la neutralización de IL10 reduce la colonización bacteriana durante la fase aguda de la infección por *B. abortus* (Fernandes & Baldwin, 1995). En concordancia, recientemente se ha demostrado que tras inhibir la señalización de IL10, el ratón muestra una mayor capacidad para controlar la infección producida por *B. abortus* tanto en la fase aguda como en la fase crónica (Xavier *et al.*, 2013).

En modelo murino se puede determinar la naturaleza de la respuesta inmune que se está generando en respuesta a la infección por *Brucella* spp. analizando las distintas subclases de IgG (Stevens *et al.*, 1995; Fernández-Lago *et al.*, 1996; Hort *et al.*, 2003) (High *et al.*, 2007). En este sentido, se ha visto que transcurridas dos semanas desde que se produce la infección con *B. abortus* comienzan a detectarse anticuerpos IgG frente al S-LPS predominando los de las subclases IgG₃ e IgG_{2a}, mientras que los de la subclase IgG₁ no comienzan a detectarse hasta el final de la fase aguda (Fernández-Lago *et al.*, 1996).

También se ha observado que en ratones tanto infectados con *B. abortus* (Elzer *et al.*, 1994a) como inmunizados con *B. abortus* inactivada (Finkelman *et al.*, 1988) la producción de anticuerpos IgG específicos frente al LPS depende de la producción de IFN γ endógeno.

4. Factores de virulencia de *Brucella* de interés en este trabajo

En comparación con otras proteobacterias patógenas como *Salmonella* o *Neisseria*, las especies del género *Brucella* carecen de muchas estructuras clásicas implicadas en la virulencia como los pili, las fimbrias, la cápsula o los plásmidos. Tampoco se han identificado adhesinas, enzimas o toxinas que actúen sobre los tejidos del hospedador. De ahí que gran parte de la investigación sobre *Brucella* esté dirigida al estudio de los distintos factores que están implicados en su virulencia, lo que también es importante para el desarrollo de nuevas vacunas vivas atenuadas frente a estos microorganismos.

4.1. Proteínas de membrana externa

4.1.1. Proteínas de la familia Omp25/Omp31

La familia Omp25/Omp31 se compone de 7 proteínas denominadas Omp31, Omp31b, Omp25, Omp25b, Omp25c, Omp25d y Omp22 (Vizcaíno *et al.*, 1996; Vizcaíno *et al.*, 2001a; Salhi *et al.*, 2003), de las cuales Omp25 y Omp31 son proteínas mayoritarias en la ME de *Brucella* spp. (Vizcaíno & Cloeckert, 2012).

Las PME mayoritarias de la ME de *Brucella* spp. se identificaron inicialmente al principio de los años 80 del siglo pasado en la fracción de la pared celular de *Brucella* insoluble en dodecil sulfato de sodio (SDS-I) (Dubray & Bézard, 1980; Dubray & Charriaut, 1983). Entonces se observó la presencia de dos proteínas mayoritarias, con una masa molecular aparente de 36-38 kDa y 25-27 kDa, fuertemente asociadas al PG de la pared celular. Estas proteínas hoy se conocen como Omp2b, con actividad porina, y Omp25, respectivamente (Verstrete *et al.*, 1982; Douglas *et al.*, 1984; Ficht *et al.*, 1988; Ficht *et al.*, 1989; de Wergifosse *et al.*, 1995). Más adelante, analizando la fracción SDS-I de *B. melitensis*, se identificó una tercera PME mayoritaria con una masa aparente de 31-34 kDa (Cloeckert *et al.*, 1992a; Cloeckert *et al.*, 1996) que en la actualidad se conoce como Omp31 (Vizcaíno *et al.*, 1996). Posteriormente, la secuenciación de los genomas de *B. melitensis* 16M (DeVecchio *et al.*, 2002), *B. suis* 1330 (Paulsen *et al.*, 2002) y *B. abortus* 9-941 (Chain *et al.*, 2005), reveló la existencia de cinco nuevos genes (*omp31b*, *omp25b*, *omp25c*, *omp25d* y *omp22*) que codifican proteínas homólogas a Omp25 y Omp31, presentando porcentajes de identidad que oscilan

entre el 22% (Omp22 *versus* Omp25) y el 67% (Omp31 *versus* Omp31b) (Salhi *et al.*, 2003).

Todas las proteínas de la familia Omp25/Omp31 muestran una secuencia señal en el extremo amino terminal (N-terminal) y un aminoácido fenilalanina en el extremo carboxi terminal (C-terminal) (de Wergifosse *et al.*, 1995; Vizcaíno *et al.*, 1996; Salhi *et al.*, 2003), características que se han descrito como necesarias para el transporte de proteínas a la ME en las bacterias Gram negativas (Pugsley, 1993; Struyvé *et al.*, 1991).

El gen *omp31* se encuentra en todas las especies del género menos en *B. abortus* (Vizcaíno *et al.*, 1997; Vizcaíno *et al.*, 1999; Martín-Martín *et al.*, 2009), en cuyo genoma existe una delección de 25 kb (de acuerdo a la secuencia de *B. melitensis* 16M) que afecta al gen *omp31* y a otros 22 hipotéticos genes (Vizcaíno *et al.*, 2001a). En *B. ovis* existen 9 sustituciones nucleotídicas que se traducen en 7 aminoácidos diferentes en la proteína Omp31 de *B. ovis* respecto a la proteína Omp31 de *B. melitensis*. Estas sustituciones de aminoácidos, son responsables de las importantes diferencias antigénicas observadas entre las dos proteínas por reactividad con anticuerpos monoclonales y sueros de animales infectados (Vizcaíno *et al.*, 2001b).

La proteína Omp25 se ha detectado, mediante inmunotransferencia, en cepas tipo de todas las especies del género (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2009). En *B. ovis* el gen que la codifica porta una delección de 36 pb en la región terminal 3' que causa una disminución de cerca de 1 KDa en la masa molecular aparente de la proteína Omp25 de *B. ovis* (Cloeckert *et al.*, 1996). Esta delección no se ha observado en ninguna otra especie de *Brucella* y por tanto se considera específica de *B. ovis* (Vizcaíno *et al.*, 2004). Entre la proteína (truncada) Omp25 de *B. ovis* y la del resto de especies de *Brucella* se observan diferencias antigénicas en la reactividad con anticuerpos monoclonales anti-Omp25 (Cloeckert *et al.*, 1996).

El gen *omp25c* presenta un secuencia casi idéntica en todas las especies del género (Vizcaíno *et al.*, 2004) y la proteína correspondiente se ha detectado en cepas tipo de todas las especies del género *Brucella* (Wagner *et al.*, 2002; Connolly *et al.*, 2006; Lamontagne *et al.*, 2007; Dahouk *et al.*, 2008), (Martín-Martín *et al.*, 2009). Incluso, en *B. ovis*, parece ser una de las PME de la familia Omp25/Omp31 mas abundante (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2009).

La proteína Omp25d no se ha detectado en ninguna especie de *Brucella* analizada (Guzmán-Verri *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 2002; Connolly *et al.*, 2006; Eschenbrenner *et al.*, 2006; Lamontagne *et al.*, 2007). Esto podría deberse a un mecanismo de control post-transcripcional relacionado con el proceso de traducción o con el reciclaje de proteínas (Martín-Martín *et al.*, 2009) ya que el gen *omp25d* se encuentra bastante conservado, no se han encontrado defectos en su secuencia, posee un claro sitio de unión al ribosoma

(Vizcaíno *et al.*, 2004) y se transcribe en todas las cepas analizadas (Martín-Martín *et al.*, 2009).

La proteína Omp22 ha podido detectarse mediante inmunotransferencia, en *B. ovis* y *B. neotomae* (Martín-Martín *et al.*, 2009) y mediante espectrometría de masas en *B. abortus* 2308 (Guzmán-Verri *et al.*, 2002; Connolly *et al.*, 2006).

En *B. melitensis* se ha observado una delección de 232 pb que incluye la región terminal 5' del gen *omp31b* lo que, probablemente, impide la síntesis de la proteína al perderse el codón de inicio de la traducción (Salhi *et al.*, 2003; Vizcaíno *et al.*, 2004; Lamontagne *et al.*, 2007) y en *B. ovis* y *B. canis* este gen presenta un codón prematuro de parada de la traducción, debido a una sustitución nucleotídica, que posiblemente acorta la proteína codificada (Vizcaíno *et al.*, 2004).

El gen *omp25b* es el más heterogéneo de la familia. Por un lado, no se encuentra en *B. ovis* ya que esta especie presenta una delección de 15 kb en su genoma, con respecto al genoma de *B. melitensis*, que afecta a este gen. Por otro lado, *omp25b* porta una inserción o delección de un nucleótido, que afecta a la proteína codificada, en las especies *B. abortus* y *B. canis*, *B. pinnipedialis* y *B. ceti* (Vizcaíno *et al.*, 2004).

En los últimos años se han llevado a cabo varias investigaciones encaminadas a dilucidar la influencia de las proteínas de la familia Omp25/Omp31 en la virulencia de las especies del género *Brucella*.

En el caso de Omp31 se ha demostrado que la delección del gen *omp31* en *B. ovis* PA no afecta ni a la capacidad de colonización esplénica de la bacteria en modelo murino (Caro-Hernández *et al.*, 2007) ni a su supervivencia dentro de macrófagos, aunque la ausencia de esta proteína causa un descenso de la capacidad invasiva de *B. ovis* PA en macrófagos (Martín-Martín *et al.*, 2008). Así mismo, se ha demostrado que la ausencia de Omp31 tampoco afecta a la virulencia de la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 (Cloeckert *et al.*, 2004), aunque cabe destacar que dicha cepa presenta niveles de la proteína Omp31 inferiores a los observados en la cepa parental de la que procede (Eschenbrenner *et al.*, 2002), por lo que no puede descartarse que este hecho esté relacionado con la atenuación de esta cepa.

Existe controversia respecto a la proteína Omp25, ya que algunos autores han demostrado que mutantes de cepas de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. ovis* que no sintetizan la proteína están atenuados tanto en su hospedador primario como en ratones (Edmonds *et al.*, 2001; Edmonds *et al.*, 2002b; Edmonds *et al.*, 2002a), mientras que en nuestro laboratorio se ha descartado la implicación en la virulencia de esta proteína en *B. ovis* PA (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2008) y Manterola *et al.* también han descartado una relación entre esta proteína y la virulencia en *B. abortus* 2308 (Manterola *et al.*, 2007).

Respecto al resto de proteínas de la familia Omp25/Omp31, se ha demostrado que,

mientras que la ausencia de la proteína Omp25c no causa ningún defecto en la virulencia de *B. ovis* PA (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2008), las cepas mutantes de *B. ovis* PA que tienen inactivados los genes *omp25d* y *omp22* presentan una fuerte atenuación de la virulencia en ratón (Caro-Hernández *et al.*, 2007). Además, muestran un descenso de la capacidad invasiva y defectos en la multiplicación y supervivencia intracelular tanto en células fagocíticas profesionales como no profesionales por lo que se ha relacionado la presencia de estas proteínas con el establecimiento y desarrollo de un nicho replicativo dentro de las células fagocíticas del hospedador (Martín-Martín *et al.*, 2008).

4.1.2. Lipoproteínas Omp10, Omp16 y Omp19

Las proteínas Omp10, Omp16 y Omp19 son proteínas minoritarias de la ME del género *Brucella*, están codificadas en los genes *omp10*, *omp16* y *omp19* y han sido detectadas mediante inmunotransferencia en todas las especies clásicas del género *Brucella* (Cloeckert *et al.*, 1990; Tibor *et al.*, 1994; Tibor *et al.*, 1996; Tibor *et al.*, 1999). Entre las distintas especies de *Brucella* existe un bajo polimorfismo en relación a estos genes (Vizcaíno *et al.*, 2000).

La secuencia de aminoácidos de Omp10, Omp16, y Omp19 contiene un tetrapéptido en su extremo N-terminal que muestra un alto grado de similitud con la secuencia de consenso requerida para la modificación y procesamiento de los precursores de lipoproteínas bacterianas: Leu-(Ala or Ser)-(Gly or Ala)-Cys desde la posición -3 hasta +1 (Tibor *et al.*, 1999). Además, se ha demostrado que su procesamiento es inhibido por globomiocina y que se tiñen por el ácido palmítico (Tibor *et al.*, 1999). Todas estas características satisfacen los criterios usados para definir una lipoproteína (Hayashi & Wu, 1990).

La proteína Omp16 muestra un importante grado de similitud con las lipoproteínas asociadas al peptidoglicano (PALs) de algunas bacterias Gram negativas como las proteínas PAL de *E. coli* K-12, PAL de *H. influenzae* y PplA de *Legionella pneumophila* (Tibor *et al.*, 1994). Además, la parte proteica de esta lipoproteína, ha sido identificada como un PAMP capaz de activar CDs y conferir cierto grado de protección frente a la infección por *B. abortus* 544 en ratón (Pasquevich *et al.*, 2010). Otros estudios indican que las partes lipídicas tanto de Omp16 como de Omp19 podrían tener un papel en el progreso de la infección ya que han revelado propiedades inmunomoduladoras (Giambartolomei *et al.*, 2004; Zwerdling *et al.*, 2008).

En relación con la virulencia, mutantes de *B. abortus* 544 con el gen *omp10* y el gen *omp19* inactivado, están atenuados en modelo murino mostrando menor colonización esplénica que la cepa parental (Tibor *et al.*, 2002), aunque, al contrario que la lipoproteína Omp19,

Omp10 no parece ser necesaria para la supervivencia intracelular (Tibor *et al.*, 2002). Por otra parte, la inactivación del gen *omp19* en la cepa atenuada *B. abortus* RB51 no incrementa la atenuación de esta cepa (Vemulapalli *et al.*, 2000).

4.2. Sistema de secreción tipo IV

El sistema de secreción tipo IV (T4SS; *Type IV Secretion System*) es un complejo multiproteico que forma un canal que atraviesa la envoltura bacteriana desde el citoplasma hasta el exterior de la bacteria y es utilizado principalmente para la secreción de macromoléculas. La estructura del T4SS de *Brucella* no está caracterizada completamente y la mayor parte de la información se relaciona con el T4SS de *Helicobacter pylori* (Terradot & Waksman, 2011) y *Agrobacterium tumefaciens* (Christie, 2004). Este último está formado por once proteínas (**Figura 4 B**), llamadas VirB1-VirB11 y VirD4, que se disponen de la siguiente manera: VirB6-VirB10 interactúan para formar un canal en el espacio periplásmico que atraviesa las dos membranas de la envuelta celular; por encima de éste VirB2 y VirB5 conforman una estructura en la superficie de la bacteria mediante la cual, ésta se pone en contacto con la célula hospedadora; y hacia el citoplasma de la bacteria se sitúan VirB4, VirB11 y VirD4, que actúan como NTPasas que aportan energía al sistema y al proceso de secreción (Schmidt-Eisenlohr *et al.*, 1999; Christie *et al.*, 2005; Atmakuri *et al.*, 2004; Fronzes *et al.*, 2009; Chandran, 2013). El papel menos claro lo juega VirB3 que parece ser una proteína de membrana interna cuyo extremo C-terminal reside en el citoplasma y que participa en la unión de VirB2 y VirB5 (Yuan *et al.*, 2005; Mossey *et al.*, 2010). Por último, VirB1 es una transglicosilasa que degrada el PG de la pared celular e interviene en la inserción del sistema en el periplasma (Zupan *et al.*, 2007).

El T4SS del género *Brucella* está codificado en el operón *virB* (conservado en todas las cepas del género secuenciadas) y está formado por 12 genes (desde *virB1* a *virB12*) que se transcriben a partir de un mismo promotor situado delante de *virB1*. Las dos principales diferencias con el T4SS de *Agrobacterium* son: un gen extra en *Brucella* (*virB12*), que codifica una lipoproteína de ME, y la ausencia de un gen homólogo a *virD4* (Boschiroli *et al.*, 2002). Las señales que inducen la expresión, ensamblaje y actividad del T4SS de *Brucella* spp. no se conocen completamente (Tsolis & O'Callaghan, 2012) (**Figura 4 A**). Diversos estudios han identificado la limitación de nutrientes (Boschiroli *et al.*, 2002) y el pH ácido (Rouot *et al.*, 2003) como importantes inductores de la expresión de los genes *virB* y se ha relacionado a varios reguladores (Rsh, IHF, HutC y MdrA) con su expresión en respuesta a la limitación de nutrientes (Sieira *et al.*, 2010; Sieira *et al.*, 2012). Además, se han descrito como reguladores directos de los genes *virB* tanto el sistema regulador de dos componentes BvrR/BvrS (Martínez-Núñez *et al.*, 2010) como el sistema *Quorum Sensing* (QS) (Delrue *et al.*,

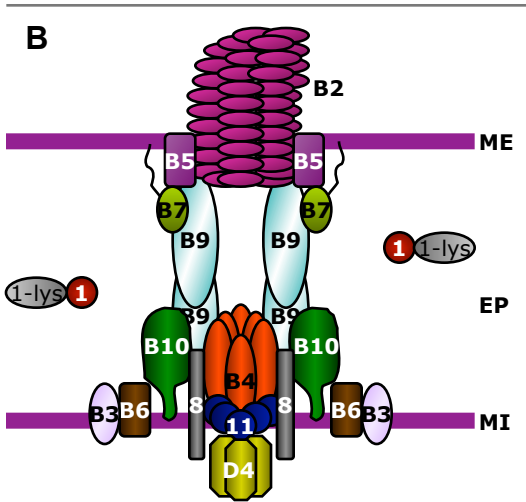
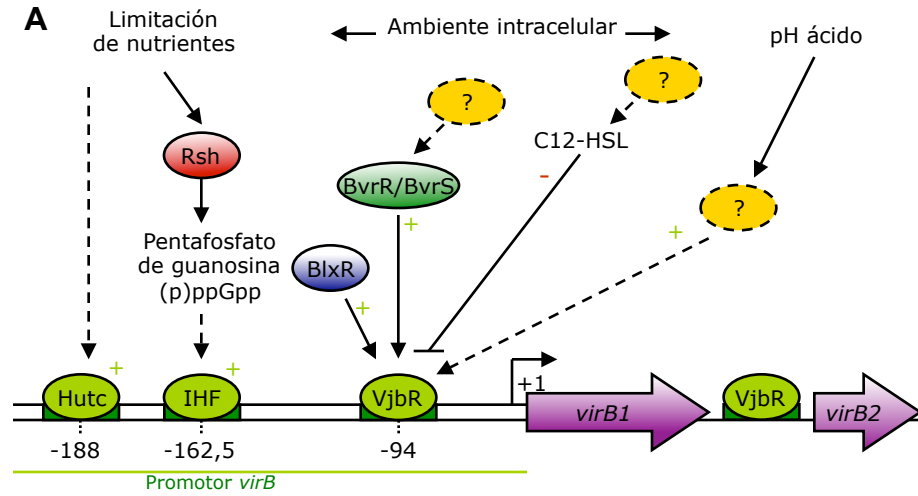


Figura 4. Sistema de secreción tipo IV. A. Regulación de la expresión génica del operón *virB* en el género *Brucella*. Esquema tomado y modificado de Rambow-Larsen *et al.*, 2009 y Arocena *et al.*, 2010. La expresión de los genes *virB* se activa mediante diferentes sistemas reguladores (+) o reprime por C12-HSL (-) en respuesta a diferentes estímulos ambientales intracelulares. En línea discontinua se muestran funciones o mecanismos que no han sido identificados hasta el momento. **B.** Modelo estructural hipotético del T4SS de *Agrobacterium tumefaciens*. Esquema tomado y modificado de Christie *et al.*, 2004. Este sistema está compuesto por 11 proteínas (VirB1-VirB11) codificadas en el operón *virB* y por la proteína VirD4 codificada en el operón *virD*. **EP**; espacio periplásmico, **ME**; membrana externa, **MI**; membrana interna.

2005; Rambow-Larsen *et al.*, 2008; Uzureau *et al.*, 2010).

Existen evidencias genéticas y bioquímicas que indican que el T4SS del género *Brucella* realiza una función similar a la que lleva a cabo el de *L. pneumophila*, que consiste en secretar proteínas efectoras a la célula hospedadora que alteran el tráfico intracelular (Shin & Roy, 2008). En los últimos años, se han identificado algunas de estas proteínas efectoras secretadas por el T4SS de *Brucella* spp., aunque aún se continúa estudiando la función biológica de las mismas: las proteínas VceA y VceC (de Jong *et al.*, 2008), BPE123 (Marchesini *et al.*, 2011), RicA (de Barsy *et al.*, 2011), y las proteínas BspA, BspB, BspC, BspE y BspF (Myeni *et al.*, 2013).

Además de estas proteínas efectoras secretadas a través de T4SS, se han identificado otras dos proteínas [CstA (de Barsy *et al.*, 2012) y Btp1 o TcpB (Salcedo *et al.*, 2008; Radhakrishnan *et al.*, 2009)] que se secretan por una vía independiente del sistema T4SS, lo que parece sugerir la existencia en el género *Brucella* de un sistema alternativo al T4SS para

la secreción de sustancias (Lacerda *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que las especies del género *Brucella* requieren de un T4SS completo y funcional para el establecimiento de la infección (O'Callaghan *et al.*, 1999; Sieira *et al.*, 2000; Hanna *et al.*, 2011; Sá *et al.*, 2012; Martín-Martín *et al.*, 2012) y este sistema se ha implicado en varios procesos relacionados con la supervivencia de *Brucella* spp. en las células hospedadoras. Así, se ha visto que las BCVs de estirpes lisas de *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* defectuosas en el operón *virB* son incapaces de promover fusiones con el RE y, en consecuencia, estos mutantes son incapaces de evitar la fusión con los lisosomas (Comerci *et al.*, 2001; Delrue *et al.*, 2001; Celli *et al.*, 2003; Starr *et al.*, 2008) y son degradados fácilmente en los fagolisosomas (Nijskens, 2008). También se ha demostrado que una mutación polar en el operon *virB* de la cepa rugosa *B. ovis* PA provoca la pérdida de la capacidad de la bacteria para sobrevivir y multiplicarse intracelularmente en macrófagos, así como de establecer una infección crónica en ratón (Martín-Martín *et al.*, 2012).

Finalmente, existen datos contradictorios sobre el papel del T4SS en la internalización de *Brucella* spp. en los macrófagos. Algunos trabajos han señalado que el operon *virB* podría estar involucrado en la entrada de las estirpes lisas de *Brucella* en los macrófagos a través de los dominios lipídicos (Kim *et al.*, 2002; Watarai *et al.*, 2002b). Sin embargo, otros autores han comprobado que mutantes de *Brucella* spp. deficientes en el sistema *virB* invaden las células con la misma eficacia que las cepas virulentas (Celli *et al.*, 2003; Fontes *et al.*, 2005; Martín-Martín *et al.*, 2012).

4.3. Regulador transcripcional VjbR

El QS es un sistema de regulación, dependiente de la densidad celular, que permite controlar la expresión génica en respuesta a moléculas señal (o autoinductores) producidas por las bacterias (Fuqua *et al.*, 1994). Las moléculas señal son, generalmente, N-acil-homoserina lactonas (A-HSL), por lo que el sistema QS depende tanto de estas moléculas señal como de la enzima requerida para su síntesis (A-HSL sintasa) y del regulador transcripcional que reconoce a la A-HSL y modula la expresión de los genes diana (Terwagne *et al.*, 2012).

En sobrenadantes de cultivos de *B. melitensis* 16M se ha logrado purificar una A-HSL, la N dodecanoil-homoserina lactona (C₁₂-HSL), aunque no se ha podido identificar en su genoma el gen encargado de su síntesis (Taminiau *et al.*, 2002). A día de hoy, aún no se conoce ni la A-HSL sintasa, ni la ruta a través de la cual *Brucella* lleva a cabo la síntesis de C₁₂-HSL, pero se sospecha que esta ruta de síntesis está conectada con el metabolismo de ácidos grasos y aminoácidos (Terwagne *et al.*, 2012).

Los reguladores transcripcionales relacionados con QS, descritos hasta el momento en *B.*

melitensis 16M, son dos: VjbR y BabR (también llamado BlxR) (Delrue *et al.*, 2005; Rambow-Larsen *et al.*, 2008). Se ha sugerido que VjbR es un activador de la expresión del gen *babR* y que BabR es un represor del gen *vjbR* lo que indica que ambos reguladores no llevan cabo funciones redundantes en el microorganismo (Uzureau *et al.*, 2010; Weeks *et al.*, 2010). También se ha visto que la expresión del gen *vjbR* es directamente dependiente del sistema de dos componentes BvrR/BvrS (Martínez-Núñez *et al.*, 2010).

El regulador transcripcional VjbR es capaz de unirse al ADN en ausencia de A-HSL (Uzureau *et al.*, 2007; Arocena *et al.*, 2010) y, recientemente, se ha propuesto que podría regular la transcripción génica en respuesta a señales medioambientales como los niveles bajos de pH (Arocena *et al.*, 2012). VjbR regula la expresión de un gran número de genes que codifican desde PMEs, lipoproteínas, adhesinas o el sistema T4SS, hasta genes implicados en el metabolismo de la bacteria y la biosíntesis del flagelo (Delrue *et al.*, 2005; Uzureau *et al.*, 2007; Uzureau *et al.*, 2010; Weeks *et al.*, 2010). Mutantes de distintas especies del género *Brucella* tanto lisas como rugosas (*B. melitensis*, *B. abortus* y *B. ovis*) con el gen *vjbR* inactivado están altamente atenuados en modelo celular y en modelo murino (Arenas-Gamboa *et al.*, 2009; Martín-Martín *et al.*, 2012). Sin embargo, la delección del gen *blxR* de *B. melitensis* 16M no causa una disminución de capacidad de colonización esplénica en modelo murino (Rambow-Larsen *et al.*, 2008), a pesar de que BlxR también se encuentra implicado en la regulación de numerosos genes involucrados en el metabolismo, virulencia y respuesta al estrés en esta cepa (Rambow-Larsen *et al.*, 2008; Uzureau *et al.*, 2010).

4.4. Sistema regulador de dos componentes BvrR/BvrS

Los sistemas reguladores de dos componentes son sistemas biológicos de señalización que abundan en bacterias y en los que intervienen al menos dos proteínas: una histidina quinasa sensora, que se autofosforila en respuesta a un estímulo y una vez activada transfiere su grupo fosfato a un residuo de aspartato de la otra proteína, y una proteína reguladora de la expresión génica. Estos sistemas responden a gran cantidad de señales físicas y químicas que regulan funciones como la división celular, la esporulación, la respuesta a estrés o la virulencia (Hoch & Silhavy, 1995).

En el género *Brucella* se ha detectado la existencia de 22 histidina quinasa sensoras y 24 reguladores que podrían formar parte de posibles sistemas de regulación de dos componentes (Lavín *et al.*, 2010).

Uno de los sistemas de dos componentes mejor caracterizados en *Brucella* es el BvrR/BvrS (López-Goñi, 2012). Este sistema fue identificado por primera vez en *B. abortus* 2308 por Sola-Landa *et al.* (Sola-Landa *et al.*, 1998) y está bien conservado en las diferentes especies (Lavín *et al.*, 2010). La proteína sensora BvrS de 601 aminoácidos presenta dos

dominios transmembrana en su extremo N-terminal, entre los cuales se encuentra una región periplásmica involucrada en la detección de señales medioambientales, y un dominio de autofosforilación y otro con actividad ATPasa en el extremo C-terminal. El segundo de los componentes, la proteína BvrR de 237 aminoácidos, es un regulador de la familia OmpR el cual presenta un dominio regulador en el extremo N-terminal (con residuos de aspartato que interactúan con los grupos fosfato) y un dominio efector (con un sitio de unión del ADN) en el extremo C-terminal (López-Goñi *et al.*, 2002; Sola-Landa *et al.*, 1998).

Respecto a la virulencia, los mutantes en los genes *bvrR* y *bvrS* de *B. abortus* 2308 están altamente atenuados en modelo murino y son incapaces de multiplicarse intracelularmente tanto en células fagocíticas como en células epiteliales (Sola-Landa *et al.*, 1998). Estudios realizados han demostrado que estos mutantes no incorporan ni activan pequeñas GTPasas de la subfamilia Rho (como *cdc2*), requeridas para la polimerización de actina, por lo que se muestran incapaces de penetrar en células HeLa en cultivo, permaneciendo unidos a la superficie celular (Guzmán-Verri *et al.*, 2001). Además, una vez dentro de las células fagocíticas, los mutantes son incapaces de inhibir la fusión con el lisosoma y, por tanto, son rápidamente destruidos en los fagolisosomas (Sola-Landa *et al.*, 1998). En este sentido, cabe destacar que este sistema está muy conservado en el grupo *Alphaproteobacteria* y que en un estudio filogenético se han encontrado sistemas homólogos en *A. tumefaciens* y *Sinorhizobium meliloti* (ChvI/ChvG y ChvI/ExoS, respectivamente) que están involucrados en las relaciones de patogenicidad y de simbiosis que establecen estas bacterias con las células eucariotas vegetales (Charles & Nester, 1993; Cheng & Walker, 1998).

El sistema BvrR/BvrS de *B. abortus* 2308 también es crítico para la homeostasis y la estructura de la ME de la bacteria (Sola-Landa *et al.*, 1998). Se ha observado que la disrupción del sistema BvrR/BvrS en *B. abortus* 2308 altera la expresión de genes que codifican PMEs, como Omp25 y Omp22 (Guzmán-Verri *et al.*, 2002; Lamontagne *et al.*, 2007; Viadas *et al.*, 2010), y de genes que se hallan involucrados en la acilación del lípido A (Manterola *et al.*, 2005). Debido a esto último, las cepas mutantes $\Delta bvrR/\Delta bvrS$ de *B. abortus* 2308 poseen un lípido A compuesto por ácidos grasos con cadenas más cortas que las observadas en las cepas parentales correspondientes. Esta diferencia en la composición de la ME altera su permeabilidad, provocando un aumento de la sensibilidad bacteriana a la acción bactericida de los péptidos catiónicos (Manterola *et al.*, 2005). En cambio, se ha demostrado que la ausencia de las PMEs, Omp25 y Omp22, en la ME de *B. abortus* 2308 no está relacionada con la atenuación en la virulencia que presentan estas cepas mutantes $\Delta bvrR/\Delta bvrS$ (Manterola *et al.*, 2007).

En un intento por determinar qué genes están regulados por este sistema, Viadas *et al.*

han llevado a cabo un análisis transcriptómico que compara los niveles de transcripción de los genes de la cepa parental *B. abortus* 2308 con los del mutante $\Delta bvrR$. El estudio de los genes que se ven afectados ha revelado, en líneas generales, que este sistema regula genes relacionados con la envoltura celular y la ME, con el metabolismo del carbono y el nitrógeno, con la virulencia bacteriana y con otros genes reguladores (Viadas *et al.*, 2010).

4.5. Glucanos cíclicos

Los β 1,2 glucanos cíclicos (C β Gs; *Cyclic β -Glucans*), polímeros de glucosa cíclicos localizados en el espacio periplásmico de la envuelta celular bacteriana, están presentes tanto en *Brucella* como en otras especies relacionadas como *A. tumefaciens* y *S. meliloti* (Bohin, 2000). Sin embargo, al contrario que en *Agrobacterium* y *Sinorhizobium*, la biosíntesis de C β Gs en *Brucella* no está osmorregulada (Briones *et al.*, 1997) y la enzima β 1,2 glucano cíclico sintasa (Cgs), no se inhibe por la adquisición de osmolitos intracelulares en respuesta a oscilaciones osmóticas (de Iannino *et al.*, 2000).

En el género *Brucella*, los C β Gs son sintetizados por la proteína de membrana citoplasmática Cgs codificada en el gen *cgs* (Iñón de Iannino *et al.*, 1998; Ciocchini *et al.*, 2004). Después de su síntesis son transportados al periplasma por la proteína transportadora Cgt y, una vez allí, modificados con al menos dos residuos succinílicos por la succinil transferasa Cgm (Roset *et al.*, 2004; Haag *et al.*, 2010) (**Figura 5**).

Los residuos succinílicos, añadidos a los C β G, confieren a la envuelta bacteriana un carácter aniónico. Estudios realizados con un mutante de *B. abortus* en el gen *cgm*, muestran que este carácter aniónico es importante para la adaptación de la bacteria a un ambiente

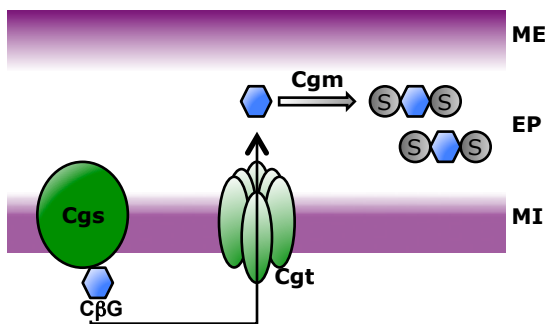


Figura 5. Modelo hipotético de la síntesis de los C β Gs. Esquema tomado y modificado de Haag, *et al.*, 2010. Los C β Gs se sintetizan por la proteína Cgs y después se transportan al periplasma por el hipotético transportador Cgt, una vez allí son modificados con una media de dos residuos succinil por la hipotética proteína Cgm. EP; espacio periplásmico, ME; membrana externa, MI; membrana interna, S; residuo succinil.

hipo-osmótico (Roset *et al.*, 2006). Además, la inactivación de este gen no interfiere en la supervivencia intracelular de la bacteria lo que sugiere que durante el tráfico intracelular no se produce dicho ambiente hipo-osmótico (Roset *et al.*, 2006).

Respecto a la función desempeñada por los C β Gs, un estudio realizado por Arellano-Reynoso *et al.* en 2005 demostró que los C β Gs actúan de forma similar a como lo hace la β -metil-ciclodextrina. Esta molécula contiene una cavidad lipofílica que le permite extraer colesterol de las membranas (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005).

Debido a que el colesterol es componente mayoritario de las balsas lipídicas y que se ha demostrado que *Brucella* spp. necesita entrar en la célula hospedadora a través de estas balsas lipídicas para establecer con éxito la infección (Naroeni & Porte, 2002; Watarai *et al.*, 2002a; Kim *et al.*, 2004; Martín-Martín *et al.*, 2010), los C β Gs podrían estar involucrados en la interacción entre *Brucella* spp. y la célula hospedadora (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005).

Además, ya que intracelularmente también pueden encontrarse balsas lipídicas en los fagosomas, se ha comprobado que los C β Gs juegan un papel importante dentro de la célula hospedadora ayudando a evadir la fusión con el lisosoma y a dirigir a la BCV hacia el RE (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005). Las BVCs de las células infectadas con un mutante Δ cgs de *B. abortus* 2308 adquieren progresivamente catepsina D y se fusionan con los lisosomas, mientras que las BCVs de las células infectadas con la cepa parental impiden su fusión con el lisosoma y son capaces de dirigirse hacia el RE (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005).

Por otra parte, en un estudio llevado a cabo en nuestro laboratorio con un mutante Δ cgs de *B. ovis* PA se observaron defectos en la internalización en macrófagos, aunque posteriormente no se vio afectada la tasa de multiplicación intracelular con respecto a la cepa parental virulenta (Martín-Martín *et al.*, 2012).

Respecto a la implicación en la virulencia en ratones del gen *cgs* de *Brucella*, se ha visto que la inactivación del gen *cgs* en *B. abortus* ocasiona un ligera atenuación de la virulencia (Briones *et al.*, 2001) y que la inactivación del gen *cgs* en *B. ovis* PA afecta fuertemente a la capacidad de colonización esplénica del mutante (Martín-Martín *et al.*, 2012).

4.6. La proteína transportadora BacA

La proteína BacA es una proteína transportadora de membrana citoplasmática que está involucrada en el transporte de VLCFAs al lípido A del LPS por un mecanismo aún no resuelto (Ferguson *et al.*, 2004). Esta proteína está codificada en el gen *bacA*, el cual también está presente en *S. meliloti* (LeVier *et al.*, 2000; LeVier & Walker, 2001).

Aunque aún no se conoce su mecanismo de acción, la ausencia de BacA en mutantes de *B. abortus* provoca un aumento de la sensibilidad de la bacteria al pH ácido, al etanol, a ciertos detergentes y a altas temperaturas de incubación, tal como sucede en *S. meliloti* (Roop *et al.*, 2002). Por ello, se ha sugerido que esta proteína en *B. abortus* 2308 podría estar relacionada con el mantenimiento de la integridad de la envuelta celular (Roop *et al.*, 2002). Sin embargo, en mutantes Δ *bacA* de *B. ovis* PA apenas existen diferencias en las propiedades de la ME con respecto a la cepa parental (Martín-Martín *et al.*, 2012).

Respecto a la relación entre la proteína BacA y la virulencia, existen resultados divergentes respecto a diferentes especies del género *Brucella*. Por un lado, se ha demostrado que una cepa mutante Δ *bacA* de *B. abortus* 2308 presenta una atenuación en la

virulencia tanto en cultivos de macrófagos como en modelo murino (LeVier *et al.*, 2000; Parent *et al.*, 2007). Dicha atenuación se ha relacionado con una posible incapacidad de estos mutantes para poder adaptarse a las condiciones ácidas que se dan en el interior de las BCVs durante el tráfico intracelular (Roop *et al.*, 2002; Bellaire *et al.*, 2005). Por otro lado, en *B. ovis* PA se ha visto que una cepa mutante $\Delta bacA$ no mostraba ningún defecto ni en la internalización ni en la multiplicación intracelular en cultivos de macrófagos, ni tampoco mostraba atenuación de la virulencia en ratones (Martín-Martín *et al.*, 2012). Se ha sugerido que esto puede deberse a que la presencia de VLCFAs no fuera tan necesaria para el mantenimiento de la integridad y las propiedades de la ME en *B. ovis* como en otras especies del género. Sin embargo, no se puede descartar la implicación de la proteína BacA en el curso de la infección por *B. ovis* en el hospedador natural (Martín-Martín *et al.*, 2012).

5. Brucelosis ovina causada por *Brucella ovis*

5.1. La enfermedad

Brucella ovis causa epididimitis contagiosa en carnero. Esta, es una enfermedad de distribución mundial, que se ha descrito en Latinoamérica y países europeos, así como en Australia y Sudáfrica, aunque probablemente se presente en la mayoría de los países que crían ovejas [Manual de la Organización Mundial de Salud Animal (OIE) sobre Animales Terrestres, (OIE, 2009)].

La epididimitis del carnero ocasionada por *B. ovis* es una enfermedad clínica o subclínica que se caracteriza por lesiones genitales en los carneros que provocan una

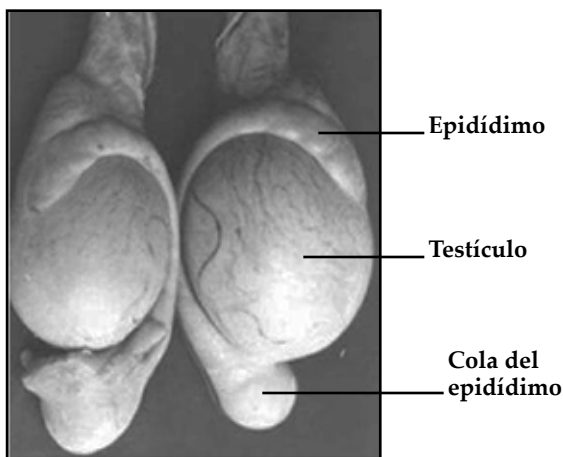


Figura 6. Tomada y modificada de Robles & Olaechea, 2001. Epididimitis unilateral izquierda causada por *B. ovis*.

disminución de su fertilidad debido a la mala calidad del semen. En los animales infectados se puede observar desde un leve aumento de tamaño hasta severas induraciones del epidídimo, que pueden ser uni o bilaterales (Robles & Olaechea, 2001) (Figura 6). En ocasiones, también pueden observarse espermatocelos con fluido espermático espeso en su interior, atrofia testicular y orquitis. En el caso de las hembras se puede observar placentitis y repetición de celo (Blasco, 1990).

La presencia de esta enfermedad en un rebaño conlleva grandes pérdidas económicas, debido a la caída de la fertilidad del rebaño, el aumento en el descarte de carneros infectados, el acortamiento de la vida reproductiva de los machos, el incremento del número de abortos, el aumento de la mortalidad perinatal y restricciones en el comercio, entre otras (Blasco, 1990; Paolicchi, 2001).

La principal vía de contagio de la infección es la sexual. El carnero es el diseminador activo de la infección a través del semen, ya que el macho portador, con o sin lesiones clínicas, puede transmitir la enfermedad. La oveja transmite la enfermedad de forma pasiva a través de fluidos vaginales, al ser cubierta por varios machos. Adicionalmente, en las ovejas, la infección puede permanecer de una estación a otra, lo que conduce a que los carneros sanos estén expuestos a la infección (Paolicchi, 2001).

Además de en los fluidos vaginales, las ovejas pueden excretar *B. ovis* en la leche y, por tanto, la transmisión oveja-lactante también puede ser un mecanismo determinante de la infección (OIE, 2009). También se han descrito casos donde la infección se ha transmitido a través de pastos y fuentes de agua contaminados con secreciones y/o excreciones corporales (Quispe *et al.*, 2002).

Al contrario que otras especies de *Brucella*, la transmisión de *B. ovis* por vía oral no parece ser relevante (Blasco, 1990). Esto podría estar relacionado, al menos en parte, con que esta especie carece de actividad ureasa, la cual ha sido relacionada con la capacidad de algunas especies de *Brucella*, como *B. abortus* y *B. suis*, para sobrevivir el paso a través del estómago en una infección experimental en modelo murino. Además, en el genoma de *B. ovis* se ha encontrado una delección que afecta a los genes *ureG2* y *ureT*, los cuales son necesarios en otras especies de *Brucella* para hacer frente al pH ácido gastrointestinal (Bandara *et al.*, 2007; Sangari *et al.*, 2007; Tsolis *et al.*, 2009; Sangari *et al.*, 2010).

En la fauna salvaje solamente se han descrito casos de contagio en ciervos (Ridler *et al.*, 2012). Hasta la fecha no se han descrito casos en humanos, por lo que la brucelosis causada por *B. ovis* no se considera una enfermedad zoonótica.

5.2. Diagnóstico

La demostración de la existencia de lesiones genitales (epididimitis unilateral u, ocasionalmente, bilateral) mediante palpación de los testículos de los carneros puede ser un indicio de la presencia de esta infección en un rebaño. Sin embargo, este diagnóstico no es suficientemente sensible porque no todos los carneros infectados con *B. ovis* presentan epididimitis (Kott *et al.*, 1988); es más, el diagnóstico clínico es extremadamente inespecífico debido a la existencia de muchas otras bacterias que causan epididimitis clínica. Entre los microorganismos que más frecuentemente causan epididimitis en los carneros se incluyen

Actinobacillus seminis, *A. actinomycetencomitans*, *Histophilus ovis*, *Haemophilus* spp., *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *B. ovis*, *B. melitensis* y *Chlamydophila abortus* (antiguamente *Chlamydia psittaci*) (Menzies, 2012). Debe hacerse hincapié, también, en que muchas lesiones epididimales palpables en los carneros son granulomas espermáticos estériles provocados por un trauma (OIE, 2009).

El mejor método de diagnóstico directo es el aislamiento del patógeno en muestras de semen, exudados vaginales o leche. Sin embargo, generalmente se recurre a pruebas serológicas ya que el diagnóstico bacteriológico es laborioso y requiere varios días (Alton *et al.*, 1998).

Las pruebas inmunológicas más eficaces y utilizadas para detectar *B. ovis* son la fijación de complemento (FC) (Myers *et al.*, 1972), la prueba de doble inmunodifusión en gel de agarosa (AGID; *Agar Gel Immunodiffusion*), que emplea como antígeno el extracto salino caliente de *B. ovis* (Myers, 1973), y el enzimoimmunoanálisis indirecto (I-ELISA; *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) en el que se han empleado como antígenos, extracto salino caliente de *B. ovis* y su R-LPS, entre otros (Marín *et al.*, 1989; Myers *et al.*, 1972); (Vigliocco *et al.*, 1997).

La única prueba prescrita por la OIE y la Unión Europea para el comercio internacional es la FC (OIE, 2009). Sin embargo, la prueba AGID se caracteriza por ser sencilla, de bajo costo y de fácil interpretación (Myers, 1973), aunque se trata de una prueba cualitativa que aún no ha sido estandarizada. Y la prueba I-ELISA es más sensible y específica que la FC o la AGID (Ris *et al.*, 1984) por lo que podría convertirse en un candidato adecuado para ser designado en el futuro como prueba prescrita para el diagnóstico de *B. ovis* (OIE, 2009).

Además, en los últimos años, se ha estado trabajado en el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas basadas en la detección de ácidos nucleicos en muestras clínicas. Manterola *et al.* en 2003 evaluaron el primer método basado en la detección mediante PCR para el diagnóstico de *B. ovis* en muestras de semen de carneros (Manterola *et al.*, 2003). Este método, que resultó incluso más sensible que el diagnóstico bacteriológico, está diseñado para amplificar la secuencia de inserción IS6501 específica del género *Brucella* y que en *B. ovis* está presente en múltiples copias (Manterola *et al.*, 2003). Más recientemente se ha descrito un nuevo método de detección específico de *B. ovis* con una sensibilidad equivalente al anterior y cuya eficacia se ha demostrado, además de en muestras de semen, en otras muestras clínicas como la orina (Xavier *et al.*, 2010).

También, se han desarrollado *test* para la tipificación de aislados de *Brucella*, mediante PCR múltiple, que permiten identificar fácilmente entre las diferentes especies de *Brucella* y las vacunas *B. melitensis* Rev1, *B. abortus* S19 y *B. abortus* RB51 (García-Yoldi *et al.*, 2006; López-Goñi *et al.*, 2008).

5.3. Control de la enfermedad

Para disminuir la incidencia de la epididimitis contagiosa del carnero causada por *B. ovis* se llevan a cabo programas de prevención, control y erradicación de la enfermedad.

Para el control de la enfermedad, la medida adoptada en los países donde la incidencia es baja se basa principalmente en el diagnóstico serológico y el sacrificio de los animales infectados. Sin embargo, en países donde la prevalencia de la infección es elevada, este procedimiento resulta poco viable. En estos casos, la vacunación de carneros y ovejas es la única medida de control disponible a medio plazo. Para un control a largo plazo se debe tener en consideración el efecto de la vacunación en el diagnóstico y deben implementarse programas de acreditación de la ausencia de *B. ovis* (Blasco, 1990; Ridler & West, 2011)

A día de hoy no existe ninguna vacuna disponible que sea específica frente a *B. ovis*, pero la vacuna atenuada *B. melitensis* Rev1, empleada desde los años 60 del pasado siglo en el control de las infecciones por *B. melitensis* en el ganado ovino y caprino, confiere protección heteróloga frente a *B. ovis*. Es por ello que, en la actualidad, esta vacuna está considerada la mejor vacuna disponible para la profilaxis de la brucelosis causada por *B. ovis* (Blasco, 1997; Marín *et al.*, 1990). Su administración en carneros de 4-5 meses, tanto por vía subcutánea como por vía conjuntival, si bien no evita completamente la infección, puede reducir el número de carneros infectados y la severidad de la misma (García-Carrillo, 1981; Fensterbank *et al.*, 1982; Fensterbank *et al.*, 1985; Blasco, 1997; Marín *et al.*, 1990; Schurig *et al.*, 2002).

Sin embargo, la vacuna atenuada *B. melitensis* Rev1 presenta varios inconvenientes que hacen que no sea una vacuna completamente idónea. Estos inconvenientes son: i) alto riesgo de aborto cuando se administra en ovejas gestantes (Blasco, 1997; Schurig *et al.*, 2002), ii) cierto riesgo de infección en su manipulación para el hombre (Blasco & Díaz, 1993) agravado por la resistencia que presenta esta cepa a la estreptomicina, uno de los antibióticos empleados comúnmente en el tratamiento de la brucelosis humana (Skalsky *et al.*, 2008) e, iii) interferencia en el diagnóstico de animales infectados por cepas lisas del género *Brucella* debido a que en los animales vacunados se induce una respuesta de anticuerpos indistinguible, por las actuales pruebas serológicas de diagnóstico (Blasco, 1997), de la generada por la infección activa. A este respecto, es importante destacar que su uso no está permitido en países donde las infecciones por *B. melitensis* se consideran erradicadas como por ejemplo Estados Unidos, Canadá y Nueva Zelanda (Cassataro *et al.*, 2005).

Todo esto hace que el desarrollo de una vacuna específica frente a *B. ovis* presente gran interés.

Objetivos

Brucella ovis ocasiona epididimitis contagiosa en ganado ovino, una enfermedad infecciosa que origina cuantiosas pérdidas económicas en el sector ganadero. Las vacunas empleadas habitualmente para la profilaxis de la brucelosis ocasionada por otras especies de *Brucella* presentan importantes inconvenientes que hacen que su uso para la prevención de infecciones ocasionadas por *B. ovis* está desaconsejado. Por ello, el desarrollo de una vacuna específica para esta especie de *Brucella* presenta gran interés.

Considerando que las vacunas más eficaces para la prevención de infecciones causadas por cepas lisas de las especies *B. melitensis* y *B. abortus* están constituidas por cepas vivas atenuadas de las respectivas especies, cabe esperar que la mejor estrategia para el desarrollo de una vacuna específica frente a *B. ovis* se base en una cepa atenuada homóloga.

Los factores de virulencia de *B. ovis* han sido muy poco estudiados, por lo que su estudio presenta el doble interés de permitir profundizar en los mecanismos empleados por esta bacteria en el establecimiento del proceso infeccioso y, además, de constituir un interesante punto de partida para el desarrollo de una vacuna atenuada específica. En nuestro laboratorio, se han obtenido una serie de mutantes atenuados de *B. ovis* en genes relacionados con la virulencia en otras especies del género *Brucella* pero que aún no se han analizado en cuanto a su interés como vacunas. Además, dado que algunas PMEs en las cepas naturalmente rugosas, como *B. ovis*, carentes de cadenas polisacarídicas O en el R-LPS se encuentran muy expuestas en la superficie de la bacteria, se cree que podrían presentar gran relevancia en la interacción con el hospedador y por tanto en la virulencia.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, los objetivos generales planteados para la realización de este trabajo han sido los siguientes:

- I. Analizar la implicación en la virulencia de *B. ovis* de distintos genes relacionados con la ME y la virulencia de cepas lisas de *Brucella* spp.**

- II. Evaluar el interés de un panel de mutantes atenuados derivados de *B. ovis* PA como vacunas vivas para la profilaxis de infecciones causadas por *B. ovis*.**

Materiales y Métodos

1. Microorganismos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

1.1. Género *Brucella*

Las cepas *B. ovis* PA (empleada como cepa parental para la obtención de mutantes) y *B. melitensis* Rev1 (Tabla I) proceden de la Colección de Cultivos de *Brucella* del Institut National de la Recherche Agronomique de Nouzilly, Francia (BCCN). El resto de cepas de *B. ovis* proceden de estudios anteriores (Tabla I) o se han obtenido durante la realización de este trabajo (Capítulo 4 de Materiales y Métodos. Tabla V).

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y mantenimiento de las cepas de *Brucella* spp. han sido el caldo tripticaseína de soja (TSB, Pronadisa) o el agar tripticaseína de soja (TSA, Pronadisa), suplementados con extracto de levadura (YE, Pronadisa) al 0,3 % (peso/volumen; p/v) y un 5 % de suero de caballo (volumen/volumen; v/v) (HS, Gibco-BRL), descomplementado por calentamiento a 56 °C durante 1 hora (medios TSB-YE-HS o TSA-YE-HS).

Tabla I. Cepas del género *Brucella* utilizadas en este estudio^a.

Cepas	Abreviatura	Características relevantes para este trabajo	Origen ^b o referencia
<i>B. melitensis</i>			
<i>B. melitensis</i> Rev1	Rev1	S-LPS. Estrep ^f . Cepa vacunal	BCCN V4a
<i>B. ovis</i>			
<i>B. ovis</i> PA	PA	R-LPS. Cepa parental virulenta	BCCN 76-250
<i>B. ovis</i> -pNV25C-A	omp25d-M	PA con <i>omp25d</i> inactivado. Kan ^r	Caro-Hernández <i>et al.</i> , 2007
<i>B. ovis</i> -pNV25E-A	omp22-M	PA con <i>omp22</i> inactivado. Kan ^r	Caro-Hernández <i>et al.</i> , 2007
<i>B. ovis</i> -pNVvjbROVL03	vjbR-M	PA con <i>vjbR</i> inactivado	Martín-Martín <i>et al.</i> , 2012
<i>B. ovis</i> -pNVvirB2OVL04	virB2-M	PA con <i>virB2</i> inactivado	Martín-Martín <i>et al.</i> , 2012
<i>B. ovis</i> -pNVcgsOVL03	cgs-M	PA con <i>cgs</i> inactivado	Martín-Martín <i>et al.</i> , 2012
<i>B. ovis</i> -pNVbacAOVL03	bacA-M	PA con <i>bacA</i> inactivado	Martín-Martín <i>et al.</i> , 2012

^a Las cepas obtenidas en este trabajo se recogen en la Tabla V.

^b BCCN, *Brucella* Culture Collection of Nouzilly, Francia.

Cuando las cepas presentaban resistencia a antibiótico, estos medios de cultivo se suplementaron con kanamicina (Kan, Sigma-Aldrich) o estreptomina (Estrep, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 50 µg/ml y 2,5 U.I./ml, respectivamente.

En los experimentos llevados a cabo en la Unidad de Sanidad Animal del Centro de Investigación Tecnológica Agroalimentaria (CITA) de Aragón, el medio empleado fue base de agar sangre N°2 (BAB, Biolife) suplementado con un 5 % de suero de ternera (Seromed, Biochrom) (medio BAB-S).

En todos los casos, la incubación se llevó a cabo a 37 °C y en atmósfera con 5% de CO₂.

Los cultivos en medio líquido se incubaron en agitadores orbitales a 116 rpm y su crecimiento se controló midiendo la densidad óptica a la longitud de onda de 600 nm (D.O. 600 nm). Para ello, se empleó el espectrofotómetro *CO8000 Biowave Personal Cell Density Meter* (WPA, Biochrom).

Todas las cepas se almacenaron a -80 °C en viales con dimetil sulfóxido (DMSO) al 7 % (v/v), con la finalidad de mantenerlas viables durante largos periodos de tiempo.

1.2. *Escherichia coli*.

Para los trabajos de clonación molecular se utilizaron las cepas JM109 y CC118 λ pir de *E. coli*, cuyas características mas relevantes se recogen en la **Tabla II**.

Para el crecimiento de *E. coli* se empleó el medio Luria Bertani (LB), compuesto por YE al 1 % (p/v) (Pronadisa), triptona al 1 % (p/v) (Pronadisa) y cloruro sódico al 1 % (p/v) (Panreac). En el caso de su uso en estado sólido, el medio LB se suplementó con agar bacteriológico (Pronadisa) a una concentración final de 15 g/ml.

Cuando fue necesario seleccionar clones bacterianos mediante resistencia a antibióticos, el medio de cultivo se suplementó con Kan y/o ampicilina (Amp, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 50 µg/ml.

Cuando fue preciso diferenciar clones con actividad β-galactosidasa, las placas de LB se suplementaron 15 minutos antes de la siembra con 20 µl de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) a una concentración de 50 mg/ml.

Los cultivos de *E. coli*, tanto en medio sólido como en medio líquido (en agitación), se realizaron a una temperatura de incubación de 37 °C.

Las cepas de *E. coli* se almacenaron a -80 °C en viales con 7 % de DMSO (v/v).

Tabla II. Cepas de *E. coli* utilizadas en el presente trabajo.

Cepas	Genotipo Relevante	Origen o referencia
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F' traD36, proAB, laq^lZΔM15]</i> .	Promega Corp.
<i>E. coli</i> CC118 λ pir	<i>Δ(ara leu), araD, ΔlacX74, galE, galK, thi-1, phoA20, rpsE, rpoB, argE(Am), recA1, λpir</i> .	Herrero <i>et al.</i> , 1990

2. Procedimientos generales de experimentación animal

2.1. Animales e inoculación

Para los ensayos realizados en modelo animal, se emplearon ratones hembra de la raza BALB/c (Charles River, Francia) de 6-7 semanas de vida, adquiridos 1 semana antes de comenzar los experimentos. Los animales se mantuvieron en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (número de registro PAE SA-001), en jaulas adecuadas, con agua y alimento *ad libitum*.

Para la inoculación de las distintas cepas se utilizó la vía de administración IP.

2.2. Extracción de bazo y muestras de sangre

Para la obtención de las muestras de bazo se procedió al sacrificio de los animales mediante dislocación cervical. Después, se extrajo el bazo en una cabina de seguridad biológica y utilizando material quirúrgico estéril.

Las extracciones de sangre se realizaron mediante punción del seno venoso submandibular.

3. Técnicas generales de manipulación de ácidos nucleicos

3.1. Vectores de clonación

pGEM[®]-T y *pGEM[®]-T Easy*

Son vectores bacterianos linearizados de 3003 y 3018 pb respectivamente (**Figura 7 A-B**), comercializados por Promega Corp. Proceden del vector pGEM[®]-5Zf(+) digerido con *EcoRV*, al que se le ha añadido un residuo de timina en cada extremo 3' generado. Debido a la presencia de estas bases, la clonación de productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ve facilitada, ya que la mayoría de las ADN polimerasas añaden una desoxiadenosina en los extremos 3' de los fragmentos amplificados.

Ambos contienen en su secuencia el origen de replicación ColE1 de *E. coli*, el gen *bla*, que codifica una β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina (Amp^r), el origen de replicación del fago f1, los promotores y los puntos de inicio de la transcripción de las ARN polimerasas T3 y SP6, que permiten las síntesis de ARN *in vitro*, y un sitio de clonación múltiple insertado en la fase de lectura abierta del gen *lacZ*. Este gen, inducible por isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), codifica el péptido α de la β -galactosidasa, enzima que al actuar sobre el sustrato X-Gal origina un producto de color azul. Esto permite la selección de clones que portan plásmidos recombinantes, ya que la inserción de un fragmento de ADN en dicha región inactiva el gen *lacZ* y las colonias poseen un color

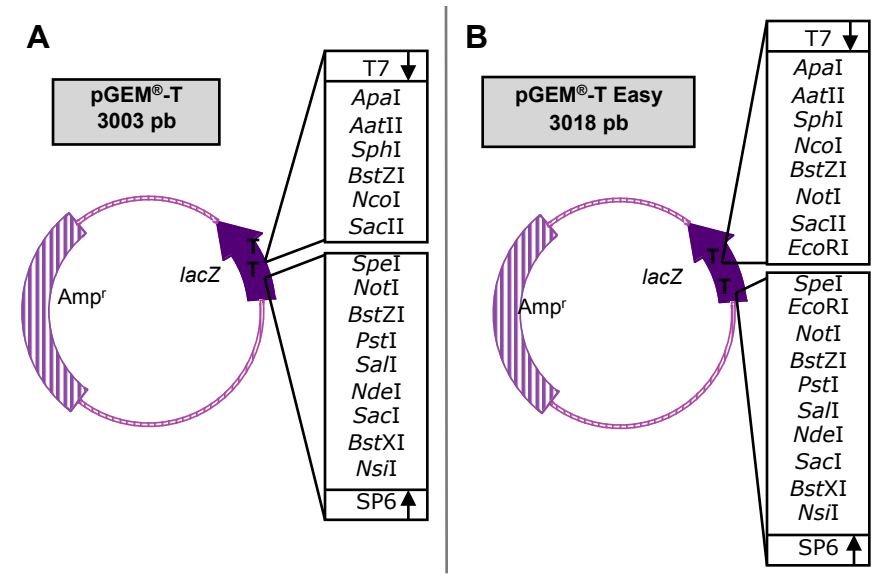


Figura 7. Esquema de los vectores de clonación pGEM-T y pGEM-T Easy.

blanco, frente a aquellas que portan el plásmido sin inserto que poseen un color azul (selección blanco-azul).

pCVD442 y pCVDKan-D

El plásmido pCVD442 posee un tamaño de 6200 pb (Donnenberg & Kaper, 1991) (**Figura. 8**) y se construyó mediante la clonación, en el plásmido pGP704 (Miller & Mekalanos, 1988), del gen *sacB* obtenido mediante la digestión con *PstI* del plásmido pUM24 (Ried & Collmer, 1987). Confiere resistencia a Amp y sensibilidad a la sacarosa (Sac) debido a la presencia del gen *sacB* de *Bacillus subtilis*. Éste último codifica la enzima levansacarasa que cataliza la hidrólisis de sacarosa en levanos (polímeros de fructosa de alto peso molecular), los cuales son tóxicos para bacterias Gram negativas (Gay *et al.*, 1985). Este plásmido posee además el origen de transferencia mobRP4 para procesos de conjugación. A la hora de su replicación, pCVD442 requiere una cepa λ pir, como lo es *E. coli* CC118, ya que el origen de replicación que porta es el denominado oriR6K, el cual necesita la proteína π codificada por el gen *pir*.

El plásmido pCVDKan-D procede de pCVD442 al cual, mediante digestión enzimática con *AspI* y *NdeI*, se le ha extraído el gen de resistencia a Amp y en su lugar se ha clonado, en orientación directa a *sacB*, el gen que confiere resistencia a Kan procedente del vector pUC4K digerido con *HincII* (**Figura 8**) (Martín-Martín *et al.*, 2012).

3.2. Digestiones enzimáticas y ligaciones

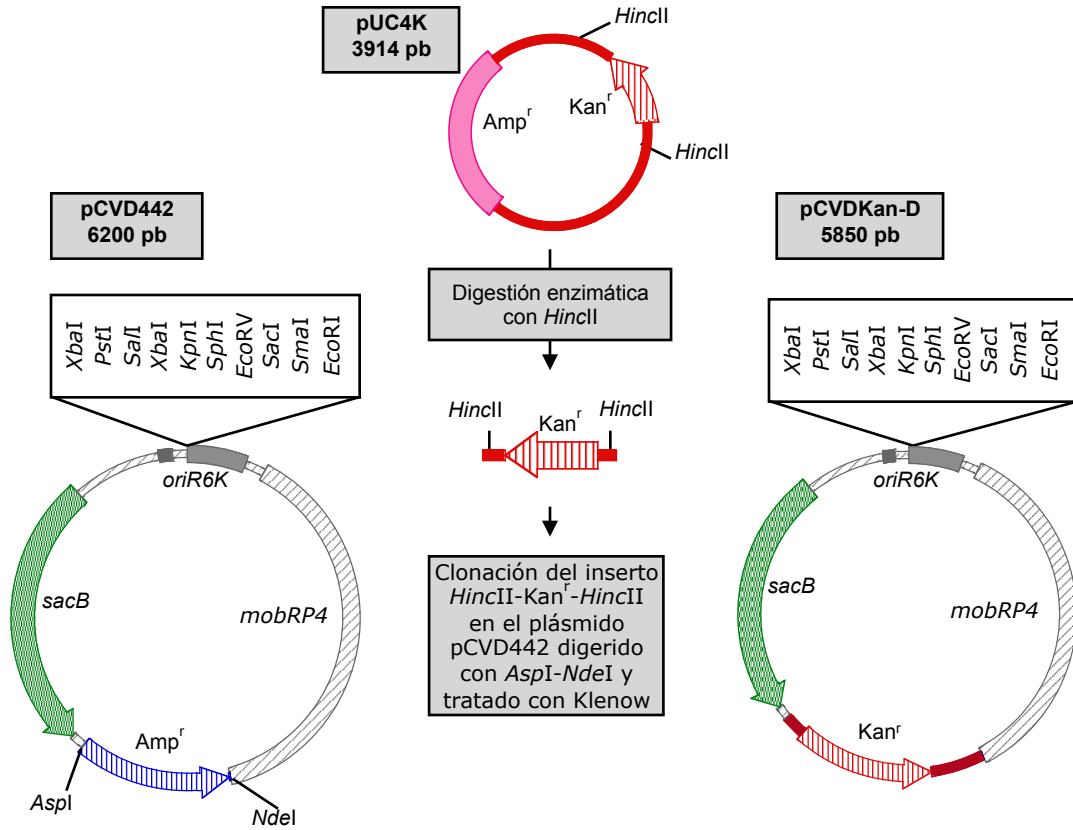


Figura 8. Construcción del plásmido pCVDKan-D. Tomado de Martín-Martín *et al.*, 2012. El gen que confiere resistencia a Amp en el plásmido pCVD442 se sustituyó por un "cassette Kan^r" procedente del plásmido pUC4K. Las enzimas de restricción empleadas, así como sus puntos de corte, se señalan en la Figura.

La digestión de ADN con endonucleasas de restricción se empleó de forma rutinaria para la caracterización física de los fragmentos de ADN, así como para la construcción de moléculas recombinantes, y se realizó siguiendo las instrucciones de temperatura y concentración de sales óptimas suministradas por los proveedores (Roche, New England Biolabs y Promega Corp.).

La ligación de moléculas de ADN se realizó con la ADN ligasa del fago T4 (Promega Corp.). Esta enzima cataliza la unión covalente de extremos cohesivos o romos de ADN mediante la formación de un enlace fosfodiéster entre los grupos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato libres.

3.3. Reacción en cadena de la polimerasa clásica

Esta técnica permite la amplificación de forma exponencial de ácidos nucleicos (Mullis *et al.*, 1986) y se utilizó en el presente trabajo para la amplificación de fragmentos de ADN tanto cromosómico como plasmídico. Cuando fue necesario obtener productos de alta fidelidad, cada reacción contenía entre 10-50 ng de ADN plasmídico o 100 ng si se trataba

de amplificar ADN cromosómico, 1 μl de una concentración 100 μM de cada uno de los oligonucleótidos, 1,75 μl de una mezcla de los didesoxinucleótidos trifosfato (*PCR Nucleotide Mix*, 10 mM de cada dNTP, Roche), 5 μl de una solución 17,5 mM de MgCl_2 y 0,75 μl de ADN polimerasa Pwo (*Pwo SuperYield DNA polymerase*, 5U/ μl , Roche) en un volumen final de 50 μl . Cuando no fue necesario obtener productos de PCR con una alta fidelidad, se utilizó el kit *GoTaq[®] Green Master Mix* (Promega Corp.), el cual proporciona una mezcla de dNTPs, MgCl_2 y ADN polimerasa Taq en unas concentraciones óptimas para la amplificación del ADN. Además contiene dos colorantes y un agente densificante que permiten el análisis directo de las reacciones de PCR en geles de agarosa.

Las reacciones de PCR se efectuaron utilizando el termociclador My Cycler[™] (BIO RAD). El tiempo de elongación varió en función del tamaño del fragmento de ADN que se quería amplificar (entre 1-2 minutos). Teniendo en cuenta esto, las condiciones generales usadas fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial de 5 minutos a 94 °C seguido de 30 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94 °C, 1 minuto a 58 °C y entre 1-2 minutos a 72 °C y para finalizar un ciclo de extensión final de 15 minutos a 72 °C.

3.4. Electroforesis de fragmentos de ADN en geles de agarosa

El análisis de los fragmentos de ADN obtenidos tras las reacciones de PCR o las digestiones enzimáticas se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Estos geles se prepararon al 0,8 % (p/v) de agarosa (*Agarose D-1 Low EEO-GQT*, Pronadisa) en TAE (Tris-acetato 40 mM, Ácido acético 20 mM y EDTA- Na^{2+} 1mM, pH 8) y contenían bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Para cargar las muestras en los pocillos del gel, éstas se mezclaron previamente con tampón de carga (Azul de bromofenol 0,1 % (p/v), Sacarosa 38 % (p/v) y EDTA- Na^{2+} 67 mM). Las electroforesis se realizaron a una corriente constante de entre 45 y 100 V. Los diferentes fragmentos de ADN se visualizaron por irradiación con luz ultravioleta de longitud de onda corta (~ 310 nm) en un transiluminador U.V. Gel Doc 2000 (BIO RAD) y se identificaron gracias al empleo de los marcadores de peso molecular III y VI de Roche y el marcador *1 kb DNA Ladder* de Promega Corp.

3.5. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Para recuperar fragmentos de ADN de interés separados electroforéticamente en geles de agarosa, se empleó el kit *GeneClean[®] II* (Q.BIOgene) siguiendo el procedimiento descrito por la casa comercial. Este método se basa en la unión específica y reversible del ADN a una resina de sílice en presencia de altas concentraciones de sal y permite extraer fragmentos de ADN de entre 200 pb y 20 kb.

3.6. Secuenciación de ADN

La secuenciación de los fragmentos de ADN descritos en este trabajo se realizó según el método de terminación de cadena diseñado por Sanger (Sanger *et al.*, 1977), empleando un sistema de marcaje por fluorescencia. La secuenciación fue realizada por el Servicio de Secuenciación Automática de ADN de la Universidad de Salamanca (secuenciador automático *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* de Applied Biosystems). El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se realizó mediante los programas *ABI PRISM®DNA Sequencing Analysis* (Applied Biosystems), *4Peaks* (Nucleobytes) y *Lasergene®SeqMan* (DNASStar).

3.7. Hibridación de ácidos nucleicos

Marcaje no radiactivo de sondas de ADN

Este método permite obtener fragmentos de ADN marcados a lo largo de toda su extensión de una forma no radioactiva. Para ello, se empleó el *kit DIG DNA labeling* (Roche), que se basa en la hibridación al azar de hexanucleótidos con el ADN molde desnaturalizado y en la elongación posterior de la cadena de ADN mediante el empleo del fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa I de *E. coli*. Esta reacción conlleva además, la incorporación de moléculas de digoxigenina (DIG) (un hapteno esteroide) unidas covalentemente al nucleótido dUTP (DIG-11-dUTP), que sustituyen a nucleótidos dTTP. Gracias a este marcaje, se puede llevar a cabo una posterior inmunodetección con anticuerpos antidigoxigenina conjugados con la enzima fosfatasa alcalina. El procedimiento de marcaje y comprobación de la calidad de la sonda se realizó siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante.

Southern blot

En primer lugar, se extrajo el ADN cromosómico, de las cepas de *Brucella* que iban a ser sometidas al estudio, mediante el método descrito en el Apartado 3.8.2. Posteriormente, este ADN se digirió con la enzima de restricción *HindIII* y se sometió a una electroforesis en gel de agarosa (Apartado 3.4) para separar los fragmentos generados en esta digestión enzimática. En la electroforesis se utilizaron como patrones de tamaño molecular los marcadores III y VI de Roche. Una vez separados los fragmentos de ADN, éstos se transfirieron a una membrana de *nylon* cargada positivamente (Roche) empleando NaOH 0,4 M para realizar dicha transferencia. A continuación, se llevaron a cabo las etapas de prehibridación, hibridación y detección de la hibridación de las sondas marcadas con DIG con los fragmentos de ADN problema siguiendo las instrucciones y utilizando los reactivos del *kit DIG Nucleic Acid Detection* (Roche). Finalmente, el tamaño de las bandas se

evaluó por comparación con las obtenidas con el patrón III y VI de Roche que se hibridaron con sondas constituidas por los mismos patrones marcados con DIG.

3.8. Extracción de ADN

3.8.1. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Para la extracción de ADN plasmídico procedente de *E. coli* con un alto grado de pureza, se empleó el *kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega Corp.) siguiendo las instrucciones facilitadas por la casa comercial. Cuando fue necesaria la obtención de una gran cantidad de ADN plasmídico, se utilizaron las columnas de intercambio aniónico *Qiagen® Plasmid Midi Kit* y *Qiagen® Plasmid Maxi Kit* (Qiagen Inc.), aplicando una modificación al protocolo dado por el fabricante. Esta variación consistió en volver a precipitar el ADN obtenido tras la centrifugación con isopropanol. Para ello, se resuspendió el ADN en 400 µl de agua estéril y se mezcló con 45 µl de NaCl 3 M y dos volúmenes de etanol al 100 %. Posteriormente, se mantuvo 30 minutos a -20 °C y después se centrifugó 20 minutos a 16000 x g. El residuo obtenido se lavó con etanol al 70 % (v/v), se dejó secar y, finalmente, se resuspendió en agua estéril.

Para el análisis de las múltiples colonias resultantes de la transformación de *E. coli* con mezclas de ligaciones, se empleó el método de lisis alcalina (Birnboim & Doly, 1979), extrayendo el ADN con fenol-cloroformo-isoamílico y precipitándolo con etanol al 100 %. Este procedimiento permite conseguir ADN plasmídico con un grado de pureza suficiente para poder realizar reacciones de digestión de ADN con enzimas de restricción, siendo un método menos costoso que el anterior.

3.8.2. Extracción de ADN cromosómico de *Brucella*

La obtención de ADN cromosómico de las diferentes cepas de *Brucella* empleadas en este trabajo se realizó mediante el *kit* comercial *UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit* (MO BIO, Laboratories, Inc.), partiendo de una suspensión bacteriana ajustada a una D.O._{600nm} de 4, en agua estéril, elaborada a partir de un cultivo en TSA-YE.HS y siguiendo las instrucciones ofrecidas por el fabricante.

3.9. Métodos de transformación de bacterias

3.9.1. Transformación de *E. coli*

El proceso de transformación en *E. coli* se realizó siguiendo el método diseñado por Hanahan en 1983 (Hanahan, 1983), basado en la aplicación de un choque térmico a células competentes obtenidas mediante tratamiento con CaCl_2 (Cohen *et al.*, 1972).

Para llevarlo a cabo, se mezclaron las células competentes de *E. coli* con el ADN plasmídico que se quería introducir en la bacteria y la mezcla se mantuvo en hielo durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las células se sometieron a un choque térmico durante 1 minuto a 42 °C y, después, se mantuvieron en hielo durante 2 minutos. A continuación, se les añadió 1 ml de caldo LB y se incubaron durante 1 hora a 37 °C con el fin de permitir que se expresara el gen de resistencia a antibiótico. Finalmente, las células se sembraron en placas de LB suplementadas con el antibiótico adecuado y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Tras la incubación se analizaron las colonias blancas como posibles clones transformantes.

3.9.2. Transformación de *B. ovis*

Para la transformación de *B. ovis* se utilizó el método de electroporación de membrana. Este método de transformación bacteriana consiste en la administración de pulsos rápidos de una corriente eléctrica de gran voltaje con el fin de producir poros transitorios en la bacteria que facilitan la penetración del ADN plasmídico deseado.

Para llevarlo a cabo, se recogió la biomasa de *B. ovis* PA crecida en placas de TSA-YE-HS durante 44 horas a 37 °C. Las células se lavaron 3 veces con agua estéril (centrifugando en cada lavado a 3000 x g durante 5 minutos) y se ajustaron a una D.O._{600nm} de 10. El resultado fueron células electrocompetentes de *B. ovis* PA. Después, se mezclaron 40 µl de estas células con 10 µl (3 µg/10µl) del ADN plasmídico que se quería introducir en la célula. La mezcla se transfirió a una cubeta estéril de electroporación de 0,2 cm de separación entre los electrodos (BIO RAD) y se sometió a descarga eléctrica de 1 pulso (2.5 kV - 5 ms, programa Ec2) en el electroporador Micropulser™ de BIO RAD. Seguidamente, las células se resuspendieron en 1 ml de TSB-YE-HS y se incubaron a 37 °C durante 24 horas en atmósfera con CO₂ al 5 %. Transcurrido este tiempo de incubación, las células se sembraron en placas de TSA-YE-HS suplementadas con el antibiótico adecuado y se incubaron en las mismas condiciones hasta la visualización de colonias. Las colonias crecidas se analizaron como posibles clones transformantes.

4. Obtención de mutantes de *B. ovis* PA

Para la obtención de las cepas mutantes, en primer lugar se inactivaron en fase los genes de interés mediante la denominada PCR de solapamiento (Ho *et al.*, 1989). Posteriormente, se construyeron los plásmidos recombinantes portadores de los genes inactivados y finalmente, se sustituyeron los genes silvestres por los genes inactivados en *B. ovis* PA.

4.1. Obtención de mutantes simples

4.1.1. Inactivación de los genes de interés mediante PCR de solapamiento

La inactivación de los genes *bvrR* (BOV_2010), *bvrS* (BOV_2011), *omp10* (BOV_A0072), *omp16* (BOV_1638), *omp19* (BOV_1858) y *omp31* (BOV_A0366) se llevó a cabo mediante PCR de solapamiento (Ho *et al.*, 1989) (**Figura 9**).

Para ello, a partir del ADN cromosómico de *B. ovis* ATCC 25840 cromosoma I (nº acceso GeneBank: CP000708.1) y cromosoma II (nº acceso GeneBank: CP000709.1) se realizaron las dos primeras amplificaciones (PCR 1A y PCR 1B) de los extremos 5' y 3' del gen respectivamente utilizando en cada una de ellas un oligonucleótido externo al gen de interés y otro interno que hibridaba delimitando la región del gen que se pretendía deleccionar (los cebadores internos tenían una región complementaria entre ellos). Posteriormente, se realizó una segunda reacción (PCR 2) mezclando los productos de PCR 1A y PCR 1B que dio como resultado el gen deleccionado (**Figura 9**). Los cebadores utilizados se recogen en la **Tabla III**.

Para la inactivación del gen *bvrR* se amplificó el extremo 5' del gen con BvrRS-F3 y BvrRSOVL-R2 y el extremo 3' con BvrROVL-F2 y BvrR-R2. El gen *bvrS* se inactivó usando BvrSMUT-F y SecRbvrRS para amplificar en 5' y BvrSOVL-F y BvrS-R en 3'. Para la inactivación del gen *omp10*, el extremo 5' del gen se amplificó con los cebadores *omp10MUT-F* y *omp10-R Ovl* y el extremo 3' con *omp10-F Ovl* y *omp10MUT-R*. El gen *omp16* se inactivó usando los cebadores *omp16MUT-F* y *omp16-R Ovl* para el extremo 3' y los cebadores *omp16-F OVI* y *omp16MUT-R* para el extremo 5'. La inactivación de *omp19* se realizó amplificando el extremo 5' con los cebadores *omp19MUT-F* y *omp19-R Ovl* y el extremo 3' con los cebadores *omp19-F Ovl* y *omp19MUT-R*. Por último, el gen *omp31* se inactivó utilizando *omp31MUT-F* y *omp31-R Ovl* para amplificar el extremo 5' y *omp31-F Ovl* y *omp31MUT-R* para amplificar el extremo 3'.

Los fragmentos amplificados se unieron, a través de las regiones de solapamiento de los cebadores internos, en la segunda PCR (PCR 2) donde se usaron como cebadores los siguientes pares: BvrRS-F3 y BvrR-R2, para el gen *bvrR*, BvrSMUT-F y BvrS-R para el gen

bvrS, *omp10MUT-F* y *omp10MUT-R* para el gen *omp10*, *omp16MUT-F* y *omp16MUT-R* para el gen *omp16*, *omp19MUT-F* y *omp19MUT-R* para el gen *omp19* y *omp31MUT-F* y *omp31MUT-R* para el gen *omp31*.

El resultado de estas últimas PCR fueron unos fragmentos de ADN que portaban los genes deletados, $\Delta bvrR$, $\Delta bvrS$, $\Delta omp10$, $\Delta omp16$, $\Delta omp19$ y $\Delta omp31$.

4.1.2. Clonación en plásmidos de los genes inactivados

Los productos finales obtenidos de las PCR de solapamiento que portaban los genes $\Delta bvrR$ y $\Delta bvrS$ se clonaron en el vector pGEM-T y los que portaban los genes $\Delta omp10$,

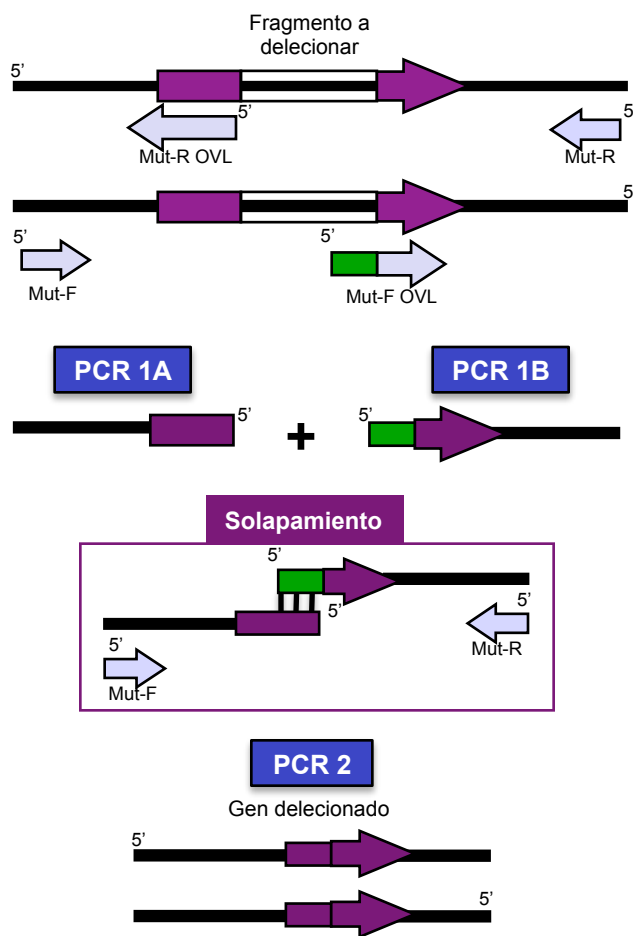


Figura 9. Descripción esquemática de la PCR de solapamiento. Esta técnica se basa en realizar, en primer lugar, dos reacciones de PCR independientes (PCR1A y PCR1B) empleando en cada una de ellas, un cebador externo al gen de interés y otro interno que hibride delimitando la zona del gen a deletar. Estos cebadores internos poseen además una región complementaria entre ellos que permite, posteriormente, en una segunda reacción (PCR2) mezclando los dos productos de PCR1A y PCR1B, obtener el gen amplificado deletado.

$\Delta omp16$, $\Delta omp19$ y $\Delta omp31$ se clonaron en el vector pGEM-T Easy. Cada mezcla de ligación se introdujo en *E. coli* para seleccionar los plásmidos pPSbvrROVL01, pPSbvrSOVL01, pNV10OVL01, pNV16OVL01, pNV19OVL01 y pNV31OVL01. El inserto de ADN de cada plásmido se secuenció con cebadores universales (Tabla III) para comprobar que no se habían introducido mutaciones no deseadas.

Una vez verificada la secuencia de los insertos, se subclonaron en el plásmido pCVD-KanD, mediante digestión enzimática con *SphI* y *SacI*, obteniéndose así los plásmidos recombinantes pPSbvrROVL02, pPSbvrSOVL02, pNV10OVL02, pNV16OVL02, pNV19OVL02 y pNV31OVL02 que, además de contener los genes $\Delta bvrR$, $\Delta bvrS$, $\Delta omp10$, $\Delta omp16$, $\Delta omp19$ y $\Delta omp31$, confieren a la célula

transformante resistencia a Kan y sensibilidad a la Sac. Los plásmidos obtenidos y sus características se recogen en la **Tabla IV**.

Los esquemas de la inactivación de los genes de interés mediante PCR de solapamiento y la construcción de los plásmidos recombinantes portadores de los genes inactivados se muestran en las **Figuras 10-15**.

Tabla III. Oligonucleótidos utilizados en la generación de cepas mutantes de *B. ovis* PA.

Oligonucleótidos usados para la construcción de las cepas mutantes (los nucleótidos resaltados en negrita son secuencias complementarias a los cebadores -R OVL)		
Nombre	Secuencia nucleotídica 5' - 3'	Gen diana (posición desde ATG)
BvrRS-F3	5' - CGGAGAGTTCCTTCAGTC	<i>bvrR</i> (-467)
BvrRSOVL-R2	5' - TTCCGACTCCAGCGCAAT	<i>bvrR</i> (+71)
BvrROVL-F2	5' - ATTGCGCTGGAGTCGGAA GGCGTCGGTTATCGTTTC	<i>bvrR</i> (+689)
BvrR-R2	5' - CAGAACACCCAGAATGGC	<i>bvrR</i> (+1615)
BvrSMUT-F	5' - ATTGCGCTGGAGTCGGAA	<i>bvrS</i> (-757)
SecRbvrRS	5' - CCTCGCGGAACTGGTTCA	<i>bvrS</i> (+198)
BvrSOVL-F	5' - TGAACCAGTTCGCGGAGG TCGAGAATATCGAGCGCA	<i>bvrS</i> (+1596)
BvrS-R	5' - CAACAATGCCGGCAGGAG	<i>bvrS</i> (+2214)
Omp10MUT-F	5' - CGCTTGGCGCGCAATATG	<i>omp10</i> (-706)
Omp10-R OVL	5' - AGCCAGCGCAAGCGACAT	<i>omp10</i> (+50)
Omp10-FOVL	5' - ATGTCGCTTGGCTGGCT CCTTAAGTGCACCTCCTCG	<i>omp10</i> (+335)
Omp10MUT-R	5' - ACCGGCTCGGCCTCGTAT	<i>omp10</i> (+1095)
Omp16MUT-F	5' - GATCGATACGGGTGCTTC	<i>omp16</i> (-722)
Omp16-R OVL	5' - AAGGGCAATAGCGATCGG	<i>omp16</i> (+29)
Omp16-FOVL	5' - CCGATCGCTATTGCCCTTACATGCTGGTCGCAGAAC	<i>omp16</i> (+449)
Omp16MUT-R	5' - GCATGGCATCGTCAAGGA	<i>omp16</i> (+1215)
Omp19MUT-F	5' - AATGTCCTGCCAGTCGAA	<i>omp19</i> (-722)
Omp19-R OVL	5' - GCTGAGCAGACTTGCTTT	<i>omp19</i> (+38)
Omp19-FOVL	5' - AAAGCAAGTCTGCTCAGC TTGATGGCCAGACCACC	<i>omp19</i> (+492)
Omp19MUT-R	5' - CAGGAAAAGCTGACGGTT	<i>omp19</i> (+1264)
31MUT-F	5' - AGAATAAAACACATGCC	<i>omp31</i> (-396)
31MUT-ROVL	5' - GATGGACGCCAAAATTAC	<i>omp31</i> (+8)
31MUT-FOVL	5' - GTAATTTGGCTCCATCG TGCGGTCTGAACTACAAG	<i>omp31</i> (+698)
31MUT-R	5' - GCTGAATGCGGAGATGGT	<i>omp31</i> (+991)

Oligonucleótidos adicionales usados para la comprobación de las cepas y plásmidos obtenidos		
Nombre	Secuencia nucleotídica 5' - 3'	Gen/Plásmido diana (posición desde ATG)
Universal -F	5' - GTTTTCCAGTCACGAC	pGEM®-T / pGEM®-T easy
Universal -R	5' - CAGGAAACAGCTATGAC	pGEM®-T / pGEM®-T easy
Sec-R BvrRS	5' - CCTCGCGGAACTGGTTCA	<i>bvrS</i> (+261)
Omp10 Sec	5' - TGCAGATGCAATATCTCG	<i>omp10</i> (-274)
Omp16 Sec	5' - ACAGCAAGCCCTACGGGA	<i>omp16</i> (-175)
Omp19 Sec	5' - AAGCCCGCAAATTGCCAG	<i>omp19</i> (-292)
Omp10 -F2	5' - ATACATGGTCCGCGGAAGG	<i>omp10</i> (-880)
Omp10 -R2	5' - TGGCGCGCATCTCGTCTT	<i>omp10</i> (+1.331)
Omp19 -F2	5' - CCGAACTTGTCAGCTCA	<i>omp19</i> (-910)
Omp19 -R2	5' - ATGCGCGCTCGGTTTCA	<i>omp19</i> (+1421)
31MUT -F2	5' - TATTGGCGAGGGTGCAGT	<i>omp31</i> (+1539)
31MUT -R2	5' - CCTGTTTCTGTCTGCCAA	<i>omp31</i> (-144)
Omp10 -F3	5' - AATGCCCCGATCATAGCC	<i>omp10</i> (+98)
Omp19 -F3	5' - TCCCGCTTGGTAATCTC	<i>omp19</i> (+95)
31-MAT	5' - GCCGACGTGGTTGTTTCT	<i>omp31</i> (+108)

Tabla IV. Plásmidos construidos para la obtención de cepas mutantes de *B. ovis* PA.

Plásmidos generados para la obtención de cepas mutantes de <i>B. ovis</i> PA	
Nombre	Breve descripción
pPSbvrROVL01	Gen mutante <i>bvrR</i> de <i>B. ovis</i> PA obtenido por PCR de solapamiento y clonado en pGEM-T en orientación directa a <i>lacZ</i> . Amp ^r
pPSbvrROVL02	Inserto <i>SphI</i> + <i>SacI</i> de pPSbvrROVL01 (contiene $\Delta bvrR$) clonado en pCVDKan-D digerido con las mismas enzimas. Kan ^r , Sac ^s
pPSbvrSOVL01	Gen mutante <i>bvrS</i> de <i>B. ovis</i> PA obtenido por PCR de solapamiento y clonado en pGEM-T en orientación directa a <i>lacZ</i> . Amp ^r
pPSbvrSOVL02	Inserto <i>SphI</i> + <i>SacI</i> de pPSbvrSOVL01 (contiene $\Delta bvrS$) clonado en pCVDKan-D digerido con las mismas enzimas. Kan ^r , Sac ^s
pNV10OVL01	Gen mutante <i>omp10</i> de <i>B. ovis</i> PA obtenido por PCR de solapamiento y clonado en pGEM-T easy en orientación directa a <i>lacZ</i> . Amp ^r
pNV10OVL02	Inserto <i>SphI</i> + <i>SacI</i> de pNV10OVL01 (contiene $\Delta omp10$) clonado en pCVDKan-D digerido con las mismas enzimas. Kan ^r , Sac ^s
pNV16OVL01	Gen mutante <i>omp16</i> de <i>B. ovis</i> PA obtenido por PCR de solapamiento y clonado en pGEM-T easy en orientación directa a <i>lacZ</i> . Amp ^r
pNV16OVL02	Inserto <i>SphI</i> + <i>SacI</i> de pNV16OVL01 (contiene $\Delta omp16$) clonado en pCVDKan-D digerido con las mismas enzimas. Kan ^r , Sac ^s
pNV19OVL01	Gen mutante <i>omp19</i> de <i>B. ovis</i> PA obtenido por PCR de solapamiento y clonado en pGEM-T easy en orientación directa a <i>lacZ</i> . Amp ^r
pNV19OVL02	Inserto <i>SphI</i> + <i>SacI</i> de pNV19OVL01 (contiene $\Delta omp19$) clonado en pCVDKan-D digerido con las mismas enzimas. Kan ^r , Sac ^s
pNV31OVL01	Gen mutante <i>omp31</i> de <i>B. ovis</i> PA obtenido por PCR de solapamiento y clonado en pGEM-T easy en orientación inversa a <i>lacZ</i> . Amp ^r
pPS31OVL02	Inserto <i>SphI</i> + <i>SacI</i> de pNV31OVL01 (contiene $\Delta omp31$) clonado en pCVDKan-D digerido con las mismas enzimas. Kan ^r , Sac ^s

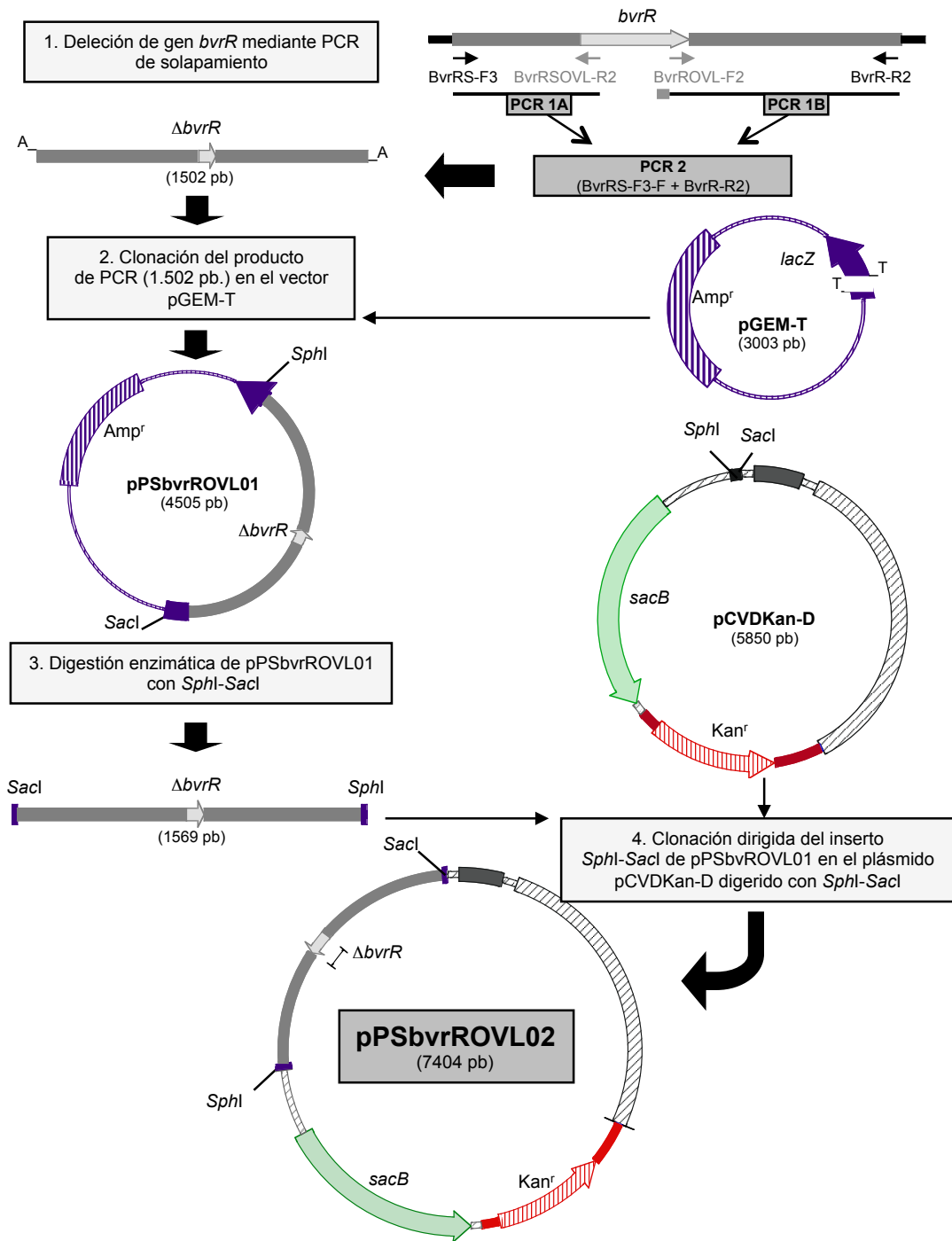


Figura 10. Construcción del plásmido recombinante pPSbvrROVL02, portador del gen $\Delta bvrR$. Se muestran los cebadores, los plásmidos y las enzimas de restricción con sus puntos de corte, empleados en la construcción del plásmido pPSbvrROVL02.

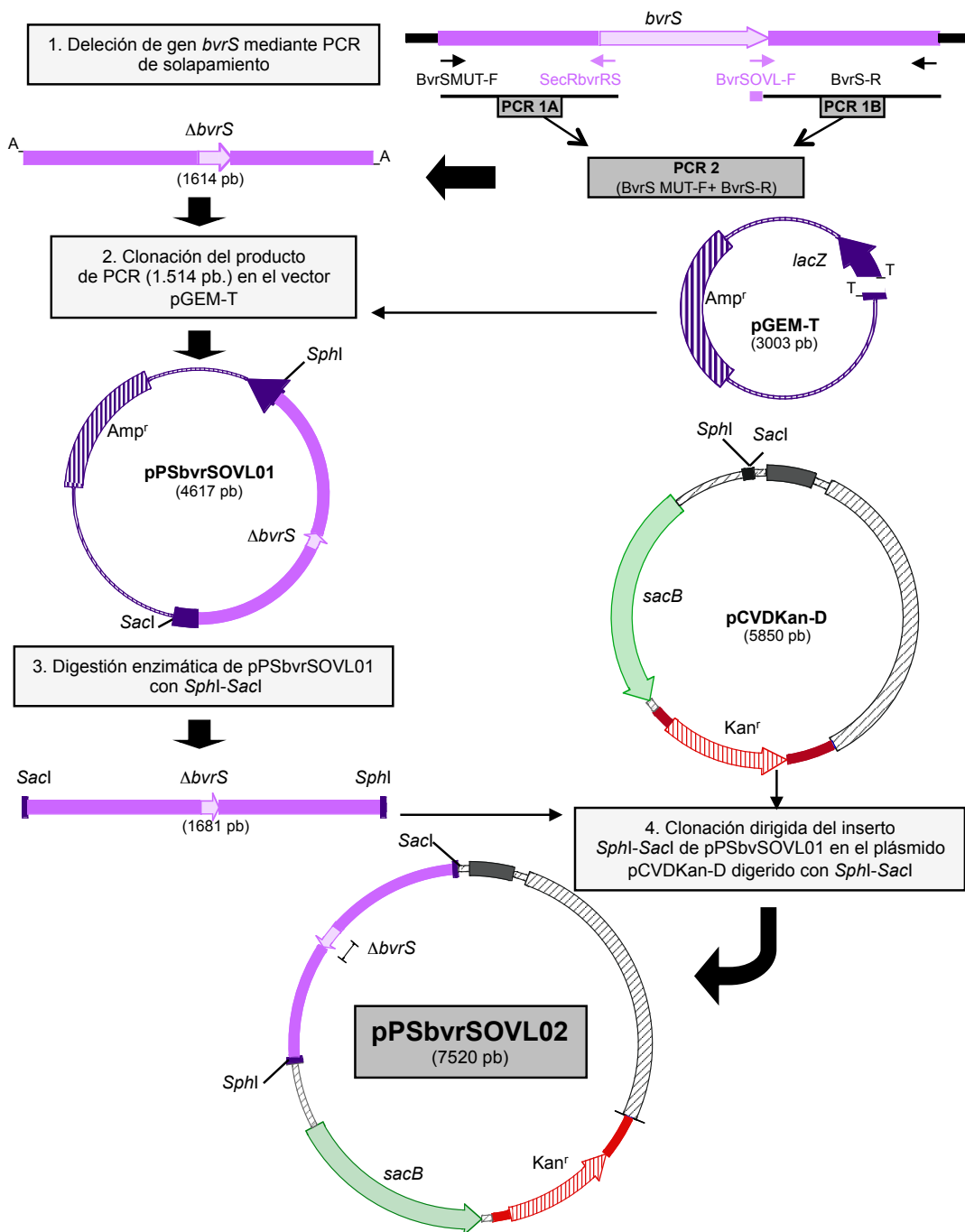


Figura 11. Construcción del plásmido recombinante pPSbvrSOVL02, portador del gen $\Delta bvrS$. Se muestran los cebadores, los plásmidos y las enzimas de restricción con sus puntos de corte, empleados en la construcción del plásmido pPSbvrSOVL02.

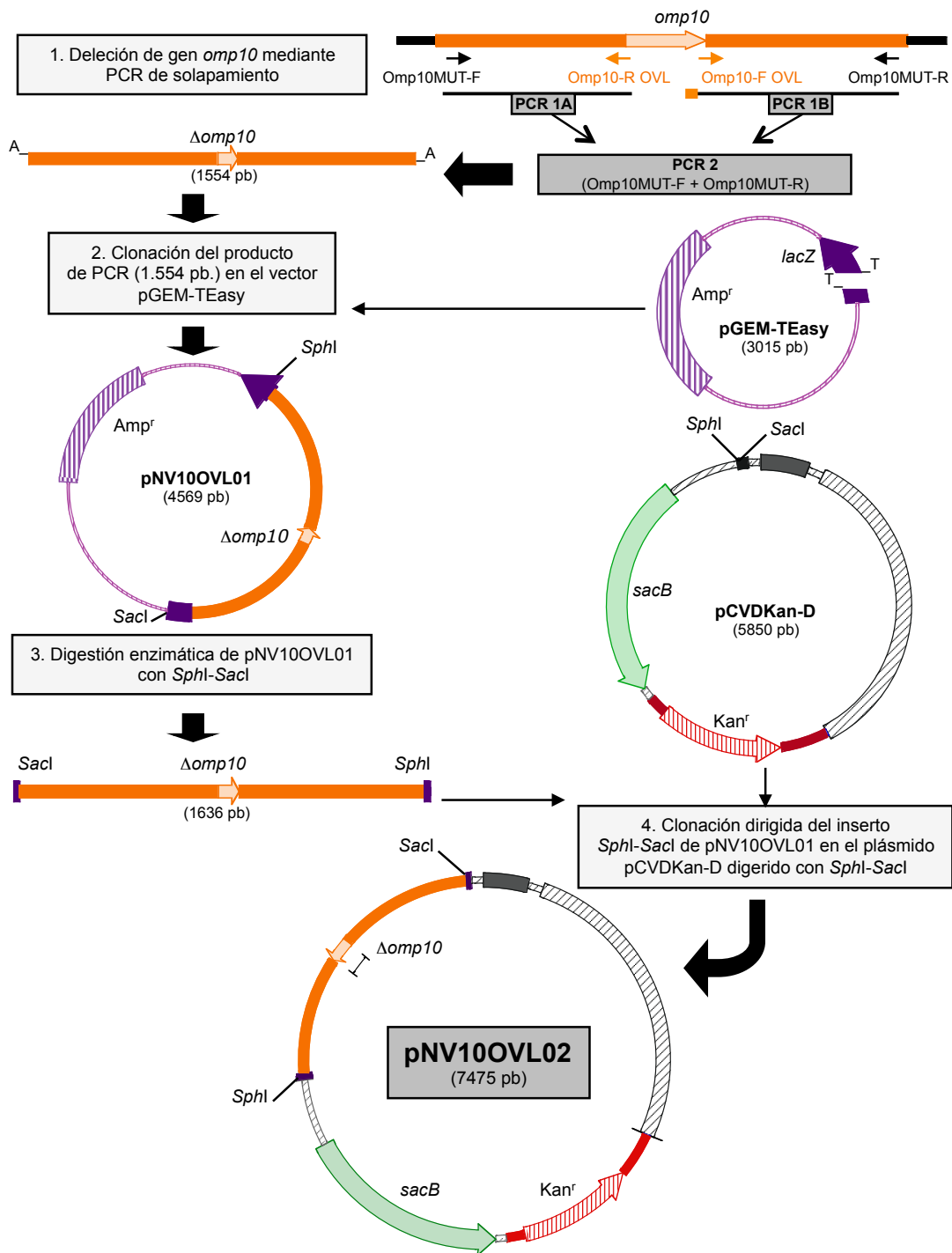


Figura 12. Construcción del plásmido recombinante pNV10OVL02, portador del gen $\Delta omp10$. Se muestran los cebadores, los plásmidos y las enzimas de restricción con sus puntos de corte, empleados en la construcción del plásmido pNV10OVL02.

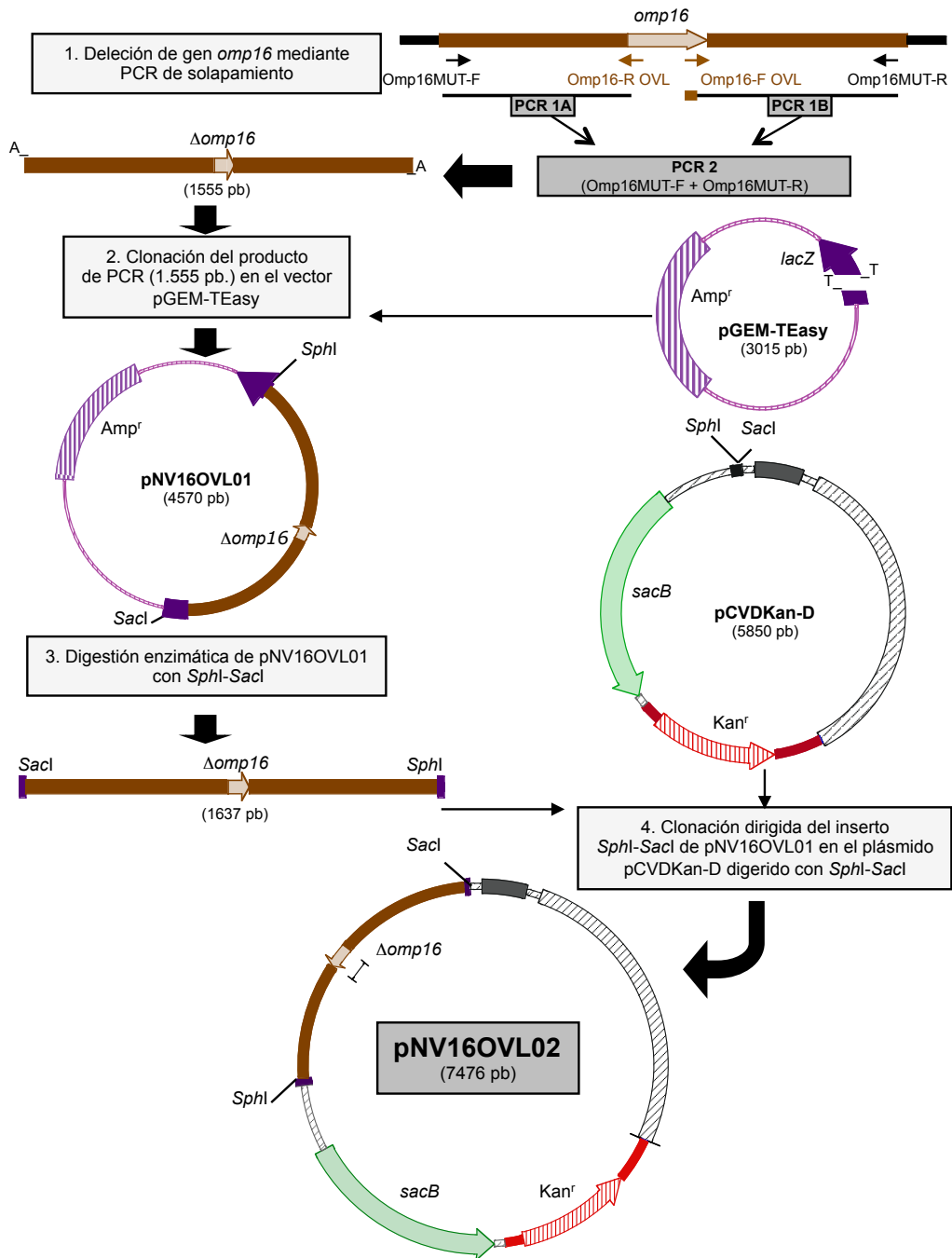


Figura 13. Construcción del plásmido recombinante pNV16OVL02, portador del gen $\Delta omp16$. Se muestran los cebadores, los plásmidos y las enzimas de restricción con sus puntos de corte, empleados en la construcción del plásmido pNV16OVL02.

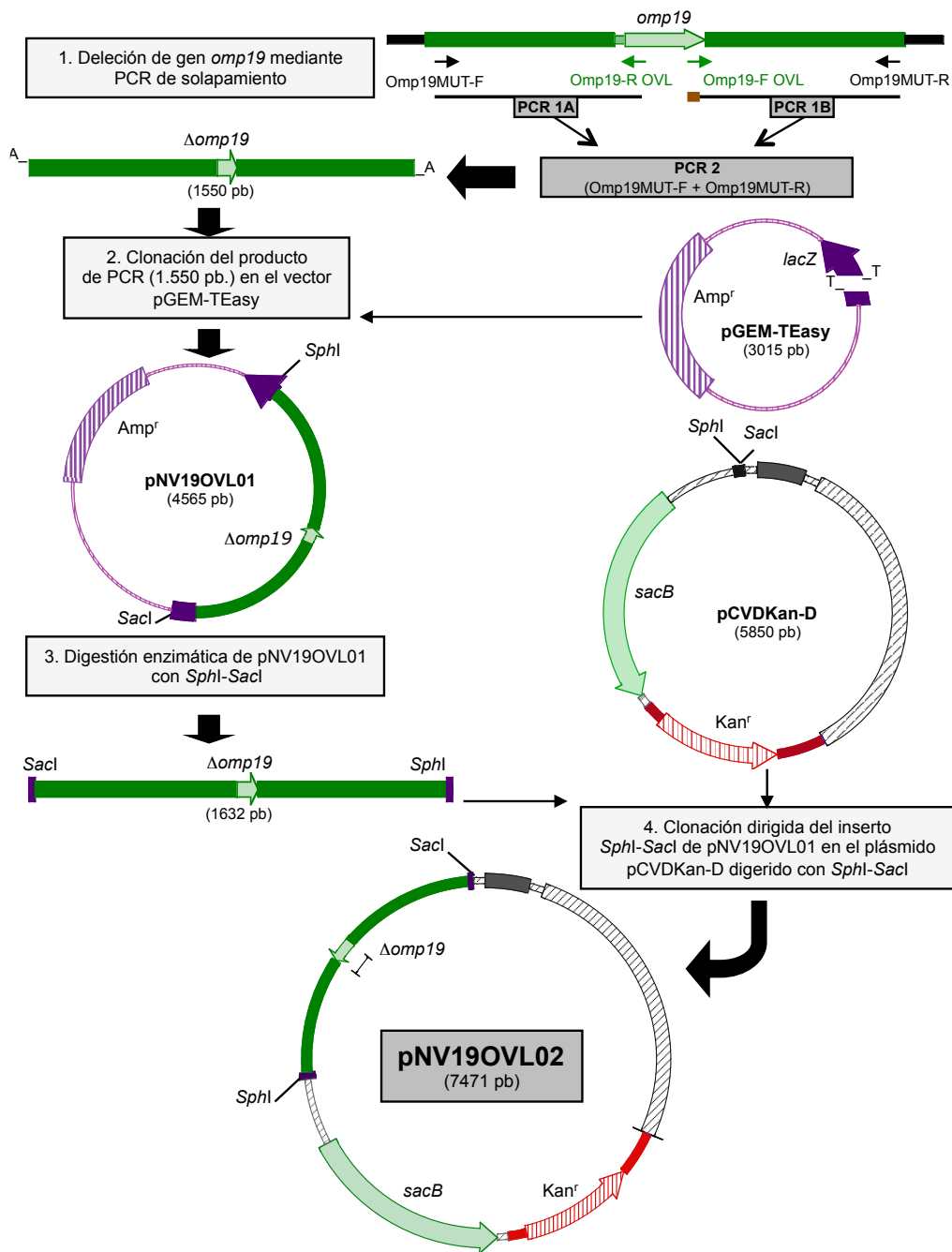


Figura 14. Construcción del plásmido recombinante pNV19OVL02, portador del gen $\Delta omp19$. Se muestran los cebadores, los plásmidos y las enzimas de restricción con sus puntos de corte, empleados en la construcción del plásmido pNV19OVL02.

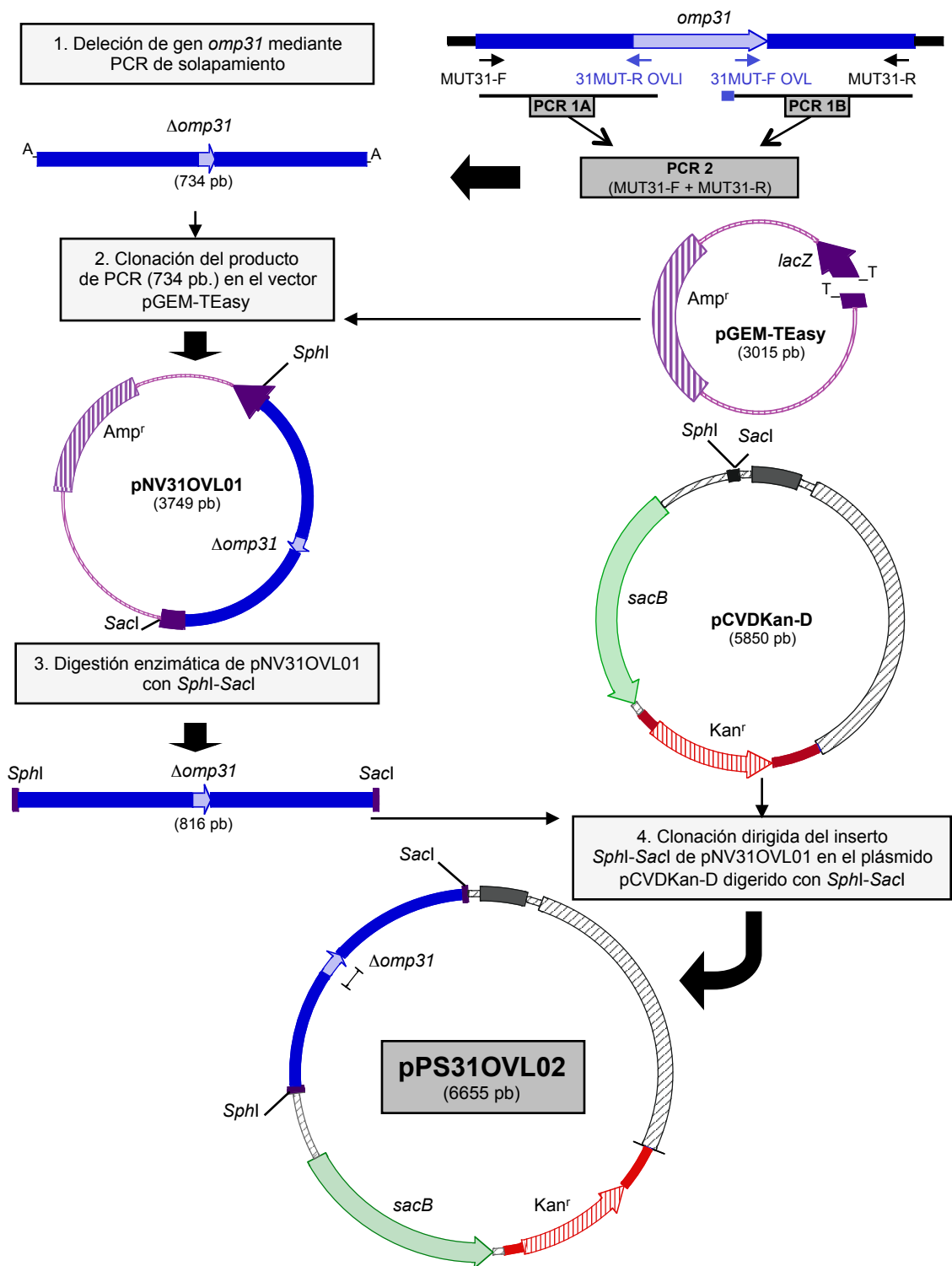


Figura 15. Construcción del plásmido recombinante pPS31OVL02, portador del gen $\Delta omp31$. Se muestran los cebadores, los plásmidos y las enzimas de restricción con sus puntos de corte, empleados en la construcción del plásmido pPS31OVL02.

4.1.3. Sustitución de los genes silvestres por los genes inactivados en *B. ovis* PA.

Una vez obtenidos los plásmidos recombinantes portadores de los genes inactivados $\Delta bvrR$, $\Delta bvrS$, $\Delta omp10$, $\Delta omp16$, $\Delta omp19$ y $\Delta omp31$, se procedió a introducirlos por electroporación (Apartado 3.9.2) en *B. ovis* PA.

Las bacterias recombinantes en las que se produjo la integración del plásmido en el cromosoma de la bacteria, mediante una recombinación homóloga simple a través de una de las dos regiones de ADN flanqueantes al gen, se seleccionaron sembrando en agar TSA-YE-HS-Kan y se caracterizaron genótipicamente como se describe en el Apartado 5.1. Las cepas seleccionadas se describen en la **Tabla V**.

Tabla V. Relación de cepas modificadas genéticamente generadas en la obtención de cepas mutantes de *B. ovis* PA.

Cepas con el plásmido integrado (portan una copia del gen silvestre y una copia del gen inactivado)				
Cepa	Abreviatura	Breve descripción	Genotipo respecto al gen de interés	Fenotipo
<i>B. ovis</i> -pPSbvrROVL02-I	bvrR-I	Plásmido pPSbvrROVL02 integrado en <i>bvrR</i>	<i>bvrR</i> ::pPSbvrROVL02	Kan ^r , Sac ^s
<i>B. ovis</i> -pPSbvrSOVL02-I	bvrS-I	Plásmido pPSbvrSOVL02 integrado en <i>bvrR</i>	<i>bvrS</i> ::pPSbvrROVL02	Kan ^r , Sac ^s
<i>B. ovis</i> -pNV10OVL02-I	omp10-I	Plásmido pNV10OVL02 integrado en <i>omp10</i>	<i>omp10</i> ::pNV10OVL02	Kan ^r , Sac ^s
<i>B. ovis</i> -pNV16OVL02-I	omp16-I	Plásmido pNV16OVL02 integrado en <i>omp19</i>	<i>omp16</i> ::pNV16OVL02	Kan ^r , Sac ^s
<i>B. ovis</i> -pNV19OVL02-I	omp19-I	Plásmido pNV19OVL02 integrado en <i>omp10</i>	<i>omp19</i> ::pNV19OVL02	Kan ^r , Sac ^s
<i>B. ovis</i> -pNV31OVL02-I	omp31-I	Plásmido pNV31OVL02 integrado en <i>omp31</i>	<i>omp31</i> ::pNV31OVL02	Kan ^r , Sac ^s
<i>B. ovis</i> -pNVbacAOVL03-pSOVL02-I	bacA/omp31-I	Plásmido pNV31OVL02 integrado en la cepa <i>B. ovis</i> -pNVbacAOVL03	<i>omp31</i> ::pNV31OVL02	Kan ^r , Sac ^s
Cepas mutantes con el gen de interés inactivado y cepas revertientes al genotipo silvestre				
Cepa	Abreviatura	Breve descripción	Genotipo	Fenotipo
<i>B. ovis</i> -pNV10OVL02-M	omp10-M	Gen <i>omp10</i> sustituido por el gen inactivado de pNV10OVL02	$\Delta omp10$	Kan ^s , Sac ^r
<i>B. ovis</i> -pNV19OVL02-M	omp19-M	Gen <i>omp19</i> sustituido por el gen inactivado de pNV19OVL02	$\Delta omp19$	Kan ^s , Sac ^r
<i>B. ovis</i> -pNV31OVL02-M	omp31-M	Gen <i>omp31</i> sustituido por el gen inactivado de pNV31OVL02	$\Delta omp31$	Kan ^s , Sac ^r
<i>B. ovis</i> -pNVbacAOVL03-pSOVL02-M	bacA/omp31-M	Gen <i>omp31</i> sustituido por el gen inactivado de pNV31OVL02 en la cepa <i>B. ovis</i> -pNVbacAOVL03	$\Delta bacA/\Delta omp31$	Kan ^s , Sac ^r
<i>B. ovis</i> -pNV10OVL02-R	omp10-R	Revertiente a genotipo silvestre	<i>omp10</i>	Kan ^s , Sac ^r
<i>B. ovis</i> -pNV19OVL02-R	omp19-R	Revertiente a genotipo silvestre	<i>omp19</i>	Kan ^s , Sac ^r
<i>B. ovis</i> -pNV31OVL02-R	omp31-R	Revertiente a genotipo silvestre	<i>omp31</i>	Kan ^s , Sac ^r
<i>B. ovis</i> -pNVbacAOVL03-pSOVL02-R	bacA/omp31-R	Revertiente a genotipo silvestre	$\Delta bacA$	Kan ^s , Sac ^r

Posteriormente, gracias a que los plásmidos integrados portaban el gen de sensibilidad a la Sac, las cepas en las que se produjo una segunda recombinación homóloga se seleccionaron, sembrándolas en placas de TSA-YE-HS suplementadas con sacarosa al 5 % (p/v). Las cepas que eran Kan^s y Sac^r se seleccionaron como posibles cepas mutantes o revertientes y sus genotipos se analizaron como se describe en el Apartado 5.1. Todas las cepas recombinantes obtenidas se recogen en la **Tabla V**.

4.2. Obtención del doble mutante $\Delta bacA \Delta omp31$

Al mutante $\Delta bacA$ de *B. ovis* PA, que había sido obtenido anteriormente (Martín-Martín *et al.*, 2012), se le introdujo, mediante electroporación, el plásmido pPS31OVL02 que portaba el gen $\Delta omp31$ (**Figura 15**).

La selección de la cepa con el plásmido integrado en el cromosoma (*bacA/omp31-I*), de la cepa mutante (*bacA/omp31-M*) y de la cepa revertiente al genotipo $\Delta bacA$ (*bacA/omp31-R*) se realizó como se describe en el Apartado anterior. Las características más relevantes de estas cepas se describen en la **Tabla V**.

5. Caracterización de las cepas obtenidas

5.1. Caracterización genotípica

Para la caracterización genotípica de las distintas cepas obtenidas en este trabajo se amplificó, mediante la técnica de PCR (Apartado 3.3), el gen diana de cada proceso de mutagénesis. Los cebadores empleados se detallan en la **Tabla III** y en el Apartado 1.1 de la sección Resultados.

También se realizó una hibridación de ácidos nucleicos *southern blot* (Apartado 3.7). Para ello, el ADN genómico de cada cepa, digerido con la enzima de restricción *HindIII*, se hibridó con sondas marcadas con DIG de los plásmidos recombinantes que contenían los genes inactivados correspondientes.

Además se realizó la secuenciación (Apartado 3.6) de la región del genoma implicada en los procesos de recombinación para comprobar la ausencia de mutaciones no deseadas. Para ello, se realizó una reacción de PCR con dos cebadores que hibridan en el exterior de dicha región y el producto resultante se secuenció. Los cebadores empleados se recogen en la **Tabla III** y en el Apartado 1.1 de la sección Resultados.

5.2. Análisis del crecimiento *in vitro*

5.2.1. Preparación de los cultivos

A partir de las cepas conservadas en DMSO a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se realizaron precultivos en placas de TSA-YE-HS que se incubaron durante 48 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una atmósfera con el 5 % de CO_2 . Posteriormente, de estos precultivos se obtuvieron otros cultivos en las mismas condiciones, a partir de los cuales se hicieron las suspensiones bacterianas empleadas en los ensayos que se describen a continuación.

5.2.2. Recuento en medio sólido de UFC

A partir de los cultivos en TSA-YE-HS (Apartado 5.2.1) se prepararon suspensiones bacterianas iniciales en 3 ml de tampón fosfato salino (PBS: Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, KCl 2,7 mM y NaCl 137 mM) que después se ajustaron a una $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ de 0,20 (que corresponde en la cepa parental *B. ovis* PA a 1×10^9 UFC/ml aproximadamente). A partir de estas suspensiones celulares, se realizaron diluciones decimales seriadas, se sembraron por triplicado 100 μl de cada dilución en placas de TSA-YE-HS y las placas se incubaron durante 7 días a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una atmósfera con un 5 % de CO_2 . Transcurrido este tiempo, se realizó el recuento de UFC y los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar (D.E.) ($n=3$) de UFC/ml en una suspensión de $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ de 0,20.

Además, se verificó el aspecto de las colonias para comprobar la ausencia de contaminación y de disociación del tamaño colonial.

5.2.3. Crecimiento en medio líquido

Para analizar el crecimiento de las cepas en medio líquido, se realizó un seguimiento de la evolución de la $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ a lo largo del tiempo. Se preparó una suspensión bacteriana de cada cepa a una $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ de 0,05 en 30 ml de TSB-YE-HS y se incubó durante 72 horas en agitación constante a 116 rpm en un agitador orbital OS 20 (BOECO), a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en una atmósfera con 5 % de CO_2 . Durante el periodo de incubación, se midió la $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ a distintos tiempos y se realizaron recuentos de UFC/ml de cultivo a las 0, 24 y 48 horas.

5.3. Estudio de las propiedades relacionadas con la membrana externa

5.3.1. Autoaglutinación en medio líquido

Para evaluar la capacidad de autoaglutinación a lo largo del tiempo de las distintas cepas, se prepararon suspensiones bacterianas en TSB-YE-HS a una $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ de 0,8. A continuación se depositó 1 ml de cada suspensión en una cubeta para espectrofotometría y

se midió la D.O._{600nm} a lo largo del tiempo durante 49 horas teniendo cuidado de no mover las cubetas. El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como la media de los porcentajes de D.O._{600nm} procedentes de tres ensayos independientes, tomando el valor de la D. O. inicial de cada cepa como el 100 %.

5.3.2. Sensibilidad a polimixina B y desoxicolato de sodio

Para evaluar la sensibilidad de las distintas cepas al péptido catiónico polimixina B (polimixina B sulfato, Sigma-Aldrich), se siguió el protocolo descrito por Martínez de Tejada *et al.* en 1995 (Martínez de Tejada *et al.*, 1995). Se prepararon suspensiones bacterianas en PBS a una D.O._{600nm} de 0,2 y se diluyeron convenientemente hasta obtener una suspensión con una concentración estimada de 1×10^4 UFC/ml. A continuación, en microplacas estériles de 96 pocillos (Falcon®), se mezclaron por triplicado 100 µl de cada suspensión bacteriana con 100 µl de PBS (control negativo) o con 100 µl de polimixina B a una concentración de 2 mg/ml en PBS. De este modo, la concentración de polimixina B en el pocillo fue de 1 mg/ml. La mezcla se incubó 1 hora a 37 °C y después se sembró, por triplicado, a razón de 50 µl por placa, en placas de TSA-YE-HS que se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂ durante 7 días. Transcurrido el tiempo de incubación, se determinó el número de colonias crecidas, y los resultados se expresaron como la media del porcentaje de UFC/placa ± D.E. de tres experimentos independientes, estimando como el 100 % de supervivencia, el recuento obtenido tras la exposición de cada cepa a PBS sin agente (control negativo).

La sensibilidad de las distintas cepas al detergente aniónico desoxicolato de sodio (Sigma-Aldrich), se llevó a cabo siguiendo la misma metodología descrita para el ensayo de sensibilidad a la polimixina B. La concentración de este agente empleada fue de 0,2 mg/ml, quedando finalmente a 0,1 mg/ml en el pocillo.

5.3.3. Sensibilidad al peróxido de hidrógeno

La sensibilidad al peróxido de hidrógeno de las distintas cepas se evaluó usando el protocolo descrito por Elzer *et al.* en 1994 (Elzer *et al.*, 1994b) con unas pequeñas modificaciones. Se prepararon suspensiones bacterianas en PBS a una D.O._{600nm} de 0,2 y a continuación se sembraron 100 µl, por triplicado, en TSA-YE-HS. Después, se colocó en el centro de cada placa un disco de papel Whatman 3MMChr de 9 milímetros y sobre él se depositaron 10 µl de H₂O₂ al 30 % (Sigma-Aldrich). Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂ durante 72 horas y transcurrido este tiempo, se analizaron los halos de inhibición haciendo cuatro medidas del diámetro de los mismos. Tras calcular la media del diámetro de cada placa, los resultados se expresaron como la media ± D.E. del

diámetro (en mm) del halo de inhibición observado en las tres placas empleadas para cada cepa.

5.4. Comportamiento en macrófagos J774.A1

5.4.1. Línea celular, medio y condiciones de cultivo

Estos ensayos se llevaron a cabo en la línea celular de macrófagos J774.A1 (DSMZ ACC170) que son células macrofágicas derivadas de un sarcoma reticular murino.

Los macrófagos se cultivaron de forma rutinaria en placas de 100 x 20 mm (Falcon®), a 37 °C y en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂. El medio de cultivo que se empleó fue el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO®, Invitrogen) suplementado con un 10 % (v/v) de suero bovino fetal (FBS, GIBCO®, Invitrogen) (medio DMEM-FBS). El mantenimiento de las células se llevó a cabo mediante dilución en medio fresco cuando el crecimiento celular alcanzaba el 75 % de la placa. Para ello, en primer lugar se llevaba a cabo un lavado con TEN (Tris-HCl 40mM, EDTA-Na²⁺ 1mM y NaCl 150mM, a pH 7,5), después las células se desprendían de la placa mediante raspado (*Cell Scraper*, Nunc) y posteriormente, tras ser resuspendidas, se diluían 1:4 en el medio de cultivo y se distribuían en nuevas placas de cultivo. El seguimiento de los cultivo se realizó con un microscopio invertido CK2 OLYMPUS y el control de viabilidad se llevó a cabo mediante tinción con azul de tripano (Merck) al 0,4 % en agua destilada.

5.4.2. Análisis de la penetración y supervivencia de los mutantes en macrófagos

En primer lugar, fue necesario hacer una preparación de macrófagos para su infección. Para ello, utilizando para su recuento una cámara de Neubauer, se prepararon suspensiones celulares en medio DMEM-FBS a una concentración de 1×10^5 células/ml, se distribuyeron en placas de 96 pocillos a razón de 200 μ l/pocillo y se incubaron 24 horas.

Por otro lado, también fue necesario preparar suspensiones bacterianas de las cepas que iban a ser estudiadas a una multiplicidad de infección (MOI) de 200. Para ello, se prepararon suspensiones bacterianas en PBS a una D.O._{600nm} de 0,2 que, considerando los resultados obtenidos con cada cepa en el análisis del crecimiento en medio sólido (Apartado 5.2.2), se diluyeron convenientemente en medio DMEM-FBS hasta alcanzar la concentración requerida. Las concentraciones exactas en cada suspensión bacteriana se determinaron retrospectivamente mediante siembra en placas de TSA-YE-HS, por triplicado, de 100 μ l de una dilución con alrededor de 1×10^3 UFC/ml.

Para realizar la infección, se retiró el medio de cultivo de los macrófagos preincubados 24 horas y se sustituyó por 100 μ l de la suspensión bacteriana. Tras incubar durante 2 horas

a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂, las monocapas celulares se lavaron 2 veces con 300 µl medio de cultivo y se volvieron a incubar con 370 µl de medio DMEM-FBS suplementado con 100 µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich), con el fin de eliminar las bacterias extracelulares.

A distintos tiempos post-infección, considerando como punto inicial de análisis (tiempo = 0 horas) el transcurrido tras una hora de incubación con gentamicina, las células se lavaron 3 veces con 400 µl medio de cultivo para eliminar los restos de antibiótico. Posteriormente, las células se incubaron durante 20 minutos con 200 µl de agua destilada estéril. Los lisados obtenidos se diluyeron decimalmente y se sembraron en placas de TSA-YE-HS que se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂ durante 7 días.

Tras la incubación, se realizaron los recuentos de las colonias crecidas, los datos individuales se transformaron en logaritmo para normalizar la distribución de los datos intragrupo (Montaraz & Winter, 1986) y los resultados se expresaron como la media ± D.E. del logaritmo (log) de las UFC/ml de los tres pocillos empleados por cada cepa y tiempo de análisis.

5.5. Análisis de la virulencia en modelo murino

A partir de cada cepa objeto de estudio (las cepas mutantes $\Delta omp10$, $\Delta omp19$, $\Delta omp31$, $\Delta bacA/\Delta omp31$ de *B. ovis* PA y la cepa parental *B. ovis* PA) se prepararon suspensiones bacterianas en PBS a una D.O._{600nm} de 0,2, que se diluyeron adecuadamente en PBS para obtener una concentración estimada de 2×10^6 UFC/ml.

Los animales, divididos de forma aleatoria en grupos, recibieron 500 µl de cada una de estas suspensiones por vía IP (dosis administrada: 1×10^6 UFC/ratón). Las concentraciones exactas en cada suspensión bacteriana se determinaron retrospectivamente mediante siembra, por triplicado, de 100 µl de una dilución con alrededor de 1×10^3 UFC/ml.

A las semanas 3 y 8 p.i., se sacrificaron 5 animales por cada grupo, se les extrajo el bazo en condiciones de esterilidad y se realizó el recuento de UFC/bazo de la cepa bacteriana previamente inoculada.

Para realizar dicho recuento, cada bazo se pesó y se homogeneizó individualmente, en una bolsa estéril, en un volumen de PBS 9 veces su peso (dilución 1:10 p/v), usando para ello un Stomacher® 80 BIOMASTER (Seward). A partir de esta primera dilución se realizaron diluciones decimales seriadas de las que se sembraron 100 µl en placas de TSA-YE-HS por triplicado. Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂ durante 7 días y se realizó el recuento y confirmación de las colonias en aquella dilución que presentaba entre 30-300 colonias. En el caso de no presentarse esta circunstancia, el recuento se llevó a cabo en las placas sembradas a partir de la dilución inicial. En todos los

casos, el 10 % de las colonias contadas se sometieron a confirmación mediante análisis por PCR (Apartado 3.3).

Para la expresión de los resultados, los datos individuales se transformaron en log y los niveles de infección se expresaron como la media \pm D.E. (n=5) del log UFC/bazo para cada grupo de animales en cada tiempo analizado.

6. Estudio, en modelo murino, de la utilidad de los mutantes $\Delta omp25d$, $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$, $\Delta virB2$ y Δcgs de *B. ovis* PA como vacunas vivas atenuadas

6.1. Persistencia de los mutantes

6.1.1. Evaluación preliminar de la colonización esplénica

Considerando los resultados disponibles de los ensayos previos de virulencia (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2012), las dosis vacunales seleccionadas fueron de 1×10^7 UFC/ratón para la cepa mutante $\Delta omp25d$ de *B. ovis* PA y de 1×10^8 UFC/ratón para las cepas mutantes $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$, $\Delta virB2$ y Δcgs de *B. ovis* PA. Se realizaron suspensiones de cada cepa mutante para obtener la dosis de bacterias deseada en un volumen de 500 μ l. También se prepararon los inóculos de la cepa parental *B. ovis* PA (dosis: 1×10^8 UFC/ratón) y de la vacuna clásica *B. melitensis* Rev1 (dosis: 1×10^5 UFC/ratón). Las concentraciones exactas en cada suspensión bacteriana se determinaron retrospectivamente mediante siembra, por triplicado, de 100 μ l de una dilución con alrededor de 1×10^3 UFC/ml.

Se inocularon 5 ratones por cepa con 500 μ l de las suspensiones bacterianas por vía IP y 3 semanas después, se sacrificaron los animales y se les extrajo el bazo para hacer el recuento de UFC/bazo. Este recuento se llevó a cabo como se describe en el Apartado 5.5. Los resultados se expresaron como la media \pm D.E. (n=5) del log UFC/bazo para cada grupo de vacunación a la semana 3 p.i.

6.1.2. Mutante Δcgs de *B. ovis* PA

Los ensayos descritos en este Apartado se llevaron a cabo en el CITA de Aragón.

En un primer ensayo, se inocularon por vía IP 100 μ l de la cepa mutante Δcgs de *B. ovis* PA y 100 μ l o de la cepa parental *B. ovis* PA (dosis: 1×10^8 UFC/ratón). A las semanas 1, 3, 5 y 10 p.i., se sacrificaron 5 animales de cada grupo y se les extrajo el bazo para hacer el recuento de UFC. Este recuento se llevó a cabo como se describe en el Apartado 5.5, con la única diferencia que se usó como medio de cultivo BAB-S en vez de TSA-YE-HS. Los

resultados se expresaron como la media \pm D.E. (n=5) del log UFC/bazo para cada cepa y a cada tiempo.

En un segundo ensayo, se establecieron 3 grupos de 5 ratones BALB/c que se inocularon por vía IP con 1×10^6 , 1×10^7 o 1×10^8 UFC de la cepa mutante Δcgs de *B. ovis* PA. A la semana 3 p.i., se sacrificaron 5 animales de cada grupo para realizar el recuento de UFC de la cepa mutante Δcgs presentes en el bazo. Este recuento también se llevó a cabo en medio de cultivo BAB-S y los resultados se expresaron como la media \pm D.E. (n=5) del log UFC/bazo para cada dosis de inoculación empleada.

6.1.3. Mutantes $\Delta omp25d$, $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$ y $\Delta virB2$ de *B. ovis* PA

Para analizar la cinética de colonización esplénica de las distintas cepas, se inocularon por vía IP 500 μ l de una suspensión bacteriana de cada cepa mutante (las dosis empleadas fueron: 1×10^7 UFC/ratón la cepa mutante $\Delta omp25d$ y 1×10^8 UFC/ratón el resto), 500 μ l de la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 (dosis: 1×10^5 UFC/ratón) o 500 μ l de la cepa parental *B. ovis* PA (dosis: 1×10^8 UFC/ratón). Las concentraciones exactas en cada suspensión bacteriana se determinaron retrospectivamente mediante siembra, por triplicado, de 100 μ l de una dilución con alrededor de 1×10^3 UFC/ml.

Para el análisis de anticuerpos en suero y citocinas endógenas en bazo, como control negativo, se incluyó un grupo de animales inoculado con 500 μ l de PBS.

A los días 1, 3, 7, 14, 21 y 28 p.i., (en el caso de las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$, de la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 y de la parental *B. ovis* PA) y a los días 7, 14 y 28 (en el caso de las cepas mutantes $\Delta vjbR$ y $\Delta virB2$), se extrajeron muestras de sangre de 5 animales de cada grupo para analizar los niveles de anticuerpos en suero (Apartado 6.3). Seguidamente, los ratones se sacrificaron y se les extrajo el bazo para analizar los niveles de citocinas (Apartado 6.2) y hacer el recuento de UFC/bazo. Este recuento se llevó a cabo como se describe en el Apartado 5.5 con la única diferencia que se usó como diluyente solución salina de Hanks (HSBB, DIFCO) en vez de PBS. Los resultados se expresaron como la media \pm D.E. (n=5) del log UFC/bazo para cada grupo de vacunación y a cada tiempo.

6.2. Análisis de citocinas endógenas en bazo

Para el análisis de citocinas endógenas (Fernández-Lago *et al.*, 1996), el homogeneizado inicial del bazo, no usado en el recuento anterior, se suplementó con CHAPS (Sigma-Aldrich) a una concentración final del 1 %. Este macerado, se incubó durante 1 hora a 4 °C para lisar las células y se centrifugó a 1500 x g para eliminar los restos celulares. En los

sobrenadantes obtenidos se analizaron las siguientes citocinas: IL1 α , IL10, IL12p40, TNF α e IFN γ .

El ensayo se llevó a cabo mediante inmunoensayos enzimáticos en sándwich comerciales (BD OptEIA™ Mouse IL1 α ELISA Set, Mouse IL10 ELISA Set, Mouse IL12p40 ELISA Set, Mouse TNF α ELISA Set y Mouse IFN γ (AN-18) ELISA Set de BD Biosciences, respectivamente) según las instrucciones facilitadas por el fabricante. Los límites de detección de la técnica para cada citocina son: 31,3 pg/0,1g de IL1 α , 31,3 pg/0,1g de IL10, 15,6 de IL12p40 y TNF α y 3,1 pg/0,1g de IFN γ .

Los resultados se expresaron como la media \pm D.E. (n=5) de los picogramos (pg) de citocina por 0,1 g de bazo analizado. A cada dato individual se le había restado previamente el valor de la media obtenida con los ratones control negativo.

6.3. Evolución en suero de anticuerpos frente a células enteras de *B. ovis*

La sangre extraída a distintos tiempos p.i. (Apartado 6.1.3) se dejó reposar durante 8 horas, para que se produjera su coagulación, se centrifugó a 800 x g durante 5 minutos y se recogió el suero resultante. Las muestras de suero se analizaron mediante I-ELISA (Vizcaíno *et al.*, 2004) para evaluar los niveles de anticuerpos de la clase IgG y las subclases IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} capaces de reaccionar con células enteras de *B. ovis* PA. Para ello, las muestras convenientemente diluidas para cada ensayo, se incubaron con células enteras de *B. ovis* PA, inactivadas por calor, fijadas a la placa de ELISA (100 μ l de una suspensión en PBS a una D.O._{600nm} de 1). La reacción antígeno-anticuerpo se detectó mediante el empleo de anticuerpos anti-IgG (Anti-mouse IgG (*Fc-specific*)-*Peroxidase*, Sigma-Aldrich), anti-IgG₁, anti-IgG_{2a}, anti-IgG_{2b}, (*Goat Anti-Mouse IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} -HRP*, Santa Cruz Biotechnology) conjugados con peroxidasa (dilución 1/4000) y una solución de ABTS como sustrato para la peroxidasa. Como control negativo se utilizó el tampón de dilución.

Los resultados de los niveles de anticuerpos de la clase IgG se expresaron como el log del título \pm D.E. (n=5), considerando que el título es el inverso de aquella dilución donde el resultado de la absorbancia a 405 nm (A_{405nm}) obtenida es el doble que el resultado de la A_{405nm} del control negativo. Los resultados de los niveles de anticuerpos de las subclases IgG₁, IgG_{2a} y IgG_{2b} se expresaron como la A_{405nm} del *pool* de sueros.

6.4. Ensayo de protección frente a una infección experimental por *B. ovis*

6.4.1. Inmunización

Para la inmunización, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de 5 animales que se inocularon respectivamente con 10⁷ UFC/ratón de la cepa mutante

$\Delta omp25d$ de *B. ovis* PA, 10^8 UFC/ratón de la cepa $\Delta omp22$ de *B. ovis* PA, 10^8 UFC/ratón de la cepa mutante $\Delta vjbR$ de *B. ovis* PA, 10^5 UFC/ratón de la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 o con 500 μ l PBS (control negativo). La concentración exacta de cada vacuna se determinó retrospectivamente mediante siembra en placas de TSA-YE-HS, por triplicado, de 100 μ l de una dilución con alrededor de 1×10^3 UFC/ml.

6.4.2. Infección experimental y evaluación de la colonización esplénica

Transcurridas 4 semanas desde la vacunación, los animales inmunizados según lo descrito anteriormente, se inocularon por vía IP con 1×10^5 UFC en 500 μ l de PBS de la cepa virulenta *B. ovis* PA. La concentración exacta en el inóculo se determinó retrospectivamente mediante siembra en placas de TSA-YE-HS, por triplicado, de 100 μ l de una dilución con alrededor de 1×10^3 UFC/ml.

Tres semanas después de la infección experimental con *B. ovis* PA, los animales se sacrificaron para realizar el recuento de UFC de *B. ovis* PA en el bazo como se indica en el Apartado 5.5.

Para confirmar si las colonias contadas pertenecían a la cepa virulenta *B. ovis* PA, o por el contrario eran restos de la cepa vacunal, se procedió de diferente manera. Si la cepa vacunal portaba un gen de resistencia a antibiótico se realizaron recuentos dobles en TSA-YE-HS y en TSA-YE-HS suplementado con el antibiótico necesario (Kan para las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de *B. ovis* D.E. y Estrep para *B. melitensis* Rev1) de manera que el número de UFC de *B. ovis* PA se obtuvo restando el número de UFC obtenido en TSA-YE-HS con antibiótico al número obtenido en TSA-YE-HS. Cuando la cepa vacunal no presentaba resistencia a ningún antibiótico (como es el caso de la cepa mutante $\Delta vjbR$) se procedió a analizar el 10 % de las colonias contadas mediante PCR (Apartado 3.3). Los oligonucleótidos que se emplearon en la confirmación fueron *vjbR* MUT-F + *vjbR* MUT-R.

Finalmente, los resultados se expresaron como la media \pm D.E. (n=5) del log UFC/bazo de *B. ovis* PA.

6.5. Análisis de citocinas producidas por esplenocitos murinos tras un segundo estímulo *in vitro* con *B. ovis* PA

Este estudio se realizó con grupos de 5 ratones inmunizados como se describe en el Apartado 6.4.1 con las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de *B. ovis* PA, la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 y PBS, respectivamente.

Transcurridas 4 semanas desde la inmunización, momento que coincide con la infección experimental en el experimento de protección, se sacrificaron los 5 ratones de cada grupo de vacunación para extraer los bazos y preparar los cultivos celulares de forma individual

(Fernández-Lago *et al.*, 2005). Para ello, cada uno de los bazos se homogeneizó en 5 ml de medio básico (DMEM, GIBCO) con homogeneizadores para tubos de Falcon®. Los homogeneizados resultantes, se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 x g. El sedimento obtenido se resuspendió en 10 ml de tampón de lisis de eritrocitos (Cloruro de amonio 154 mM, Bicarbonato potásico 10 mM y EDTA-Na²⁺ 0,082 mM), se mantuvo en hielo 5 minutos y posteriormente se lavó dos veces con 10 ml de medio completo (RPMI 1640, Suero Bovino Fetal 10 %, L-glutamina 4 mM, Piruvato Sódico 1 mM, 2-mercaptoetanol 5x10⁻² mM, GIBCO). Una vez realizado el último lavado, las células se resuspendieron en 1 ml de medio completo suplementado con 100 µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich). Para verificar la viabilidad de las células y proceder a su recuento en cámara de Neubauer, se tiñeron con Azul de Tripano al 0,4 % en agua. Finalmente, las células se resuspendieron en medio completo con gentamicina hasta obtener una concentración de 4x10⁵ células/ml.

Los esplenocitos obtenidos de cada bazo se repartieron en 6 pocillos en placas de cultivo de 24 pocillos (Nunc) a razón de 1 ml/pocillo o lo que es lo mismo 4x10⁵ células/pocillo. Posteriormente, se estimularon *in vitro* con *B. ovis* PA inactivadas por calor durante 50 minutos a 65°C (1x10⁷ UFC/pocillo), Concanavalina A (Concentración final: 10 µg/pocillo) o con medio completo (dos pocillos en cada caso). Después, las placas se incubaron a 37 °C durante 72 horas en atmósfera húmeda con el 5 % de CO₂. Transcurrido el periodo de incubación, se centrifugó el contenido de cada pocillo a 1400 x g durante 5 minutos para recoger los sobrenadantes que se conservaron a -80 °C hasta que se realizó el análisis de citocinas IL1α, IL10, IL12p40, IFNγ y TNFα como se describe en el Apartado 6.2.

Los resultados se expresaron como la media ± D.E. (n=5) de los pg de citocina por ml de sobrenadante analizado.

7. Métodos estadísticos empleados

Las comparaciones estadísticas entre diferentes grupos se llevaron a cabo empleando el Test de Mínimas Diferencias Significativas Protegidas de Fisher (IBM® SPSS Statistics), considerándose estadísticamente significativas aquellas diferencias que presentaron valores de $P \leq 0,05$.

Resultados

1. Análisis de la implicación en la virulencia de *B. ovis* de distintos genes relacionados con la ME y la virulencia de cepas lisas de *Brucella* spp.

Este estudio se llevó a cabo con el objetivo de profundizar en el conocimiento de los mecanismos de virulencia de *B. ovis* e incrementar el panel de mutantes atenuados de *B. ovis* disponibles en el laboratorio para el posterior análisis de su interés como vacunas.

En primer lugar, se abordó la construcción de cepas mutantes en el sistema regulador de dos componentes BvrR/BvrS y en las lipoproteínas de ME Omp10, Omp16 y Omp19. Asimismo, se construyó un doble mutante en los genes *omp31* y *bacA*, ambos relacionados con la ME, para evaluar si la acumulación de estas dos mutaciones, que individualmente no afectan a la virulencia de *B. ovis* (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2012), conducen a una atenuación y/o modificación de las propiedades relacionadas con la ME. Con el objeto de poder establecer comparaciones entre el doble mutante $\Delta bacA/\Delta omp31$ y los respectivos mutantes simples, y considerando que el gen *omp31* se había sustituido por un gen de resistencia a kanamicina en el mutante $\Delta omp31$ previamente obtenido (Caro-Hernández *et al.*, 2007), también se construyó un mutante $\Delta omp31$ empleando la PCR de solapamiento.

Tras realizar la caracterización genotípica y analizar sus características de crecimiento, los mutantes obtenidos se sometieron al análisis tanto de su virulencia, realizando ensayos de infección en cultivos de macrófagos murinos y estudios de la cinética de colonización esplénica en ratón, como de una serie de características relacionadas con las propiedades de la ME.

1.1. Construcción de cepas mutantes de *B. ovis* PA

Las cepas mutantes de *B. ovis* PA se generaron reemplazando, a través de procesos de recombinación homóloga, cada gen silvestre por otro inactivado. La inactivación de los genes de interés se realizó mediante PCR de solapamiento, para evitar un efecto polar en la mutación, y la transformación bacteriana de las cepas del género *Brucella* se llevó a cabo mediante electroporación. La metodología empleada se describe con detalle en el Capítulo 4 de Materiales y Métodos.

Como resultado de la electroporación de *B. ovis* PA con los plásmidos recombinantes pNV10OVL02, pNV16OVL02, pNV19OVL02, pPS31OVL02, pPSBvrROVL02 y pPSBvrSOVL02 portadores de los genes de interés inactivados (Tabla V), se obtuvieron cepas en las cuales los plásmidos se habían integrado en el cromosoma bacteriano por un proceso de recombinación homóloga por entrecruzamiento simple. Las cepas resultantes,

denominadas de forma abreviada como omp10-I, omp16-I, omp19-I, omp31-I, bvrR-I y bvrS-I (**Tabla VI**), son a la vez portadoras de una copia mutada y de una copia silvestre de los genes *omp10*, *omp16*, *omp19*, *omp31*, *bvrR* y *bvrS*, respectivamente. Además portan el gen *sacB* y un gen de resistencia a Kan.

A continuación, estas cepas se cultivaron en medio suplementado con sacarosa, para seleccionar las bacterias en las que se había producido un segundo entrecruzamiento simple que origina la pérdida del plásmido pCVDKan-D portador del gen *sacB* y con ello la obtención de una cepa mutante o de una cepa revertiente al genotipo silvestre. Este segundo entrecruzamiento dio lugar a las cepas mutantes deseadas en el caso de los genes *omp10*, *omp19* y *omp31*, pero en el caso de los genes *omp16*, *bvrR* y *bvrS* siempre dio lugar al genotipo revertiente silvestre, no consiguiéndose obtener ninguna cepa mutante en estos genes.

La cepa doble mutante se obtuvo de manera similar reemplazando en una cepa mutante *ΔbacA* de *B. ovis* PA (Martín-Martín *et al.*, 2012) el gen *omp31* silvestre por el gen *omp31* inactivado por PCR de solapamiento y clonado en el plásmido pPS31OVL02.

Todas las cepas obtenidas en este trabajo, así como sus características más relevantes, se detallan en la **Tabla VI**.

1.2. Caracterización inicial de las cepas mutantes de *B. ovis* PA obtenidas en este trabajo

1.2.1. Verificación genotípica

La delección de los genes *omp10*, *omp19* y *omp31* en cada una de las cepas mutantes generadas se confirmó mediante amplificación del gen de interés por PCR, análisis del genoma bacteriano por *southern blot* y secuenciación de la región del genoma implicada en los procesos de recombinación (Capítulo 3 de Materiales y Métodos).

Se realizaron amplificaciones por PCR utilizando los cebadores externos al gen de interés (**Tabla V**), omp10MUT-F y omp10MUT-R para el gen *omp10*, omp19MUT-F y omp19MUT-R en el caso del gen *omp19* y finalmente 31MUT-F y 31MUT-R para *omp31*.

Los resultados de las electroforesis de los productos de PCR se muestran en la **Figura 16 B**, **Figura 17 B** y **Figura 18 B-C**. Para cada uno de los genes implicados en el proceso de mutación se observaron los resultados esperados tomando como referencia el genoma de *B. ovis* ATCC 25840 (nº acceso GeneBank: CP000708.1 y CP000709.1). Así, las cepas revertientes mostraron una banda amplificada del mismo tamaño que la cepa parental, las cepas mutantes un banda de tamaño inferior y las cepas con el plásmido integrado, las dos bandas correspondientes al gen entero y el gen inactivado. La ausencia de los genes diana

en cada cepa mutante se verificó, además, mediante una reacción de PCR empleando un cebador externo a la región delecionada y un cebador interno (omp10MUT-F y omp10-F3 para el gen *omp10*, omp19MUT-F y omp19-F3 para el gen *omp19* y 31MUT-F y 31-MAT para el gen *omp31*). Como era de esperar, no se obtuvo amplificación en las cepas mutantes pero sí en las cepas revertientes, en las cepas con el plásmido integrado y en la cepa parental (datos no mostrados).

Las hibridaciones de ADN-ADN por *southern blot* se realizaron usando como sondas los plásmidos portadores de cada gen mutado pNV10OVL02, pNV19OVL02 y pPS31OVL02 (Tabla IV) marcados con DIG. Los esquemas con los genotipos y con los tamaños de los fragmentos esperados tras la digestión enzimática con *HindIII* del ADN cromosómico de cada cepa se representan en la Figura 16 A, Figura 17 A, y Figura 18 A.

Respecto al gen *omp10*, tras digerir el ADN genómico con *HindIII*, esperábamos obtener dos fragmentos de 4721 y 4574 pb en la cepa revertiente silvestre y en *B. ovis* PA (Figura 16 A) y otros dos fragmentos de 4721 y 4271 pb en la cepa mutante *B. ovis* Δ omp10 (Figura 16 A). Se observaron los dos fragmentos esperados para la cepa mutante mientras que los dos fragmentos esperados para la cepa revertiente y parental se revelaron como una única banda (Figura 16 C. Carriles PA y R) debido a que tienen un tamaño muy parecido. De manera similar, en la cepa con el plásmido integrado en el cromosoma (omp10-I), esperábamos obtener 7 fragmentos de 4721, 4574, 2939, 1854, 841 y 423 pb que hibridaran con la sonda pero solo se observaron 5 bandas, ya que los fragmentos de 4712 y 4574 pb aparecieron como una única banda y la banda de 423 pb es demasiado pequeña para ser detectada en las condiciones empleadas (Figura 16 C. Carril I).

En el caso del gen *omp19*, se observó un fragmento de 3819 pb tanto en la cepa revertiente como en la cepa parental, un fragmento de 3400 pb en la cepa mutante y 5 fragmentos de 3349, 2939, 2190, 1854 y 841 pb en la cepa con el plásmido integrado en el genoma (Figura 17 C). Estos resultados coinciden con lo esperado según se representa en la Figura 17 A.

Por último, respecto al gen *omp31* esperábamos obtener dos fragmentos de 2360 y 1585 pb en las cepas revertientes (omp31-R y bacA/omp31-R), en el mutante Δ bacA de *B. ovis* PA y en la cepa parental, otros dos de 2360 y 913 pb en las cepas mutantes (omp31-M y bacA/omp31-M) y 7 fragmentos de 2939, 2360, 1854, 1585, 841, 595 y 424 pb en las cepas con el plásmido integrado en el genoma (omp31-I y bacA/omp31-I). En la imagen del *southern blot* (Figura 18 D-E) se pueden observar todas las bandas de los fragmentos esperados menos la de 424 pb ya que, como hemos dicho, la detección de bandas con un tamaño menor de 500 pb resulta difícil en las condiciones empleadas.

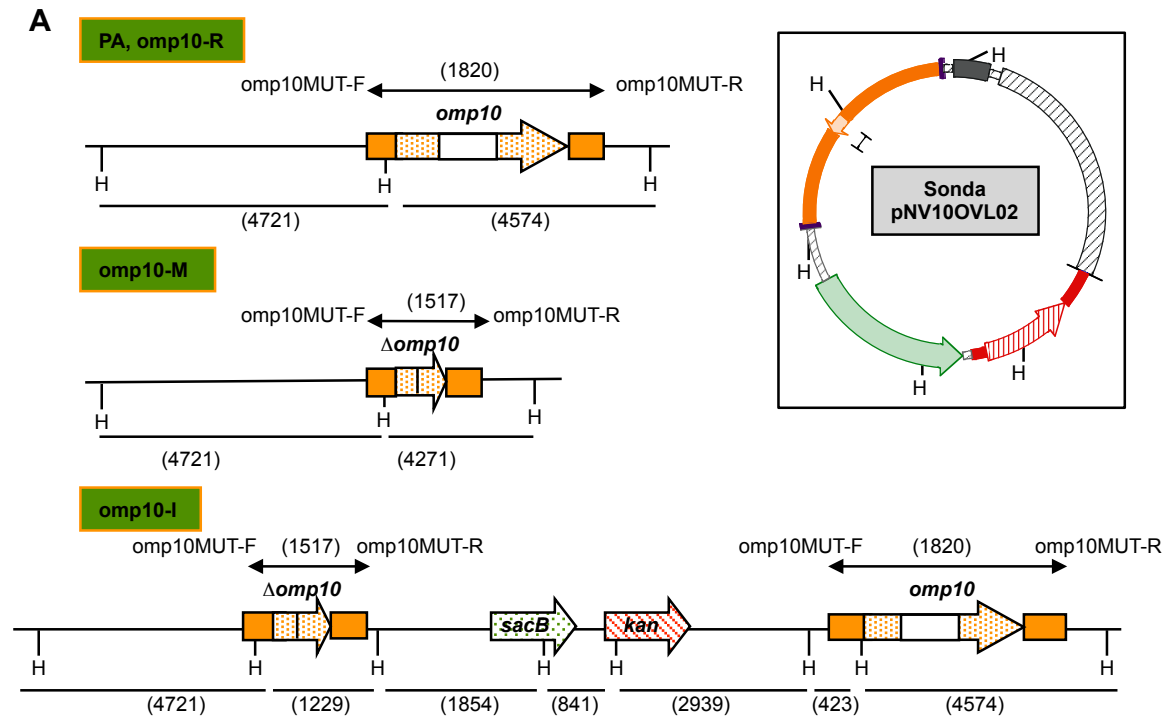
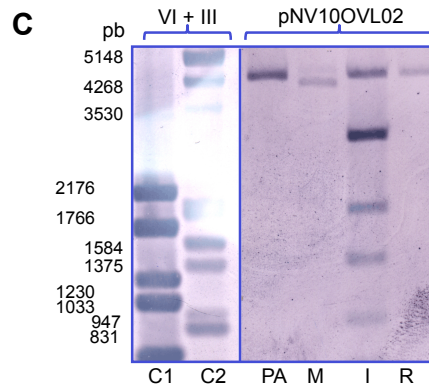
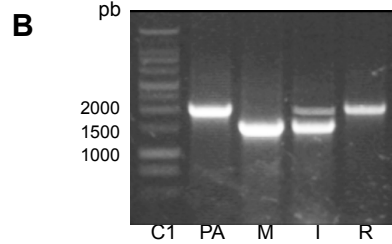


Figura 16. Verificación genotípica de *B. ovis*-pNV10OVL02-M (Δ *omp10*). A. Esquema del genotipo relativo al gen *omp10* que presentan la cepa parental *B. ovis* PA, el mutante (*omp10*-M), el revertiente (*omp10*-R) y la cepa con el plásmido integrado en el genoma (*omp10*-I). Se muestran los puntos de corte de la enzima de restricción *Hind*III utilizada en el *southern blot* y el plásmido usado como sonda marcada con DIG. B. Resultados obtenidos en la amplificación por PCR de las cepas *B. ovis* PA (PA), *omp10*-M (M), *omp10*-I (I) y *omp10*-R (R), con los oligonucleótidos *omp10*MUT-F y *omp10*MUT-R. El carril C1 corresponde al marcador *1kb DNA ladder* de Promega. C. Resultados obtenidos en el análisis genético mediante *southern blot* de las cepas *B. ovis* PA (PA), *omp10*-M (M), *omp10*-I (I) y *omp10*-R (R). Los carriles C1 y C2, corresponden a los patrones de ADN VI y III de Roche, respectivamente, revelados con una sonda de ellos mismos marcada con digoxigenina (VI + III).



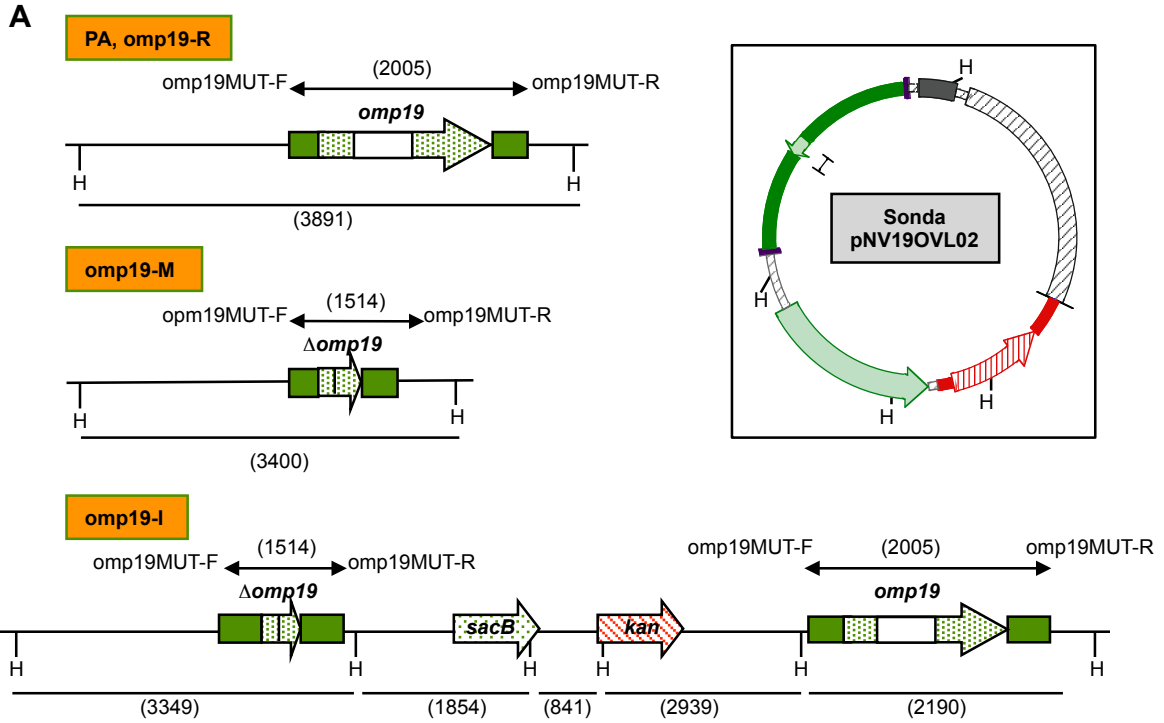
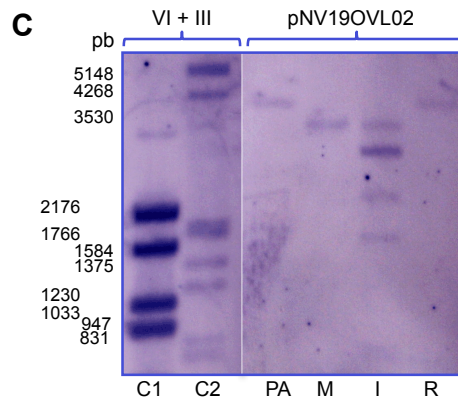
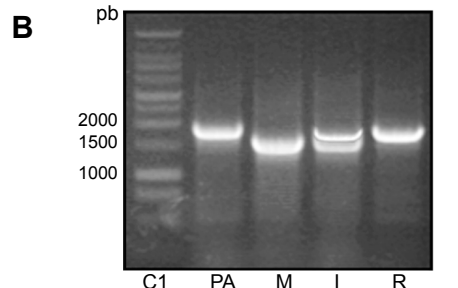


Figura 17. Verificación genotípica de *B. ovis*-pNV19OVL02-M ($\Delta omp19$). **A.** Esquema del genotipo relativo al gen *omp19* que presentan la cepa parental *B. ovis* PA, el mutante (omp19-M), el revertiente (omp19-R) y la cepa con el plásmido integrado (omp19-I), mostrándose los puntos de corte de la enzima de restricción *Hind*III utilizada en el *southern blot* y el plásmido usado como sonda marcada con DIG. **B.** Resultados obtenidos en la amplificación por PCR de las cepas *B. ovis* PA (PA), omp19-M (M), omp19-I (I) y omp19-R (R), con los oligonucleótidos omp19MUT-F y omp19MUT-R. El carril C1 corresponde al marcador *1kb DNA ladder* de Promega. **C.** Resultados obtenidos en el análisis genético mediante *southern blot* de las cepas *B. ovis* PA (PA), omp19-M (M), omp19-I (I) y omp19-R (R). Los carriles C1 y C2, corresponden a los patrones de ADN VI y III de Roche, respectivamente, revelados con una sonda de ellos mismos marcada con digoxigenina (VI + III).



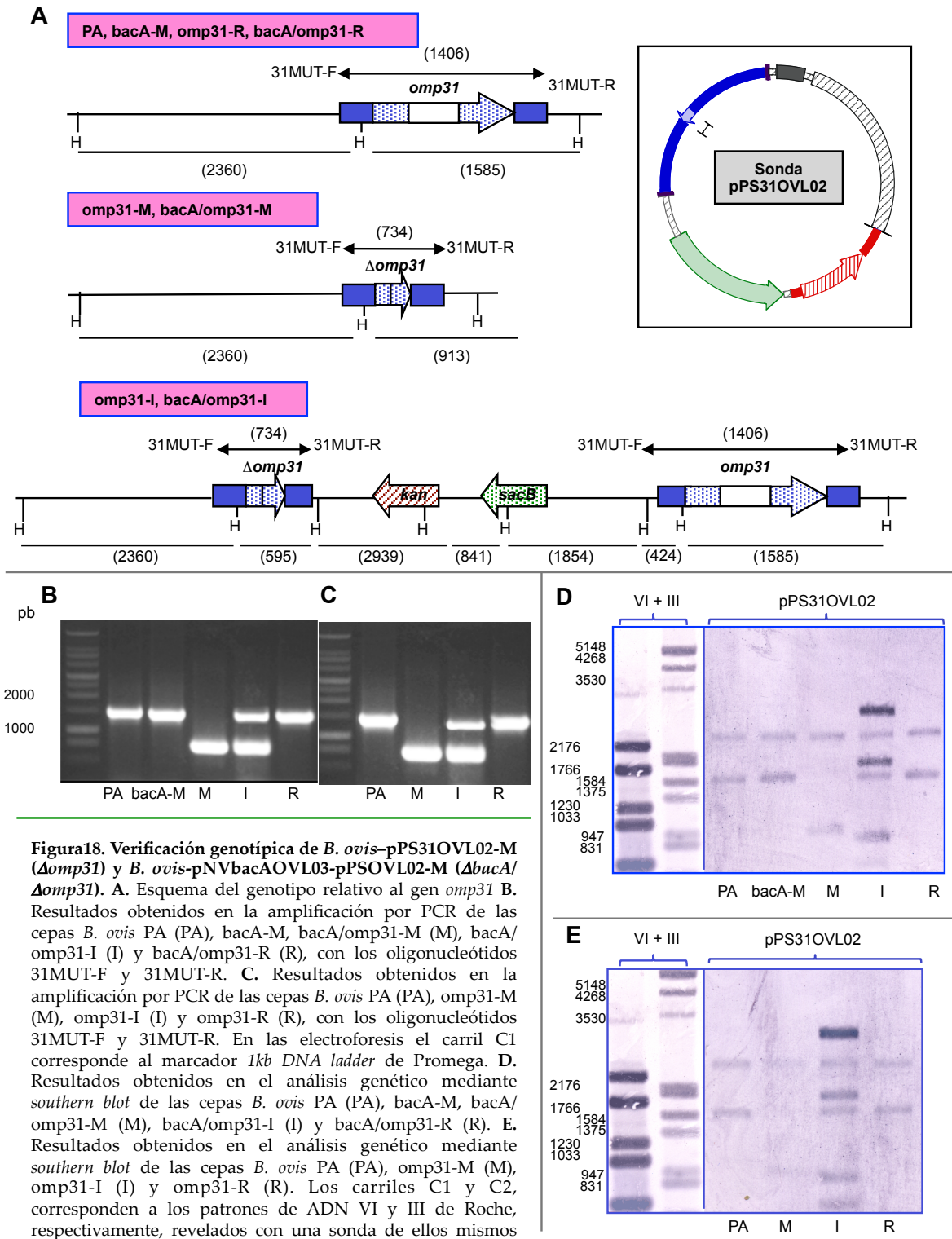


Figura 18. Verificación genotípica de *B. ovis*-pPS31OVL02-M (Δ omp31) y *B. ovis*-pNVbacAOVL03-pPSOVL02-M (Δ bacA/ Δ omp31). A. Esquema del genotipo relativo al gen *omp31*. B. Resultados obtenidos en la amplificación por PCR de las cepas *B. ovis* PA (PA), bacA-M, bacA/omp31-M (M), bacA/omp31-I (I) y bacA/omp31-R (R), con los oligonucleótidos 31MUT-F y 31MUT-R. C. Resultados obtenidos en la amplificación por PCR de las cepas *B. ovis* PA (PA), omp31-M (M), omp31-I (I) y omp31-R (R), con los oligonucleótidos 31MUT-F y 31MUT-R. En las electroforesis el carril C1 corresponde al marcador *1kb DNA ladder* de Promega. D. Resultados obtenidos en el análisis genético mediante *southern blot* de las cepas *B. ovis* PA (PA), bacA-M, bacA/omp31-M (M), bacA/omp31-I (I) y bacA/omp31-R (R). E. Resultados obtenidos en el análisis genético mediante *southern blot* de las cepas *B. ovis* PA (PA), omp31-M (M), omp31-I (I) y omp31-R (R). Los carriles C1 y C2, corresponden a los patrones de ADN VI y III de Roche, respectivamente, revelados con una sonda de ellos mismos marcada con digoxigenina (VI + III).

La verificación genotípica de las cepas mutantes $\Delta omp10$, $\Delta omp19$, $\Delta omp31$ y $\Delta bacA/\Delta omp31$ de *B. ovis* PA se completó con la determinación de la secuencia completa de nucleótidos de la región implicada en los procesos de recombinación. Para ello, se realizó una amplificación por PCR con los cebadores omp10-F2 y omp10-R2 para el gen *omp10*, omp19-F2 y omp19-R2 para el gen *omp19* y 31MUT-F2 y 31MUT-R2 para el gen *omp31* (Tabla III), que son cebadores externos a la región de recombinación. La secuenciación de los productos amplificados proporcionó los resultados esperados, no observándose modificaciones no deseadas en la secuencia de nucleótidos.

1.2.2. Análisis del crecimiento en medio sólido y líquido

Una vez confirmada la correcta delección de los genes de interés se llevó a cabo un análisis del crecimiento *in vitro* en medio sólido de las cepas mutantes y en medio líquido de las cepas mutantes y revertientes obtenidas, utilizando *B. ovis* PA como control del patrón de crecimiento.

Crecimiento en medio sólido

Para analizar el crecimiento en medio sólido, se realizaron recuentos de UFC/ml en placas de TSA-YE-HS a partir de suspensiones bacterianas de D.O._{600nm} 0,2 (Apartado 5.2. de Materiales y Métodos). Aunque las diferencias no fueron drásticas, los recuentos de UFC/ml fueron ligeramente menores en las cepas mutantes $\Delta omp10$, $\Delta omp19$, $\Delta omp31$ y $\Delta bacA/\Delta omp31$ de *B. ovis* PA que en la cepa parental *B. ovis* PA (Tabla VI). Todas las cepas

Tabla VI. UFC/ml de una suspensión en PBS de D.O._{600nm} de 0,2

Cepas	Log UFC/ml media \pm D.E. (n=3)
PA	9,55 \pm 0,03
omp10-M	9,30 \pm 0,09*
omp19-M	9,29 \pm 0,17*
omp31-M	9,26 \pm 0,03*
bacA/omp31-M	9,19 \pm 0,00**

Simbología:

* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,005$, indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el resultado obtenido con *B. ovis* PA

mutantes desarrollaron un tamaño de colonia similar al de la cepa parental *B. ovis* PA tras 6 días de incubación (Figura 19 A-B). Sin embargo, las colonias de las cepas *B. ovis* $\Delta omp31$ y *B. ovis* $\Delta bacA/\Delta omp31$ empezaron a visualizarse tras 96 horas de incubación, lo que supone un retraso de 24 horas con respecto a la cepa parental y las cepas *B. ovis* $\Delta omp10$ y *B. ovis* $\Delta omp19$, cuyas colonias fueron visibles a partir de las 72 horas de incubación.

Crecimiento en medio líquido

El análisis del crecimiento en medio líquido se llevó a cabo midiendo la evolución a lo largo del tiempo de la D.O._{600nm} de suspensiones bacterianas en TSB-YE-HS con D.O._{600nm}

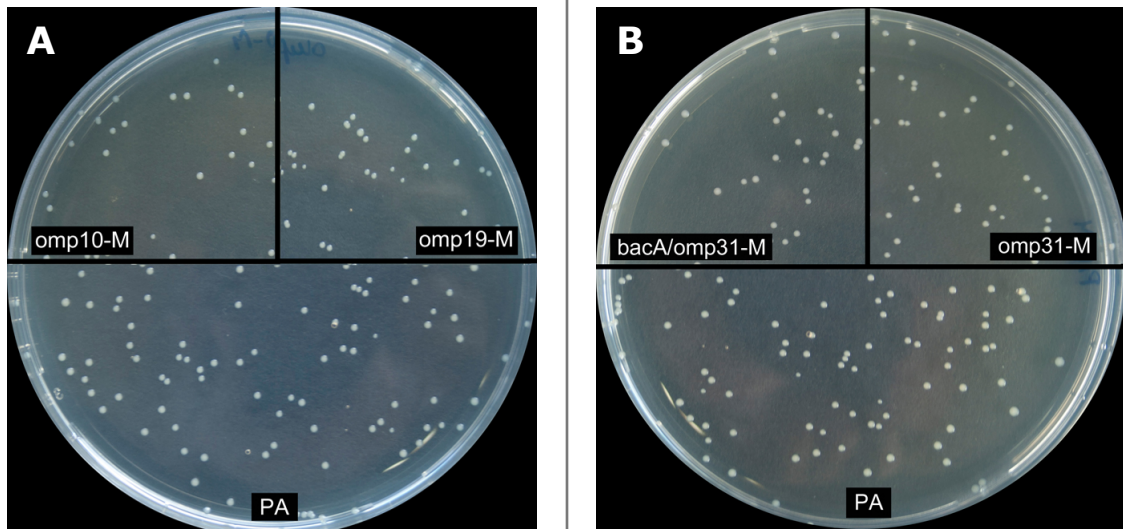


Figura 19. Colonias de los mutantes obtenidos en este trabajo. Se muestran las colonias obtenidas en TSA-YE-HS tras 6 días de incubación a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂.

inicial de 0,05 (Apartado 5.2 de Materiales y Métodos). En la **Figura 20 A-D** se muestran las curvas obtenidas para cada mutante objeto de estudio y su revertiente silvestre, en relación con la cepa parental *B. ovis* PA. En el caso del doble mutante *B. ovis* $\Delta bacA/\Delta omp31$ también se incluyó en el estudio el mutante $\Delta bacA$ de *B. ovis* PA (**Figura 20 D**).

Todas las cepas analizadas alcanzaron la fase estacionaria transcurridas aproximadamente 48 horas de incubación. Sin embargo, no todas las cepas mostraron una progresión similar de la fase exponencial ya que presentaron diferentes valores al final de dicha fase. Así, la D.O._{600nm} alcanzada por la cepa mutante *B. ovis* $\Delta omp10$ y la cepa mutante *B. ovis* $\Delta omp19$ fue de 1,34 y 1,26 respectivamente, mientras que la cepa mutante *B. ovis* $\Delta omp31$, *B. ovis* PA y los tres revertientes los valores de D.O._{600nm} llegaron a valores de entre 1,54 y 1,56. Las cepas mutantes $\Delta omp10$ y $\Delta omp19$ mantuvieron valores de D.O._{600nm} ligeramente inferiores a los observados con la cepa parental hasta el final del experimento (69 horas de incubación) (**Figura 20 A-B**). Tanto la cepa mutante $\Delta omp31$ como la cepa doble mutante $\Delta bacA/\Delta omp31$ presentaron una evolución de la D.O._{600nm} a lo largo del tiempo similar a la observada con la cepa parental y las correspondientes cepas revertientes (**Figura 20 C-D**).

Dado que la medida de la D.O._{600nm} es un método indirecto para evaluar el crecimiento microbiano, también se determinó el número de UFC/ml de cada cepa a las 0, 24 y 48 horas de incubación. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla VII**.

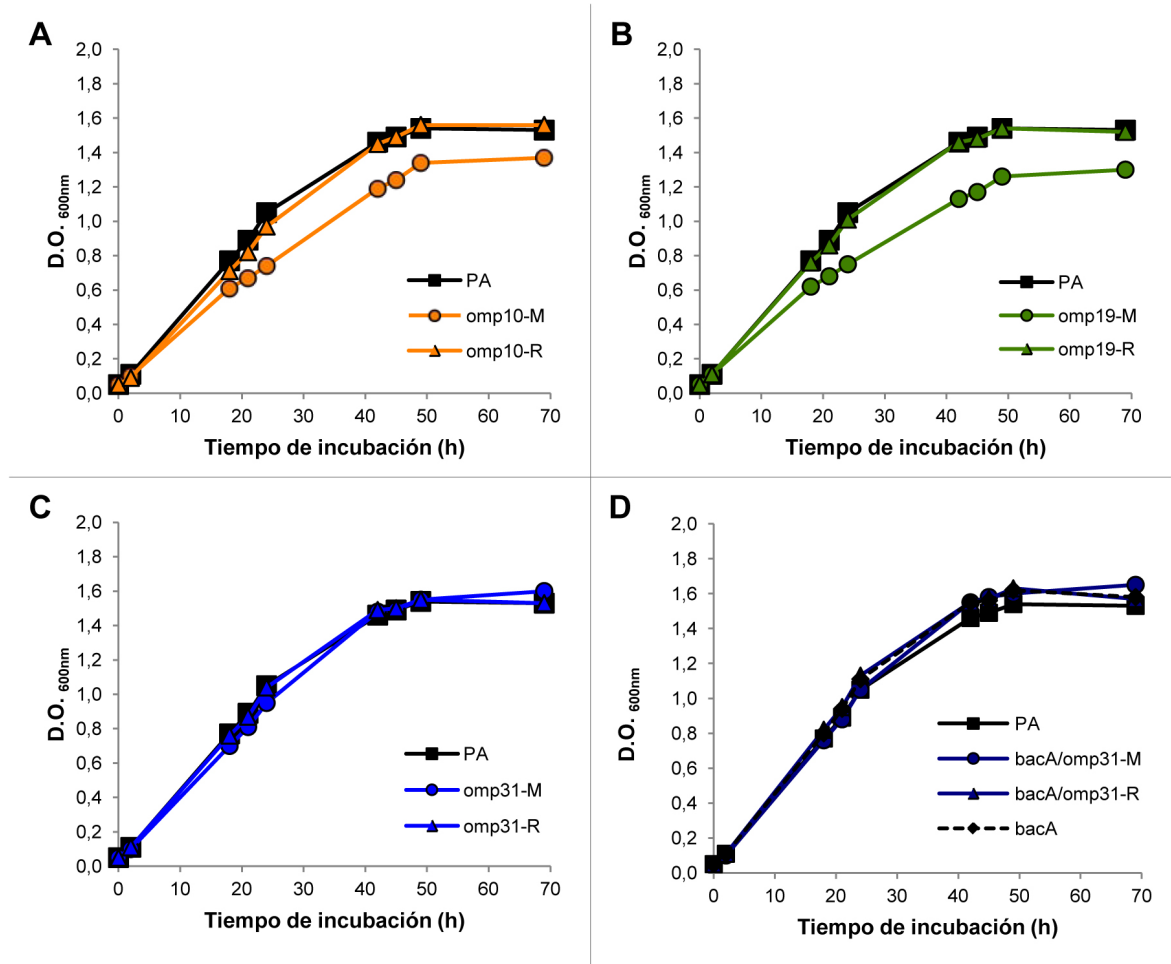


Figura 20. Análisis del crecimiento en medio líquido de las cepas mutantes y revertientes silvestres de *B. ovis* PA obtenidas en este trabajo. A-D. Se muestra la evolución de la D.O._{600nm} a lo largo del tiempo de los cultivos en TSB-YE-HS de las distintas cepas. Los controles usados fueron *B. ovis* PA y el mutante $\Delta bacA$, en el caso del doble mutante.

Tabla VII. Relación entre D.O._{600nm} y UFC/ml a distintos tiempos de la cepa parental *B. ovis* PA y de las cepas mutantes y revertientes obtenidas en este estudio.

Cepas	PA	omp10-M	omp10-R	omp19-M	omp19-R	omp31-M	omp31-R	bacA-M	bacA/ omp31-M	bacA/ omp31-R	Tiempo
UFC/ml	3,30x10 ⁸	2,40x10 ⁸	3,12x10 ⁸	2,13x10 ⁸	3,20x10 ⁸	2,27x10 ⁸	4,30x10 ⁸	3,60x10 ⁸	2,97x10 ⁸	3,60x10 ⁸	0 horas
D.O. _{600nm}	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	
UFC/ml	8,90x10 ⁹	3,15x10 ⁹	7,45x10 ⁹	3,90x10 ⁹	6,10x10 ⁹	6,40x10 ⁹	9,70x10 ⁹	1,24x10 ¹⁰	2,45x10 ⁹	1,26x10 ¹⁰	24 horas
D.O. _{600nm}	1,05	0,74	0,97	0,75	1,01	0,95	1,04	1,13	1,05	1,11	
UFC/ml	1,04x10 ¹⁰	9,10x10 ⁹	1,41x10 ¹⁰	6,90x10 ⁹	1,26x10 ¹⁰	1,80x10 ¹⁰	1,35x10 ¹⁰	1,11x10 ¹⁰	1,27x10 ¹⁰	1,13x10 ¹⁰	48 horas
D.O. _{600nm}	1,54	1,34	1,56	1,26	1,54	1,55	1,55	1,60	1,63	1,62	

En ellos podemos destacar que a tiempo 0 horas, en que la D.O._{600nm} (0,05) era igual para todas las cepas, se observaron pequeñas diferencias en los recuentos de UFC/ml que no resultaron estadísticamente significativas. A las 24 horas la cepa mutante $\Delta omp10$ y la cepa mutante $\Delta omp19$ mostraron recuentos bastante inferiores a la cepa parental, diferencias que también se habían puesto de manifiesto en la medida de la D.O._{600nm}. Con el tiempo, dichas diferencias se fueron minimizando y a las 48 horas, alcanzada la fase estacionaria, los recuentos de UFC/ml, aunque menores, no eran tan diferentes al igual que había ocurrido con la D.O._{600nm}.

1.2.3. Estudio de las propiedades de la membrana externa

Con el fin de comprobar si la inactivación de los genes *omp10*, *omp19* y *omp31* causaba en las cepas mutantes resultantes alguna alteración relacionada con las propiedades de la ME y que podría a su vez repercutir en la virulencia de la bacteria, se sometió a estas cepas a diversos ensayos que permiten evaluar este aspecto.

Análisis de la autoaglutinación

En primer lugar, evaluamos la capacidad de autoaglutinación en medio líquido TBS-YE-HS que presentaba cada una de las cepas derivadas de *B. ovis* PA obtenidas en este trabajo. Para la realización de dicho estudio se prepararon suspensiones de cada bacteria en medio líquido a una D.O._{600nm} de 0,8 y posteriormente, sin agitación, se fueron analizando las variaciones que sufría este valor de D.O. a lo largo del tiempo (Apartado 5.3.1 de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se expresaron como la media de los porcentajes de D.O._{600nm} procedentes de tres ensayos independientes, considerando la D.O._{600nm} inicial de 0,8 como el 100%.

Todas las cepas revertientes al genotipo silvestre, así como el mutante $\Delta bacA$ de *B. ovis* PA, mostraron un comportamiento similar al observado con la cepa parental, con un ligero incremento de la D.O., a partir de las 2 horas de incubación, que se mantuvo hasta el final del experimento a las 49 horas (**Figura 21**). El mutante *B. ovis* $\Delta omp10$ presentó una evolución muy similar, aunque a partir de las 24 horas de incubación mostró una leve reducción de la D.O. en comparación con la cepa parental (**Figura 21 A**). Algo más acusada fue la disminución de la D.O. en el caso de la cepa mutante *B. ovis* $\Delta omp19$, aunque la D.O._{600nm} al final del experimento solo había disminuido hasta el 91,45% del valor inicial (**Figura 21 B**). En contraste, las cepas mutantes $\Delta omp31$ y $\Delta bacA/\Delta omp31$ de *B. ovis* PA presentaron una marcada capacidad de autoaglutinación con valores de D.O._{600nm} aproximados del 55% a las 24 horas y del 20 % a las 49 horas de incubación (**Figura 21 C-D**).

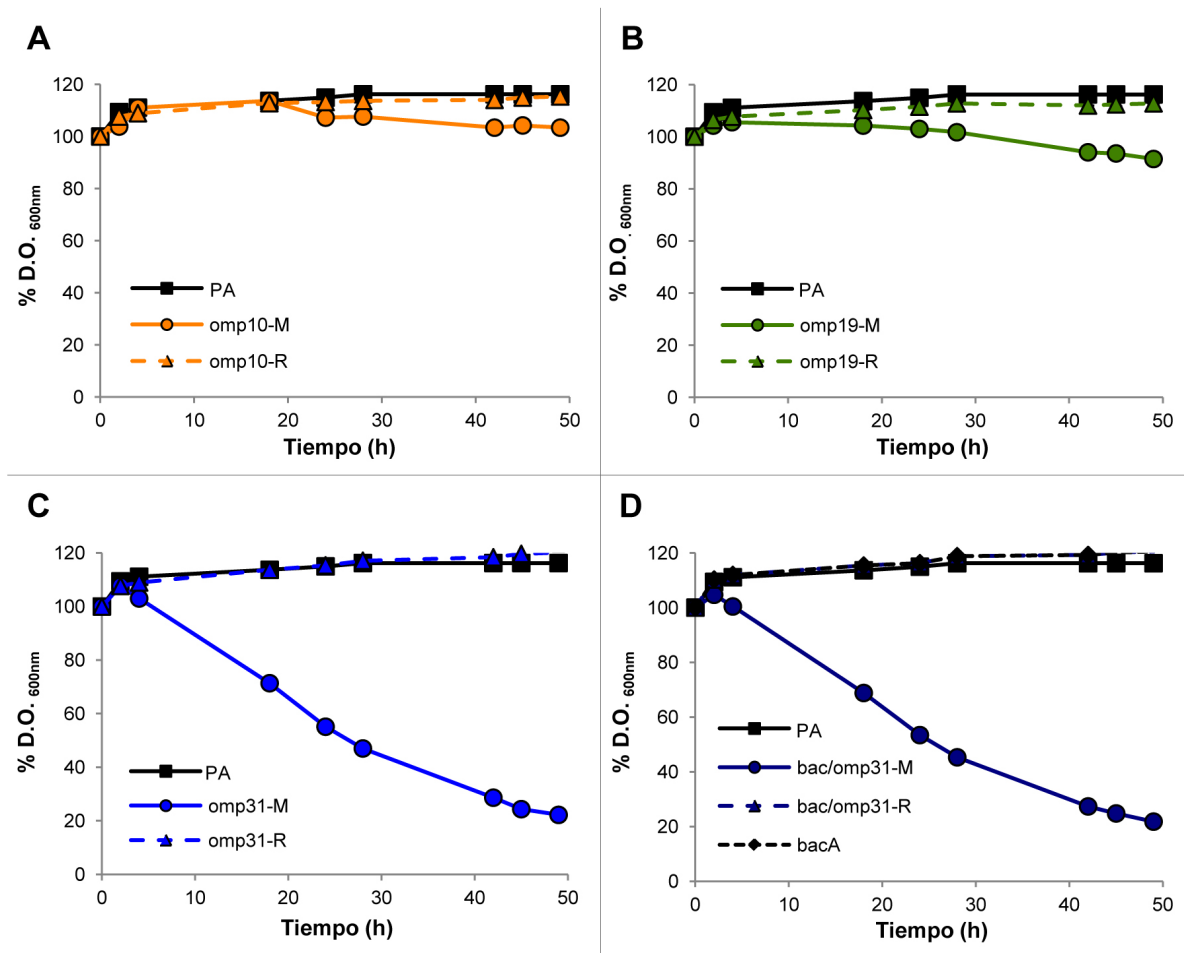


Figura 21. Autoaglutinación en medio líquido de las cepas mutantes y revertientes silvestres de *B. ovis* PA obtenidas en este trabajo. A-D. Se muestra el seguimiento de la $D.O_{600\text{nm}}$ a lo largo del tiempo de las suspensiones bacterianas preparadas en TSB-YE-HS. Los controles usados fueron *B. ovis* PA y en el caso del doble mutante el mutante $\Delta bacA$. Los datos representados hacen referencia a la media de tres ensayos llevados a cabo independientemente en las mismas condiciones, considerando la $D.O_{600\text{nm}}$ inicial de las suspensiones (0,8) como el valor 100% en cada caso. Para una mayor claridad, no se ha incluido en las gráficas la desviación estándar de cada punto ya que en todos los casos fue poco representativa (D.E. < 3,39).

Evaluación de la sensibilidad a polimixina B y desoxicolato de sodio

En la misma línea de seguir analizando si las mutaciones originadas en la cepa *B. ovis* PA causaban alteraciones en la ME que pudiesen provocar una disminución de la virulencia de la bacteria, realizamos varios ensayos para evaluar si la capacidad de resistencia al efecto bactericida de ciertos compuestos se veía alterada en las cepas mutantes. Para ello, llevamos a cabo un estudio de la sensibilidad que mostraban las cepas obtenidas en este trabajo a la acción bactericida de la polimixina B y del desoxicolato de sodio, determinando las tasas de supervivencia que presentaban tras ser expuestas durante 1 hora a una concentración de 1 mg/ml de polimixina B y de 0,1 mg/ml de desoxicolato

sódico. En ambos casos, se consideró como 100% de supervivencia el recuento de UFC obtenido tras la incubación de cada cepa solo en PBS durante el mismo periodo de tiempo (Apartado 5.3.2 de Materiales y Métodos).

La cepa parental presentó un porcentaje de supervivencia próximo al 80 % tras la exposición a polimixina B (**Figura 22 A**) y ni la cepa *B. ovis* $\Delta omp19$ ni ninguna de las cepas revertientes silvestres mostraron diferencias significativas con la cepa parental. Sin embargo la cepa *B. ovis* $\Delta omp10$ presentó un porcentaje de supervivencia del $42,9 \pm 2,3$ %, lo que fue significativamente menor ($P \leq 0,005$) que lo observado en la cepa parental. El mutante que presentó mayor sensibilidad a la polimixina B fue el $\Delta omp31$ de *B. ovis* PA, ya que solo un $15,1 \pm 9,5$ % de las células fue capaz de crecer tras la exposición al agente. El doble mutante $\Delta bacA/\Delta omp31$, mostró un porcentaje de supervivencia del $60,2 \pm 6,8$ %, lo cual no fue significativamente diferente de *B. ovis* PA pero sí ($P \leq 0,05$) del mutante $\Delta bacA$ de *B. ovis* PA ($91,3 \pm 4,4$ %).

El porcentaje de supervivencia tras la exposición a desoxicolato de sodio de *B. ovis* PA, los revertientes silvestres y el mutante $\Delta omp19$ osciló entre el 94 y el 100% dependiendo de

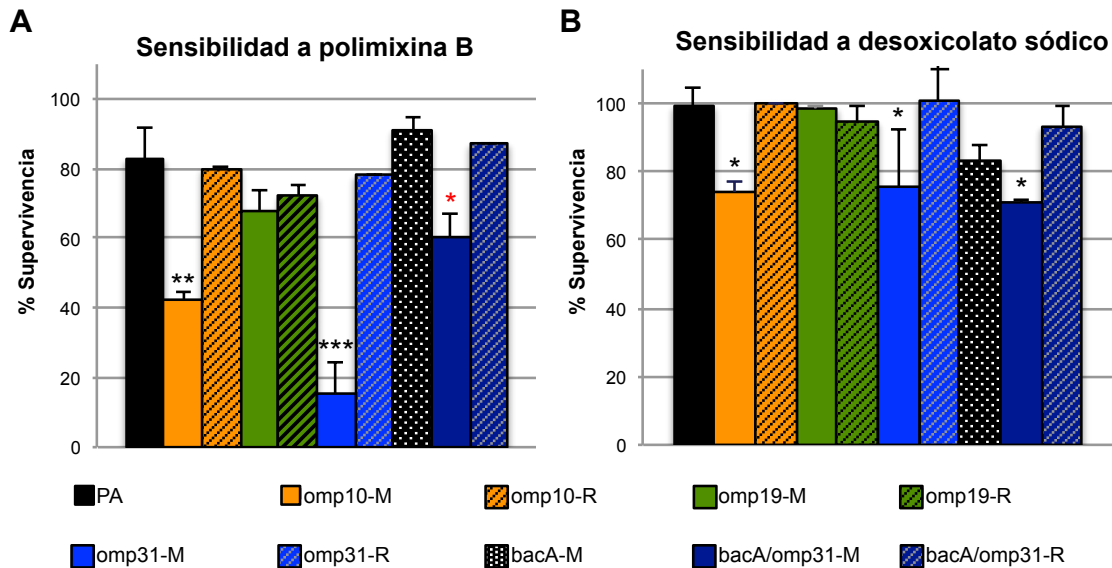


Figura 22. Sensibilidad a la exposición a polimixina B (A) y desoxicolato de sodio (B) de las cepas mutantes y revertientes silvestres de *B. ovis* PA obtenidas en este trabajo. A-B. Se muestran los porcentajes de supervivencia de cada cepa tras su exposición durante 1 hora a concentraciones de 1mg/ml de polimixina B y de 0,1 mg/ml de desoxicolato de sodio. Los datos muestran la media \pm D.E. ($n=3$) de los porcentajes obtenidos, considerando para cada cepa como 100% de supervivencia el número de UFC/placa obtenido al incubar en las mismas condiciones con PBS.

Simbología:

* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,005$, *** $P \leq 0,0005$, indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el resultado obtenido por *B. ovis* PA.

* $P \leq 0,05$, indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el resultado obtenido por el mutante $\Delta bacA$.

la cepa, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Por el contrario, los mutantes $\Delta omp10$, $\Delta omp31$ y el doble mutante $\Delta bacA/\Delta omp31$ presentaron una mayor sensibilidad ($P \leq 0,05$) al detergente que la cepa parental, con porcentajes de supervivencia en torno al 75 % (Figura 22 B).

Evaluación de la sensibilidad al peróxido de hidrógeno

Finalmente, para concluir el estudio de la integridad de la ME de las cepas mutantes de *B. ovis* PA, se determinó la sensibilidad al peróxido de hidrógeno, un intermediario producido durante la explosión oxidativa de los macrófagos y utilizado por estos como un mecanismo bactericida. Para ello, se extendieron 100 μ l de una suspensión en PBS de cada cepa a una D.O._{600nm} de 0,2 en placas de TSA-YE-HS y, posteriormente, en cada una de ellas se depositó un disco de papel Whatman impregnado con 10 μ l de peróxido de hidrógeno al 30 %. Una vez transcurridas 72 horas de incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición generados y se calculó para cada cepa la media \pm D. E. de los valores obtenidos provenientes de tres placas independientes (Apartado 5.3.3 de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 23 donde podemos observar

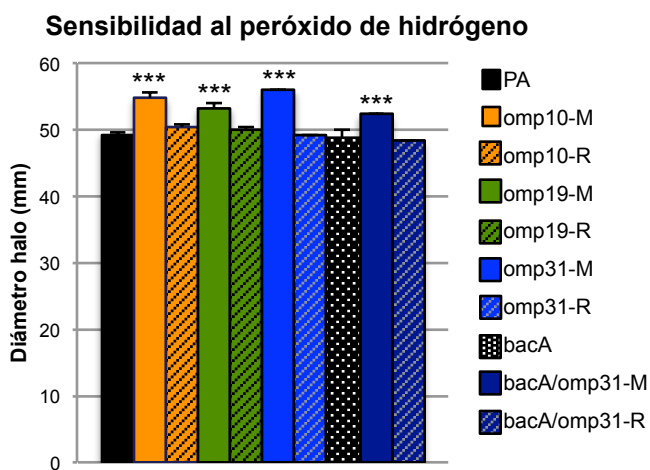


Figura 23. Sensibilidad al peróxido de hidrógeno de las cepas mutantes y revertientes silvestres de *B. ovis* PA obtenidas en este trabajo. Se muestra la media \pm D.E. ($n=3$) del diámetro del halo de inhibición producido por acción del peróxido de hidrógeno.

Simbología:

*** $P \leq 0,0005$, indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el resultado obtenido por *B. ovis* PA.

cómo la sensibilidad al peróxido de hidrógeno en todas las cepas mutantes obtenidas en este trabajo fue significativamente mayor ($P \leq 0,0005$), con medias de diámetro de halo comprendidas entre 52-56 mm, que la sensibilidad mostrada por la cepa parental *B. ovis* PA y por el mutante $\Delta bacA$ de *B. ovis* PA (diámetro medio ligeramente inferior a 50 mm). Las cepas revertientes al genotipo silvestre se comportaron de manera similar a *B. ovis* PA.

1.3. Análisis de la capacidad infectiva y de multiplicación intracelular en cultivos de macrófagos murinos de las cepas mutantes de *B. ovis* PA obtenidas en este trabajo.

Tras analizar las propiedades de la ME de las cepas mutantes y revertientes silvestres, se procedió a realizar estudios de infección *in vitro* de células fagocíticas profesionales, en concreto macrófagos murinos, con el fin de comprobar si la mutación afectaba a la capacidad de colonización y a la multiplicación intracelular. Para ello, realizamos ensayos de infección de cultivos con 2×10^4 células de macrófagos murinos J774.A1 empleando las condiciones experimentales señaladas en el Apartado 5.4 de Materiales y Métodos. Las dosis exactas de infección se recogen en la **Figura 24 E**.

La cepa parental *B. ovis* PA, tras la internalización en macrófagos J774.A1, mostró durante las 72 horas p.i. analizadas un número de UFC prácticamente constante (del orden de 4,5 log UFC) (**Figura 24**). El mutante $\Delta bacA$ de *B. ovis* PA y todas las cepas revertientes obtenidas en este trabajo presentaron un patrón de infección de macrófagos similar al descrito para la cepa parental (**Figura 24 D**).

Por el contrario, las cepas mutantes $\Delta omp10$, $\Delta omp19$, $\Delta omp31$ y $\Delta bacA/\Delta omp31$ de *B. ovis* PA mostraron una capacidad de internalización similar a la cepa parental, pero a las 24 horas p.i. en todas ellas se observó una disminución de entre 0,65 y 1,45 log en el número de UFC intracelulares dependiendo de la cepa mutante. Posteriormente, el número de UFC, para cada cepa mutante, se mantuvo constante durante las 72 horas que duró el experimento (**Figura 24 A-D**).

1.4. Estudio de la virulencia en ratones BALB/c de las cepas mutantes de *B. ovis* PA obtenidas en este trabajo.

Otro apartado de la caracterización de los mutantes obtenidos consistió en realizar un estudio de la colonización esplénica en modelo murino usando como control la cepa parental virulenta *B. ovis* PA. Para ello, los ratones se inocularon por vía IP con aproximadamente 1×10^6 UFC y después se evaluó, a las semanas 3 y 8 p.i., el número de bacterias viables presente en los bazo de 5 ratones por cada cepa (Apartado 5.5 Materiales y Métodos). Las dosis exactas de inoculación se determinaron mediante recuentos retrospectivos en placa (**Figura 25 B**).

Los resultados obtenidos mostraron que, transcurridas 3 semanas, los recuentos bacterianos en los bazo de los animales inoculados con la cepa *B. ovis* $\Delta omp10$ ($5,29 \pm 0,1$ log UFC/bazo) fueron ligeramente inferiores ($P \leq 0,05$) a los observados con *B. ovis* PA ($6,82 \pm 0,9$ log UFC/bazo) (**Figura 25 A**), mientras que el resto de cepas mutantes presentaron un grado de colonización esplénica similar a la de la cepa parental. La diferencia observada entre la cepa mutante $\Delta omp10$ y *B. ovis* PA no se mantuvo en el tiempo, de modo que a la

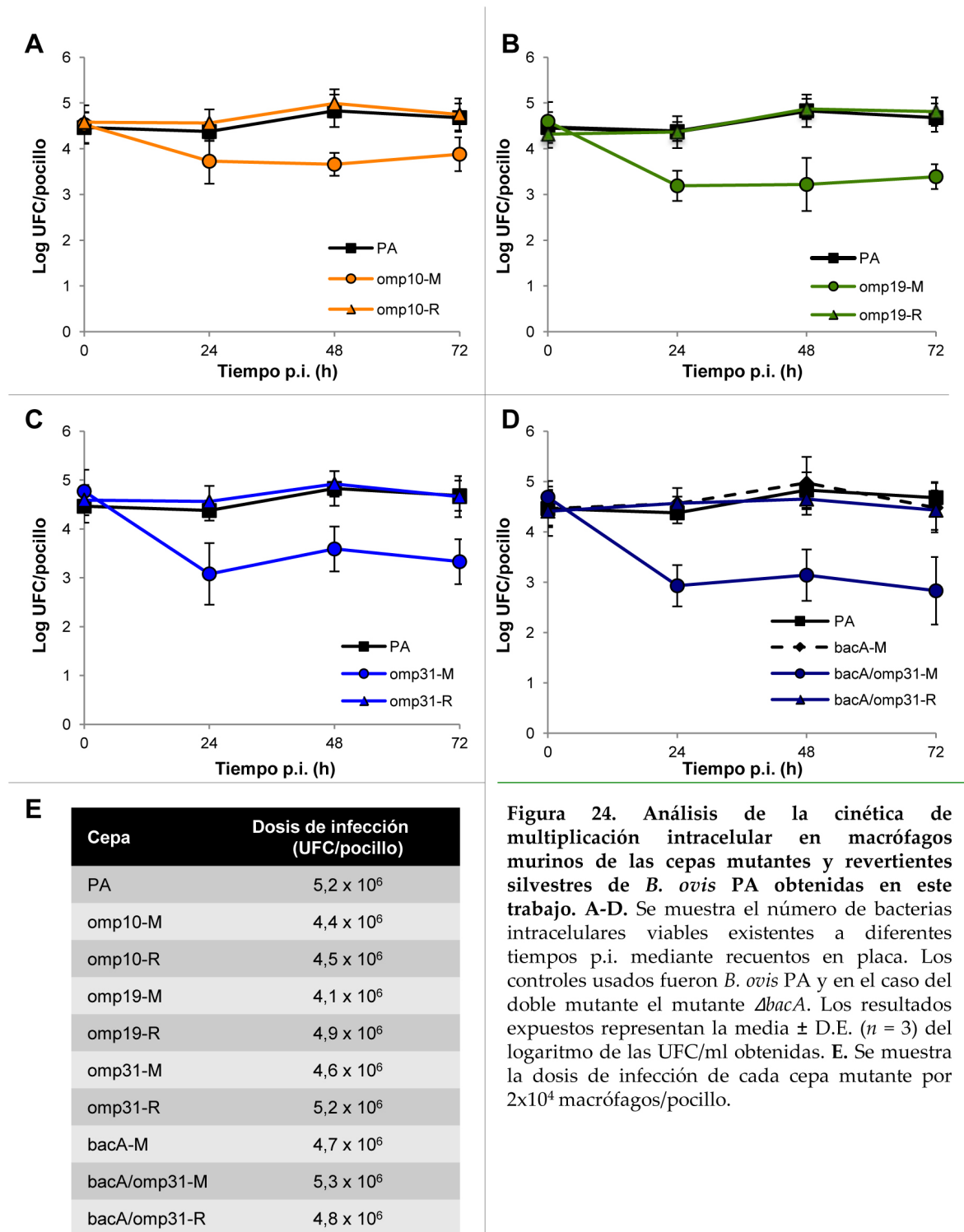


Figura 24. Análisis de la cinética de multiplicación intracelular en macrófagos murinos de las cepas mutantes y revertientes silvestres de *B. ovis* PA obtenidas en este trabajo. A-D. Se muestra el número de bacterias intracelulares viables existentes a diferentes tiempos p.i. mediante recuentos en placa. Los controles usados fueron *B. ovis* PA y en el caso del doble mutante el mutante $\Delta bacA$. Los resultados expuestos representan la media \pm D.E. ($n = 3$) del logaritmo de las UFC/ml obtenidas. E. Se muestra la dosis de infección de cada cepa mutante por 2×10^4 macrófagos/pocillo.

semana 8 p.i. todas las cepas mutantes presentaron recuentos esplénicos similares a los mostrados por la cepa parental.

En el análisis del peso de los bazos (**Figura 25 B**), a la semana 3 p.i. se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el peso de los bazos de los animales inoculados con *B. ovis* PA y el peso de los bazos de los animales inoculados con los mutantes, observándose mayor esplenomegalia en los bazos de los animales infectados con la cepa parental. Estas diferencias no se mantuvieron en el tiempo y a la semana 8 p.i. todos los bazos mostraron un peso similar.

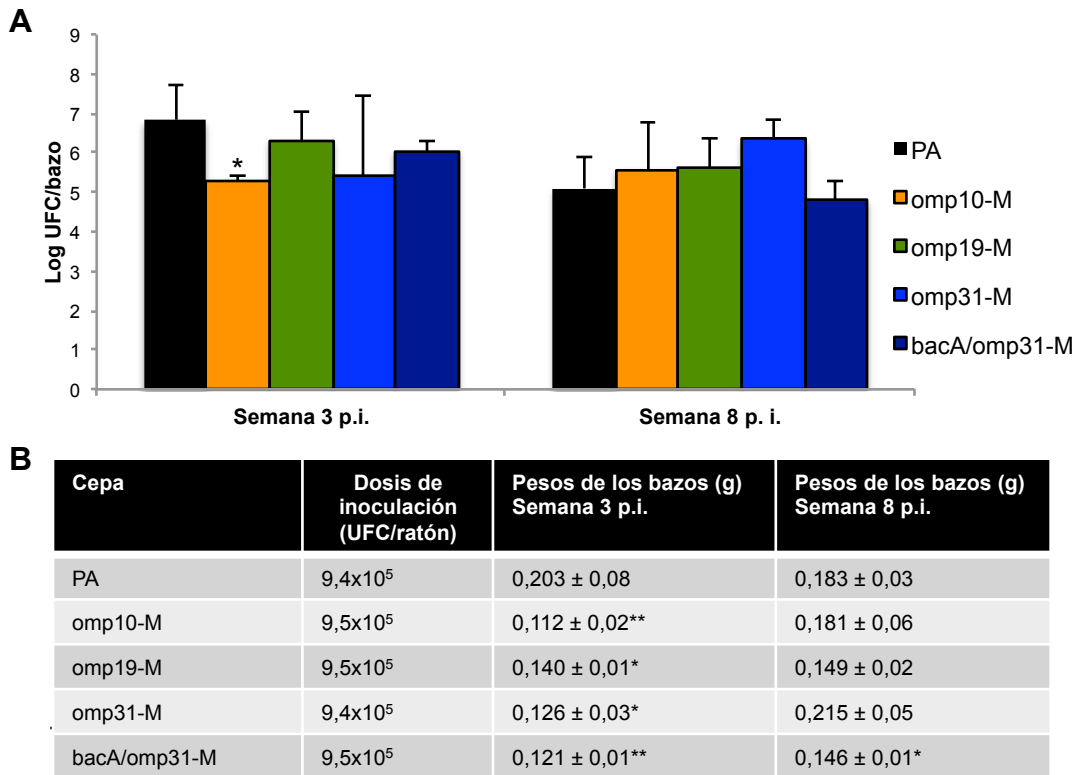


Figura 25. Análisis de la virulencia en ratones BALB/c de las cepas mutantes de *B. ovis* PA obtenidas en el presente trabajo. Se muestran los valores de infección esplénica obtenidos a las semanas 3 y 8 p.i., expresados como la media \pm D.E. del log UFC/bazo siendo $n=5$. **B.** Dosis (UFC/ratón) exactas de cada una de las cepas inoculadas IP y media \pm D.E. del peso de los bazos procedentes de ratones BALB/c infectados con cada una de las cepas y sacrificados a las semanas 3 y 8 p.i. (expresados en gramos).

Simbología:

* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,005$, indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el resultado obtenido con *B. ovis* PA.

2. Estudio, en modelo murino, de mutantes atenuados de *B. ovis* PA como vacunas vivas frente a infecciones producidas por *B. ovis*

Otro de los objetivos generales de este trabajo ha sido el de analizar la utilidad como vacunas, frente a infecciones ocasionadas por *B. ovis*, de cepas mutantes con virulencia atenuada derivadas de *B. ovis* PA. Considerando que los mutantes $\Delta omp10$, $\Delta omp19$, $\Delta omp31$ y $\Delta bacA/\Delta omp31$ de *B. ovis* PA obtenidos durante la realización de este trabajo no presentaron un disminución relevante de la virulencia en los ensayos de infección experimental en ratón (Figura 25), para la consecución de este objetivo únicamente se emplearon los mutantes atenuados $\Delta omp25d$, $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$, $\Delta virB2$ y Δcgs de *B. ovis* PA previamente obtenidos en nuestro laboratorio (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2012).

2.1. Evaluación preliminar de la colonización esplénica de los mutantes atenuados de *B. ovis* PA en la dosis de vacunación seleccionada

Considerando la marcada atenuación observada para los mutantes $\Delta omp25d$, $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$, $\Delta virB2$ y Δcgs de *B. ovis* PA en los experimentos de virulencia previamente realizados (Figura 26) (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2012), se

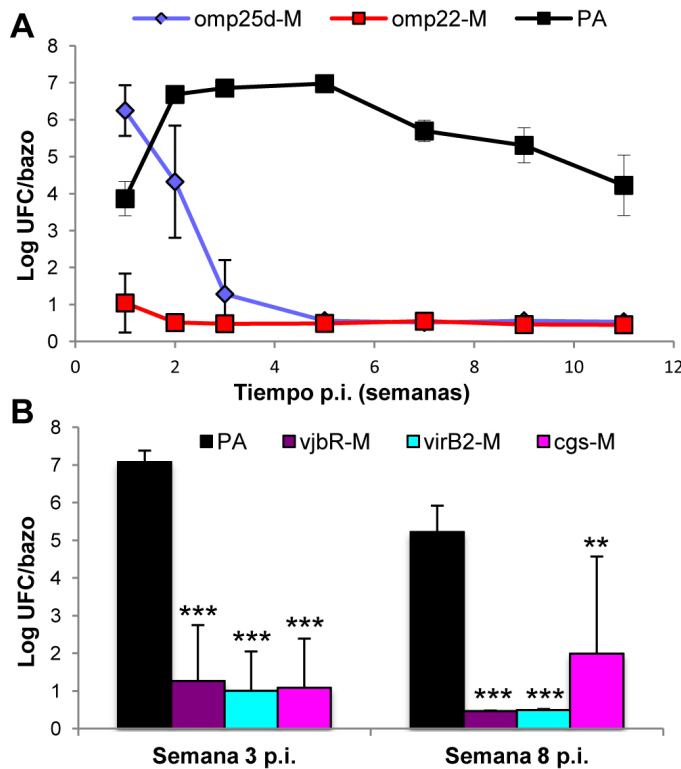


Figura 26. Análisis de la virulencia en ratones BALB/c de las cepas mutantes $\Delta omp25d$, $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$, $\Delta virB2$ y Δcgs de *B. ovis* PA (Tomado y adaptado de Caro-Hernández *et al.*, 2007 y Martín-Martín *et al.*, 2012). A. Valores de infección esplénica de los mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ (dosis de inoculación 5×10^6 UFC/ratón, aproximadamente), obtenidos las primeras 11 semanas p.i., expresados como la media \pm D.E. del log UFC/bazo siendo $n=5$. B. Valores de infección esplénica de los mutantes $\Delta vjbR$, $\Delta virB2$ y Δcgs (dosis de inoculación 10^6 UFC/ratón, aproximadamente) obtenidos a las semanas 3 y 8 p.i., expresados como la media \pm D.E. del log UFC/bazo siendo $n=5$.

Simbología:
* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,005$, *** $P \leq 0,0005$, indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el resultado obtenido por *B. ovis* PA.

seleccionó una dosis de vacunación de 10^8 UFC/ratón para todos los mutantes, excepto para el mutante $\Delta omp25d$. Este mutante se empleó a una dosis de 10^7 UFC/ratón ya que en los experimentos previos de virulencia (Caro-Hernández *et al.*, 2007) se observó que en la primera semana p.i. presentaba niveles de colonización esplénica superiores a los obtenidos con la cepa parental (**Figura 26 A**). Teniendo en cuenta estudios previos que emplean *B. melitensis* Rev1 como vacuna control en modelo murino, la dosis de vacunación seleccionada para la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 fue de 10^5 UFC/ratón (Jiménez de Bagués *et al.*, 1993; Jiménez de Bagués *et al.*, 1994; Cassataro *et al.*, 2007).

Para tener una estimación previa del grado de colonización esplénica de las distintas cepas mutantes al ser empleadas en las dosis de vacunación seleccionadas, se realizó un recuento del número de bacterias presentes en el bazo de los animales inmunizados en la semana 3 p.i. (**Figura 27**), momento que coincide con el máximo de infección esplénica en el caso de la cepa virulenta *B. ovis* PA. Para ello, se inocularon por vía IP 5 ratones por cepa y, transcurridas 3 semanas, se evaluó el número de bacterias viables presente en los bazos (Apartado 6.1.1 de Materiales y Métodos). Los resultados muestran que, a la dosis vacunal seleccionada, todas las cepas mutantes de *B. ovis* PA, menos *B. ovis* Δcgs , presentaron un grado de colonización esplénica significativamente inferior al observado en la cepa parental virulenta *B. ovis* PA (**Figura 27**) pero superior al observado en experimentos previos con dosis de infección inferiores (**Figura 26**).

Ya que el mutante Δcgs de *B. ovis* PA al ser inoculado a una dosis de 10^8 UFC/ratón

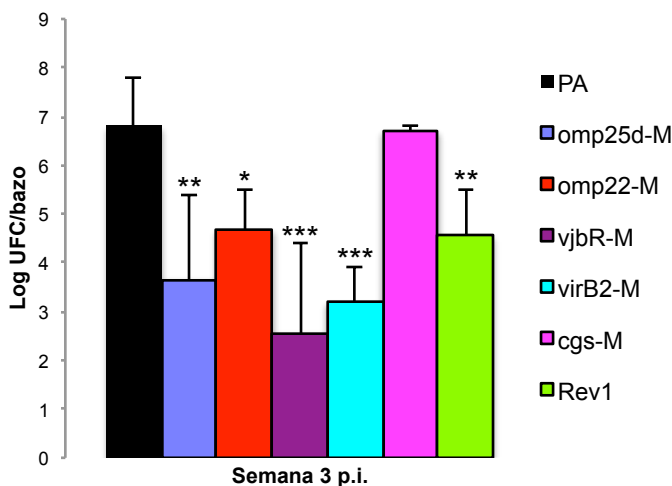


Figura 27. Análisis de la colonización esplénica en ratones BALB/c de las cepas mutantes $\Delta omp25d$, $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$, $\Delta virB2$ y Δcgs de *B. ovis* PA a la dosis de vacunación seleccionada (10^7 UFC/ratón para $\Delta omp25d$ y 10^8 UFC/ratón para la cepa parental *B. ovis* PA y para el resto de mutantes). Valores de infección esplénica obtenidos a la semana 3 p.i., expresados como la media \pm D.E. del log UFC/bazo siendo $n=5$. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,005$, *** $P \leq 0,0005$, indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el resultado obtenido por *B. ovis* PA.

presentó niveles de infección esplénica a la semana 3 p.i. similares a los observados con la cepa parental virulenta *B. ovis* PA (**Figura 27**), se realizó un nuevo estudio para analizar su comportamiento en estadios más tardíos de la infección. Para ello, los ratones se inocularon con 10^8 UFC y se realizaron recuentos de bacterias en bazo a las semanas 1, 3, 5 y 10 p.i. (Apartado 6.1.2 de Materiales y Métodos). Los resultados obtenidos mostraron un perfil de colonización esplénica bastante similar en los

animales inoculados con la cepa mutante *B. ovis* Δcgs y los animales inoculados con la cepa parental virulenta *B. ovis* PA en las primeras 5 semanas p.i. Sin embargo, en la semana 10 p.i. el número de UFC en bazo fue considerablemente menor en el mutante que en la cepa parental (**Figura 28 A**). El peso de los bazos en los animales inoculados con el mutante Δcgs de *B. ovis* PA fue significativamente menor que el observado en los ratones inoculados con la cepa parental a lo largo de todo el experimento (**Figura 28 B**).

A la vista de los resultados, se consideró interesante evaluar lo que ocurría al inocular este mutante en una dosis intermedia (**Figura 28 C-D**), por lo que se realizó un

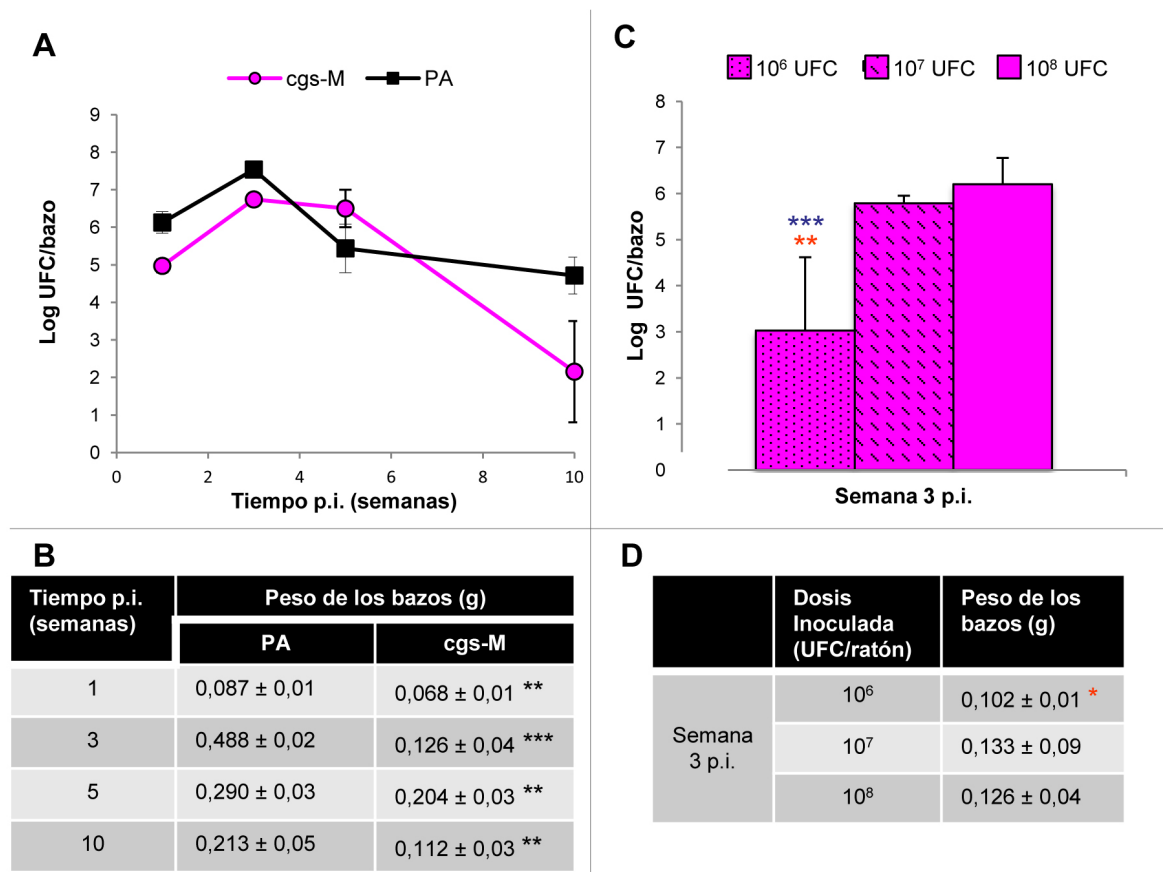


Figura 28. Análisis de la colonización esplénica, a diferentes dosis, del mutante Δcgs de *B. ovis* PA. A. Colonización esplénica del mutante Δcgs de *B. ovis* PA (dosis de inoculación: 10^8 UFC/ratón) y de la cepa parental *B. ovis* PA (dosis de inoculación: 10^8 UFC/ratón). **B.** Peso de los bazos a lo largo del tiempo de los ratones inoculados con Δcgs (dosis: 10^8 UFC/ratón) y con PA (dosis: 10^8 UFC/ratón). **C.** Colonización esplénica del mutante Δcgs trascurridas 3 semanas de la inoculación con distintas dosis 10^6 UFC/ratón, 10^7 UFC/ratón y 10^8 UFC/ratón. **D.** Peso de los bazos procedentes de los ratones inoculados con distintas dosis del mutante Δcgs en la semana 3 p.i. En las figuras A y C se representa la media \pm D.E del log UFC/bazo. ($n=5$) y en las tablas B y D la media \pm D.E del peso del bazo expresado en gramos ($n=5$).

Simbología:

** $P \leq 0,005$, *** $P \leq 0,0005$, indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el resultado obtenido por *B. ovis* PA

*** $P \leq 0,0005$, indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el resultado de dosis 10^8 UFC/ratón

* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,005$ indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el resultado de dosis 10^7 UFC/ratón

experimento adicional en el que se cuantificó el grado de infección esplénica a la semana 3 p.i. en ratones inoculados con 10^6 , 10^7 y 10^8 UFC del mutante Δcgs de *B. ovis* PA. Los resultados obtenidos mostraron que la dosis inoculada tenía una marcada influencia en el grado de colonización esplénica de la bacteria. Los recuentos esplénicos fueron considerablemente menores en los animales inoculados con la dosis 10^6 UFC/ratón (log UFC/bazo de $3,03 \pm 1,6$) que en los animales inoculados con las dosis de 10^7 UFC/ratón o 10^8 UFC/ratón (**Figura 28 C**), si bien los animales inoculados con 10^7 o 10^8 UFC/ratón mostraron recuentos esplénicos similares entre sí (**Figura 28 C**). Al igual que se observó en el experimento anterior (**Figura 28 A-B**), los ratones inoculados con la cepa mutante Δcgs de *B. ovis* PA presentaron una esplenomegalia muy limitada independientemente de la dosis inoculada (**Figura 28 D**).

Tras analizar los resultados obtenidos en este apartado con la cepa mutante *B. ovis* PA Δcgs , se consideró que la atenuación de este mutante no era suficiente para que pudiera ser empleado como vacuna viva y no se incluyó en los estudios posteriores.

2.2. Análisis de la persistencia de los mutantes atenuados de *B. ovis* PA en la dosis de vacunación seleccionada

Con los mutantes seleccionados en el apartado anterior y con objeto de evaluar tanto la cinética de colonización esplénica como la respuesta inmune inducida, se realizó un estudio más amplio que se extendió hasta el día 28 p.i., momento que coincide con la infección experimental en los ensayos de protección detallados más adelante.

Para ello, los mutantes se inocularon por vía IP en las dosis indicadas en la **Figura 29 F** y se realizaron recuentos en bazo en los días 7, 14, y 28 p.i. Además, se consideró interesante seleccionar dos mutantes para un estudio más completo que incluyera puntos de muestreo adicionales a los días 1, 3 y 21 p.i. Considerando los resultados obtenidos en el experimento inicial de colonización esplénica a la semana 3 p.i. (**Figura 27**), los mutantes seleccionados fueron *B. ovis* $\Delta omp25d$ y *B. ovis* $\Delta omp22$ ya que, aunque no presentaron diferencias significativas con los mutantes $\Delta vjbR$ y $\Delta virB2$ de *B. ovis* PA, proporcionaron los valores medios de UFC/bazo más elevados y similares a los obtenidos con la vacuna clásica *B. melitensis* Rev1 (**Figura 27**). En este estudio ampliado también se incluyeron la cepa parental *B. ovis* PA, la vacuna clásica *B. melitensis* Rev1 y un grupo de animales inoculado con PBS como control negativo para el análisis de anticuerpos en suero y citocinas endógenas en bazo como se describe en el Apartado 6.1.3 de Materiales y Métodos.

En los animales inoculados con la cepa parental virulenta *B. ovis* PA los recuentos esplénicos fueron aumentando progresivamente hasta el día 14 p.i. y a partir de este momento, hasta el final del experimento (día 28 p.i.), se mantuvieron más o menos

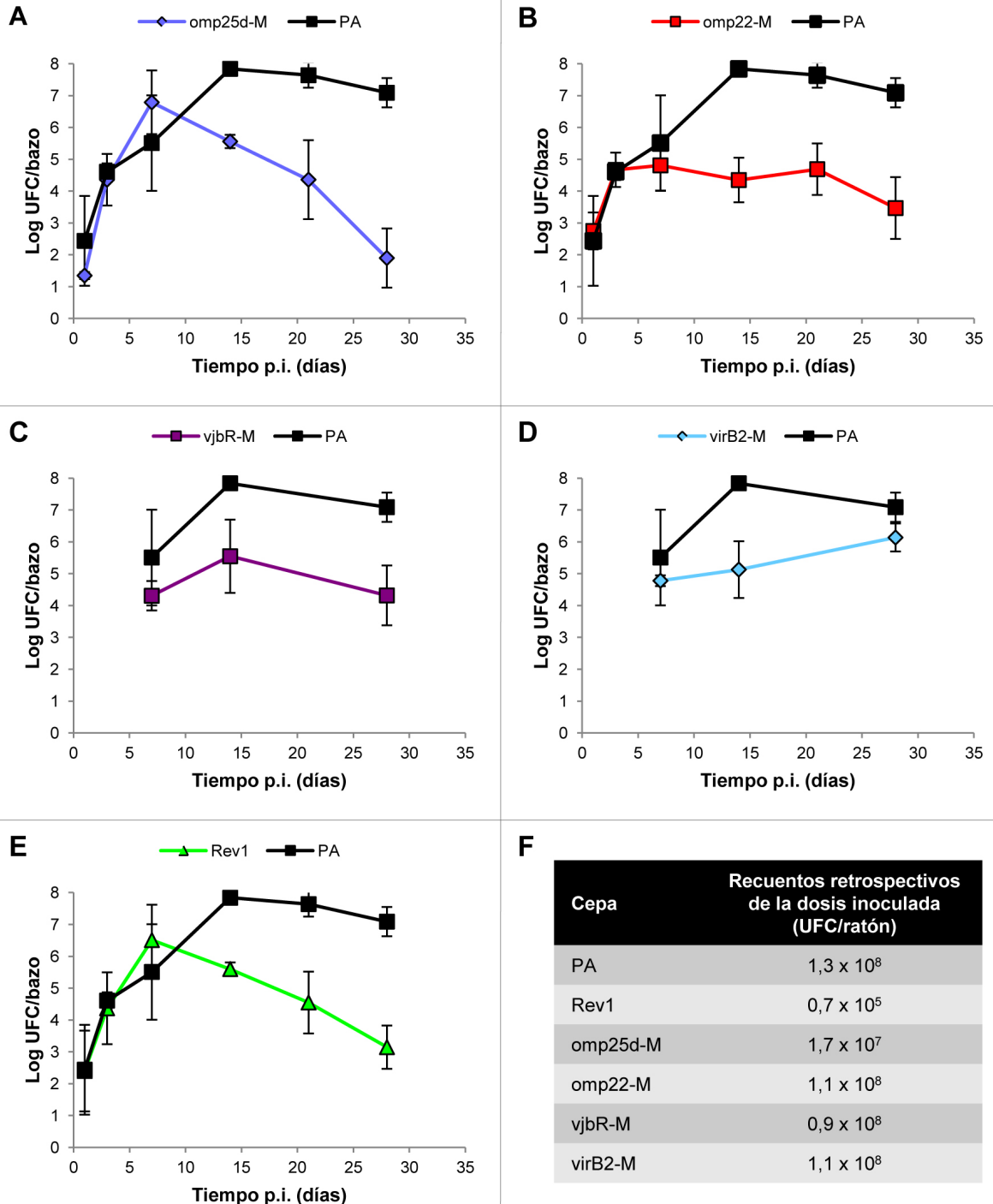


Figura 29. Cinética de colonización esplénica a dosis vacunal de los distintos mutantes atenuados. A. $\Delta omp25d$ (dosis: 10^7 UFC/ratón). B. $\Delta omp22$ (dosis: 10^8 UFC/ratón). C. $\Delta vjbR$ (dosis: 10^8 UFC/ratón). D. $\Delta virB2$ (dosis: 10^8 UFC/ratón). E. Cepas vacunales *B. melitensis* Rev 1 (dosis: 10^5 UFC/ratón). Se representa el log UFC/bazo \pm D.E. ($n=5$) de cada mutante junto con los resultados obtenidos para la cepa parental *B. ovis* PA (dosis: 10^8 UFC/ratón). F. Dosis de inoculación de cada cepa mutante por ratón, determinada mediante recuento retrospectivo.

constantes (en torno a 7 log UFC/bazo). En el caso de los animales inoculados con la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1, los recuentos esplénicos fueron aumentando progresivamente de forma similar a *B. ovis* PA hasta el día 7 p.i., momento en que se alcanzó el nivel máximo de infección ($6,51 \pm 1,1$ log UFC/bazo). A partir de este momento fueron disminuyendo progresivamente hasta el final del experimento ($3,15 \pm 0,7$ log UFC/bazo el día 28 p.i.) (**Figura 29 E**).

El perfil de colonización esplénica del mutante $\Delta omp25d$ de *B. ovis* PA fue similar al observado en la vacuna clásica *B. melitensis* Rev1 (**Figura 29 A**), con recuentos máximos en bazo a día 7 p.i. ($6,79 \pm 1$ log UFC/bazo) y una disminución exponencial en el número de UFC/bazo desde ese momento hasta el día 28 p.i. en que termina el experimento. Cabe destacar que, aunque las diferencias observadas en el número de UFC/bazo entre la cepa mutante $\Delta omp25d$ de *B. ovis* PA y *B. melitensis* Rev1 no fueron estadísticamente significativas, al final de este experimento en 4 de los 5 animales inoculados con la cepa mutante no se aisló ninguna bacteria del bazo mientras que, en todos los animales inoculados con *B. melitensis* Rev1 sí.

En los animales inoculados con las cepas mutantes $\Delta omp22$ (**Figura 29 B**) y $\Delta vjbR$ (**Figura 29 C**) de *B. ovis* PA los recuentos esplénicos obtenidos hasta el día 7 p.i. (en torno a 4,5 log UFC/bazo) fueron similares a los observados con *B. ovis* PA. Sin embargo, a partir de este momento, no evolucionaron a niveles superiores sino que se mantuvieron prácticamente estables a lo largo de todo el experimento, de modo que a día 28 p.i. fueron del orden de 2 log inferiores a los observados con *B. ovis* PA (**Figura 29 B y C**).

El mutante $\Delta virB2$, sorprendentemente, presentó recuentos esplénicos similares a PA tanto el día 7 p.i. ($4,78 \pm 0,2$ log UFC/bazo) como el día 28 p.i. ($6,14 \pm 0,4$ log UFC/bazo). La diferencia entre ambas cepas fue que con la cepa virulenta *B. ovis* PA se alcanzaron valores de 7 log UFC/bazo el día 14 p.i. que se mantuvieron hasta el día 28 p.i. y con la cepa $\Delta virB2$ los valores de los recuentos esplénicos alcanzados fueron de $5,54 \pm 0,9$ log UFC/bazo a día 14 p.i. (**Figura 29 D**).

2.3. Evolución de los anticuerpos, capaces de reaccionar con células enteras de *B. ovis*, en el suero de los animales vacunados

Los ratones empleados en el estudio de la persistencia en bazo de los mutantes atenuados de *B. ovis* PA también se utilizaron para analizar la evolución en suero de los niveles de anticuerpos de la clase IgG capaces de reaccionar con células enteras de *B. ovis* PA en la técnica de I-ELISA (Apartado 6.3 de Materiales y Métodos). Además, se había incluido un grupo de animales inoculado con PBS como control negativo.

En los animales inoculados con las cepas mutantes $\Delta omp25d$, $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$ y $\Delta virB2$ de *B. ovnis* PA estos anticuerpos empezaron a detectarse a los 7 días p.i. y sus niveles se incrementaron progresivamente hasta el final del experimento en el día 28 p.i. (Figura 30). Las diferencias entre estos grupos de ratones fueron poco relevantes, aunque a los 14 días p.i. los animales inoculados con la cepa *B. ovnis* $\Delta omp25d$ presentaron un título de anticuerpos inferior al observado en los animales inoculados con los demás mutantes de *B. ovnis*. En los animales inmunizados con *B. melitensis* Rev1 la respuesta de anticuerpos reactivos con células enteras de *B. ovnis* PA solo fue detectable a partir del día 14 p.i. y los niveles fueron significativamente inferiores ($P \leq 0,005$) a los observados en los animales inmunizados con los mutantes derivados de *B. ovnis* PA (Figura 30). Finalmente, en el suero de los animales inoculados con PBS no se detectaron anticuerpos IgG reactivos con células enteras de *B. ovnis* PA (Figura 30).

Posteriormente, en las mismas muestras de suero y también mediante I-ELISA, se realizó el estudio de las subclases IgG₁, IgG_{2a} e IgG_{2b} reactivas frente a células enteras de *B. ovnis* PA inactivadas por calor (Apartado 6.3 de Materiales y Métodos).

En los animales inoculados con las cepas mutantes $\Delta omp25d$, $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$ y $\Delta virB2$ de

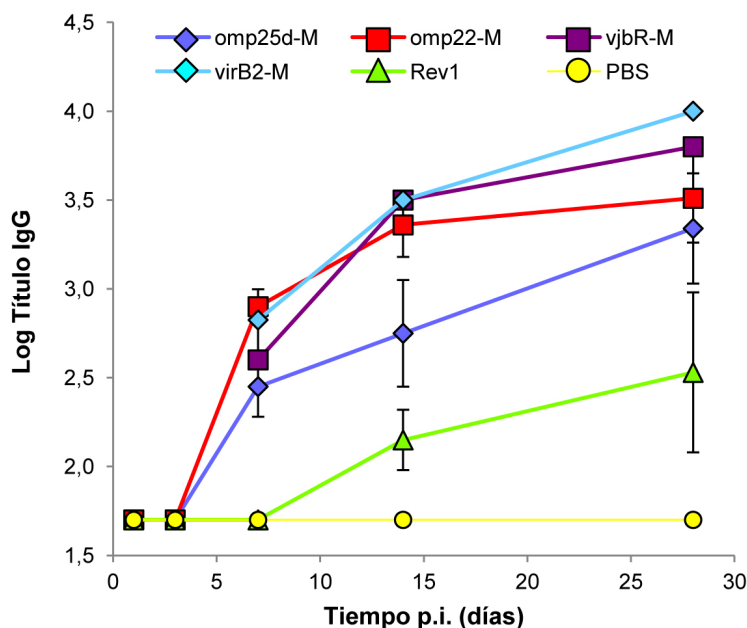


Figura 30. Evolución de los niveles de anticuerpos de la clase IgG, frente a células enteras inactivadas por calor de *B. ovnis* PA, en muestras de suero de ratones inoculados con los mutantes atenuados $\Delta omp25d$ (dosis 10^7 UFC/ratón), $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$, $\Delta virB2$ (dosis 10^8 UFC/ratón), con la cepa vacunal Rev 1 (dosis 10^5 UFC/ratón) y con PBS (control negativo). Se representa el log del título \pm D.E. (n=5). El límite de detección es de 1,7 log título.

B. ovnis PA las 3 subclases comenzaron a detectarse el día 7 p.i. y continuaron incrementándose hasta el día 28 p.i. (Figura 31 A-D). Coincidiendo con lo observado en los niveles de IgG total (Figura 30) los niveles de IgG₁, IgG_{2a} e IgG_{2b} observados a los 14 días p.i. en los animales inoculados con la cepa mutante $\Delta omp25d$ de *B. ovnis* PA fueron ligeramente inferiores al resto (Figura 31 A). En todos los casos el nivel de IgG₁ fue ligeramente superior aunque no se observó una clara predominancia.

En los animales inoculados con la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 los niveles de IgG₁, IgG_{2a} e IgG_{2b} observados fueron muy inferiores a los observados en los animales inmunizados con las cepas mutantes de *B. ovis*, comenzándose a detectar las 3 subclases en el mismo momento, el día 14 p.i., y sin un claro predominio de ninguna de ellas (Figura 31 E).

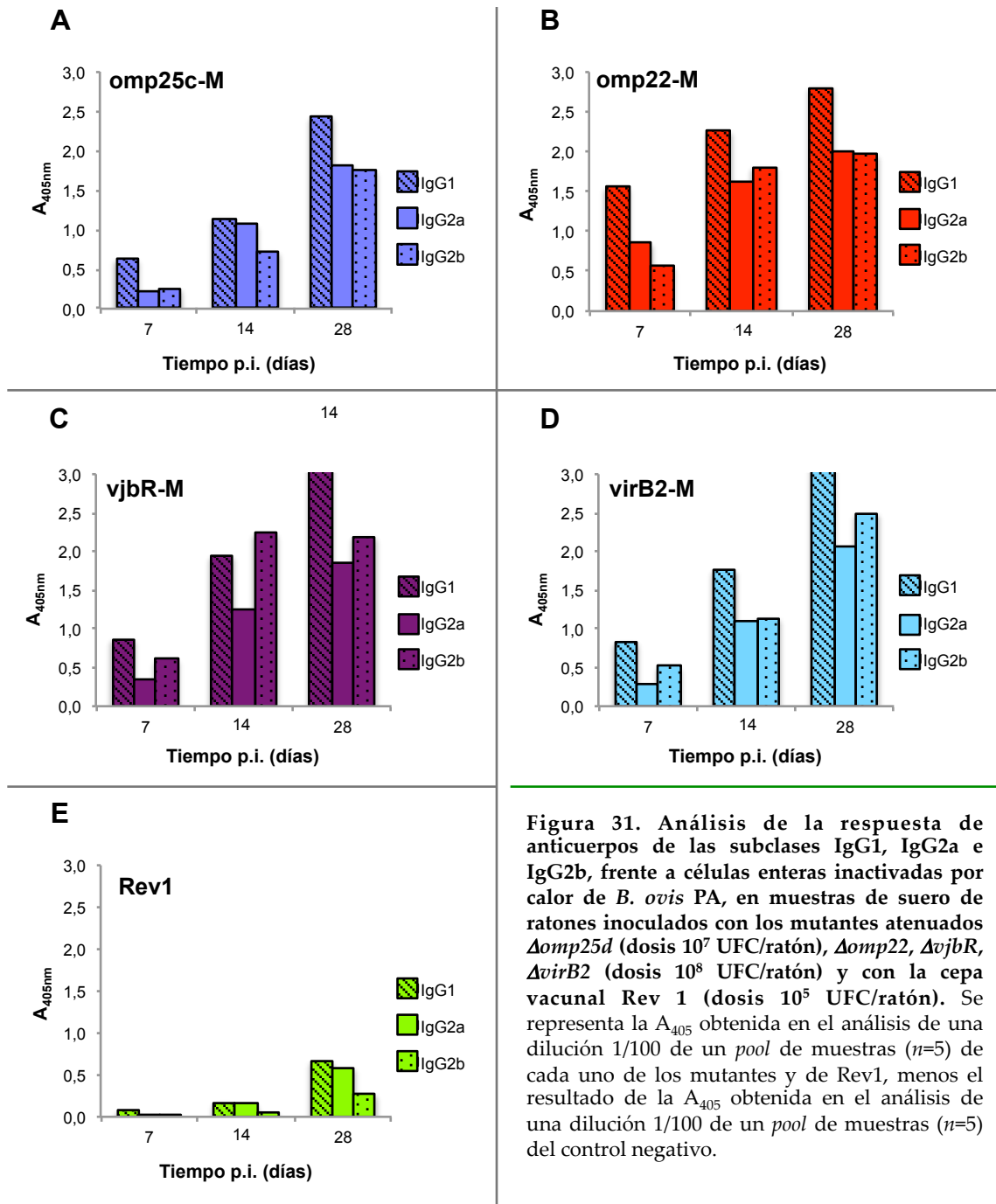


Figura 31. Análisis de la respuesta de anticuerpos de las subclases IgG₁, IgG_{2a} e IgG_{2b}, frente a células enteras inactivadas por calor de *B. ovis* PA, en muestras de suero de ratones inoculados con los mutantes atenuados $\Delta omp25d$ (dosis 10^7 UFC/ratón), $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$, $\Delta virB2$ (dosis 10^8 UFC/ratón) y con la cepa vacunal Rev 1 (dosis 10^5 UFC/ratón). Se representa la A_{405} obtenida en el análisis de una dilución 1/100 de una *pool* de muestras ($n=5$) de cada uno de los mutantes y de Rev1, menos el resultado de la A_{405} obtenida en el análisis de una dilución 1/100 de una *pool* de muestras ($n=5$) del control negativo.

2.4 Evolución de la producción de citocinas endógenas en el bazo de los animales inmunizados

En los mismos animales empleados en el estudio anterior, se llevó a cabo un análisis del peso de los bazos y de las citocinas endógenas producidas en los mismos. Para ello, el homogeneizado del bazo se lisó con CHAPS como se describe en el Apartado 6.2 de Materiales y Métodos y en los sobrenadantes obtenidos se analizaron, mediante ELISA, las citocinas IFN γ , IL1 α , TNF α , IL12p40 e IL10.

Análisis del peso de los bazos

Los resultados del peso de los bazos se recogen en la **Tabla VIII**. El peso medio de los bazos extraídos de los animales inoculados con PBS osciló entre 0,075 y 0,096 gramos. En referencia a estos valores, en los animales inoculados con la cepa parental virulenta *B. ovis* PA se observó un aumento progresivo del peso de los bazos a partir del día 14 p.i. y hasta el final del experimento, momento en el que se alcanzaron valores de $0,484 \pm 0,30$ g. En los animales inoculados con la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 se observó un aumento en el peso de los bazos entre los días 7 y 28 p.i., destacando una marcada esplenomegalia el día 14 p.i. ($0,448 \pm 0,06$ g). En los bazos procedentes de los animales inoculados con las cepas mutantes $\Delta omp25d$, $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$ y $\Delta virB2$ de *B. ovis* PA no se observó un aumento tan importante de tamaño, manteniéndose éste siempre por debajo de 0,200 g (**Tabla VIII**)

Tabla VIII. Peso de los bazos (media \pm D.E.) de los ratones inoculados con la cepa virulenta *B. ovis* PA (dosis 10^8 /UFC/ratón), los mutantes atenuados $\Delta omp25d$ (dosis 10^7 /UFC/ratón), $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$, $\Delta virB2$ (dosis 10^8 UFC/ratón), la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 (dosis 10^5 /UFC/ratón) y de los ratones control (inoculados con PBS).

Tiempo p.i. (días)	Peso (g) del bazo de los animales inoculados con:						
	PA	omp25d-M	omp22-M	vjbR-M	virB2-M	Rev1	PBS
1	0,076 \pm 0,01	0,069 \pm 0,02	0,088 \pm 0,01	ND	ND	0,075 \pm 0,01	0,075 \pm 0,00
3	0,086 \pm 0,01	0,079 \pm 0,01	0,096 \pm 0,00	ND	ND	0,082 \pm 0,02	0,080 \pm 0,00
7	0,104 \pm 0,03	0,134 \pm 0,02	0,108 \pm 0,02	0,104 \pm 0,01	0,116 \pm 0,01	0,188 \pm 0,05	0,089 \pm 0,01
14	0,190 \pm 0,03	0,134 \pm 0,03	0,099 \pm 0,02	0,124 \pm 0,01	0,099 \pm 0,00	0,448 \pm 0,06	0,078 \pm 0,00
21	0,397 \pm 0,08	0,113 \pm 0,03	0,100 \pm 0,01	ND	ND	0,221 \pm 0,03	0,077 \pm 0,00
28	0,484 \pm 0,30	0,105 \pm 0,02	0,099 \pm 0,01	0,111 \pm 0,01	0,174 \pm 0,01	0,137 \pm 0,02	0,096 \pm 0,00

Análisis de la producción de citocinas endógenas en los bazos

En los animales inoculados con la cepa parental virulenta *B. ovis* PA la producción de citocinas endógenas en bazo comenzó a detectarse, en general, a partir del día 7 p.i. En el caso del IFN γ , los niveles máximos de producción se observaron entre los días 14 y 28 p.i. y fueron de aproximadamente 1700 pg/0,1g bazo. Respecto a la IL1 α y el TNF α los niveles máximos de producción se detectaron el día 21 p.i. y fueron de aproximadamente 6000 y

400 pg/0,1g bazo, respectivamente, mientras que los niveles máximos de IL12p40 (aproximadamente 1500 pg/0,1g bazo) se detectaron el día 14 p.i. Una vez alcanzados los niveles máximos de IL1 α , TNF α e IL12p40 comenzó a observarse un leve descenso que no se observó en el caso del IFN γ . Los niveles de IL10 fueron despreciables a lo largo de todo el experimento (**Figuras 32-36**).

En el caso de los bazos de los animales inoculados con la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 los niveles máximos detectados de citocinas endógenas fueron, a excepción de TNF α e IL10, similares a los observados en la cepa virulenta. Sin embargo, en el caso de la vacuna clásica, la producción de citocinas fue más rápida, alcanzándose los niveles máximos el día 7 p.i. Posteriormente, la cantidad de citocinas endógenas fue disminuyendo hasta el día 28 p.i., momento en el que se detectaron niveles basales de todas ellas (**Figura 32 A-D**). Respecto al TNF α y la IL10, en los animales inoculados con la vacuna clásica *B. melitensis* Rev1 los niveles máximos de TNF α detectados, además de producirse el día 7 p.i., fueron significativamente inferiores a los observados en *B. ovis* PA (**Figura 32 C**) y únicamente fue en estos animales en los que se detectó producción de IL10 (728 \pm 215 pg/0,1g bazo en el día 21 p.i.) (**Figura 32 E**).

La producción de citocinas endógenas observada en los bazos de los animales inoculados con el mutante $\Delta omp25d$ de *B. ovis* PA fue muy similar a la observada en *B. melitensis* Rev1 (**Figura 33 A-D**) con algunas diferencias; en los bazos de los animales inoculados con el mutante $\Delta omp25d$ no se observó producción de IL10 durante el periodo de tiempo analizado (**Figura 33 E**) y el nivel máximo de IL1 α fue menor ($P \leq 0,005$) que el observado en los animales inoculados con la vacuna clásica (2588 \pm 1352 pg/0,1g bazo) (**Figura 33 B**).

Respecto a los animales inoculados con el mutante $\Delta omp22$ de *B. ovis* PA la cantidad máxima de IFN γ , IL1 α y TNF α observada en los puntos analizados fue ligeramente inferior a 500, 1000 y 100 pg/0,1g de bazo, respectivamente, no observándose en ningún momento un aumento destacado en su producción (**Figura 34 A-C**). Sin embargo, la progresión en los niveles de IL12p40 fue similar a la observada en *B. melitensis* Rev1, alcanzándose los niveles máximos entre los días 7 y 14 p.i. (aproximadamente 1000 pg/0,1g bazo) (**Figura 33 D**).

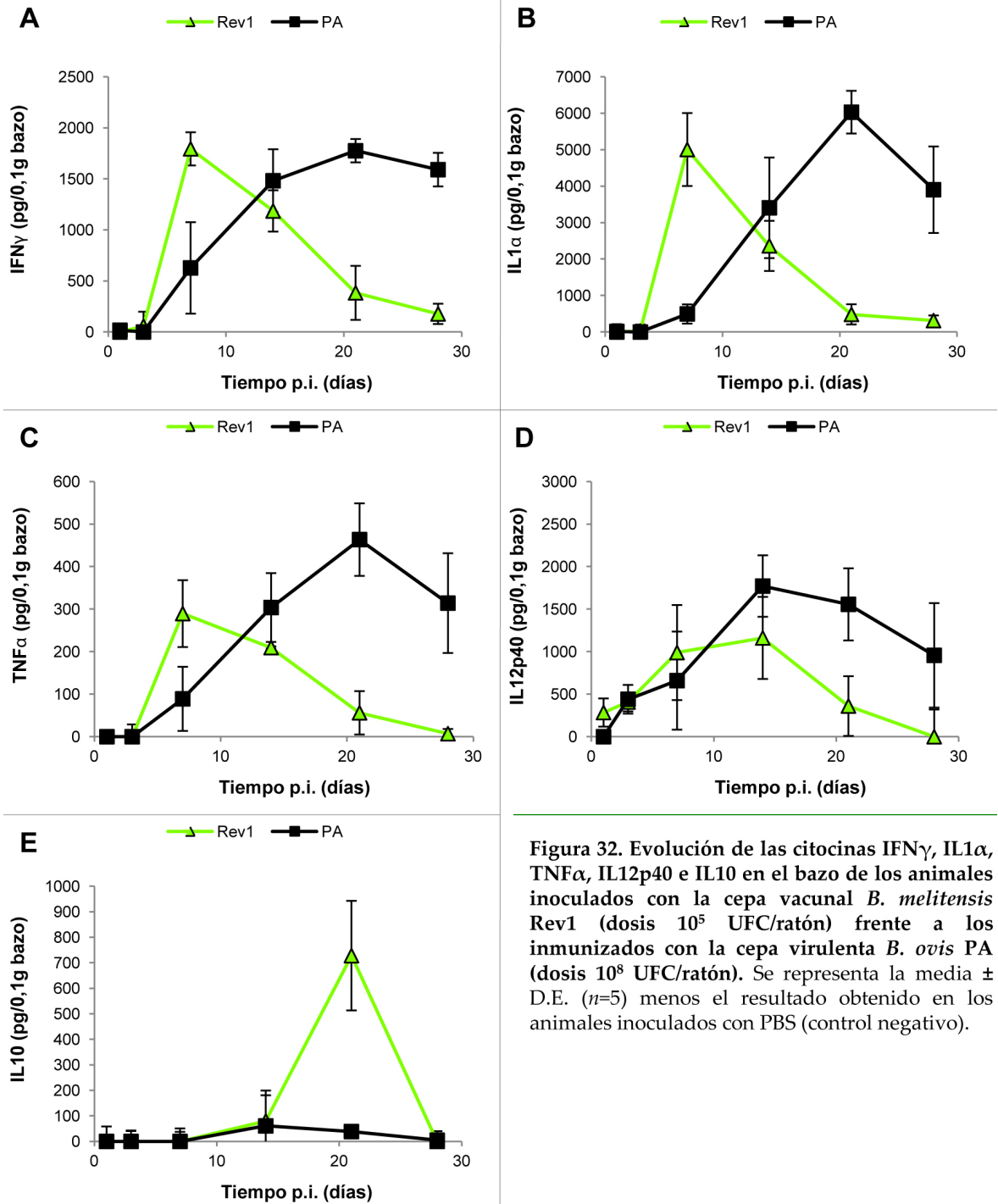


Figura 32. Evolución de las citocinas IFN γ , IL1 α , TNF α , IL12p40 e IL10 en el bazo de los animales inoculados con la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 (dosis 10^5 UFC/ratón) frente a los inmunizados con la cepa virulenta *B. ovis* PA (dosis 10^8 UFC/ratón). Se representa la media \pm D.E. ($n=5$) menos el resultado obtenido en los animales inoculados con PBS (control negativo).

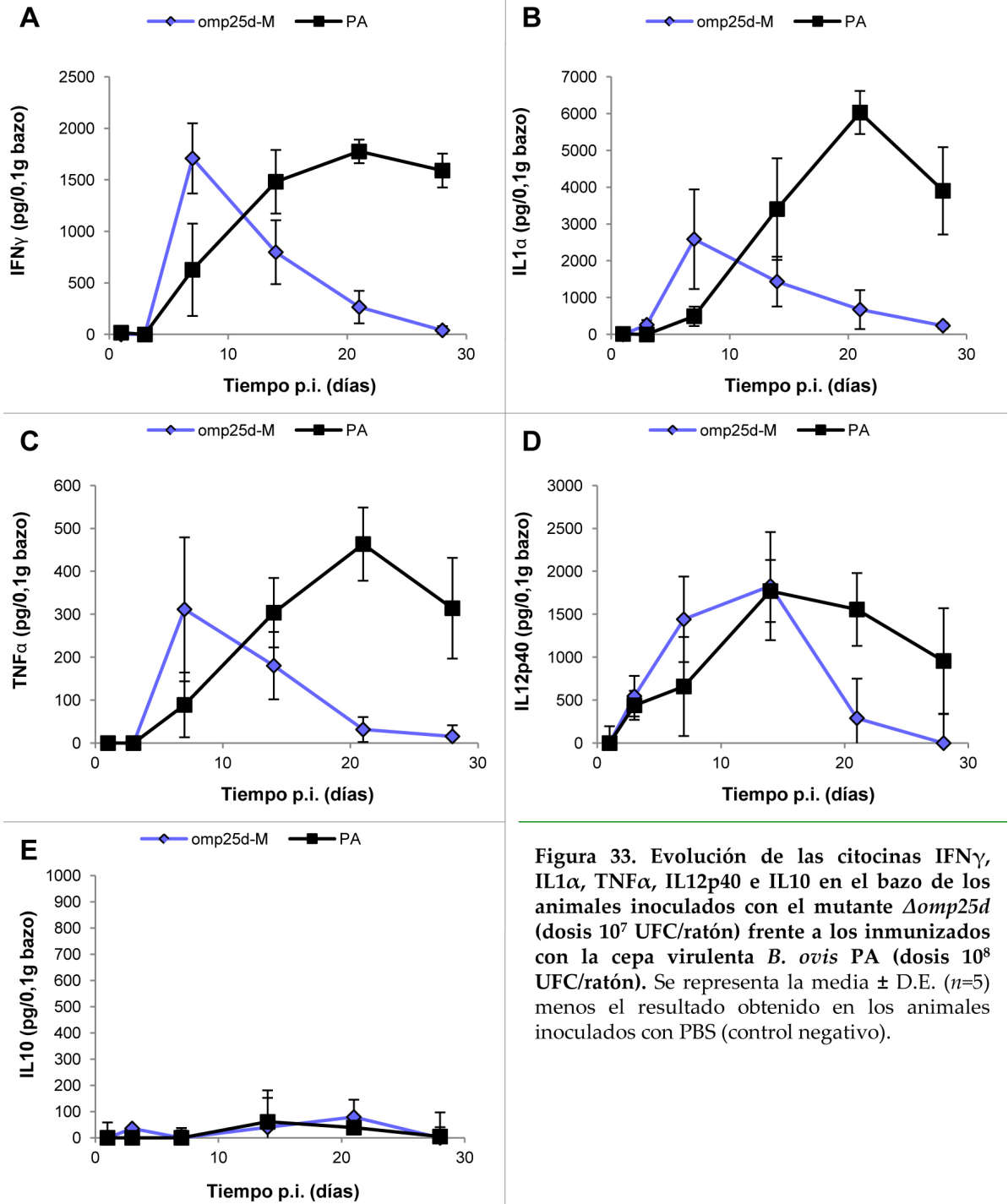


Figura 33. Evolución de las citocinas IFN γ , IL1 α , TNF α , IL12p40 e IL10 en el bazo de los animales inoculados con el mutante $\Delta omp25d$ (dosis 10^7 UFC/ratón) frente a los inmunizados con la cepa virulenta *B. ovis* PA (dosis 10^8 UFC/ratón). Se representa la media \pm D.E. ($n=5$) menos el resultado obtenido en los animales inoculados con PBS (control negativo).

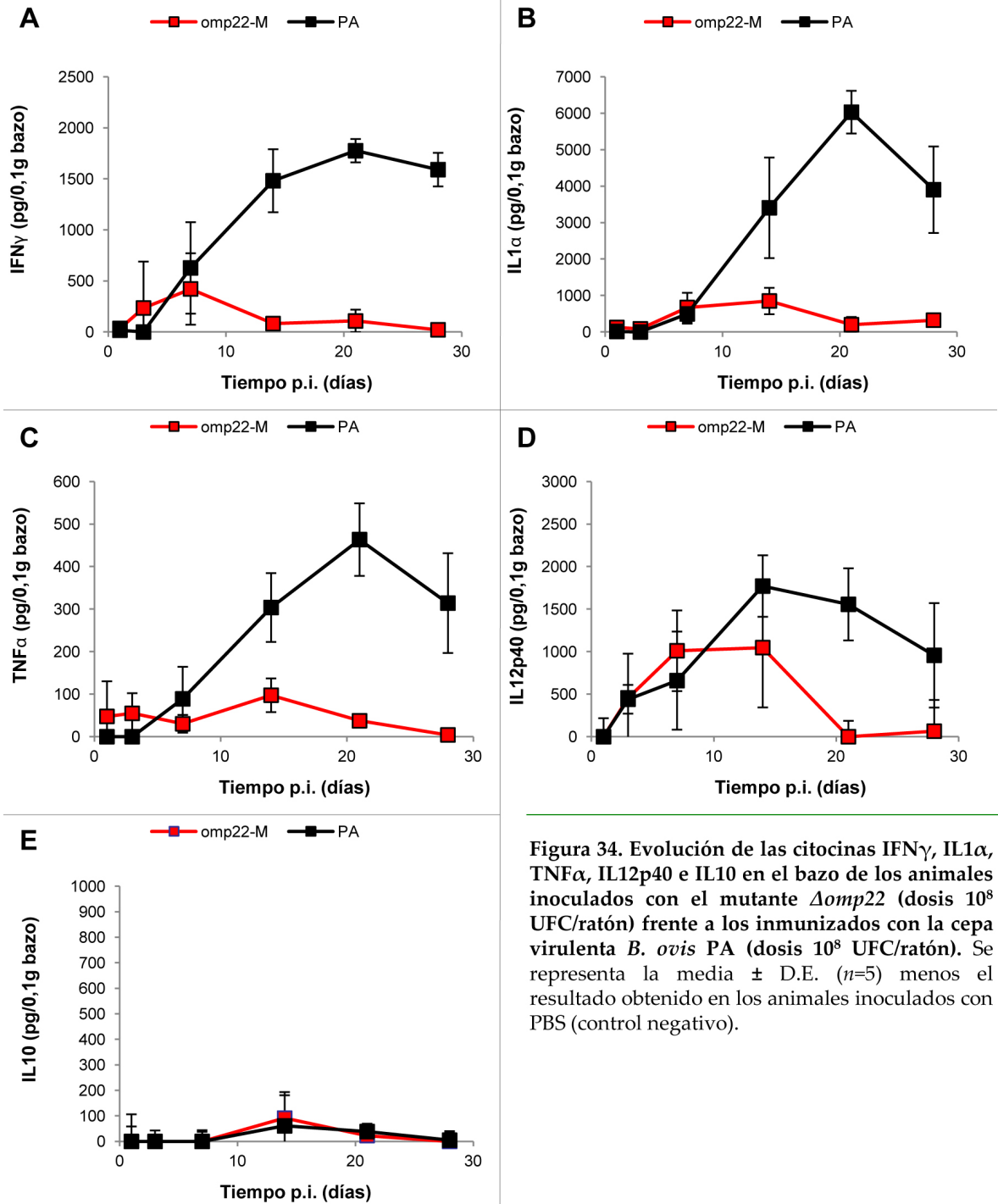


Figura 34. Evolución de las citocinas IFN γ , IL1 α , TNF α , IL12p40 e IL10 en el bazo de los animales inoculados con el mutante $\Delta omp22$ (dosis 10^8 UFC/ratón) frente a los inmunizados con la cepa virulenta *B. ovis* PA (dosis 10^8 UFC/ratón). Se representa la media \pm D.E. ($n=5$) menos el resultado obtenido en los animales inoculados con PBS (control negativo).

En los bazos de los animales inoculados con el mutante $\Delta vjbR$ de *B. ovis* PA los niveles detectados de IFN γ e IL1 α también permanecieron constantes a largo del tiempo analizado e inferiores a 150 y 1200 pg/0,1g bazo, respectivamente (**Figura 35 A-B**). En la producción de TNF α e IL12p40 se detectó un incremento entre los días 7 y 14p.i. (**Figura 35 C-D**), alcanzándose niveles estadísticamente similares a los detectados en los bazos de los animales inoculados con la vacuna clásica *B. melitensis* Rev1.

En los bazos de los animales inoculados con el mutante $\Delta virB2$ de *B. ovis* PA, aunque no se alcanzaron los niveles observados en los bazos de los animales inoculados con *B. ovis* PA y *B. melitensis* Rev1, se detectó una cierta cantidad de IFN γ y de IL1 α el día 28 p.i. (**Figura 36 A-B**). A diferencia de lo observado en el resto de mutantes, los niveles máximos de producción de TNF α se observaron entre los días 14 p.i. y 28 p.i. y fueron similares a los observados en *B. melitensis* Rev1 (aproximadamente 250 pg /0,1g bazo) (**Figura 36 C**) también, se observó una producción de IL12p40 similar a la observada en la vacuna clásica *B. melitensis* Rev1 (**Figura 36 D**).

El día 28 p.i., momento en el que se lleva a cabo la infección experimental en el ensayo de protección, el nivel de citocinas endógenas detectado en los bazos de los animales inoculados tanto con la vacuna clásica como con las cepas mutantes atenuadas $\Delta omp25d$, $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$ de *B. ovis* PA fue basal.

Por último, cabe destacar que si tenemos en cuenta el peso del bazo (**Tabla VIII**) la cantidad de citocinas endógenas (pg/bazo) sería hasta tres veces superior en los animales inoculados con la vacuna *B. melitensis* Rev1 el día 14 p.i. y en los animales inoculados con la cepa virulenta *B. ovis* PA los días 21 y 28 p.i.

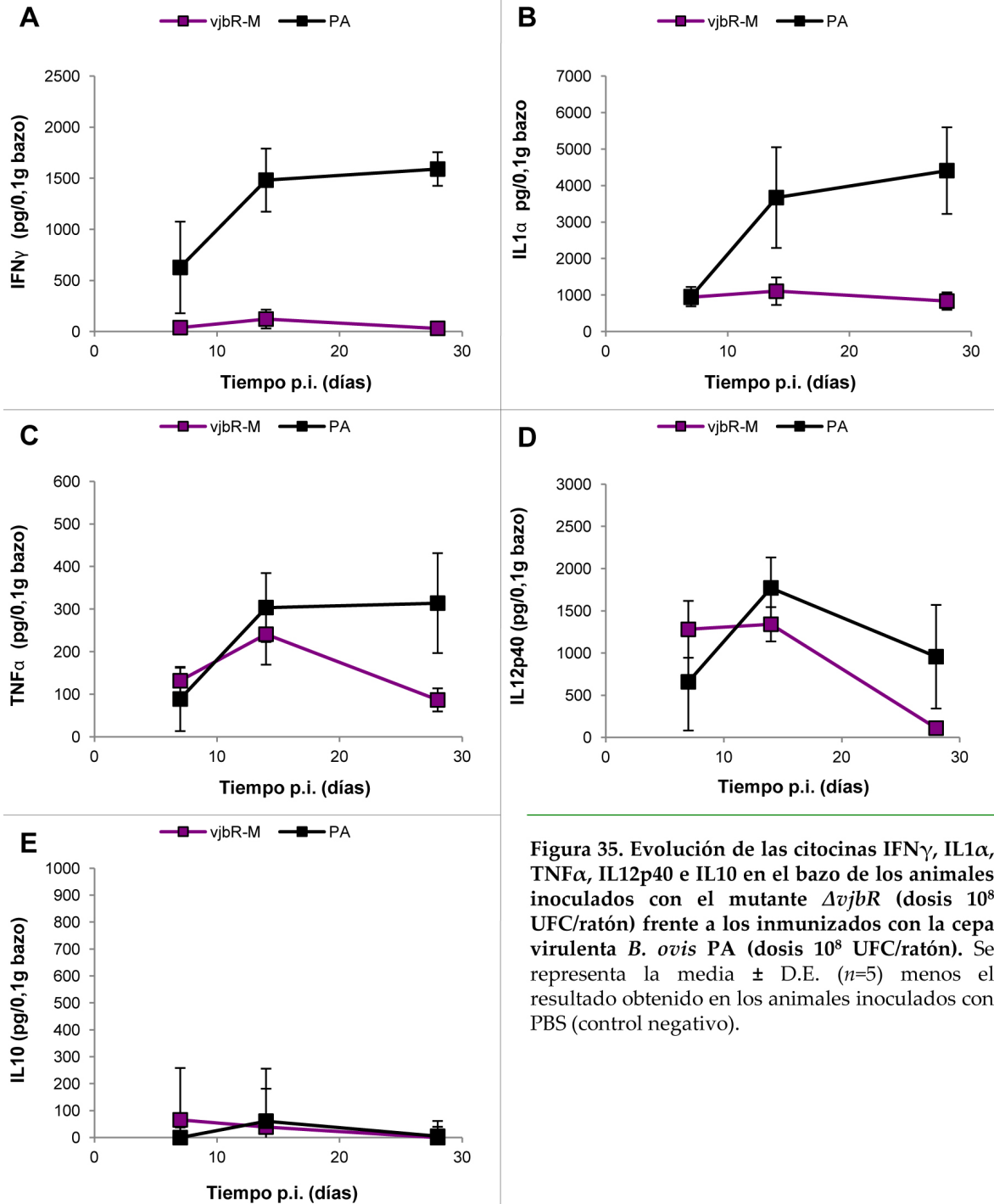


Figura 35. Evolución de las citocinas IFN γ , IL1 α , TNF α , IL12p40 e IL10 en el bazo de los animales inoculados con el mutante $\Delta vjbR$ (dosis 10^8 UFC/ratón) frente a los inmunizados con la cepa virulenta *B. ovis* PA (dosis 10^8 UFC/ratón). Se representa la media \pm D.E. ($n=5$) menos el resultado obtenido en los animales inoculados con PBS (control negativo).

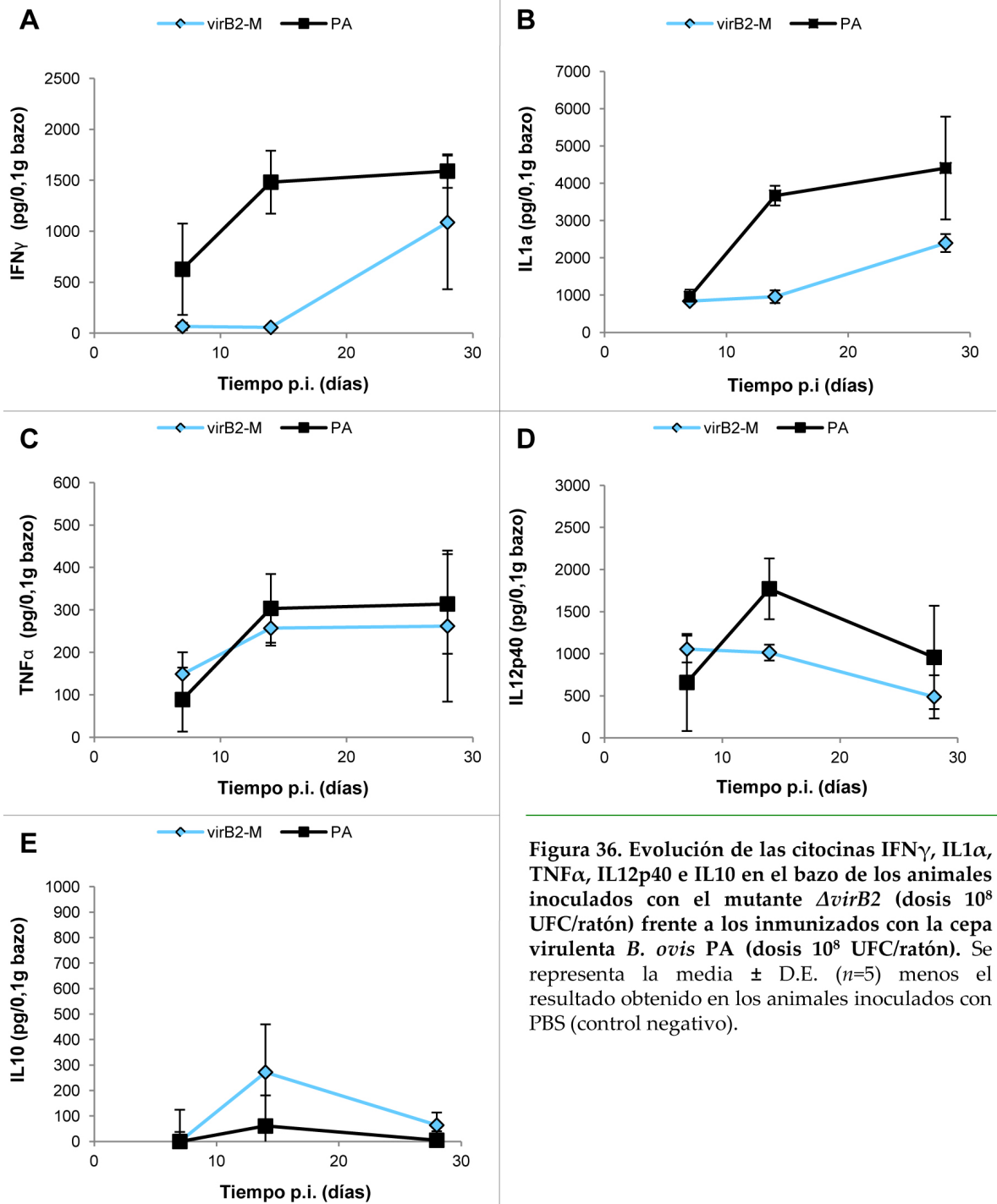


Figura 36. Evolución de las citocinas IFN γ , IL1 α , TNF α , IL12p40 e IL10 en el bazo de los animales inoculados con el mutante $\Delta virB2$ (dosis 10^8 UFC/ratón) frente a los inmunizados con la cepa virulenta *B. ovis* PA (dosis 10^8 UFC/ratón). Se representa la media \pm D.E. ($n=5$) menos el resultado obtenido en los animales inoculados con PBS (control negativo).

2.5. Estudio de protección frente a una infección experimental con *B. ovis* PA

Para analizar la capacidad protectora de los mutantes atenuados de *B. ovis* frente a una infección con la cepa virulenta *B. ovis* PA, se diseñó un modelo murino experimental (Apartado 6.4 de Materiales y Métodos) en el cual se vacunaron 5 ratones con cada una de las cepas objeto de estudio; transcurridas 4 semanas desde la vacunación, los animales se infectaron con *B. ovis* PA y tres semanas después de la infección se realizaron recuentos de *B. ovis* PA en el bazo de los animales vacunados. El experimento se llevó a cabo siguiendo las sugerencias de la Organización Mundial de Sanidad Animal para el control de calidad de las vacunas vivas atenuadas frente a las estirpes lisas de *Brucella* (OIE, 2004).

Los mutantes objeto de este estudio fueron los mutantes $\Delta omp25d$, $\Delta omp22$ y $\Delta vjbR$ de *B. ovis* PA, ya que el mutante $\Delta virB2$ presentaba altos niveles de infección a día 28 p.i. similares a los de la cepa parental virulenta (**Figura 29 D**). Las dosis empleadas para la vacunación e infección, determinadas retrospectivamente, se recogen en la **Figura 37 A**.

Según este modelo experimental, en los ratones no vacunados (grupo PBS) se observaron niveles de infección de $6,41 \pm 0,4$ log UFC/bazo de *B. ovis* PA a la semana 3 p.i. (**Figura 37 B**). En el mismo periodo de tiempo, en los animales que fueron vacunados con la vacuna clásica *B. melitensis* Rev1 estos niveles de infección (**Figura 37 B**) fueron muy inferiores ($P \leq 0,005$) ($2,93 \pm 1,2$ log UFC/bazo).

En los animales vacunados con la cepa mutante $\Delta omp25d$ de *B. ovis* PA también se observaron niveles de infección de *B. ovis* PA muy bajos ($P \leq 0,005$) ($2,70 \pm 2,0$ log UFC/bazo), siendo el grado de protección conferido similar al obtenido con la vacuna clásica *B. melitensis* Rev1 (**Figura 37 B**).

En los animales vacunados con los mutantes $\Delta omp22$ y $\Delta vjbR$ de *B. ovis* PA los valores de infección esplénica obtenidos a las 3 semanas p.i. también fueron inferiores ($P \leq 0,05$) a los obtenidos en el grupo sin vacunar. Sin embargo, el grado de significación estadística de la protección conferida por estos mutantes fue menor ($P \leq 0,05$) que el conferido por la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 y la cepa *B. ovis* $\Delta omp25d$ ($P \leq 0,005$) (**Figura 37 B**).

Simultáneamente al recuento de la cepa virulenta *B. ovis* PA se llevó a cabo el recuento de las cepas vacunales. La vacuna clásica *B. melitensis* Rev1 se detectó en niveles de aproximadamente 2,5 log UFC/bazo en 4 de los 5 animales inmunizados, mientras que en ninguno de los animales inmunizados con la cepa *B. ovis* $\Delta omp25d$ y solo en dos de los inmunizados con la cepa *B. ovis* $\Delta omp22$ se detectaron restos de la cepa vacunal (datos no mostrados).

A

Grupo de vacunación	Dosis vacunal (UFC/ratón)	Dosis infecciosa <i>B. ovís</i> PA (UFC/ratón)	Log UFC/bazo (Media ± D.E.)	Logaritmos de protección
PBS		0,9x10 ⁵	6,41 ± 0,4	
Rev1	0,9x10 ⁵	0,9x10 ⁵	2,93 ± 1,2 **	3,48
omp25d-M	1,2x10 ⁷	0,9x10 ⁵	2,70 ± 2,0 **	3,71
omp22-M	0,8x10 ⁸	0,9x10 ⁵	3,35 ± 2,0 *	3,03
vjbR-M	0,9x10 ⁸	0,9x10 ⁵	4,77 ± 0,9 *	1,64

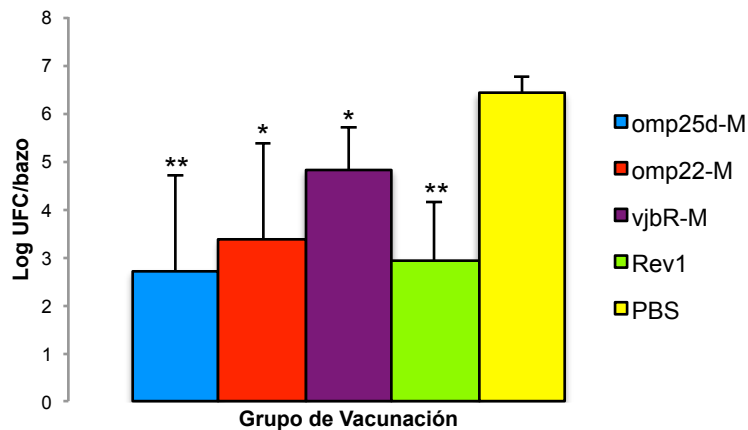
B

Figura 37. Ensayo de protección frente a *B. ovís*. **A.** Dosis exactas de vacunación e infección. Resultados de los recuentos esplénicos a la semana 3 post infección con *B. ovís* PA, expresados como la media ± D.E. del log de UFC/bazo ($n=5$) y logaritmos de protección expresados como la diferencia entre el recuento esplénico obtenido para cada grupo de vacunación y el recuento esplénico obtenido en el grupo sin vacunar (grupo PBS). **B.** Valores de infección esplénica obtenidos a las semanas 3 post infección con *B. ovís* PA, expresados como la media ± D.E. del log de UFC/bazo ($n=5$).

Simbología:

* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,005$, indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el resultado obtenido por el grupo sin vacunar.

2.6. Evaluación de la respuesta inmune celular inducida tras un segundo estímulo *in vitro* con *B. ovís* PA

En este estudio se incluyeron los dos mutantes de *B. ovís* PA que originaron los valores más elevados del log de protección frente a la infección (Figura 37 A), junto con la vacuna clásica *B. melitensis* Rev1.

Para analizar la respuesta inmune producida tras un segundo estímulo, se realizaron cultivos celulares con esplenocitos procedentes de ratones vacunados con *B. ovís* $\Delta omp25d$ (dosis exacta de vacunación: $1,1 \times 10^7$ UFC/ratón), con *B. ovís* $\Delta omp22$ (dosis exacta de vacunación: $1,4 \times 10^8$ UFC/ratón), con *B. melitensis* Rev1 (dosis exacta de vacunación: $0,9 \times 10^5$ UFC/ratón) o sin vacunar (grupo PBS). Dichos cultivos se estimularon con células

enteras de *B. ovis* PA inactivadas por calor y a los 3 días se cuantificaron, mediante ELISA, las citocinas secretadas al medio por estos esplenocitos (Apartado 6.4.3 de Materiales y Métodos).

Como control de la viabilidad de las células, una parte de los esplenocitos obtenidos de cada bazo, además de con *B. ovis* PA, se estimularon con concanavalina A y otra parte con el medio de cultivo RPMI. Los resultados obtenidos fueron acordes con lo que cabía esperar (datos no mostrados); esto es, en los sobrenadantes de los esplenocitos estimulados con concanavalina A, los niveles de citocinas obtenidos fueron altos (control positivo) y en los sobrenadantes de los esplenocitos estimulados solamente con medio de cultivo los niveles de citocinas fueron bajos (control negativo). Los datos correspondientes a los controles negativos se consideraron como los niveles basales de producción de citocinas y se restaron de los niveles de citocinas obtenidos tras la estimulación con *B. ovis* PA.

En las condiciones del ensayo, los esplenocitos procedentes de los animales vacunados con *B. melitensis* Rev1 o con los dos mutantes atenuados *B. ovis* $\Delta omp25d$ y *B. ovis* $\Delta omp22$ secretaron gran cantidad de IFN γ . Esta fue de las citocinas analizadas la secretada de forma más abundante, en respuesta a un segundo estímulo con *B. ovis* PA (del orden de 200 ng/ml). Por el contrario, la producción de IFN γ por los esplenocitos procedentes de los animales del grupo PBS fue en torno a 20 veces inferior (**Figura 38 A**). Si bien, los esplenocitos procedentes de las tres vacunas atenuadas ensayadas secretaron niveles de IFN γ significativamente superiores a los secretados por los esplenocitos procedentes de animales sin vacunar ($P \leq 0,0005$) cabe destacar que, la cantidad de IFN γ secretada por los esplenocitos procedentes de animales vacunados con *B. melitensis* Rev1 fue el doble que la secretada por los esplenocitos procedentes de los mutantes atenuados de *B. ovis* PA (**Figura 38 A**).

En relación con la producción de IL1 α , no se encontraron diferencias entre la cantidad de citocina producida por los esplenocitos procedentes de los animales vacunados con *B. melitensis* Rev1 y los procedentes del grupo sin vacunar (**Figura 38 B**). En contraste, la cantidad de IL1 α producida por los esplenocitos procedentes de los grupos inoculados con los mutantes atenuados *B. ovis* $\Delta omp25d$ y *B. ovis* $\Delta omp22$ fue alrededor de cuatro o tres veces superior, respectivamente (**Figura 38 B**).

Tras la estimulación *in vitro* con *B. ovis* PA, los esplenocitos procedentes de los animales vacunados con las tres vacunas atenuadas *B. ovis* $\Delta omp25d$, con *B. ovis* $\Delta omp22$ y *B. melitensis* Rev1 secretan TNF α en un grado similar y en cantidad dos veces superior a la secretada por los esplenocitos procedentes del grupo de animales sin vacunar (**Figura 38 C**). No se observaron diferencias significativas entre la cantidad de IL12p40 producida por

los esplenocitos de los animales inmunizados con las tres vacunas atenuadas y la producida por los esplenocitos del grupo control inoculados con PBS (**Figura 38. D**).

Con respecto a la IL10, se observó una fuerte producción en los esplenocitos procedentes de animales inmunizados con la vacuna clásica *B. melitensis* Rev1, mientras que los esplenocitos procedentes de las dos cepas mutantes derivadas de *B. ovis* PA se comportaron de forma similar a los procedentes del grupo control inoculado con PBS (**Figura 38 E**).

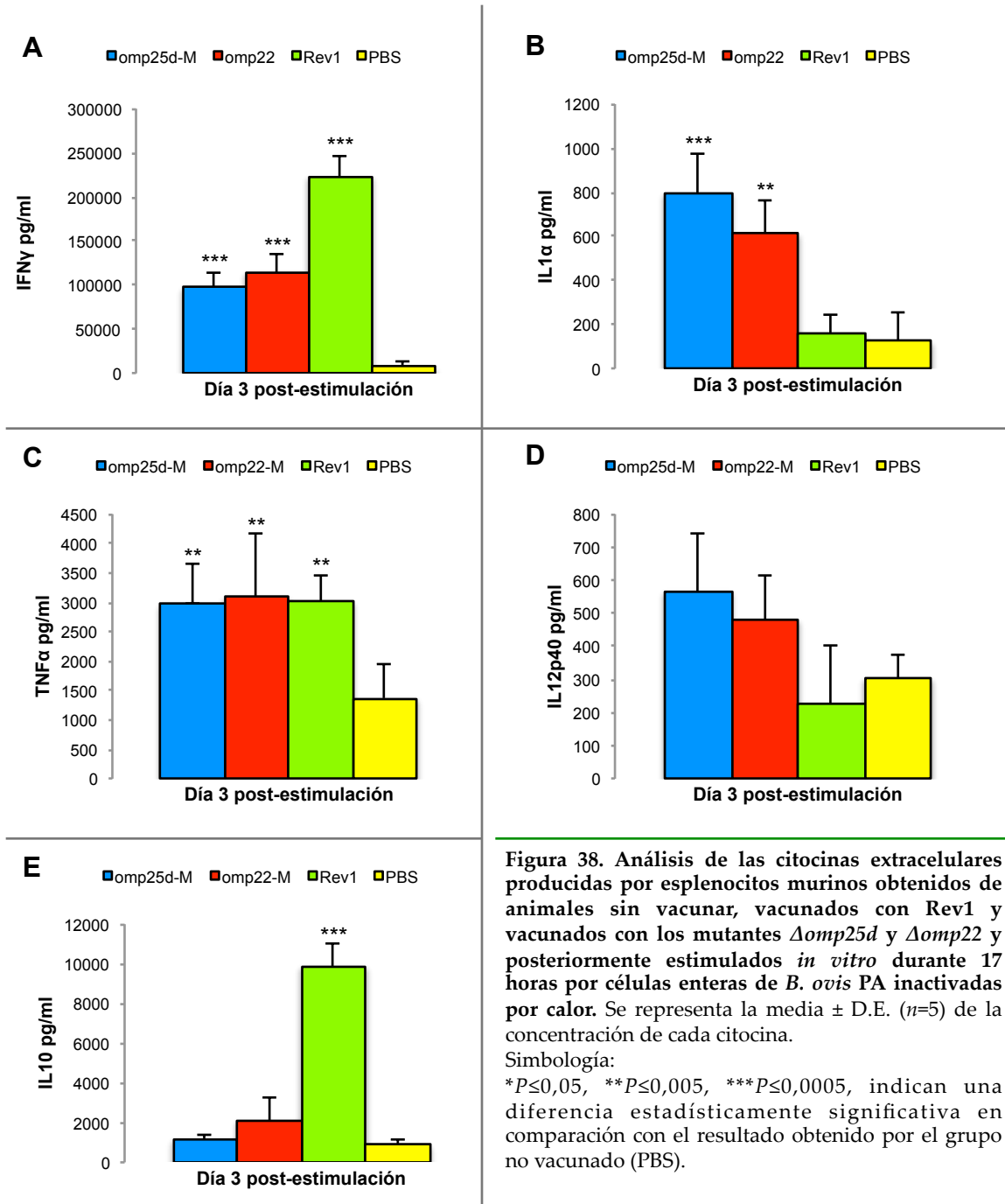


Figura 38. Análisis de las citocinas extracelulares producidas por esplenocitos murinos obtenidos de animales sin vacunar, vacunados con Rev1 y vacunados con los mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ y posteriormente estimulados *in vitro* durante 17 horas por células enteras de *B. ovis* PA inactivadas por calor. Se representa la media \pm D.E. ($n=5$) de la concentración de cada citocina.

Simbología:

* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,005$, *** $P \leq 0,0005$, indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con el resultado obtenido por el grupo no vacunado (PBS).

Discusión

1. Implicación en la virulencia de *B. ovis* de distintos genes relacionados con la ME y la virulencia de cepas lisas de *Brucella* spp.

1.1. Genes *bvrR* y *bvrS*

El sistema de dos componentes BvrR/BvrS de *Brucella* spp. tiene un potente efecto regulador en multitud de genes relacionados con la virulencia de la estirpe lisa *B. abortus* 2308 (Capítulo 4. Apartado 4.4. de la Introducción). Sin embargo, en la actualidad no se conoce el papel que desempeña este sistema en las especies naturalmente rugosas del género *Brucella* como *B. ovis*. De ahí que uno de los objetivos de este trabajo haya sido obtener cepas mutantes de *B. ovis* PA en los genes *bvrR* y *bvrS* y analizar las posibles consecuencias de la inactivación de los mismos en nuestra especie objeto de estudio.

Los intentos realizados para construir, mediante recombinación homóloga (Capítulo 4 de Materiales y Métodos), cepas mutantes portadoras de los genes *bvrR* o *bvrS* delecionados en la estirpe naturalmente rugosa *B. ovis* PA, no tuvieron éxito. Las cepas con el plásmido portador del gen de interés delecionado integrado en el cromosoma (*B. ovis*-pNVbvrROVL02-I y *B. ovis*-pNVbvrSOVL02-I) (Tabla V), siempre revertían el genotipo silvestre durante el crecimiento en medio suplementado con sacarosa (datos no mostrados). Todas las colonias analizadas, aproximadamente 200, resultaron ser portadoras del gen silvestre, mientras que con esta metodología, en líneas generales, el 20 % de las colonias que se analizan son portadoras del gen delecionado.

Estos resultados sugieren que los genes *bvrR* y *bvrS* son vitales para la supervivencia *in vitro* de *B. ovis* PA, lo cual no es de extrañar ya que, como se ha dicho, se sabe que el sistema de regulación de dos componentes BvrR/BvrS en la especie lisa *B. abortus* está implicado en procesos cruciales para la supervivencia y la virulencia bacteriana (Martínez-Núñez *et al.*, 2010; Viadas *et al.*, 2010). Por tanto, es de esperar que este sistema regulador también pueda desempeñar las mismas funciones vitales en la especie *B. ovis*. Además, los mutantes en los genes *bvrR* y *bvrS* obtenidos en las especies lisas *B. abortus* 2308 y *B. suis* 1330 se han construido mediante mutagénesis con transposones (Sola-Landa *et al.*, 1998; Köhler *et al.*, 2002) e, intentos anteriores de eliminar estos genes mediante recombinación homóloga también resultaron fallidos (Salhi *et al.*, 2003).

1.2. Genes *omp10*, *omp16* y *omp19*

Las proteínas Omp10, Omp16 y Omp19 son lipoproteínas de la ME de *Brucella* spp. (Clockaert *et al.*, 1990; Tibor *et al.*, 1994; Tibor *et al.*, 1996; Tibor *et al.*, 1999) y en la cepa lisa

B. abortus 544 se han relacionado con funciones de adhesión e invasión celular, supervivencia intracelular y respuesta inmune innata (Tibor *et al.*, 2002; Giambartolomei *et al.*, 2004; Zwerdling *et al.*, 2008). Sin embargo, en la actualidad se desconoce el papel de estas lipoproteínas de ME en la especie naturalmente rugosa *B. ovis* por lo que nos propusimos la obtención y caracterización de mutantes de *B. ovis* PA en los genes *omp10*, *omp16* y *omp19*.

Para la obtención de estos mutantes, también se utilizó una metodología de mutagénesis mediante recombinación homóloga (Capítulo 4 de Materiales y Métodos). De este modo se consiguió obtener cepas con los genes *omp10* y *omp19* delecionados (*B. ovis*-pNV10OVL02-M y *B. ovis*-pNV19OVL02-M) (Tabla V). Sin embargo, utilizando la misma metodología, no se obtuvo ninguna cepa con el gen *omp16* delecionado, ya que fueron fallidos todos los intentos por conseguir una doble recombinación en la cepa con el plásmido pNV16OVL02 integrado en su cromosoma con resultado de la pérdida de la copia del gen silvestre (datos no mostrados).

Esto sugiere que el gen *omp16* es necesario para la supervivencia *in vitro* de *B. ovis* PA, lo que parece estar apoyado por el hecho de que a día de hoy, no se han descrito mutantes con el gen *omp16* delecionado en ninguna de las especies del género *Brucella*. La lipoproteína Omp16 - que se ha detectado en las seis especies clásicas del género *Brucella* (Tibor *et al.*, 1999) - muestra un alto grado de similitud con PALs de algunas bacterias Gram negativas, como *E. coli* y *H. influenzae* (Chen & Henning, 1987; Green *et al.*, 1987). Estas PALs están altamente conservadas en las bacterias Gram negativas y parecen jugar una función estructural en la célula bacteriana mediante el anclaje de la ME a la pared celular e incluso se ha propuesto que puedan participar en otros procesos celulares, incluida la división celular (Lazzaroni & Portalier, 1992; Lazzaroni *et al.*, 1999; Parsons & Orban, 2005; Parsons *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2006; Parsons *et al.*, 2008). Por tanto no es de extrañar que en *B. ovis* la lipoproteína Omp16 lleve a cabo funciones esenciales para la bacteria, lo que justificaría la imposibilidad de obtención de una cepa mutante *B. ovis* $\Delta omp16$.

La ME de los microorganismos pertenecientes al género *Brucella* además de constituir una barrera estructural y funcional con el entorno y ser el primer punto de contacto entre la bacteria y las células del animal hospedador, se considera en gran parte responsable de las características particulares de estos microorganismos que los diferencian de otras bacterias Gram negativas (Vizcaíno & Cloeckert, 2012). Por tanto, cualquier alteración que modifique sus propiedades puede tener un efecto importante no solo en el crecimiento *in vitro* sino también en el establecimiento de un proceso infeccioso. De ahí que en la caracterización de los mutantes obtenidos en este trabajo se procedió a analizar, además del crecimiento *in vitro*, algunas de las propiedades particulares de la ME de *Brucella* como son

la autoaglutinación y la resistencia a polimixina B, desoxicolato sódico y peróxido de hidrógeno.

Respecto al crecimiento en medio líquido no se observaron diferencias drásticas entre las cepas mutantes $\Delta omp10$ y $\Delta omp19$ de *B. ovis* PA y la cepa parental *B. ovis* PA aunque sí, algunas leves diferencias. A pesar de que todos alcanzaron la fase estacionaria al mismo tiempo (aproximadamente a las 48 horas) la progresión de la fase exponencial no fue igual en las cepas mutantes y PA, ya que la D.O._{600nm} alcanzada al final de esta fase fue inferior y se mantuvo por debajo hasta el final del experimento en las cepas mutantes (**Figura 20 A-B**). Estas diferencias también se pusieron de manifiesto en el crecimiento en medio sólido donde, el número de UFC/ml de una suspensión en PBS de D.O._{600nm} de 0,2 también fue ligeramente menor en las cepas mutantes *B. ovis* $\Delta omp10$ y *B. ovis* $\Delta omp19$ que en la cepa parental (**Tabla VI**). El hecho de que existan deficiencias en el crecimiento de las cepas mutantes podría deberse a que, la eliminación de los respectivos genes *omp10* y *omp19* en *B. ovis* PA tenga como consecuencia una re-estructuración y/o desestabilización de la ME que podría dificultar la incorporación de nutrientes. Estos posibles cambios en la ME, llevados al contexto de vida intracelular, también podrían suponerle a *B. ovis* mayores dificultades para crecer en las condiciones ambientales que se dan en el interior de la célula hospedadora como pueden ser limitación de nutrientes y/o pH ácido. En contraste, en los mutantes atenuados $\Delta omp10$ y $\Delta omp19$ de *B. abortus* 544, descritos y caracterizados por Tibor *et al.* en 2002 (Tibor *et al.*, 2002), no se detectaron defectos en el crecimiento en medio líquido.

Se sabe que en algunos microorganismos, como *Yersinia enterocolitica*, *E. coli*, o *Vibrio cholerae*, la capacidad de autoaglutinación está relacionada con la virulencia (Roggenkamp *et al.*, 1995; Chiang *et al.*, 1995; Knutton *et al.*, 1999). Sin embargo, en los microorganismos del género *Brucella* no se ha podido demostrar una correlación entre la capacidad de autoaglutinación y la virulencia (Martín-Martín *et al.*, 2011). Así, se ha observado que algunas cepas virulentas lisas como *B. abortus* 2308, *B. neotomae* 5K33 y *B. suis* 1330, la cepa virulenta rugosa, *B. ovis* PA y la cepa vacunal atenuada lisa *B. melitensis* Rev1 no son capaces de autoaglutinar de manera importante, mientras que la cepa atenuada vacunal rugosa *B. abortus* RB51 y la cepa virulenta rugosa *B. canis* RM6/66 presentan una fuerte capacidad de autoaglutinación (Martín-Martín *et al.*, 2011). Además, los mutantes atenuados $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de *B. ovis* PA se comportan igual que la cepa parental y no autoaglutinan, mientras que los mutantes $\Delta omp31$, $\Delta omp25$ y $\Delta omp25c$ de *B. ovis* PA, que no presentan atenuación en la virulencia, muestran una marcada capacidad de autoaglutinación (Caro-Hernández *et al.*, 2007). En los experimentos llevados a cabo en este trabajo, los mutantes *B. ovis* $\Delta omp10$ y *B. ovis* $\Delta omp19$ mostraron una leve capacidad de

autoaglutinación, algo más acusada en el caso del mutante $\Delta omp19$ *B. ovis* PA, mientras que la cepa parental permaneció en suspensión a lo largo de todo el experimento (**Figura 21 A-B**). Esto podría deberse a que la eliminación de estas dos lipoproteínas en *B. ovis* PA afecte a la estructura global de la ME, sin que esto parezca estar relacionado con la virulencia. Sin embargo, sí podría relacionarse con que estas lipoproteínas tengan una presencia relevante en *B. ovis* PA cuantitativamente hablando, ya que mutantes de *B. ovis* PA en genes que codifican proteínas mayoritarias de ME presentan una marcada capacidad de autoaglutinación (Caro-Hernández *et al.*, 2007).

Los péptidos catiónicos, además de encontrarse en numerosos fluidos corporales y tejidos de mamíferos, forman parte de los mecanismos bactericidas oxígeno-independientes de las células fagocíticas (Jenssen *et al.*, 2006). Los microorganismos del género *Brucella* presentan una mayor resistencia a la acción bactericida de péptidos catiónicos que otras bacterias Gram negativas como las pertenecientes al género *Salmonella* (Freer *et al.*, 1996; Martínez de Tejada & Moriyón, 1993; Martínez de Tejada *et al.*, 1995). Esta propiedad se le atribuye, principalmente, a la ME y sus particulares características (Apartado 2.4 de la Introducción). Por ello, al igual que en los trabajos llevados a cabo previamente por otros autores (Freer *et al.*, 1996; Freer *et al.*, 1999; Martínez de Tejada *et al.*, 1995; Sola-Landa *et al.*, 1998; Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2011; Martín-Martín *et al.*, 2012), en este trabajo se usó el péptido catiónico polimixina B para evaluar tanto la estabilidad de la ME como la posible susceptibilidad de los mutantes de *B. ovis* PA al efecto bactericida mediado por éstos en el interior del hospedador. Los resultados de los ensayos de sensibilidad a polimixina B mostraron que el mutante $\Delta omp10$ de *B. ovis* PA era más sensible a este compuesto que la cepa parental mientras que el mutante $\Delta omp19$ de *B. ovis* PA se comportó de forma similar a esta (**Figura 22 A-B**). Estos resultados contrastan con los obtenidos previamente con los mismos mutantes de la cepa lisa *B. abortus* 544 ya que el mutante $\Delta omp10$ no mostró aumento en la sensibilidad a la polimixina B (Tibor *et al.*, 2002), mientras que la supervivencia del mutante $\Delta omp19$ se redujo en relación a la de la cepa parental (Tibor *et al.*, 2002). Estas diferencias entre las dos cepas de *Brucella* podrían estar relacionadas con la distinta composición de su ME, ya que *B. abortus* 544 es una cepa lisa con cadenas polisacáridicas O en el LPS y, además, se han descrito diferencias importantes entre las dos cepas tanto en el perfil de PME como en las propiedades relacionadas con la ME (Vizcaíno *et al.*, 2000; Vizcaíno *et al.*, 2004; Martín-Martín *et al.*, 2011; Vizcaíno & Cloeckert, 2012). Por otra parte, el porqué de esta mayor sensibilidad del mutante $\Delta omp10$ de *B. ovis* PA a polimixina B es difícil de explicar con los datos disponibles, ya que no se ha realizado ningún ensayo de las propiedades físico-químicas de la ME -como la carga neta negativa (Iriarte *et al.*, 2005) o el grado de acilación del lípido A

(Manterola *et al.*, 2005) - que se piensa que puedan estar relacionadas con una mayor sensibilidad a este péptido catiónico.

Los microorganismos pertenecientes al género *Brucella* son también más resistentes a la acción de algunos detergentes que otras bacterias Gram negativas, algo que también se ha atribuido a las características peculiares de la ME de *Brucella*. Por este motivo, en este trabajo - al igual que en otros trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2011; Martín-Martín *et al.*, 2012) - se utilizó la susceptibilidad al desoxicolato sódico, un detergente aniónico, como modelo para evaluar las posibles alteraciones de la ME de las cepas mutantes obtenidas. Los ensayos de sensibilidad a desoxicolato sódico de las cepas mutantes, al igual que ocurriera con la sensibilidad a polimixina B, mostraron que el mutante $\Delta omp10$ de *B. ovis* PA era más sensible a la acción de este detergente que la cepa parental, mientras que el mutante $\Delta omp19$ se comportaba de forma similar a *B. ovis* PA (Figura 22. A-B). En el caso de los mutantes $\Delta omp10$ y $\Delta omp19$ de *B. abortus* 544 ambos mostraron mayor sensibilidad a este detergente que la cepa parental 544 (Tibor *et al.*, 2002). Parece, por lo tanto, que la eliminación del gen *omp10*, tanto en la cepa lisa *B. abortus* 544 como en la rugosa *B. ovis* PA, provoca un aumento en la sensibilidad de la bacteria al desoxicolato sódico, aunque esta correlación se produce con la delección del gen *omp19*. Este aumento en la sensibilidad al desoxicolato sódico en ambas estirpes de *Brucella* (una de fenotipo liso y otra de fenotipo rugoso) al eliminar el gen *omp10* podría ser debido a que se produzcan cambios en la ME de estas bacterias, independientes de la estructura de su LPS, que facilitarían la acción detergente de este compuesto.

En la caracterización de las cepas mutantes de *B. ovis* PA obtenidas en este trabajo se incluyó el análisis de la sensibilidad a peróxido de hidrógeno ya que este compuesto forma parte de los mecanismos oxígeno-dependientes que poseen las células fagocíticas para la destrucción de bacterias y parece contribuir al control de la replicación intracelular de *Brucella* spp. (Jiang & Baldwin, 1993; Kim *et al.*, 2000). Los resultados mostraron cómo ambos mutantes $\Delta omp10$ y $\Delta omp19$ de *B. ovis* PA fueron significativamente más susceptibles al peróxido de hidrógeno que la cepa parental (Figura 23) lo que, sumado al conjunto de los resultados, hace pensar que ambos mutantes muestran alteraciones, en mayor o menor grado, en las propiedades de su ME.

Una de las principales características de las especies del género *Brucella* es su capacidad para infectar células fagocíticas y sobrevivir en su interior estableciendo un nicho replicativo (Capítulo 3 de la Introducción. Figura 2). En macrófagos no activados, como la línea celular de macrófagos murinos J774.A1, se ha observado que las cepas lisas virulentas de *Brucella* muestran una curva de replicación característica (Baldwin & Goenka, 2006;

Grilló *et al.*, 2011) que a menudo muestra un descenso de entre 0,5 y 1 log UFC durante las primeras 12-15 horas p.i. y, posteriormente, un incremento de entre 1 y 2 log UFC después de 24-48 horas de infección. Se relaciona con defectos en la virulencia bacteriana el hecho de que, transcurridas las primeras 12 horas p.i., la cepa ensayada muestre un rápido descenso en el número de UFC intracelulares (Baldwin & Goenka, 2006). La cepa rugosa virulenta *B. ovis* PA también es capaz de invadir y sobrevivir intracelularmente en macrófagos murinos (Martín-Martín *et al.*, 2010) y su capacidad de multiplicación intracelular es un factor determinante en la virulencia (Martín-Martín *et al.*, 2010). Por ello, se incluyó un estudio de infección de macrófagos para analizar la implicación de los genes *omp10* y *omp19* en la internalización y multiplicación de *B. ovis* PA en células fagocíticas profesionales. Tras el análisis de los resultados, podemos concluir que la presencia los genes *omp10* y *omp19* no es necesaria para la correcta internalización de *B. ovis* PA en macrófagos murinos J774.A1, ya que en ambos mutantes derivados de *B. ovis* PA se observó un número de bacterias que penetran en las células fagocíticas similar al observado con la cepa parental (**Figura 24 A-B**). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Tibor *et al.* para los mutantes $\Delta omp10$ y $\Delta omp19$ de *B. abortus* 544 (Tibor *et al.*, 2002). Además, un estudio realizado recientemente en células HeLa ha relacionado la ausencia de lipoproteínas (*lip*) en la estirpe lisa *B. abortus* 544 con cambios en la superficie celular que afectarían únicamente a la actividad adherente de bacterias pero no a su capacidad de internalización en las células hospedadoras (Kim *et al.*, 2013).

Tras la internalización de las cepas *B. ovis* $\Delta omp10$ y *B. ovis* $\Delta omp19$ en el interior de los macrófagos, se observó un descenso en el número de UFC intracelulares del orden de 1 log a las 24 horas p.i., posteriormente, el número de UFC se mantuvo estable hasta el final del experimento, mientras que en la cepa parental el número de UFC intracelulares se mantuvo constante durante todo el tiempo analizado sin observarse dicho descenso de UFC en las primeras horas p.i. (**Figura 24 A-B**). Esto podría sugerir que aunque los mutantes podrían ser mas sensibles que la cepa parental a las condiciones iniciales dentro de la célula fagocítica (**Figura 24 A-B**), hecho que también estaría avalado por el aumento de sensibilidad observado en ellos al peróxido de hidrógeno (**Figura 23**), ambos conseguirían interactuar con el RE y desarrollar una BCV donde se darían las condiciones óptimas para la replicación, por lo que la ausencia de los genes *omp10* y *omp19* no parece afectar de forma significativa a la supervivencia en el interior de los macrófagos. En concordancia con esto, el mutante $\Delta omp19$ de *B. abortus* 544 también mostró un ligero menor ratio en de crecimiento intracelular durante las primeras 24 horas de infección, mientras que el mutante $\Delta omp10$ de la misma cepa se comportó de forma similar a la cepa parental *B. abortus* 544 en lo que respecta a la supervivencia y multiplicación intracelular en

macrófagos (Tibor *et al.*, 2002).

Además de estos ensayos de infección de macrófagos *in vitro*, para llevar a cabo la caracterización de los mutantes obtenidos en este trabajo, se realizaron estudios de colonización esplénica *in vivo* en modelo murino ya que, durante el curso de la infección en la brucelosis murina, el recuento de bacterias en el bazo de los ratones proporciona un perfil altamente reproducible y sensible a pequeñas variaciones de la virulencia (Grilló *et al.*, 2011) (Capítulo 3 de la Introducción). En el curso de la infección de *B. ovis* PA en ratón, la semana 3 p.i. coincide con el punto de máxima infección esplénica (fase aguda) y la semana 8 p.i. con un punto en el que los recuentos esplénicos han comenzado a disminuir (fase crónica de declive) (Jiménez de Bagués *et al.*, 1993; Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2012). La cepa *B. ovis* $\Delta omp10$, presentó un comportamiento relativamente similar al de la cepa parental *B. ovis* PA con la salvedad de que el grado de colonización esplénica observado en la semana 3 p.i. fue del orden de 1 log inferior al alcanzado por la cepa parental (**Figura 25 A**). Lo que parece indicar que el mutante $\Delta omp10$ de *B. ovis* PA no es capaz de alcanzar el mismo nivel de infección que la cepa parental en la fase aguda aunque, posteriormente, sí puede de establecer una infección persistente. Considerando estos resultados no se puede descartar una participación del gen *omp10* en la virulencia de *B. ovis* PA en ratón, aunque dicha participación parece poco relevante. En lo que se refiere a la cepa mutante $\Delta omp19$ de *B. ovis* PA, esta mostró un grado de colonización esplénica similar en todo momento al observado en la cepa parental virulenta (**Figura 25 A**) por lo que, en las condiciones experimentales empleadas, el gen *omp19* no parece presentar un papel relevante en el establecimiento del proceso infeccioso en *B. ovis* PA en el modelo murino.

El hecho de que las lipoproteínas Omp10 y Omp19 tengan un papel irrelevante en la virulencia de *B. ovis* en modelo murino resulta sorprendente ya que estas lipoproteínas intervienen en la virulencia de la cepa lisa *B. abortus* 544 (Tibor *et al.*, 2002). Además, era de esperar que en una especie naturalmente rugosa como *B. ovis*, carente de cadenas polisacáridicas O en el LPS de la ME, estas PME podrían tener mayor implicación en el establecimiento y/o evolución del proceso infeccioso, ya que en las cepas naturalmente rugosas algunas PME, como Omp10 y Omp19, están más expuestas en la superficie de la bacteria que en las estirpes lisas donde estas proteínas se ven enmascaradas por las cadenas polisacáridicas O (Clockaert *et al.*, 1990; Bowden *et al.*, 1995a).

Por otro lado, también contrasta con que no muestren una virulencia atenuada en modelo murino, el hecho de que ambos mutantes $\Delta omp10$ y $\Delta omp19$ de *B. ovis* PA induzcan un leve aumento del tamaño del bazo en comparación con la esplenomegalia inducida en el curso de la infección con la cepa parental virulenta *B. ovis* (**Figura 25 B**). Si bien, esta menor

inflamación podría deberse al papel descrito por Giambartolomei *et al.* de las lipoproteínas como mediadores de la respuesta pro-inflamatoria en la especie lisa *B. abortus* (Giambartolomei *et al.*, 2004).

A pesar de la ausencia de implicación en la virulencia en ratón, en las condiciones ensayadas, no se puede descartar por completo la implicación de los genes *omp10* y *omp19* en la virulencia de *B. ovis* en el hospedador natural.

En lo sucesivo, podría ser interesante analizar la respuesta inmune que desencadenan las proteínas *Omp10* y *Omp19* en el curso de la infección producida por *B. ovis* para ver si la construcción de cepas portadoras de esta/estas mutaciones podría ser útil en el desarrollo de vacunas vivas inmunológicamente diferenciables de las cepas virulentas.

1.3. Mutantes $\Delta bacA$, $\Delta omp31$ y $\Delta bacA/\Delta omp31$

El gen *bacA* codifica una proteína integral de la membrana citoplasmática de *Brucella* spp. involucrada en la acilación del lípido A del LPS con VLCFAs (Ferguson *et al.*, 2004) y el gen *omp31* codifica una de las proteínas mayoritarias de la ME de *Brucella* spp. (Vizcaíno & Cloeckert, 2012). En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se ha analizado la implicación de estos genes *bacA* y *omp31* relacionados con la ME en el proceso infeccioso de *B. ovis*, sin encontrarse que estuvieran relacionados con la virulencia en modelo murino (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2008; Martín-Martín *et al.*, 2012).

En este trabajo nos propusimos construir y caracterizar una cepa mutante portadora de estos dos genes delecionados con el objeto de analizar si la doble mutación repercutía en la virulencia y la estabilidad bacteriana. Para ello, mediante doble recombinación homóloga (Capítulo 4 de Materiales y Métodos), se sustituyó en el mutante $\Delta bacA$ de *B. ovis* PA previamente construido y caracterizado (Martín-Martín *et al.*, 2012), el gen *omp31* silvestre por el gen *omp31* delecionado mediante PCR de solapamiento. Siguiendo la misma metodología, se construyó un mutante $\Delta omp31$ de *B. ovis* PA que nos serviría como control, ya que, el mutante $\Delta omp31$ de *B. ovis* PA del que disponíamos se había construido reemplazando el gen *omp31* por un *cassette* de *kan* y no utilizando PCR de solapamiento (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2008). La correcta construcción, tomando como referencia el genoma secuenciado de *B. ovis* ATCC 25840 de la cepa mutante $\Delta omp31$ de *B. ovis* PA, la cepa doble mutante $\Delta bacA/\Delta omp31$ de *B. ovis* PA, las cepas revertientes al fenotipo silvestre y las cepas con el plásmido completo integrado en su cromosoma obtenidas en este trabajo (Tabla V) fue confirmada mediante PCR, *Southern Blot* (Figura 18) y secuenciación.

Tras la caracterización genotípica, se procedió a analizar el crecimiento *in vitro*, las propiedades de la ME, la capacidad de colonización, supervivencia y multiplicación

intracelular *in vitro* en cultivos de macrófagos murinos y el grado de colonización esplénica *in vivo* en modelo murino de estas cepas, usando como controles la cepa parental virulenta *B. ovis* PA y el mutante $\Delta bacA$ de *B. ovis* PA.

Los mutantes $\Delta omp31$ y $\Delta bacA/\Delta omp31$ de *B. ovis* PA obtenidos en este trabajo se comportaron de forma similar a *B. ovis* PA y al mutante *B. ovis* $\Delta bacA$ en lo que se refiere al crecimiento en medio líquido (**Figura 20 C-D**). Sin embargo, en el crecimiento en medio sólido, en ambos mutantes fue necesario un día más de incubación para observar colonias visibles y se obtuvieron recuentos de UFC/ml ligeramente inferiores a los obtenidos con *B. ovis* PA (**Tabla VI**), lo que parece indicar que la eliminación del gen *omp31* afecta negativamente al crecimiento de *B. ovis* PA en medio sólido.

En cuanto a la capacidad de autoaglutinación, en ambos mutantes *B. ovis* $\Delta omp31$ y *B. ovis* $\Delta bacA/\Delta omp31$ se observa una marcada capacidad de autoaglutinación (**Figura 21 C-D**), mientras que *B. ovis* PA y el mutante $\Delta bacA$ de *B. ovis* PA permanecieron en suspensión. Podemos relacionar, por tanto, la ausencia del gen *omp31* con la capacidad de autoaglutinación en *B. ovis* PA.

Tras la exposición a polimixina B el porcentaje de supervivencia del doble mutante $\Delta bacA/\Delta omp31$ de *B. ovis* PA, aunque fue ligeramente inferior al observado por el mutante *B. ovis* $\Delta bacA$, fue similar al de la cepa parental (**Figura 22 A**). Sin embargo, el mutante $\Delta omp31$ de *B. ovis* PA fue considerablemente más sensible a polimixina B que la cepa parental (**Figura 22 A**). En los ensayos realizados de resistencia a desoxicolato sódico, tanto en el mutante simple *B. ovis* $\Delta omp31$ como en el doble mutante *B. ovis* $\Delta bacA/\Delta omp31$ se observó un menor porcentaje de supervivencia a este detergente que el observado en *B. ovis* PA y en el mutante $\Delta bacA$ de *B. ovis* PA (**Figura 22 B**). La sensibilidad a peróxido de hidrógeno en las dos cepas mutantes, simple *B. ovis* $\Delta omp31$ y doble *B. ovis* $\Delta bacA/\Delta omp31$ *B. ovis* PA, fue mayor que en la cepa parental y en el mutante $\Delta bacA$ de *B. ovis* PA (**Figura 23**). A la vista de estos resultados podemos deducir que la inactivación del gen *omp31* está relacionada con una mayor sensibilidad a desoxicolato sódico y a peróxido de hidrógeno en la cepa *B. ovis* PA. Sin embargo, el incremento de sensibilidad a polimixina B originado por la eliminación del gen *omp31* en *B. ovis* PA (**Figura 22 A**) se ve compensada por la delección simultánea del gen *bacA*, ya que el doble mutante $\Delta bacA/\Delta omp31$ de *B. ovis* PA fue más resistente a este péptido catiónico que el mutante simple *B. ovis* $\Delta omp31$.

Respecto a la capacidad de colonización, supervivencia y multiplicación intracelular en cultivos de macrófagos murinos el doble mutante *B. ovis* $\Delta bacA/\Delta omp31$ y el mutante simple *B. ovis* $\Delta omp31$ mostraron un comportamiento similar (**Figura 24 C-D**). Ambos mutantes presentaron un grado de internalización similar al observado tanto en la cepa parental virulenta como en el mutante $\Delta bacA$ de *B. ovis* PA. Sin embargo, a las 24 horas p.i.

se produjo un descenso en el número de UFC intracelulares que se mantuvo más o menos constante hasta el final del experimento (**Figura 24 C-D**). Estos resultados apuntan a que los defectos que se observan en las primeras horas p.i. en el doble mutante *B. ovis* $\Delta bacA/\Delta omp31$ se deben a la inactivación del gen *omp31* y no a la del gen *bacA*. Esto, a su vez, coincide con lo descrito por Martín-Martín *et al.*, en cuyo trabajo se ponía de manifiesto que la eliminación del gen *bacA* en la cepa virulenta naturalmente rugosa *B. ovis* PA no afectaba ni a su capacidad de internalización ni a su multiplicación intracelular en macrófagos murinos (Martín-Martín *et al.*, 2012).

Para conocer si estos mutantes muestran una atenuación de su virulencia, además del estudio de infección *in vitro* de macrófagos murinos, se llevó a cabo un estudio de colonización esplénica *in vivo* en modelo murino. Los resultados obtenidos mostraron que tanto el mutante simple $\Delta omp31$ como el doble mutante $\Delta bacA/\Delta omp31$ alcanzan el mismo grado de colonización esplénica que la cepa parental virulenta *B. ovis* PA y el mutante $\Delta bacA$ de *B. ovis* PA tanto en la semana 3 p.i. como en la semana 8 p.i. (**Figura 25 A**). Por tanto, parece que ni la eliminación del gen *omp31*, ni la del gen *bacA*, influyen en la colonización esplénica en modelo murino de la cepa *B. ovis* PA. Tampoco la eliminación simultánea de ambos modifica la virulencia de *B. ovis* PA.

La construcción de mutantes con uno o varios genes delecionados repercute también en el campo de la investigación encaminada al desarrollo de vacunas marcadas para la diferenciación serológica. Así, la eliminación de genes codificantes de proteínas inmunodominantes permite generar cepas que desencadenen una respuesta inmune que posibilita establecer una diferenciación entre la cepa vacunal y la infección producida por cepas naturales. Este es el caso de la proteína Omp31 que, aunque se ha descartado su relación con la virulencia en *B. ovis* en modelo murino, es una de las proteínas inmunodominantes en el transcurso de las infecciones ocasionadas por *B. ovis* (Vizcaíno *et al.*, 2001b; Cloeckert *et al.*, 2002; Cloeckert *et al.*, 2004; Vizcaíno & Cloeckert, 2012). Por ello, conseguir una doble mutación que atenúe el mutante *B. ovis* $\Delta omp31$ podría dar como resultado una buena vacuna viva atenuada. Desafortunadamente, el doble mutante *B. ovis* $\Delta bacA/\Delta omp31$, construido y evaluado en este trabajo, no está atenuado aunque, en nuestra opinión, la búsqueda de nuevos mutantes múltiples es una vía de investigación a continuar.

2. Mutantes atenuados de *B. ovis* PA como vacunas vivas frente a infecciones producidas por *B. ovis*

B. ovis es el agente causal de la epididimitis contagiosa en carneros, enfermedad para la cual aún no existe una vacuna específica. La cepa lisa atenuada *B. melitensis* Rev1 es la vacuna que actualmente se emplea en el control de las infecciones producidas por *B. melitensis* en ganado ovino y caprino y, además, se considera la mejor vacuna disponible frente a la brucelosis causada por la especie naturalmente rugosa *B. ovis* (Blasco, 1997; Marín *et al.*, 1990). Sin embargo, además de otros inconvenientes, esta vacuna induce anticuerpos frente al S-LPS que es el principal antígeno en las pruebas serológicas empleadas actualmente en el diagnóstico de la brucelosis causada por especies lisas (Blasco, 1997). Por ello, el uso de *B. melitensis* Rev1 está prohibido en los países o regiones donde las infecciones causadas por *B. melitensis* se consideran erradicadas (Cassataro *et al.*, 2005) y, en consecuencia, esta vacuna tampoco puede ser usada en la profilaxis de las infecciones causadas por *B. ovis*.

Ya que las vacunas vivas atenuadas han sido las que han proporcionado los mejores resultados, en términos de protección, frente a las infecciones causadas por otras especies de *Brucella* como *B. abortus* y *B. melitensis* (Ficht *et al.*, 2009; Godfroid *et al.*, 2011) cabe esperar que una cepa atenuada sea la mejor elección como vacuna frente a las infecciones causadas por *B. ovis*. Las vacunas vivas son capaces de inducir altos niveles de protección con la administración de una dosis única ya que portan todos los componentes inmunogénicos que pueden estar involucrados en la protección (Schurig *et al.*, 2002; Ko & Splitter, 2003). Además, la persistencia de la cepa vacunal en el hospedador ayuda a estimular a largo plazo esta inmunidad protectora (Grilló *et al.*, 2000; Grilló *et al.*, 2011). En contraste, las vacunas subcelulares han demostrado, en general, una baja eficacia protectora frente a las infecciones ocasionadas por *Brucella* y, además, requieren la administración de varias dosis y el empleo de adyuvantes (Ficht & Rice-Ficht, 2012). En las vacunas vivas, una virulencia residual elevada de podría comprometer la seguridad de las mismas lo que constituye una desventaja frente a vacunas que son totalmente seguras como las vacunas subcelulares y las vacunas de ADN (Ficht & Rice-Ficht, 2012). Es por ello, que en el desarrollo de vacunas vivas atenuadas es importante garantizar la estabilidad del fenotipo de la cepa vacunal (Grilló *et al.*, 2000) así como la imposibilidad de revertir a la forma virulenta (Moriyón *et al.*, 2004). En este sentido, las cepas portadoras de múltiples mutaciones proporcionan mayor seguridad. Un análisis del genoma de la vacuna clásica *B.*

abortus S19 mostró diferencias, con respecto a las estirpes virulentas de *B. abortus*, en 24 genes asociados con virulencia bacteriana con lo que la restauración de la virulencia en *B. abortus* S19 se considera casi imposible de forma espontánea (Crasta *et al.*, 2008).

Teóricamente, la cepa vacunal rugosa *B. abortus* RB51 podría constituir una buena alternativa a *B. melitensis* Rev1 para la prevención de infecciones ocasionadas por *B. ovis*, ya que su interferencia con el diagnóstico es mínima. Pero se ha demostrado que esta vacuna atenuada es ineficaz frente a *B. ovis* en ganado ovino (Jiménez de Bagués *et al.*, 1995). Es más, aunque se han documentado casos de protección heteróloga, se ha demostrado que en el ganado las especies homólogas de *Brucella* confieren más protección que las especies heterólogas (Adams, 1990).

Por todo esto, parece lógico pensar que una cepa atenuada de *B. ovis* sería el candidato más interesante para desarrollar una vacuna específica frente a la epididimitis contagiosa del carnero. En este sentido, un trabajo publicado recientemente describe como una cepa atenuada de *B. ovis* es capaz de inducir una buena respuesta inmune en su hospedador natural aunque no se ha evaluado su eficacia protectora frente a la infección (Silva *et al.*, 2013).

Debido a lo anteriormente expuesto, uno de los objetivos de este trabajo ha sido analizar el potencial de cinco mutantes de *B. ovis* PA, cuya atenuación había sido previamente demostrada en modelo murino (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2012), como vacunas vivas atenuadas frente a infecciones producidas por *B. ovis*, en comparación con la vacuna clásica heteróloga *B. melitensis* Rev1.

En experimentos previos (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2012), se observó que las cepas mutantes $\Delta omp25d$, $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$, $\Delta virB2$ y Δcgs de *B. ovis* PA (Tabla I), inoculadas en una dosis de aproximadamente 10^6 UFC/ratón, estaban fuertemente atenuadas (Figura 26 A-B). En base a la atenuación previamente mostrada, se estableció como dosis vacunal 10^8 UFC/ratón para las cepas mutantes $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$, $\Delta virB2$ y Δcgs de *B. ovis* PA y 10^7 UFC/ratón para la cepa *B. ovis* $\Delta omp25d$ - ya que en esta cepa se observaron niveles de colonización esplénica superiores a *B. ovis* PA en la semana 1 p.i. (Figura 26 A). Estas dosis se establecieron con el fin de aumentar tanto el grado de colonización esplénica como la persistencia bacteriana ya que, aunque las vacunas vivas atenuadas deben mostrar una disminución de la virulencia en comparación con las cepas parentales virulentas, estudios llevados a cabo con las cepas *B. abortus* 2308, *B. abortus* S19 y *B. abortus* RB51 sugieren que para que se induzca una inmunidad adecuada y duradera las cepas vacunales deben sobrevivir un tiempo en los tejidos del sistema reticuloendotelial (Grilló *et al.*, 2011). En la semana 3 p.i. - momento que coincide con la fase aguda de la infección por *B. ovis* en modelo murino (Jiménez de Bagués *et al.*, 1993; Caro-Hernández *et*

al., 2007; Martín-Martín *et al.*, 2012) - con todas las cepas mutantes se observaron, a las dosis de vacunación establecidas, recuentos esplénicos inferiores a los observados con la cepa parental virulenta *B. ovis* PA, excepto en el caso de la cepa *B. ovis* Δcgs que mostró un grado de colonización esplénica similar al de la cepa parental. Por tanto, el aumento de la dosis de inoculación consiguió que los mutantes $\Delta omp25d$, $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$ y $\Delta virB2$ de *B. ovis* PA, a la vez que seguían mostrando atenuación, produjeran un incremento del grado de colonización esplénica con respecto a los ensayos previos con una dosis inferior de inoculación (entre 10^6 y 5×10^6 log UFC/ratón) (Figura 26 y Figura 27).

En un análisis más completo de la colonización esplénica de la cepa mutante *B. ovis* Δcgs se observó que a las dosis 10^7 y 10^8 UFC/ratón esta cepa mostraba un grado de colonización esplénica muy similar al observado en la cepa parental y que a la dosis 10^6 UFC/ratón presentaba una marcada atenuación (Figura 28 A-B), por lo que se decidió descartar esta cepa mutante *B. ovis* Δcgs para ser ensayada, en estas condiciones de trabajo, como vacuna viva. Dado que son otras las condiciones que se dan en el hospedador natural, podría ser interesante analizar el comportamiento de este mutante en carneros.

Una vez fijada la dosis vacunal para las cepas mutantes, se llevó a cabo un análisis de la colonización esplénica durante los primeros 28 días p.i. para determinar tanto la persistencia bacteriana como la respuesta inmune inducida en este periodo de tiempo.

Durante el curso de la infección por *Brucella* spp., el recuento de bacterias en el bazo de los ratones proporciona perfiles de colonización esplénica altamente reproducibles (Grilló *et al.*, 2011). Éstos son sensibles a pequeñas variaciones de la virulencia, por lo que habitualmente se emplean para evaluar la atenuación de cepas mutantes frente a la parental. Dependiendo de la capacidad de multiplicarse y persistir en el bazo de los ratones se pueden distinguir tres categorías de cepas de *Brucella*: virulentas, atenuadas y no virulentas (Grilló *et al.*, 2011). Las cepas virulentas muestran un perfil de colonización esplénica en el que se observan varias fases: i) el inicio de la infección o colonización del bazo (los 2-3 primeros días p.i.); ii) la fase aguda que comprende desde el inicio de la infección hasta que se alcanzan los recuentos esplénicos máximos (del orden de 7 log UFC/bazo) en la semana 2-3 p.i.; iii) la fase crónica constante (entre la semana 3 hasta la semana 8-11 p.i) en la que se produce una meseta en los recuentos esplénicos; y iv) la fase crónica de declive, en la que los recuentos esplénicos comienzan a disminuir y que puede alargarse más allá de 36 semanas. Las cepas no virulentas, independientemente de la dosis, son incapaces de multiplicarse o persistir, y las cepas atenuadas pueden multiplicarse al nivel de las cepas virulentas en las fases tempranas pero persisten cortos periodos de tiempo, incluso cuando se inoculan dosis altas (Grilló *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta los patrones de colonización esplénica mencionados, y como era de esperar dado lo descrito

previamente para esta cepa (Jiménez de Bagués *et al.*, 1994; Caro-Hernández *et al.*, 2007), *B. ovis* PA presentó un comportamiento similar al observado con cepas virulentas de otras especies de *Brucella* (Grilló *et al.*, 2011), alcanzando recuentos esplénicos máximos en el día 14 p.i. (fase aguda) que se mantuvieron constantes hasta el final del experimento en el día 28 p.i. (fase crónica constante) (Figura 29). En contraste, las cepas $\Delta omp25d$, $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$ y $\Delta virB2$ de *B. ovis* PA mostraron diferentes perfiles de colonización esplénica entre ellas que ponen de manifiesto que, si bien todas están atenuadas con respecto a la cepa parental, no todas poseen la misma capacidad para multiplicarse y persistir en el bazo (Figura 29 A-E). Las cepas $\Delta omp25d$, $\Delta omp22$ y $\Delta vjbR$ y la vacuna clásica *B. melitensis* Rev1 alcanzaron los recuentos máximos en bazo en el día 7 p.i., mostrando un acortamiento de la fase aguda. Además, en los animales inoculados con *B. ovis* $\Delta omp25d$ y *B. melitensis* Rev1 no se observó fase crónica ya que, tras el pico de colonización esplénica observado el día 7 p.i., se produjo un descenso constante de UFC en el bazo (Figura 29 A y E). En los animales inoculados con las cepas mutantes $\Delta omp22$ y $\Delta vjbR$ de *B. ovis* PA, aunque no se observaron los niveles de infección alcanzados por la cepa parental en ninguno de los puntos analizados, se observó cierta persistencia durante el periodo de tiempo evaluado (Figura 29 B y C). Por otra parte, la cepa $\Delta virB2$ de *B. ovis* PA no alcanzó los recuentos máximos de colonización esplénica hasta el día 28 p.i., siendo los niveles de infección observados similares a los alcanzados por la cepa parental (Figura 29 D). Dado que el día 28 p.i. se seleccionó para llevar a cabo la infección experimental en los ensayos de protección, la cepa mutante $\Delta virB2$ de *B. ovis* PA no se consideró lo suficientemente atenuada para ser ensayada como vacuna viva en las condiciones de trabajo establecidas.

En el curso de la brucelosis murina se produce esplenomegalia. Este aumento de tamaño del bazo es una consecuencia de la respuesta inflamatoria y es dependiente de la dosis y la virulencia de la cepa (Grilló *et al.*, 2011). En las estirpes virulentas, generalmente, se observa un fuerte aumento del peso del bazo ($\geq 0,400$ g) que se pone de manifiesto desde la semana 3 p.i. La cepa vacunal *B. abortus* S19 induce un pico característico de esplenomegalia que tiene lugar en torno a la semana 2 p.i. y que, dependiendo de la dosis, puede superar incluso al observado con las estirpes virulentas *B. abortus* 2308 o 544 en el mismo periodo de tiempo. Sin embargo, mientras que en los ratones infectados con *B. abortus* S19 el peso del bazo disminuye rápidamente, en los ratones inoculados con estirpes virulentas el incremento de peso en el bazo puede mantenerse hasta el final de la fase crónica (Grilló *et al.*, 2011). Como era de esperar, según lo descrito por otros autores (Silva *et al.*, 2011), en los ensayos llevados a cabo en este trabajo en los animales inoculados con la cepa virulenta *B. ovis* PA se observó una marcada esplenomegalia a partir del día 14 p.i. que se mantuvo hasta el final del experimento el día 28 p.i. (Tabla VIII). También en los

bazos de los animales inoculados con la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 se observó un aumento de peso entre los días 7 y 21 p.i. destacando un pronunciado pico en torno al día 14 p.i. (Tabla VIII). Sin embargo, los bazos de los animales inoculados con las cepas mutantes $\Delta omp25d$, $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$ y $\Delta virB2$ de *B. ovis* PA no superaron los 0,200 g en todo el periodo de tiempo analizado. Este hecho parece más propio de las cepas no virulentas que, incluso cuando se inoculan dosis altas, raramente causan un incremento en el tamaño del bazo (Grilló *et al.*, 2006). Una leve inducción de esplenomegalia, siempre que no perjudique a la correcta inducción de la respuesta inmune y, por ende, a la eficacia protectora de la cepa vacunal, puede considerarse una ventaja en cepas atenuadas que se postulan a candidatos como vacunas vivas, ya que supondría minimizar este efecto secundario de la vacunación. Por tanto, la reducida esplenomegalia inducida por los mutantes de *B. ovis* PA constituye una mejora sobre la vacuna actual *B. melitensis* Rev1 que induce una marcada esplenomegalia (Stevens *et al.*, 1995; Arenas-Gamboa *et al.*, 2008; González *et al.*, 2008) (Tabla VIII).

Además, se ha descrito que en los bazos de los animales infectados con *B. ovis*, se observan microgranulomas durante el periodo de tiempo en el que se produce esplenomegalia (Silva *et al.*, 2011), mientras que en los animales infectados con un mutante atenuado en el transportador ABC ($\Delta abcAB$) de *B. ovis* en los que no se indujo esplenomegalia tampoco se detectaron estas histopatologías (Silva *et al.*, 2011). Aunque en este trabajo no hemos evaluado las posibles lesiones producidas en el bazo tras la inoculación de las cepas mutantes derivadas de *B. ovis* PA, la atenuación de su virulencia y el hecho de que no induzcan una inflamación del bazo elevada, determinada por su peso, puede llevarnos a inferir que dichas lesiones no son ocasionadas, lo que supondría eliminar otro efecto adverso consecuencia de la vacunación.

Para analizar la respuesta inmune de naturaleza humoral inducida por las cepas $\Delta omp25d$, $\Delta omp22$, $\Delta vjbR$ y $\Delta virB2$ de *B. ovis* PA se determinaron en el suero de los animales inmunizados los niveles de anticuerpos tanto de la clase IgG como de las subclases IgG₁, IgG_{2a} e IgG_{2b} capaces de reaccionar con células enteras de *B. ovis* PA. Todos los mutantes analizados en este trabajo indujeron la producción de un elevado título de anticuerpos de la clase IgG, frente a células enteras de *B. ovis* PA, detectados a partir del día 7 p.i. Sin embargo, en el suero de los animales inoculados con la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 los niveles de anticuerpos reactivos con células enteras de *B. ovis* PA fueron significativamente menores a lo largo de todo el periodo de tiempo analizado (Figura 30). Estos resultados no son de extrañar, ya que frente a células enteras, cabe esperar que se detecten los anticuerpos que son reactivos con los principales antígenos de superficie que, en el caso de *B. ovis*, son el R-LPS y las PMEs (Chin & Scully, 1986; Kittelberger *et al.*, 1995; Gamazo &

Moriyón, 1987; Bowden *et al.*, 2000). Sin embargo, en las cepas lisas de *Brucella*, como la vacuna clásica *B. melitensis* Rev1, las cadenas polisacarídicas O son antígenos inmunodominantes por lo que los anticuerpos específicos frente al S-LPS son mayoritarios tras la infección/inmunización con estas cepas (Zygmunt *et al.*, 1994; Fernández-Lago *et al.*, 1996). Además, en trabajos previos, no se detectaron anticuerpos capaces de reaccionar con los antígenos de superficie de *B. ovis* en muestras de suero procedentes de carneros infectados experimentalmente con cepas lisas de *B. abortus* y *B. melitensis* (Suárez *et al.*, 1988; Suárez *et al.*, 1991). Sin embargo, hay que tener en cuenta que aunque la colonización esplénica fue similar a la observada con la cepa *B. ovis* $\Delta omp25d$, la dosis de inoculación empleada con la cepa *B. melitensis* Rev1 fue muy inferior a la empleada con los mutantes derivados de *B. ovis* PA, lo que también podría influir en el desarrollo inicial de anticuerpos.

Aunque el papel de los anticuerpos en el control de la brucelosis murina sigue siendo analizado en el momento presente, y algunos autores consideran que éstos no son relevantes para el control de la infección ocasionada por la especie lisa *B. abortus* (Goenka *et al.*, 2011), en la especie rugosa *B. ovis* la capacidad de los anticuerpos para conferir protección en ratón sí parece jugar un papel significativo, siendo las funciones protectoras que se atribuyen a los anticuerpos frente a *B. ovis* la opsonización, la mediación de la muerte extracelular por el complemento o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Jiménez de Bagués *et al.*, 1994). Se cree que los principales antígenos involucrados en la protección frente a *B. ovis* son el R-LPS y algunas PMEs, ya que la transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales específicos frente a estos antígenos confiere protección frente a *B. ovis* (Bowden *et al.*, 1995b; Bowden *et al.*, 2000). Por todo esto, es deseable que una vacuna frente a *B. ovis* sea capaz de inducir un buen nivel de anticuerpos específicos frente a estos antígenos de superficie.

La proporción de las distintas subclases de IgG generadas durante la respuesta inmune da una idea de la naturaleza de la misma. Así, en modelo murino, cuando el isotipo IgG₁ predomina sobre el resto se considera que la respuesta inmune inducida es principalmente de naturaleza humoral o Th2 y si los isotipos que predominan son IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃ se considera que la respuesta inmune que se está induciendo es principalmente la mediada por células o Th1 (Apartado 3.3 de la Introducción).

Tras la infección de ratones CD-1 con *B. abortus* 2308 o con *B. abortus* S19 los anticuerpos que se detectaron en el suero, específicos frente a las cadenas polisacarídicas O, fueron de la subclase IgG₃ (Elzer *et al.*, 1994a) y tras la infección con *B. abortus* 2308 los anticuerpos que se detectaron en el suero de ratones CD-1, específicos frente al S-LPS, fueron de las subclases IgG₃ e IgG_{2a} (Fernández-Lago *et al.*, 1996). Dado que los principales antígenos de

superficie en cepas lisas de *Brucella* son las cadenas polisacáridicas O del S-LPS estos resultados llevaron a los autores a sugerir que en respuesta a la infección tanto por la estirpe virulenta lisa *B. abortus* 2308 como por la vacuna clásica *B. abortus* S19 se induce en el hospedador una respuesta inmune mayoritariamente mediada por células o Th1 (Elzer *et al.*, 1994a; Fernández-Lago *et al.*, 1996).

Con respecto a la estirpe virulenta rugosa *B. ovis*, no existen trabajos previos que analicen, frente a células enteras, los distintos isotipos de inmunoglobulina de la clase IgG inducidos. Únicamente se ha descrito que, tras la infección con *B. ovis*, los anticuerpos reactivos con el HS de *B. ovis*, fueron predominantemente de las subclases IgG_{2a} e IgG₃ (Jiménez de Bagués *et al.*, 1994). En el estudio llevado a cabo en este trabajo se analizaron, frente a células enteras de *B. ovis*, las subclases IgG₁, IgG_{2a} e IgG_{2b} generadas en el suero de los animales inmunizados con las distintas cepas mutantes atenuadas derivadas de *B. ovis* PA. Ninguna subclase de IgG predominó claramente sobre el resto (**Figura 31**) lo que parece indicar que la respuesta inmune que se induce tras la inmunización con las cepas mutantes derivadas de *B. ovis* PA es mixta de naturaleza Th1 y Th2. Esta respuesta inmune heterogénea también ha sido descrita tras la inoculación con cepas mutantes atenuadas derivadas de la especie rugosa *B. canis* (Palomares-Resendiz, *et al.*, 2012) y contrasta con la respuesta observada tras la inmunización con vacunas subcelulares en las que, generalmente, se observa un claro predominio de determinadas subclases. Así, tras la inmunización con HS de *B. ovis* - sólo o con adyuvante - los anticuerpos detectados fueron principalmente de las subclases IgG_{2a} e IgG_{2b} (Jiménez de Bagués *et al.*, 1994). Tras la inmunización con la proteína recombinante Omp31 de *B. melitensis* (Cassataro *et al.*, 2005) o con la quimera BLSOmp31 (BLS; *Brucella Lumacine Synthase*) (Cassataro *et al.*, 2007) los anticuerpos detectados, específicos frente a la propia proteína recombinante Omp31, fueron de las subclases IgG₁ e IgG_{2a} con un predominio de los de la subclase IgG₁, y tras la inmunización con una vacuna de ADN que codifica un homólogo de un transportador ABC se detectaron anticuerpos, específicos frente a la proteína transportadora, únicamente de la subclase IgG_{2a} (Riquelme-Neira *et al.*, 2013).

Las especies lisas del género *Brucella* son capaces de evadir la respuesta inmune innata (Fernández-Lago *et al.*, 1996; Barquero-Calvo *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2008; Rolán *et al.*, 2009) y esto parece ser una de las claves de su parasitismo (Martirosyan *et al.*, 2011). Los TLR juegan un papel importante en la inmunidad innata ya que, mediante el reconocimiento de los PAMPs, son una de las primeras líneas de defensa del hospedador frente al patógeno (Kawai & Akira, 2010). La activación de los TLR tiene como consecuencia la producción de citocinas pro-inflamatorias por las células del sistema inmunitario (Capítulo 3 de de Introducción y **Figura 3**). Tras la infección con la cepa

virulenta *B. abortus* 2308 los niveles de citocinas pro-inflamatorias no comienzan a ser significativos hasta el final de la fase aguda de la infección (entre los días 15 y 21 p.i.) (Fernández-Lago *et al.*, 1996; Zhan & Cheers, 1998; Fernández-Lago *et al.*, 1999; Sathiyaseelan *et al.*, 2006; Cha *et al.*, 2010). En el análisis de las citocinas producidas en el bazo de los animales inoculados con la cepa virulenta *B. ovis* PA, la vacuna clásica *B. melitensis* Rev1 o las diferentes cepas mutantes de *B. ovis* PA llevado a cabo en este trabajo (**Figuras 32-36**) se observó que las citocinas IFN γ , IL1 α , TNF α e IL12p40 no comenzaron a detectarse, generalmente, hasta el día 7 p.i., aunque en los animales inoculados con *B. ovis* PA no alcanzaron niveles significativos hasta el día 14 p.i. Esta respuesta tardía pone de manifiesto que, en comparación con la respuesta inflamatoria desencadenada por otras bacterias Gram negativas como *Salmonella*, que genera citocinas pro-inflamatorias detectables en suero en las primeras 24 h p.i. (Weiss *et al.*, 2005; Barquero-Calvo *et al.*, 2007), todas las cepas analizadas, independientemente de la atenuación mostrada, inducen en modelo murino una respuesta inflamatoria débil en los primeros días p.i. Esta leve respuesta inflamatoria inducida por *B. ovis* PA concuerda con lo descrito previamente por otros autores (Martín-Martín *et al.*, 2010; Sá *et al.*, 2012) y sugiere que *B. ovis* también actúa como un patógenofurtivo evadiendo la respuesta inmune durante el inicio de la infección.

Dado que es conocido que las cepas virulentas del género *Brucella* tienen alterados algunos PAMPs lo que les permite pasar desapercibidas ante la inmunidad innata (Moreno *et al.*, 1981; Lapaque *et al.*, 2005; Barquero-Calvo *et al.*, 2007; Salcedo *et al.*, 2008; Martirosyan *et al.*, 2011), el hecho de que en los animales inoculados con las cepas mutantes atenuadas derivadas de *B. ovis* PA muestren, en relación con la cepa parental, una rápida y/o menor producción de citocinas en el bazo, podría deberse, entre otros factores, a que en estas cepas los PAMPs son reconocidos de forma diferente y/o más efectiva por las células de la inmunidad innata del hospedador desencadenándose una respuesta inmune variable en relación con la cepa virulenta *B. ovis*.

Por otro lado, cabe destacar que los niveles máximos de IFN γ , IL1 α y TNF α en los bazos de los animales inoculados con las cepas mutantes derivadas de *B. ovis* PA y con la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 (**Figuras 32-36**) se alcanzaron cuando se produjo el mayor grado de colonización esplénica (**Figura 29**). Además, la concentración de estas citocinas en bazo fue significativamente menor cuando el grado de colonización esplénica no superaba 6 log UFC/bazo. Resultados similares se observaron en los animales inoculados con la cepa parental virulenta *B. ovis* PA detectándose los niveles máximos de estas citocinas cuando se alcanzó un grado de colonización esplénica superior a 6 log UFC/bazo (**Figuras 32-36**). El hecho de que tanto tras la infección con la estirpe virulenta rugosa *B. ovis* PA como con las cepas atenuadas derivadas de ella y con la vacuna clásica *B. melitensis* Rev1, se detecten

niveles significativos de estas citocinas cuando el grado de colonización es alto parece indicar que existe una relación entre el nivel de infección y la producción de citocinas. Esto concuerda con lo observado en la especie lisa *B. abortus* donde, en ratones BALB/c infectados con *B. abortus* 2308 se detectaron niveles significativos de IFN γ en suero durante el final de la fase aguda que se mantuvieron durante la fase crónica momentos que se corresponden con un alto grado de colonización esplénica, mientras que en animales infectados con la cepa vacunal *B. abortus* S19 la producción de IFN γ se detectó mucho antes y los niveles disminuyeron más rápidamente, al igual que ocurrió con el número de UFC/bazo (Hort *et al.*, 2003; Sathiyaseelan *et al.*, 2006; Cha *et al.*, 2010).

En lo referente a la IL10 se ha observado producción endógena de esta citocina los primeros días p.i. tras la infección con la cepa virulenta *B. abortus* 2308 (Fernandes & Baldwin, 1995; Fernández-Lago *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 1996). Recientemente, se ha descrito que *B. abortus* durante las primeras fases de la infección impide la activación de los macrófagos induciendo la producción de linfocitos T reguladores CD4+CD25+ que secretan IL10 (Xavier *et al.*, 2013). También se ha visto que la ausencia de IL10 mejora la producción de citocinas pro-inflamatorias e incrementa la resistencia del hospedador a *B. abortus* (Corsetti *et al.*, 2013). No obstante, en nuestro trabajo experimental no se ha detectado esta citocina ni en los bazos de los animales inoculados con la cepa parental virulenta *B. ovis* PA, ni en los bazos de los animales inoculados con las cepas mutantes derivadas de ésta en todo el periodo de tiempo analizado. Únicamente se detectó una descarga de IL10 en los bazos de los animales inoculados con la vacuna *B. melitensis* Rev1 el día 21 p.i. (Figura 32), momento en el que también se observó una disminución en la inflamación del bazo (Tabla VIII) y la concentración del resto de citocinas se redujo hasta niveles basales. Dado el papel inmunoregulador propuesto para esta citocina (Xavier *et al.*, 2013; Corsetti *et al.*, 2013), esta descarga de IL10 podría suponer un mecanismo para contrarrestar los efectos negativos en el hospedador derivados de una respuesta inmune exacerbada. Este fenómeno de descarga de citocinas - caracterizado por el incremento del nivel de citocina durante un corto periodo de tiempo - se ha observado también en otras bacterias y también se ha sugerido que el hospedador utiliza este fenómeno para prevenir las lesiones causadas por una profusa respuesta inmune (Wang *et al.*, 2013).

Para evaluar la eficacia de una vacuna se requiere la determinación de la protección conferida tras una infección experimental (Bosserey *et al.*, 1984; Bosserey, 1992). En este trabajo, la eficacia protectora de las cepas mutantes seleccionadas se evaluó comparando la capacidad de los ratones que recibieron las vacunas experimentales ($\Delta omp25d$, $\Delta omp22$ y $\Delta vjbR$ de *B. ovis* PA), una vacuna de referencia (*B. melitensis* Rev1) (Bosserey, 1991; Grilló *et al.*, 2006), o PBS para restringir la infección en el bazo después de una infección

experimental con la cepa virulenta *B. ovis* PA. El nivel de infección en el bazo de los animales vacunados tanto con las cepas mutantes $\Delta omp25d$, $\Delta omp22$ y $\Delta vjbR$ de *B. ovis* PA como con la vacuna clásica *B. melitensis* Rev1, en comparación con el nivel de infección en el bazo de los animales sin vacunar, fue significativamente menor (**Figura 37**). Posteriormente, el grado de protección conferido por las cepas *B. ovis* $\Delta omp25d$, *B. ovis* $\Delta omp22$ y *B. melitensis* Rev1 fue comparado con la cantidad de citocinas secretadas por los esplenocitos procedentes de los animales vacunados tras un segundo estímulo con *B. ovis* PA (**Figura 38**), con el fin de determinar si era posible establecer correlación entre la respuesta inmune de naturaleza celular observada y la protección conferida por las diferentes cepas vacunales.

Una inmunidad protectora frente a *Brucella* requiere mecanismos de inmunidad mediada por células *y*, en particular, una respuesta caracterizada por la producción de IFN γ (Eze *et al.*, 2000; He *et al.*, 2001; Ko & Splitter, 2003; Martirosyan *et al.*, 2011). En este sentido los esplenocitos procedentes de los animales vacunados con los mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de *B. ovis* PA y con *B. melitensis* Rev1, tras 72 horas la estimulación *in vitro*, secretaron al medio una gran cantidad de IFN γ , mas de 100 veces superior a la cantidad de IFN γ secretada por los esplenocitos procedentes de los animales sin vacunar (**Figura 38 A**), avalando el hecho de que las células procedentes de los animales vacunados responden a un segundo estímulo generando una respuesta inmune de naturaleza celular. Por tanto, parece probable que la gran cantidad producida de esta citocina en respuesta a un segundo estímulo con *B. ovis* PA sea responsable, al menos en parte, de la protección conferida por estas cepas atenuadas frente a una infección experimental con *B. ovis* PA. Por otro lado, los esplenocitos procedentes de los animales vacunados con *B. melitensis* Rev1 secretaron el doble de IFN γ que los esplenocitos procedentes de los animales inmunizados con los mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de *B. ovis* PA (**Figura 38 A**). No obstante, las tres cepas mostraron una eficacia protectora similar frente a *B. ovis* PA. Tampoco en otros estudios en los que se evaluó la cantidad de IFN γ secretado por esplenocitos procedentes de animales inmunizados con mutantes atenuados derivados de *B. abortus* 2308 se encontró una clara correlación entre el grado de protección conferido por las distintas cepas mutantes y la cantidad de IFN γ , aunque en todos los casos se detectó un mínimo de IFN γ tras un segundo estímulo con *B. abortus* 2308 (Kahl-McDonagh & Ficht, 2006). Estos resultados sugieren que, posiblemente, exista un mecanismo regulador que controle al acción protectora del IFN γ en este proceso.

En los resultados obtenidos en el presente trabajo, se observó que los esplenocitos procedentes de los animales tanto inmunizados con los mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de *B. ovis* PA como con *B. melitensis* Rev1 secretaron al medio una cantidad de TNF α superior a

la secretada por los esplenocitos procedentes de los animales sin vacunar (**Figura 38 C**), lo que también podría estar relacionado con la eficacia protectora. Dado que el TNF α es una citocina pro-inflamatoria involucrada en la activación de los macrófagos (Billard *et al.*, 2007; Salcedo *et al.*, 2008), estos resultados sugieren que, en un segundo contacto con *B. ovis* PA, en los animales previamente vacunados se produce una mayor activación de las células fagocíticas y una respuesta pro-inflamatoria más potente que en los animales sin inmunizar. Por el contrario, no se observaron diferencias entre los animales vacunados y los animales control en la secreción de IL12p40 (**Figura 38 D**). Teniendo en cuenta que la IL12 está relacionada con la diferenciación de los linfocitos Th0 a Th1 y la consecuente producción de IFN γ (Zhan & Cheers, 1995; Zhan *et al.*, 1996), estos resultados parecen indicar que, en un segundo contacto con *B. ovis* PA, la mayor producción de IFN γ no se relaciona con una mayor producción de IL12p40.

La IL1 α es una citocina pro-inflamatoria que actúa sobre los linfocitos T CD4+ mejorando notablemente su expansión y diferenciación tras una estimulación antigénica específica (Ben-Sasson *et al.*, 2009). Los esplenocitos procedentes de los animales vacunados con los mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de *B. ovis* PA secretaron IL1 α en una cantidad significativamente mayor que la secretada por los esplenocitos procedentes de los ratones inmunizados con la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 y los animales sin vacunar (**Figura 38 B**). Considerando que las tres vacunas presentaron una eficacia protectora similar, parece que la IL1 α no contribuye en gran medida a la protección conferida por *B. melitensis* Rev1 frente a una infección experimental por *B. ovis*. Sin embargo, la secreción de esta citocina únicamente por los esplenocitos procedentes de animales inmunizados con las cepas mutantes atenuadas derivadas de la cepa homóloga *B. ovis* PA podría relacionarse con la especificidad de antígeno y contribuir a la protección originada por estas cepas.

Finalmente, al igual que ocurriera en las citocinas endógenas del bazo, únicamente los esplenocitos procedentes de animales inoculados con *B. melitensis* Rev1 fueron capaces de secretar IL10 tras un segundo estímulo con células enteras de *B. ovis* PA (**Figura 38 E**). Dado el carácter anti-inflamatorio de esta citocina (Corsetti *et al.*, 2013), estos resultados sugieren que su presencia tras un segundo estímulo con *B. ovis* PA no impide la actividad protectora de *B. melitensis* Rev1. En contraste, su baja producción en los grupos vacunados con las cepas atenuadas derivadas de *B. ovis* podría contribuir a la protección conferida constituyendo una ventaja para estas vacunas.

En las últimas décadas se han ensayado, frente a infecciones experimentales con *B. ovis*, extractos celulares como el HS de *B. ovis* (Jiménez de Bagués *et al.*, 1993), vacunas subcelulares como R-LPS, PME, (Estein *et al.*, 2003) e incluso vacunas de ADN utilizando vectores que codifican la PME Omp31 o una quimera BLSOmp31 (Cassataro *et al.*, 2005;

Cassataro *et al.*, 2007) y antígenos encapsulados (Murillo *et al.*, 2002; Estevan *et al.*, 2008). Aunque en algunos casos se han obtenido resultados de protección similares a los obtenidos con la vacuna clásica *B. melitensis* Rev1, estas vacunas subcelulares requieren la administración de varias dosis y el empleo de adyuvantes. En contraste, las cepas *B. ovis* $\Delta omp25d$ y *B. ovis* $\Delta omp22$ evaluadas en este trabajo, en una única dosis, y sin la necesidad de ser administradas de forma conjunta con adyuvantes, desencadenan una respuesta inmune mixta tanto de naturaleza humoral como celular (**Figura 30** y **Figura 38**) capaz de reducir la colonización esplénica de la cepa virulenta *B. ovis* PA en niveles equivalentes a los conseguidos tras la inmunización con la vacuna clásica *B. melitensis* Rev1 (**Figura 37**), considerada como la vacuna más eficaz frente a *B. ovis*. Además, estas cepas muestran unas características - virulencia reducida aún a dosis muy altas e inducción de una leve esplenomegalia - que confieren seguridad a la vacuna eliminando así efectos secundarios no deseados en la vacunación sin comprometer la eficacia.

Considerando los inconvenientes de la vacunación con *B. melitensis* Rev1 especialmente en la profilaxis de las infecciones por *B. ovis* (Apartado 5.3 de la Introducción), las cepas *B. ovis* $\Delta omp25d$ y *B. ovis* $\Delta omp22$ analizadas en este trabajo constituyen una alternativa prometedora como vacunas homólogas específicas contra la epididimitis contagiosa del carneros ocasionada por *B. ovis*. Por ello, estas cepas merecen ser evaluadas como vacunas en su hospedador natural. Además, también podría ser interesante analizar otras formulaciones que pudieran incrementar su actividad protectora, como la microencapsulación para la liberación prolongada descrita con éxito en mutantes atenuados de otras especies de *Brucella* (Arenas-Gamboa *et al.*, 2009).

Conclusiones

En vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación podemos establecer las siguientes conclusiones:

- 1.** Atendiendo a la imposibilidad de obtener los mutantes correspondientes, los genes *bvrR*, *bvrS* y *omp16* son esenciales para el crecimiento *in vitro* de *B. ovis* PA en las condiciones empleadas.
- 2.** Los genes *omp10* y *omp19* no son esenciales para la virulencia de *B. ovis* PA en modelo murino, aunque están relacionados con la estabilidad de su ME y con la supervivencia de la bacteria en el interior de macrófagos J774.A1 durante las primeras 24 horas post-infección.
- 3.** La doble mutación en los genes relacionados con la ME *omp31* y *bacA*, que individualmente no están implicados en la virulencia de *B. ovis* PA, confiere a *B. ovis* PA un fenotipo muy similar al mostrado por la cepa mutante simple *B. ovis* $\Delta omp31$ y tampoco produce una atenuación de su virulencia.
- 4.** El hecho de que los genes *omp10*, *omp19* y *bacA*, implicados en la virulencia de estirpes lisas del género *Brucella*, no puedan relacionarse con el establecimiento del proceso infeccioso en *B. ovis* vuelve a poner de manifiesto las diferencias que existen entre las distintas especies del género *Brucella* a pesar de la gran similitud genética que presenta este género.
- 5.** Las cepas mutantes $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de *B. ovis* PA inducen en el hospedador una respuesta inmune protectora mixta de naturaleza humoral y celular que se evidencia, principalmente, por un alto título de anticuerpos de la clase IgG en suero y por una mayor y más rápida secreción, tras un segundo estímulo con *B. ovis*, de IL1 α , TNF α e IFN γ ; estas dos últimas citocinas previamente ha sido relacionadas con la eficacia protectora frente a las especies lisas del género *Brucella*.
- 6.** Considerando la inmunidad protectora conferida tras la evaluación inicial en modelo murino, los mutantes atenuados $\Delta omp25d$ y $\Delta omp22$ de *B. ovis* PA constituyen una alternativa prometedora frente a la vacuna heteróloga *B. melitensis* Rev1 para la profilaxis de la epididimitis del carnero producida por *B. ovis*.

Bibliografía

A

- Adams, L. G. (1990). Vaccination against brucellosis. *Advances in brucellosis research*. Editado por L. G. Adams. Texas University Press, College Satation. USA.
- Adone, R., Francia, M., Pistoia, C., Pesciaroli, M. & Pasquali, P. (2011). *B. melitensis* rough strain B115 is protective against heterologous *Brucella* spp. infections. *Vaccine* 29, 2523–2529.
- Aktas, M., Wessel, M., Hacker, S., Klüsener, S., Gleichenhagen, J. & Narberhaus, F. (2010). Phosphatidylcholine biosynthesis and its significance in bacteria interacting with eukaryotic cells. *Eur J Cell Biol* 89, 888–894.
- Allen, C. A., Adams, L. G. & Ficht, T. A. (1998). Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect Immun* 66, 1008–1016.
- Alton, G. G., Jones, L. M., Angus, R. D. & Verger, J. M. (1998). Techniques for the brucellosis laboratory. Editado por INRA. París, Francia.
- Anderson, T. D. & Cheville, N. F. (1986). Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus*-infected trophoblasts in experimental placentitis. Bacterial replication occurs in rough endoplasmic reticulum. *Am J Pathol* 124, 226–237.
- Aragón, V., Díaz, R., Moreno, E. & Moriyón, I. (1996). Characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* native haptens as outer membrane O-type polysaccharides independent from the smooth lipopolysaccharide. *J Bacteriol* 178, 1070–1079.
- Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A. E., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyón, I. & Gorvel, J.-P. (2005). Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol* 6, 618–625.
- Arenas, G. N., Staskevich, A. S., Aballay, A. & Mayorga, L. S. (2000). Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect Immun* 68, 4255–4263.
- Arenas-Gamboa, A. M., Ficht, T. A., Kahl-McDonagh, M. M., Gomez, G. & Rice-Ficht, A. C. (2009). The *Brucella abortus* S19 $\Delta vjBR$ Live Vaccine Candidate Is Safer than S19 and Confers Protection against Wild-Type Challenge in BALB/c Mice When Delivered in a Sustained-Release Vehicle. *Infect Immun* 77, 877–884.
- Arenas-Gamboa, A. M., Ficht, T. A., Kahl-McDonagh, M. M. & Rice-Ficht, A. C. (2008). Immunization with a single dose of a microencapsulated *Brucella melitensis* mutant enhances protection against wild-type challenge. *Infect Immun* 76, 2448–2455.
- Aridor, M., Fish, K. N., Bannykh, S., Weissman, J., Roberts, T. H., Lippincott-Schwartz, J. & Balch, W. E. (2001). The Sar1 GTPase coordinates biosynthetic cargo selection with endoplasmic reticulum export site assembly. *J Cell Biol* 152, 213–229.
- Arocena, G. M., Sieira, R., Comerci, D. J. & Ugalde, R. A. (2010). Identification of the quorum-sensing target DNA sequence and N-Acyl homoserine lactone responsiveness of the *Brucella abortus virB* promoter. *J Bacteriol* 192, 3434–3440.
- Arocena, G. M., Zorreguieta, A. & Sieira, R. (2012). Expression of VjbR under nutrient limitation conditions is regulated at the post-transcriptional level by specific acidic pH values and urocanic acid. *PLoS ONE* 7, e35394.
- Atmakuri, K., Cascales, E. & Christie, P. J. (2004). Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Mol Microbiol* 54, 1199–1211.

B

- Baldwin, C. L. & Goenka, R. (2006). Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? *Crit Rev Immunol* 26, 407–442.
- Bandara, A. B., Contreras, A., Contreras-Rodriguez, A., Martins, A. M., Dobrea, V., Poff-Reichow, S., Rajasekaran, P., Sriranganathan, N., Schurig, G. G. & Boyle, S. M. (2007). *Brucella suis* urease encoded by *ure1* but not *ure2* is necessary for intestinal infection of BALB/c mice. *BMC Microbiol* 7, 57.
- Bargen, von, K., Gorvel, J.-P. & Salcedo, S. P. (2012). Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiol Rev* 36, 533–562.

- Barkha, S., Dharmendra Kumar, S. & Dhirendra Kumar, S. (2011). Immunochemical characterization of antigens of *Brucella canis* and their use in seroprevalence study of canine brucellosis. *Asian Pac J Trop Med* 4, 857–861.
- Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Weiss, D. S., Guzmán-Verri, C., Chacón-Díaz, C., Rucavado, A., Moriyón, I. & Moreno, E. (2007). *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS ONE* 2, e631.
- Barquero-Calvo, E., Conde-Álvarez, R., Chacón-Díaz, C., Quesada-Lobo, L., Martirosyan, A., Guzmán-Verri, C., Iriarte, M., Mancek-Keber, M., Jerala, R. & otros autores. (2009). The differential interaction of *Brucella* and *Ochrobactrum* with innate immunity reveals traits related to the evolution of stealthy pathogens. *PLoS ONE* 4, e5893.
- Bellaire, B. H., Roop, R. M. & Cardelli, J. A. (2005). Oposonized virulent *Brucella abortus* replicates within nonacidic, endoplasmic reticulum-negative, LAMP-1-positive phagosomes in human monocytes. *Infect Immun* 73, 3702–3713.
- Ben-Sasson, S. Z., Hu-Li, J., Quiel, J., Cauchetaux, S., Ratner, M., Shapira, I., Dinarello, C. A. & Paul, W. E. (2009). IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 7119–7124.
- Bhat, U. R., Carlson, R. W., Busch, M. & Mayer, H. (1991). Distribution and phylogenetic significance of 27-hydroxy-octacosanoic acid in lipopolysaccharides from bacteria belonging to the alpha-2 subgroup of *Proteobacteria*. *Int J Syst Bacteriol* 41, 213–217.
- Billard, E. E., Dornand, J. J. & Gross, A. A. (2007). *Brucella suis* prevents human dendritic cell maturation and antigen presentation through regulation of tumor necrosis factor alpha secretion. *Infect Immun* 75, 4980–4989.
- Billard, E., Cazevieille, C., Dornand, J. & Gross, A. (2005). High susceptibility of human dendritic cells to invasion by the intracellular pathogens *Brucella suis*, *B. abortus*, and *B. melitensis*. *Infect Immun* 73, 8418–8424.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513–1523.
- Blasco, J. M. (1997). A review of the use of *B. melitensis* Rev1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev Vet Med* 31, 275–283.
- Blasco, J. M. & Díaz, R. (1993). *Brucella melitensis* Rev1 vaccine as a cause of human brucellosis. *Lancet* 342, 805.
- Blasco, J.-M. (1990). *Brucella ovis*. *Animal Brucellosis*. Editado por K. H. Nielsen & J. R. Duncan CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- Bohin, J. P. (2000). Osmoregulated periplasmic glucans in *Proteobacteria*. *FEMS Microbiol Lett* 186, 11–19.
- Boschiroli, M. L., Ouahrani-Bettache, S., Foulongne, V., Michaux-Charachon, S., Bourg, G., Allardet-Servent, A., Cazevieille, C., Lavigne, J.-P., Liautard, J.-P. & otros autores. (2002). Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet Microbiol* 90, 341–348.
- Bosseray, N. (1991). *Brucella melitensis* Rev1 living attenuated vaccine: stability of markers, residual virulence and immunogenicity in mice. *Biologicals* 19, 355–363.
- Bosseray, N. (1992). Control methods and thresholds of acceptability for anti-brucella vaccines. *Dev Biol Stand* 79, 121–128.
- Bosseray, N., Plommet, A. M. & Plommet, M. (1984). Theoretical, practical and statistical basis for a general control method of activity for anti-*Brucella* vaccines. *Dev Biol Stand* 56, 257–270.
- Bowden, R. A., Cloeckert, A., Zygmunt, M. S., Bernard, S. & Dubray, G. (1995a). Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect Immun* 63, 3945–3952.
- Bowden, R. A., Cloeckert, A., Zygmunt, M. S. & Dubray, G. (1995b). Outer-membrane protein- and rough lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies protect mice against *Brucella ovis*. *J Med Microbiol* 43, 344–347.
- Bowden, R. A., Estein, S. M., Zygmunt, M. S., Dubray, G. & Cloeckert, A. (2000). Identification of protective outer membrane antigens of *Brucella ovis* by passive immunization of mice with monoclonal antibodies. *Microbes Infect* 2, 481–488.
- Briones, G., Iñón de Iannino, N., Roset, M., Vigliocco, A., Paulo, P. S. & Ugalde, R. A. (2001). *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect Immun* 69, 4528–4535.

- Briones, G., Iñón de Iannino, N., Steinberg, M. & Ugalde, R. A. (1997). Periplasmic cyclic 1,2-beta-glucan in *Brucella* spp. is not osmoregulated. *Microbiology* **143** (Pt 4), 1115–1124.
- Buddle, M. B. (1956). Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in new Zealand and Australia. *J Hygiene* **54**, 351–364. Cambridge University Press.
- Bukata, L., Altabe, S., de Mendoza, D., Ugalde, R. A. & Comerci, D. J. (2008). Phosphatidylethanolamine synthesis is required for optimal virulence of *Brucella abortus*. *J Bacteriol* **190**, 8197–8203.
- Bundle, D. R., Cherwonogrodzky, J. W., Gidney, M. A., Meikle, P. J., Perry, M. B. & Peters, T. (1989). Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. *Infect Immun* **57**, 2829–2836.

C

- Campos, M. A. M., Rosinha, G. M. S. G., Almeida, I. C. I., Salgueiro, X. S. X., Jarvis, B. W. B., Splitter, G. A. G., Qureshi, N. N., Bruna-Romero, O. O., Gazzinelli, R. T. R. & Oliveira, S. C. S. (2003). Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infect Immun* **72**, 176–186.
- Cardoso, P. G., Macedo, G. C., Azevedo, V. & Oliveira, S. C. (2006). *Brucella* spp. noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb Cell Fact* **5**, 13.
- Carmichael, L. E. & Bruner, D. W. (1968). Characteristics of a newly-recognized species of *Brucella* responsible for infectious canine abortions. *Cornell Vet* **48**, 579–592.
- Caro-Hernández, P., Fernández-Lago, L., de Miguel, M. J., Martín-Martín, A. I., Cloeckaert, A., Grilló, M.-J. & Vizcaíno, N. (2007). Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. *Infect Immun* **75**, 4050–4061.
- Cassataro, J., Pasquevich, K. A., Estein, S. M., Laplagne, D. A., Velikovskiy, C. A., la Barrera, de, S., Bowden, R., Fossati, C. A., Giambartolomei, G. H. & Goldbaum, F. A. (2007). A recombinant subunit vaccine based on the insertion of 27 amino acids from Omp31 to the N-terminus of BLS induced a similar degree of protection against *B. ovis* than Rev1 vaccination. *Vaccine* **25**, 4437–4446.
- Cassataro, J., Velikovskiy, C. A., la Barrera, de, S., Estein, S. M., Bruno, L., Bowden, R., Pasquevich, K. A., Fossati, C. A. & Giambartolomei, G. H. (2005). 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.
- Celli, J., Olivier, M. & Finlay, B. B. (2001). Enteropathogenic *Escherichia coli* mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. *EMBO J* **20**, 1245–1258.
- Celli, J. (2006). Surviving inside a macrophage: the many ways of *Brucella*. *Res Microbiol* **157**, 93–98.
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D.-M., Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E. & Gorvel, J.-P. (2003). *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* **198**, 545–556.
- Celli, J., Salcedo, S. P. & Gorvel, J.-P. (2005). *Brucella* coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 1673–1678.
- Cha, S.-B., Rayamajhi, N., Kang, M.-L., Lee, W.-J., Shin, M.-K. & Yoo, H.-S. (2010). Comparative study of gamma interferon production in mice immunized with outer membrane proteins and whole bacteria of *Brucella abortus*. *Jpn J Infect Dis* **63**, 49–51.
- Chain, P. S. G., Comerci, D. J., Tolmasky, M. E., Larimer, F. W., Malfatti, S. A., Vergez, L. M., Agüero, F., Land, M. L., Ugalde, R. A. & Garcia, E. (2005). Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. *Infect Immun* **73**, 8353–8361.
- Chand, P., Sadana, J. R. & Malhotra, A. K. (2002). Epididymo-orchitis caused by *Brucella melitensis* in breeding rams in India. *Vet Rec* **150**, 84–85.
- Chandran, V. (2013). Type IV secretion machinery: molecular architecture and function. *Biochem Soc Trans* **41**, 17–28.
- Charles, T. C. & Nester, E. W. (1993). A chromosomally encoded two-component sensory transduction system is required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **175**, 6614–6625.

- Chaves-Olarte, E., Guzmán-Verri, C., Méresse, S., Desjardins, M., Pizarro-Cerdá, J., Badilla, J., Gorvel, J.-P. & Moreno, E. (2002). Activation of Rho and Rab GTPases dissociates *Brucella abortus* internalization from intracellular trafficking. *Cell Microbiol* **4**, 663–676.
- Chen, R. & Henning, U. (1987). Nucleotide sequence of the gene for the peptidoglycan-associated lipoprotein of *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem* **163**, 73–77.
- Cheng, H. P. & Walker, G. C. (1998). Succinoglycan production by *Rhizobium meliloti* is regulated through the ExoS-ChvI two-component regulatory system. *J Bacteriol* **180**, 20–26.
- Chiang, S. L., Taylor, R. K., Koomey, M. & Mekalanos, J. J. (1995). Single amino acid substitutions in the N-terminus of *Vibrio cholerae* TcpA affect colonization, autoagglutination, and serum resistance. *Mol Microbiol* **17**, 1133–1142.
- Chin, J. C. & Scully, C. (1986). Identification of immunoreactive membrane antigens of *Brucella ovis* by ELISA profiling. *Res Vet Sci* **41**, 1–6.
- Christie, P. J. (2004). Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 219–234.
- Christie, P. J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S. & Cascales, E. (2005). Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol* **59**, 451–485.
- Ciocchini, A. E., Roset, M. S., Iñón de Iannino, N. & Ugalde, R. A. (2004). Membrane topology analysis of cyclic glucan synthase, a virulence determinant of *Brucella abortus*. *J Bacteriol* **186**, 7205–7213.
- Cirl, C., Wieser, A., Yadav, M., Duerr, S., Schubert, S., Fischer, H., Stappert, D., Wantia, N., Rodriguez, N. & other authors. (2008). Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nat Med* **14**, 399–406.
- Cloekaert, A., de Wergifosse, P., Dubray, G. & Limet, J. N. (1990). Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect Immun* **58**, 3980–3987.
- Cloekaert, A., Kerkhofs, P. & Limet, J. N. (1992a). Antibody response to *Brucella* outer membrane proteins in bovine brucellosis: immunoblot analysis and competitive enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* **30**, 3168–3174.
- Cloekaert, A., Verger, J. M., Grayon, M., Paquet, J. Y., Garin-Bastuji, B., Foster, G. & Godfroid, J. (2001). Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes Infect* **3**, 729–738.
- Cloekaert, A., Verger, J. M., Grayon, M., Zygmunt, M. S. & Grépinet, O. (1996). Nucleotide sequence and expression of the gene encoding the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella ovis*: Evidence for antigenic shift, compared with other *Brucella* species, due to a deletion in the gene. *Infect Immun* **64**, 2047–2055.
- Cloekaert, A., Weynants, V., Godfroid, J., Verger, J. M., Grayon, M. & Zygmunt, M. S. (1998). O-Polysaccharide epitopic heterogeneity at the surface of *Brucella* spp. studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* **5**, 862–870.
- Cloekaert, A., Zygmunt, M. S., de Wergifosse, P., Dubray, G. & Limet, J. N. (1992b). Demonstration of peptidoglycan-associated *Brucella* outer-membrane proteins by use of monoclonal antibodies. *J Gen Microbiol* **138**, 1543–1550.
- Cloekaert, A., Zygmunt, M. S., Dubray, G. & Limet, J. N. (1993). Characterization of O-polysaccharide specific monoclonal antibodies derived from mice infected with the rough *Brucella melitensis* strain B115. *J Gen Microbiol* **139**, 1551–1556.
- Cloekaert, A., Jacques, I., Grilló, M.-J., Marín, C. M., Grayon, M., Blasco, J.-M. & Verger, J.-M. (2004). Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev1 single and double deletion mutants of the *bp26* and *omp31* genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. *Vaccine* **22**, 2827–2835.
- Cloekaert, A. & Vizcaíno, N. (2005). DNA Polymorphism and Taxonomy of *Brucella* Species. *Brucella: Molecular and Cellular Biology*. Editado por I. López-Goñi & I. Moriyón. Horizon Bioscience. Norfolk, England.
- Cloekaert, A., Vizcaíno, 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.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**, 2110–2114.

- Comerci, D. J., Martínez-Lorenzo, M. J., Sieira, R., Gorvel, J. P. & Ugalde, R. A. (2001). Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol* 3, 159–168.
- Comerci, D. J., Altabe, S., de Mendoza, D. & Ugalde, R. A. (2006). *Brucella abortus* synthesizes phosphatidylcholine from choline provided by the host. *J Bacteriol* 188, 1929–1934.
- Conde-Álvarez, R., Grilló, M. J., Salcedo, S. P., de Miguel, M. J., Fugier, E., Gorvel, J.-P., Moriyón, I. & Iriarte, M. (2006). Synthesis of phosphatidylcholine, a typical eukaryotic phospholipid, is necessary for full virulence of the intracellular bacterial parasite *Brucella abortus*. *Cell Microbiol* 8, 1322–1335.
- Connolly, J. P., Comerci, D., Alefantis, T. G., Walz, A., Quan, M., Chafin, R., Grewal, P., Mujer, C. V., Ugalde, R. A. & DelVecchio, V. G. (2006). Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. *Proteomics* 6, 3767–3780.
- Copin, R., De Baetselier, P., Carlier, Y., Letesson, J.-J. & Muraille, E. (2007). MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during *Brucella melitensis* infection. *J Immunol* 178, 5182–5191.
- Corbeil, L. B., Blau, K., Inzana, T. J., nielsen, K. H., Jacobson, R. H., Corbeil, R. R. & Winter, A. J. (1988). Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. *Infect Immun* 56, 3251–3261.
- Corbel, M. J. (1990). *Brucella*. Topley & Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity. Baltimore, USA.
- Corbel, M. J. & Brinley-Morgan, W. J. (1984). Genus *Brucella*, Meyer and Shaw 1920, 173 AL. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, USA.
- Corsetti, P. P., de Almeida, L. A., Carvalho, N. B., Azevedo, V., Silva, T. M. A., Teixeira, H. C., Faria, A. C. & Oliveira, S. C. (2013). Lack of endogenous IL-10 enhances production of proinflammatory cytokines and leads to *Brucella abortus* clearance in mice. *PLoS ONE* 8, e74729.
- Crasta, O. R., Folkerts, O., Fei, Z., Mane, S. P., Evans, C., Martino-Catt, S., Bricker, B., Yu, G., Du, L. & Sobral, B. W. (2008). Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes. *PLoS ONE* 3, e2193.

D

- Dahouk, Al, S., Jubier-Maurin, V., Scholz, H. C., Tomaso, H., Karges, W., Neubauer, H. & Köhler, S. (2008). Quantitative analysis of the intramacrophagic *Brucella suis* proteome reveals metabolic adaptation to late stage of cellular infection. *Proteomics* 8, 3862–3870.
- Davis, D. S. & Elzer, P. H. (2002). *Brucella* vaccines in wildlife. *Vet Microbiol* 90, 533–544.
- de Almeida, L. A., Macedo, G. C., Marinho, F. A. V., Gomes, M. T. R., Corsetti, P. P., Silva, A. M., Cassataro, J., Giambartolomei, G. H. & Oliveira, S. C. (2013). Toll-like receptor 6 plays an important role in host innate resistance to *Brucella abortus* infection in mice. *Infect Immun* 81, 1654–1662.
- de Barsy, M., Jamet, A., Filopon, D., Nicolas, C., Laloux, G., Rual, J.-F., Muller, A., Twizere, J.-C., Nkengfac, B. & otros autores. (2011). Identification of a *Brucella* spp. secreted effector specifically interacting with human small GTPase Rab2. *Cell Microbiol* 13, 1044–1058.
- de Barsy, M., Mirabella, A., Letesson, J.-J. & De Bolle, X. (2012). A *Brucella abortus* *cstA* mutant is defective for association with endoplasmic reticulum exit sites and displays altered trafficking in HeLa cells. *Microbiology* 158, 2610–2618.
- de Iannino, N. I., Briones, G., Iannino, F. & Ugalde, R. A. (2000). Osmotic regulation of cyclic 1,2-beta-glucan synthesis. *Microbiology* 146 (Pt 7), 1735–1742.
- de Jong, M. F., Sun, Y.-H., Hartigh, den, A. B., van Dijk, J. M. & Tsois, R. M. (2008). Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Mol Microbiol* 70, 1378–1396.
- de Wergifosse, P., Lintermans, P., Limet, J. N. & Cloeckert, A. (1995). Cloning and nucleotide sequence of the gene coding for the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. *J Bacteriol* 177, 1911–1914.
- De, B. K., Stauffer, L., Koylass, M. S., Sharp, S. E., Gee, J. E., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Vega, R., Clark, T. A. & otros autores. (2008). Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *J Clin Microbiol* 46, 43–49.
- Delrue, R. M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J. P. & Letesson, J. J. (2001). Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* 3, 487–497.

- Delrue, R.-M., Deschamps, C., Léonard, S., Nijskens, C., Danese, I., Schaus, J.-M., Bonnot, S., Ferooz, J., Tibor, A. & otros autores. (2005). A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell Microbiol* 7, 1151–1161.
- DelVecchio, V. G., Kapatral, V., Elzer, P., Patra, G. & Mujer, C. V. (2002). The genome of *Brucella melitensis*. *Vet Microbiol* 90, 587–592.
- Detilleux, P. G., Deyoe, B. L. & Cheville, N. F. (1990). Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells *in vitro*. *Infect Immun* 58, 2320–2328.
- Donnenberg, M. S. & Kaper, J. B. (1991). Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* 59, 4310–4317.
- Dornand, J., Gross, A., Lafont, V., Liautard, J., Oliaro, J. & Liautard, J.-P. (2002). The innate immune response against *Brucella* in humans. *Vet Microbiol* 90, 383–394.
- Douglas, J. T. & Palmer, D. A. (1988). Use of monoclonal antibodies to identify the distribution of A and M epitopes on smooth *Brucella* species. *J Clin Microbiol* 26, 1353–1356.
- Douglas, J. T., Rosenberg, E. Y., Nikaido, H., Verstrete, D. R. & Winter, A. J. (1984). Porins of *Brucella* species. *Infect Immun* 44, 16–21.
- Dubray, G. & Bézard, G. (1980). Isolation of three *Brucella abortus* cell-wall antigens protective in murine experimental brucellosis. *Ann Rech Vet* 11, 367–373.
- Dubray, G. & Charriaut, C. (1983). Evidence of three major polypeptide species and two major polysaccharide species in the *Brucella* outer membrane. *Ann Rech Vet* 14, 311–318.

E

- Edmonds, M. D. M., Cloeckaert, A. A., Booth, N. J. N., Fulton, W. T. W., Hagius, S. D. S., Walker, J. V. J. & Elzer, P. H. P. (2001). Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25 kDa outer membrane protein in cattle. *Am J Vet Res* 62, 1461–1466.
- Edmonds, M. D. M., Cloeckaert, A. A., Hagius, S. D. S., Samartino, L. E. L., Fulton, W. T. W., Walker, J. V. J., Enright, F. M. F., Booth, N. J. N. & Elzer, P. H. P. (2002a). Pathogenicity and protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis* Δ *omp25* deletion mutant. *Res Vet Sci* 72, 5–5.
- Edmonds, M. D. M., Cloeckaert, A. A. & Elzer, P. H. P. (2002b). *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.
- Eisenschenk, F. C., Houle, J. J. & Hoffmann, E. M. (1999). Mechanism of serum resistance among *Brucella abortus* isolates. *Vet Microbiol* 68, 235–244.
- Elzer, P. H., Jacobson, R. H., nielsen, K. H., Douglas, J. T. & Winter, A. J. (1994a). BALB/c mice infected with *Brucella abortus* express protracted polyclonal responses of both IgG2a and IgG3 isotypes. *Immunol Lett* 42, 145–150.
- Elzer, P. H., Phillips, R. W., Kovach, M. E., Peterson, K. M. & Roop, R. M. (1994b). Characterization and genetic complementation of a *Brucella abortus* high-temperature-requirement A (*htrA*) deletion mutant. *Infect Immun* 62, 4135–4139.
- Eschenbrenner, M., Horn, T. A., Wagner, M. A., Mujer, C. V., Miller-Scandle, T. L. & DelVecchio, V. G. (2006). Comparative proteome analysis of laboratory grown *Brucella abortus* 2308 and *Brucella melitensis* 16M. *J Proteome Res* 5, 1731–1740.
- Eschenbrenner, M., Wagner, M. A., Horn, T. A., Kraycer, J. A., Mujer, C. V., Hagius, S., Elzer, P. & DelVecchio, V. G. (2002). Comparative proteome analysis of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev1 and a virulent strain, 16M. *J Bacteriol* 184, 4962–4970.
- Esteyn, S. M., Cassataro, J., Vizcaíno, 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.
- Estevan, M., Gamazo, C., Martínez-Galan, F. & Irache, J. M. (2008). Stability of poly(epsilon-caprolactone) microparticles containing *Brucella ovis* antigens as a vaccine delivery system against brucellosis. *AAPS Pharm Sci Tech* 9, 1063–1069.

Eze, M. O., Yuan, L., Crawford, R. M., Paronavitana, 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**, 257–263.

F

- Fensterbank, R., Pardon, P. & Marly, J. (1982). Efficacy of *Brucella melitensis* Rev1 vaccine against *Brucella ovis* infection in rams. *Ann Rech Vet* **13**, 185–190.
- Fensterbank, R., Pardon, P. & Marly, J. (1985). Vaccination of ewes by a single conjunctival administration of *Brucella melitensis* Rev1 vaccine. *Ann Rech Vet* **16**, 351–356.
- Ferguson, G. P., Datta, A., Baumgartner, J., Roop, R. M., Carlson, R. W. & Walker, G. C. (2004). Similarity to peroxisomal-membrane protein family reveals that *Sinorhizobium* and *Brucella* BacA affect lipid-A fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 5012–5017.
- Fernandes, D. M. & Baldwin, C. L. (1995). Interleukin-10 downregulates protective immunity to *Brucella abortus*. *Infect Immun* **63**, 1130–1133.
- Fernandes, D. M., Jiang, X., Jung, J. H. & Baldwin, C. L. (1996). Comparison of T cell cytokines in resistant and susceptible mice infected with virulent *Brucella abortus* strain 2308. *FEMS Immunol Med Microbiol* **16**, 193–203.
- Fernandez-Prada, C. M., Nikolich, M., Vemulapalli, R., Sriranganathan, N., Boyle, S. M., Schurig, G. G., Hadfield, T. L. & Hoover, D. L. (2001). Deletion of *wboA* enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Infect Immun* **69**, 4407–4416.
- Fernandez-Prada, C. M., Zelazowska, E. B., Nikolich, M., Hadfield, T. L., Roop, R. M., Robertson, G. L. & Hoover, D. L. (2003). Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect Immun* **71**, 2110–2119.
- Fernández-Lago, L., Monte, M. & Chordi, A. (1996). Endogenous gamma interferon and interleukin-10 in *Brucella abortus* 2308 infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* **15**, 109–114.
- Fernández-Lago, L., Rodríguez-Tarazona, E. & Vizcaíno, N. (1999). Differential secretion of interleukin-12 (IL-12) subunits and heterodimeric IL-12p70 protein by CD-1 mice and murine macrophages in response to intracellular infection by *Brucella abortus*. *J Med Microbiol* **48**, 1065–1073.
- Fernández-Lago, L., Orduña, A. & Vizcaíno, N. (2005). Reduced interleukin-18 secretion in *Brucella abortus* 2308-infected murine peritoneal macrophages and in spleen cells obtained from *B. abortus* 2308-infected mice. *J Med Microbiol* **54**, 527–531.
- Ferrero, M. C., Fossati, C. A. & Baldi, P. C. (2009). Smooth *Brucella* strains invade and replicate in human lung epithelial cells without inducing cell death. *Microbes Infect* **11**, 476–483.
- Ficht, T. A., Bearden, S. W., Sowa, B. A. & Adams, L. G. (1988). A 36-kilodalton *Brucella abortus* cell envelope protein is encoded by repeated sequences closely linked in the genomic DNA. *Infect Immun* **56**, 2036–2046.
- Ficht, T. A., Bearden, S. W., Sowa, B. A. & Adams, L. G. (1989). DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infect Immun* **57**, 3281–3291.
- Ficht, T. A., Kahl-McDonagh, M. M., Arenas-Gamboa, A. M. & Rice-Ficht, A. C. (2009). Brucellosis: the case for live, attenuated vaccines. *Vaccine* **27 Suppl 4**, D40–3.
- Ficht, T. A. & Rice-Ficht, A. C. (2012). Molecular and chemical approaches to *Brucella* vaccine development. *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*, pp. 243–258. Editado por I. López-Goñi & D. O'Callaghan. Norfolk, UK.
- Finkelman, F. D., Goroff, D. K., Fultz, M., Morris, S. C., Holmes, J. M. & Mond, J. J. (1990). Polyclonal activation of the murine immune system by an antibody to IgD. X. Evidence that the precursors of IgG1-secreting cells are newly generated membrane IgD+B cells rather than the B cells that are initially activated by anti-IgD antibody. *J Immunol* **145**, 3562–3569.
- Finkelman, F. D., Katona, I. M., Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. (1988). IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during *in vivo* humoral immune responses. *J Immunol* **140**, 1022–1027.

- Fontes, P., Alvarez-Martinez, M.-T., Gross, A., Carnaud, C., Köhler, S. & Liautard, J.-P. (2005). Absence of evidence for the participation of the macrophage cellular prion protein in infection with *Brucella suis*. *Infect Immun* **73**, 6229–6236.
- Forestier, C., Deleuil, F., Lapaque, N., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (2000). *Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation. *J Immunol* **165**, 5202–5210.
- Foulongne, V., Bourg, G., Cazevieille, C., Michaux-Charachon, S. & O'Callaghan, D. (2000). Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an *in vitro* human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infect Immun* **68**, 1297–1303.
- Freer, E., Moreno, E., Moriyón, I., Pizarro-Cerdá, J., Weintraub, A. & Gorvel, J. P. (1996). *Brucella-Salmonella* lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than are their native *Brucella* sp. counterparts. *J Bacteriol* **178**, 5867–5876.
- Freer, E., Pizarro-Cerdá, J., Weintraub, A., Bengoechea, J. A., Moriyón, I., Hultenby, K., Gorvel, J. P. & Moreno, E. (1999). The outer membrane of *Brucella ovis* shows increased permeability to hydrophobic probes and is more susceptible to cationic peptides than are the outer membranes of mutant rough *Brucella abortus* strains. *Infect Immun* **67**, 6181–6186.
- Freer, E., Rojas, N., Weintraub, A., Lindberg, A. A. & Moreno, E. (1995). Heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Res Microbiol* **146**, 569–578.
- Fronzes, R., Schäfer, E., Wang, L., Saibil, H. R., Orlova, E. V. & Waksman, G. (2009). Structure of a type IV secretion system core complex. *Science* **323**, 266–268.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**, 269–275.

G

- Galdiero, E., Romano Carratelli, C., Vitiello, M., Nuzzo, I., Del Vecchio, E., Bentivoglio, C., Perillo, G. & Galdiero, F. (2000). HSP and apoptosis in leukocytes from infected or vaccinated animals by *Brucella abortus*. *New Microbiol* **23**, 271.
- Gamazo, C. & Moriyón, I. (1987). Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infect Immun* **55**, 609–615.
- García-Carrillo, C. (1981). Protection of rams against *Brucella ovis* infection by *Brucella melitensis* Rev1 vaccine. *Zentralbl Veterinarmed B* **28**, 425–431.
- García-Yoldi, D., Marín, C. M., de Miguel, M. J., Muñoz, P. M., Vizmanos, J. L. & López-Goñi, I. (2006). Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis* Rev1. *Clin Chem* **52**, 779–781.
- Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Berkelman, T. & Kado, C. I. (1985). Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **164**, 918–921.
- Giambartolomei, G. H., Zwerdling, A., Cassataro, J., Bruno, L., Fossati, C. A. & Philipp, M. T. (2004). Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *J Immunol* **173**, 4635–4642.
- Godfroid, F., Taminiau, B., Danese, I., Denoel, P., Tibor, A., Weynants, V., Cloeckaert, A., Godfroid, J. & Letesson, J. J. (1998). Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Infect Immun* **66**, 5485–5493.
- Godfroid, J., Garin-Bastuji, B., Saegerman, C. & Blasco, J. M. (2013). Brucellosis in terrestrial wildlife. *Rev Sci Tech* **32**, 27–42.
- Godfroid, J., Scholz, H. C., Barbier, T., Nicolas, C., Wattiau, P., Fretin, D., Whatmore, A. M., Cloeckaert, A., Blasco, J. M. & otros autores. (2011). Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Prev Vet Med* **102**, 118–131.
- Goldfine, H. (1984). Bacterial membranes and lipid packing theory. *J Lipid Res* **151**, 1501–1507.
- Goenka, R., Parent, M. A., Elzer, P. H. & Baldwin, C. L. (2011). B cell-deficient mice display markedly enhanced resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus*. *J Infect Dis* **203**, 1136–1146.
- González, D., Grilló, M.-J., de Miguel, M. J., Ali, T., Arce-Gorvel, V., Delrue, R.-M., Conde-Álvarez, R., Muñoz, P., López-Goñi, I. & otros autores. (2008). Brucellosis vaccines: assessment of *Brucella*

- melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *PLoS ONE* 3, e2760.
- Green, B. A., Quinn-Dey, T. & Zlotnick, G. W. (1987).** Biologic activities of antibody to a peptidoglycan-associated lipoprotein of *Haemophilus influenzae* against multiple clinical isolates of *H. influenzae* type b. *Infect Immun* 55, 2878–2883.
- Grilló, M. J., Bosseray, N. & Blasco, J. M. (2000).** *In vitro* markers and biological activity in mice of seed lot strains and commercial *Brucella melitensis* Rev1 and *Brucella abortus* B19 vaccines. *Biologicals* 28, 119–127.
- Grilló, M.-J. M., Blasco, J. M. J., Gorvel, J. P. J., Moriyón, I. I. & Moreno, E. E. (2011).** What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Vet Res* 43, 29–29.
- Grilló, M.-J., Manterola, L., de Miguel, M. J., Muñoz, P.-M., Blasco, J.-M., Moriyón, I. & López-Goñi, I. (2006).** Increases of efficacy as vaccine against *Brucella abortus* infection in mice by simultaneous inoculation with avirulent smooth *bvrS/bvrR* and rough *wbkA* mutants. *Vaccine* 24, 2910–2916.
- Gross, A., Terraza, A., Ouahrani-Bettache, S., Liautard, J. P. & Dornand, J. (2000).** *In vitro* *Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells. *Infect Immun* 68, 342–351.
- Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E., Eichel-Streiber, von, C., López-Goñi, I., Thelestam, M., Arvidson, S., Gorvel, J. P. & Moreno, E. (2001).** GTPases of the Rho subfamily are required for *Brucella abortus* internalization in nonprofessional phagocytes: direct activation of Cdc42. *J Biol Chem* 276, 44435–44443.
- Guzmán-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Parra, A., Cloeckart, A., Garin, J., Gorvel, J. P., Moriyón, I., Moreno, E. & López-Goñi, I. (2002).** The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the *Rhizobiaceae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 12375–12380.

H

- Haag, A. F., Myka, K. K., Arnold, M. F. F., Caro-Hernández, P. & Ferguson, G. P. (2010).** Importance of Lipopolysaccharide and Cyclic β -1,2-Glucans in *Brucella*-Mammalian Infections. *Int J Microbiol* 2010, ID 124509.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557–580.
- Hancock, R. E. (1997).** The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol* 5, 37–42.
- Hanna, N., Jiménez de Bagüés, M. P., Ouahrani-Bettache, S., Yakhlifi, El, Z., Köhler, S. & Occhialini, A. (2011).** The *virB* operon is essential for lethality of *Brucella microti* in the Balb/c murine model of infection. *J Infect Dis* 203, 1129–1135.
- Hayashi, S. & Wu, H. C. (1990).** Lipoproteins in bacteria. *J Bioenerg Biomembr* 22, 451–471.
- He, Y., Vemulapalli, R., Zeytun, A. & Schurig, G. G. (2001).** Induction of specific cytotoxic lymphocytes in mice vaccinated with *Brucella abortus* RB51. *Infect Immun* 69, 5502–5508.
- Herrero, M., de Lorenzo, V. & Timmis, K. N. (1990).** Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 172, 6557–6567.
- High, K. P., Prasad, R., Marion, C. R., Schurig, G. G., Boyle, S. M. & Sriranganathan, N. (2007).** Outcome and immune responses after *Brucella abortus* infection in young adult and aged mice. *Biogerontology* 8, 583–593.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989).** Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51–59.
- Hoch, J. A. & Silhavy, T. J. (1995).** *Two-component Signal Transduction*. Editado por ASM Press. Washington, D.C., USA
- Holmes, B., Popoff, M. & Kiredjian, M. (1988).** *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 38, 406–416.
- Hong, P. C., Tsolis, R. M. & Ficht, T. A. (2000).** Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. *Infect Immun* 68, 4102–4107.
- Hort, G. M. G., Weisenburger, J. J., Borsdorf, B. B., Peters, C. C., Banai, M. M., Hahn, H. H., Jacob, J. J. & Mielke, M. E. A. M. (2003).** Delayed type hypersensitivity-associated disruption of splenic

periarteriolar lymphatic sheaths coincides with temporary loss of IFN-gamma production and impaired eradication of bacteria in *Brucella abortus*-infected mice. *Microbes Infect* **5**, 95–106.

- Huang, L.-Y. L., Ishii, K. J. K., Akira, S. S., Aliberti, J. J. & Golding, B. B. (2005). Th1-like cytokine induction by heat-killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9. *J Immunol* **175**, 3964–3970.
- Hubálek, Z., Scholz, H. C., Sedláček, I., Melzer, F., Sanogo, Y. O. & Nesvadbová, J. (2007). Brucellosis of the common vole (*Microtus arvalis*). *Vector Borne Zoonotic Dis* **7**, 679–687.
- Huddleson, I. F. (1929). *The differentiation of the species of the genus Brucella*. Editado por Michigan State College Agricultural Experimental Station. Technical Bulletin **100**, 1–16.
- Iñón de Iannino, N., Briones, G., Tolmasky, M. & Ugalde, R. A. (1998). Molecular cloning and characterization of *cgs*, the *Brucella abortus* cyclic beta(1-2) glucan synthetase gene: genetic complementation of *Rhizobium meliloti ndvB* and *Agrobacterium tumefaciens chvB* mutants. *J Bacteriol* **180**, 4392–4400.

I

- Iriarte, M., González, D., Delrue, R.-M., Monreal, D., Conde, R., López-Goñi, I., Letesson, J.-J. & Moriyón, I. (2005). *Brucella* lipopolysaccharide: Structure, Biosíntesis and Genetics. *Brucella: molecular and Cellular Biology*, pp. 159–191. Editado por I. López-Goñi & I. Moriyón. Horizon Bioscience. Pamplona, Spain.

J

- Jacques, I., Grayon, M. & Verger, J.-M. (2007). Oxidative metabolic profiles of *Brucella* strains isolated from marine mammals: contribution to their species classification. *FEMS Microbiol Lett* **270**, 245–249.
- Jenssen, H., Hamill, P. & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **19**, 491–511.
- Jiang, X. & Baldwin, C. L. (1993). Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*. *Infect Immun* **61**, 124–134.
- Jiménez de Bagués, M. P., Barberán, M., Marín, C. M. & Blasco, J. M. (1995). The *Brucella abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine* **13**, 301–304.
- 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.
- Jiménez de Bagués, M. P., Marín, C. M., Barberán, M. & Blasco, J. M. (1993). Evaluation of vaccines and of antigen therapy in a mouse model for *Brucella ovis*. *Vaccine* **11**, 61–66.

K

- Kahl-McDonagh, M. M. & Ficht, T. A. (2006). Evaluation of protection afforded by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants exhibiting different rates of clearance in BALB/c mice. *Infect Immun* **74**, 4048–4057.
- Kamio, Y. & Nikaido, H. (1976). Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase c and cyanogen bromide activated dextran in the external medium. *Biochemistry* **15**, 2561–2570.
- Kawai, T. & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**, 373–384.
- Kim, D. H., Son, B. G., Lim, J. J., Lee, J. J., Kim, D. G., Lee, H. J., Min, W., Rhee, M. H., Kim, K. D. & otros autores. (2013). The role of a *Brucella abortus* lipoprotein in intracellular replication and pathogenicity in experimentally infected mice. *Microb Pathog* **54**, 34–39. Elsevier Ltd.
- Kim, J. A., Sha, Z. & Mayfield, J. E. (2000). Regulation of *Brucella abortus* catalase. *Infect Immun* **68**, 3861–3866.
- Kim, S., Watarai, M., Makino, S. I. & Shirahata, T. (2002). Membrane sorting during swimming internalization of *Brucella* is required for phagosome trafficking decisions. *Microb Pathog* **33**, 225–237.
- Kim, S., Watarai, M., Suzuki, H., Makino, S. I., Kodama, T. & Shirahata, T. (2004). Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*. *Microb Pathog* **37**, 11–19.

- Kittelberger, R., Hilbink, F., Hansen, M. F., Ross, G. P., de Lisle, G. W., Cloeckert, A. & de Bruyn, J. (1995). Identification and characterization of immunodominant antigens during the course of infection with *Brucella ovis*. *J Vet Diagn Invest* 7, 210–218.
- Knutton, S., Shaw, R. K., Anantha, R. P., Donnenberg, M. S. & Zorgani, A. A. (1999). The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. *Mol Microbiol* 33, 499–509.
- 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.
- Kott, R. W., Halver, G. C., Firehammer, B. & Thomas, V. M. (1988). Relationships between *Brucella ovis* semen culture and various semen and serology parameters. *Theriogenology* 29, 961–970.
- Köhler, S., Foulongne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M. & Liautard, J.-P. (2002). The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 15711–15716.

L

- Lacerda, T. L. S., Cardoso, P. G., Augusto de Almeida, L., Camargo, I. L. B. D. C., Afonso, D. A. F., Trant, C. C., Macedo, G. C., Campos, E., Cravero, S. L. & otros autores. (2010). Inactivation of formyltransferase (*wbkC*) gene generates a *Brucella abortus* rough strain that is attenuated in macrophages and in mice. *Vaccine* 28, 5627–5634.
- Lacerda, T. L. S., Salcedo, S. P. & Gorvel, J.-P. (2013). *Brucella* T4SS: the VIP pass inside host cells. *Curr Opin Microbiol* 16, 45–51.
- Lamontagne, J., Butler, H., Chaves-Olarte, E., Hunter, J., Schirm, M., Paquet, C., Tian, M., Kearney, P., Hamaidi, L. & otros autores. (2007). Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*. *J Proteome Res* 6, 1519–1529.
- Lamontagne, J., Forest, A., Marazzo, E., Denis, F., Butler, H., Michaud, J.-F., Boucher, L., Pedro, I., Villeneuve, A. & otros autores. (2009). Intracellular adaptation of *Brucella abortus*. *J Proteome Res* 8, 1594–1609.
- Lapaque, N., Moriyón, I., Moreno, E. & Gorvel, J.-P. (2005). *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol* 8, 60–66.
- Lavín, J. L., Binnewies, T. T., Pisabarro, A. G., Ussery, D. W., García-Lobo, J. M. & Oguiza, J. A. (2010). Differences in two-component signal transduction proteins among the genus *Brucella*: implications for host preference and pathogenesis. *Vet Microbiol* 144, 478–483.
- Lazzaroni, J. C., Germon, P., Ray, M. C. & Vianney, A. (1999). The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability. *FEMS Microbiol Lett* 177, 191–197.
- Lazzaroni, J. C. & Portalier, R. (1992). The *excC* gene of *Escherichia coli* K-12 required for cell envelope integrity encodes the peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL). *Mol Microbiol* 6, 735–742.
- LeVier, K., Phillips, R. W., Grippe, V. K., Roop, R. M. & Walker, G. C. (2000). Similar requirements of a plant symbiont and a mammalian pathogen for prolonged intracellular survival. *Science* 287, 2492–2493.
- LeVier, K. & Walker, G. C. (2001). Genetic analysis of the *Sinorhizobium meliloti* BacA protein: differential effects of mutations on phenotypes. *J Bacteriol* 183, 6444–6453.
- López-Goñi, I., García-Yoldi, D., Marín, C. M., De Miguel, M. J., Muñoz, P. M., Blasco, J. M., Jacques, I., Grayon, M., Cloeckert, A. & other authors. (2008). Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains. *J Clin Microbiol* 46, 3484–3487.
- López-Goñi, I. I., Guzmán-Verri, C. C., Manterola, L. L., Sola-Landa, A. A., Moriyón, I. I. & Moreno, E. E. (2002). Regulation of *Brucella* virulence by the two-component system BvrR/BvrS. *Vet Microbiol* 90, 329–339.
- López-Goñi, I. (2012). The Two-component System BvrR/BvrS: a Master Regulator of *Brucella* Virulence. *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*, pp. 201–209. Editado por I. López-Goñi & D. O'Callaghan. Norfolk, UK.

M

- Macedo, G. C. G., Magnani, D. M. D., Carvalho, N. B. N., Bruna-Romero, O. O., Gazzinelli, R. T. R. & Oliveira, S. C. S. (2008). Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection. *J Immunol* **180**, 1080–1087.
- Manterola, L. L., Tejero-Garcés, A. A., Ficapal, A. A., Shopayeva, G. G., Blasco, J. M. J., Marin, C. M. C. & López-Goñi, I. I. (2003). Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Brucella ovis* infection in semen samples from rams. *Vet Microbiol* **92**, 65–72.
- Manterola, L. L., Guzmán-Verri, C. C., Chaves-Olarte, E. E., Barquero-Calvo, E. E., de Miguel, M.-J. M., Moriyón, I. I., Grilló, M.-J. M., López-Goñi, I. I. & Moreno, E. E. (2007). BvrR/BvrS-controlled outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for *Brucella abortus* virulence. *Infect Immun* **75**, 4867–4874.
- Manterola, L. L., Moriyón, I. I., Moreno, E. E., Sola-Landa, A. A., Weiss, D. S. D., Koch, M. H. J. M., Howe, J. J., Brandenburg, K. K. & López-Goñi, I. I. (2005). The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides. *J Bacteriol* **187**, 5631–5639.
- Marchesini, M. I., Herrmann, C. K., Salcedo, S. P., Gorvel, J.-P. & Comerci, D. J. (2011). In search of *Brucella abortus* type IV secretion substrates: screening and identification of four proteins translocated into host cells through VirB system. *Cell Microbiol* **13**, 1261–1274.
- Marín, C. M., Barberán, M., Jiménez de Bagués, M. P. & Blasco, J. M. (1990). Comparison of subcutaneous and conjunctival routes of Rev1 vaccination for the prophylaxis of *Brucella ovis* infection in rams. *Res Vet Sci* **48**, 209–215.
- Marín, C. M., Jiménez de Bagués, M. P., Blasco, J. M., Gamazo, C., Moriyón, I. & Díaz, R. (1989). Comparison of three serological tests for *Brucella ovis* infection of rams using different antigenic extracts. *Vet Rec* **125**, 504–508.
- Martirosyan, A., Moreno, E. & Gorvel, J.-P. (2011). An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunol Rev* **240**, 211–234.
- Martín-Martín, A. I., Caro-Hernández, P., Orduña, A., Vizcaíno, N. & Fernández-Lago, L. (2008). Importance of the Omp25/Omp31 family in the internalization and intracellular replication of virulent *B. ovis* in murine macrophages and HeLa cells. *Microbes Infect* **10**, 706–710.
- Martín-Martín, A. I., Caro-Hernández, P., Sancho, P., Tejedor, C., Cloeckert, A., Fernández-Lago, L. & Vizcaíno, N. (2009). Analysis of the occurrence and distribution of the Omp25/Omp31 family of surface proteins in the six classical *Brucella* species. *Vet Microbiol* **137**, 74–82.
- Martín-Martín, A. I., Sancho, P., De Miguel, M. J., Fernández-Lago, L. & Vizcaíno, N. (2012). Quorum-Sensing and BvrR/BvrS Regulation, the Type IV Secretion System, Cyclic Glucans, and BacA in the Virulence of *Brucella ovis*: Similarities to and Differences from Smooth Brucellae. *Infect Immun* **80**, 1783–1793.
- Martín-Martín, A. I., Sancho, P., Tejedor, C., Fernández-Lago, L. & Vizcaíno, N. (2011). Differences in the outer membrane-related properties of the six classical *Brucella* species. *Vet J* **189**, 103–105.
- Martín-Martín, A. I., Vizcaíno, N. & Fernández-Lago, L. (2010). Cholesterol, ganglioside GM1 and class A scavenger receptor contribute to infection by *Brucella ovis* and *Brucella canis* in murine macrophages. *Microbes Infect* **12**, 246–251.
- Martínez de Tejada, G. & Moriyón, I. (1993). The outer membranes of *Brucella* spp. are not barriers to hydrophobic permeants. *J Bacteriol* **175**, 5273–5275.
- Martínez de Tejada, G., Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E. & Moriyón, I. (1995). The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect Immun* **63**, 3054–3061.
- Martínez-Núñez, C., Altamirano-Silva, P., Alvarado-Guillén, F., Moreno, E., Guzmán-Verri, C. & Chaves-Olarte, E. (2010). The two-component system BvrR/BvrS regulates the expression of the type IV secretion system VirB in *Brucella abortus*. *J Bacteriol* **192**, 5603–5608.
- McQuiston, J. R., Vemulapalli, R., Inzana, T. J., Schurig, G. G., Sriranganathan, N., Fritzinger, D., Hadfield, T. L., Warren, R. A., Lindler, L. E. & otros autores. (1999). Genetic characterization of a Tn5-disrupted glycosyltransferase gene homolog in *Brucella abortus* and its effect on lipopolysaccharide composition and virulence. *Infect Immun* **67**, 3830–3835.
- Meador, V. P. & Deyoe, B. L. (1989). Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine placenta. *Vet Pathol* **26**, 513–515.

- Meikle, P. J., Perry, M. B., Cherwonogrodzky, J. W. & Bundle, D. R. (1989). Fine structure of A and M antigens from *Brucella* biovars. *Infect Immun* **57**, 2820–2828.
- Menzies, P. I. (2012). Vaccination programs for reproductive disorders of small ruminants. *Anim Reprod Sci* **130**, 162–172.
- Meyer, K. F. & Shaw, E. B. (1920). A comparison of the morphologic, cultural and biochemical characteristics of *B. abortus* and *B. melitensis* from cattle. Studies on the Genus *Brucella* Nov. Gen. I. *J Infect Dis* **27**, 173–184.
- Miller, V. L. & Mekalanos, J. J. (1988). A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J Bacteriol* **170**, 2575–2583.
- Montaraz, J. A. & Winter, A. J. (1986). Comparison of living and nonliving vaccines for *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Infect Immun* **53**, 245–251.
- Moreno, E., Berman, D. T. & Boettcher, L. A. (1981). Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infect Immun* **31**, 362–370.
- Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M. & Mayer, H. (1990). *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class *Proteobacteria*. *J Bacteriol* **172**, 3569–3576.
- Moreno, E. & Moriyón, I. (2002). *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 1–3.
- Moriyón, I. & Berman, D. T. (1982). Effects of nonionic, ionic, and dipolar ionic detergents and EDTA on the *Brucella* cell envelope. *J Bacteriol* **152**, 822–828.
- Moriyón, I. & López-Goñi, I. (1998). Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Int Microbiol* **1**, 19–26.
- Moriyón, I., Grilló, M.-J., Monreal, D., González, D., Marín, C., López-Goñi, 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.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**, 2348–2357.
- Mossey, P., Hudacek, A. & Das, A. (2010). *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion protein VirB3 is an inner membrane protein and requires VirB4, VirB7, and VirB8 for stabilization. *J Bacteriol* **192**, 2830–2838.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263–273.
- Muñoz, P.-M., de Miguel, M. J., Grilló, M.-J., Marín, C.-M., Barberán, M. & Blasco, J.-M. (2008). Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. *Vaccine* **26**, 2562–2569.
- Murillo, M., Goñi, M. M., Irache, J. M., Arangoa, M. A., Blasco, J. M. & Gamazo, C. (2002). Modulation of the cellular immune response after oral or subcutaneous immunization with microparticles containing *Brucella ovis* antigens. *J Control Release* **85**, 237–246.
- Murphy, E. A., Parent, M., Sathiyaseelan, J., Jiang, X. & Baldwin, C. L. (2001). Immune control of *Brucella abortus* 2308 infections in BALB/c mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* **32**, 85–88.
- Murphy, T. F., Kirkham, C. & Lesse, A. J. (2006). Construction of a mutant and characterization of the role of the vaccine antigen P6 in outer membrane integrity of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **74**, 5169–5176.
- Myeni, S., Child, R., Ng, T. W., Kupko, J. J., Wehrly, T. D., Porcella, S. F., Knodler, L. A. & Celli, J. (2013). *Brucella* Modulates Secretory Trafficking via Multiple Type IV Secretion Effector Proteins. *PLoS Pathog* **9**, e1003556.
- Myers, D. M. (1973). Field evaluation of the gel diffusion test for the diagnosis of ram epididymitis caused by *Brucella ovis*. *Appl Microbiol* **26**, 855–857.
- Myers, D. M., Jones, L. M. & Varela-Diaz, V. M. (1972). Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by *Brucella ovis* and other *Brucella*. *Appl Microbiol* **23**, 894–902.

N

- Naroeni, A. & Porte, F. (2002). Role of cholesterol and the ganglioside GM(1) in entry and short-term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect Immun* **70**, 1640–1644.
- Nicoletti, P. (1990). Vaccination against *Brucella*. *Adv Biotechnol Processes* **13**, 147–168.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 593–656.

O

- O'Callaghan, D., Cazeville, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M. L., Bourg, G., Foulongne, V., Frutos, P., Kulakov, Y. & Ramuz, M. (1999). A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol Microbiol* **33**, 1210–1220.
- Oliveira, S. C., Harms, J. S., Banai, M. & Splitter, G. A. (1996). 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.
- Oliveira, S. C., de Almeida, L. A., Carvalho, N. B., Oliveira, F. S. & Lacerda, T. L. S. (2012). Update on the role of innate immune receptors during *Brucella abortus* infection. *Vet Immunol Immunopathol* **148**, 129–135.
- Oliveira, S. C., de Oliveira, F. S., Macedo, G. C., de Almeida, L. A. & Carvalho, N. B. (2008). The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: Toll-like receptors and beyond. *Microbes Infect* **10**, 5–5.
- OIE. (2009). Epididimitis Ovina (*Brucella ovis*). *Manual de la Organización Mundial de Salud Animal sobre Animales Terrestres*. Editado por la Organización Mundial de Salud Animal.
- OIE. (2004). *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. Editado por la Organización Mundial de Salud Animal.
- Osterman, B. & Moriyón, I. (2006). International Committee on Systematics of Prokaryotes, Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1173–1175.

P

- Paixão, T. A., Roux, C. M., Hartigh, den, A. B., Sankaran-Walters, S., Dandekar, S., Santos, R. L. & Tsolis, R. M. (2009). Establishment of systemic *Brucella melitensis* infection through the digestive tract requires urease, the type IV secretion system, and lipopolysaccharide O antigen. *Infect Immun* **77**, 4197–4208.
- Palacios-Chaves, L., Conde-Álvarez, R., Gil-Ramírez, Y., Zúñiga-Ripa, A., Barquero-Calvo, E., Chacón-Díaz, C., Chaves-Olarte, E., Arce-Gorvel, V., Gorvel, J.-P. & otros autores. (2011). *Brucella abortus* ornithine lipids are dispensable outer membrane components devoid of a marked pathogen-associated molecular pattern. *PLoS ONE* **6**, e16030.
- Palmer, D. A. & Douglas, J. T. (1989). Analysis of *Brucella* lipopolysaccharide with specific and cross-reacting monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* **27**, 2331–2337.
- Palomares-Resendiz, E., Arellano-Reynoso, B., Hernández-Castro, R., Tenorio-Gutiérrez, V., Salas-Téllez, E., Suárez-Güemes, F. & Díaz-Aparicio, E. (2012). Immunogenic response of *Brucella canis* virB10 and virB11 mutants in a murine model. *Front Cell Infect Microbiol* **2**, 35.
- Paolicchi, F. A. (2001). Epididimitis de los carneros por *Brucella ovis*. Editado por D. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Madrid, España.
- Parent, M. A., Goenka, R., Murphy, E., LeVier, K., Carreiro, N., Golding, B., Ferguson, G., Roop, R. M., II, Walker, G. C. & Baldwin, C. L. (2007). *Brucella abortus* bacA mutant induces greater pro-inflammatory cytokines than the wild-type parent strain. *Microbes Infect* **9**, 55–62.
- Parsons, L. M., Grishaev, A. & Bax, A. (2008). The periplasmic domain of TolR from *Haemophilus influenzae* forms a dimer with a large hydrophobic groove: NMR solution structure and comparison to SAXS data. *Biochemistry* **47**, 3131–3142.

- Parsons, L. M., Lin, F. & Orban, J. (2006). Peptidoglycan recognition by Pal, an outer membrane lipoprotein. *Biochemistry* **45**, 2122–2128.
- Parsons, L. M. & Orban, J. (2005). NMR assignment of the periplasmic domain of peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) from *Haemophilus influenzae*. *J Biomol NMR* **32**, 93.
- Pasquali, P., Adone, R., Gasbarre, L. C., Pistoia, C. & Ciuchini, F. (2001). Mouse cytokine profiles associated with *Brucella abortus* RB51 vaccination or *B. abortus* 2308 infection. *Infect Immun* **69**, 6541–6544.
- Pasquevich, K. A., Garcia Samartino, C., Coria, L. M., Estein, S. M., Zwerdling, A., Ibanez, A. E., Barrionuevo, P., Oliveira, F. S. D., Carvalho, N. B. & otros autores. (2010). The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells *in vivo*, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuvanting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis. *J Immunol* **184**, 5200–5212.
- Paulsen, I. T., Seshadri, R., Nelson, K. E., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., Read, T. D., Dodson, R. J., Umayam, L., Brinkac, L. M. & otros autores. (2002). The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 13148–13153.
- Pei, J. & Ficht, T. A. (2004). *Brucella abortus* rough mutants are cytopathic for macrophages in culture. *Infect Immun* **72**, 440–450.
- Pei, J., Turse, J. E., Wu, Q. & Ficht, T. A. (2006). *Brucella abortus* rough mutants induce macrophage oncosis that requires bacterial protein synthesis and direct interaction with the macrophage. *Infect Immun* **74**, 2667–2675.
- Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (2000). Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes Infect* **2**, 829–835.
- Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E., Sanguedolce, V., Mege, J. L. & Gorvel, J. P. (1998). Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect Immun* **66**, 2387–2392.
- Plommet, M. & Plommet, A. M. (1988). Virulence of *Brucella*: bacterial growth and decline in mice. *Ann Rech Vet* **19**, 65–67.
- Porte, F., Liautard, J. P. & Köhler, S. (1999). Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect Immun* **67**, 4041–4047.
- Pugsley, A. P. (1993). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**, 50–108.

Q

- Qin, Q.-M., Pei, J., Ancona, V., Shaw, B. D., Ficht, T. A. & de Figueiredo, P. (2008). RNAi screen of endoplasmic reticulum-associated host factors reveals a role for IRE1alpha in supporting *Brucella* replication. *PLoS Pathog* **4**, e1000110.
- Quispe, R., Rivera, H. & Rosadio, R. (2002). Cinética de la infección por *Brucella ovis* en carneros durante una época de empadre. *Rev Inv Vet Perú* **13**, 61–66.

R

- Radhakrishnan, G. K., Yu, Q., Harms, J. S. & Splitter, G. A. (2009). *Brucella* TIR domain-containing protein mimics properties of the Toll-like receptor adaptor protein TIRAP. *J Biol Chem* **284**, 9892–9898.
- Rambow-Larsen, A. A., Rajashekara, G., Petersen, E. & Splitter, G. (2008). Putative quorum-sensing regulator BlxR of *Brucella melitensis* regulates virulence factors including the type IV secretion system and flagella. *J Bacteriol* **190**, 3274–3282.
- Ridler, A. L., West, D. M. & Collett, M. G. (2012). Pathology of *Brucella ovis* infection in red deer stags (*Cervus elaphus*). *N Z Vet J* **60**, 146–149.
- Ridler, A. L. & West, D. M. (2011). Control of *Brucella ovis* infection in sheep. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **27**, 61–66.
- Ried, J. L. & Collmer, A. (1987). An *nptI-sacB-sacR* cartridge for constructing directed, unmarked mutations in gram-negative bacteria by marker exchange-eviction mutagenesis. *Gene* **57**, 239–246.

- Riquelme-Neira, R., Retamal-Díaz, A., Acuña, F., Riquelme, P., Rivera, A., Sáez, D. & Oñate, A. (2013). Protective effect of a DNA vaccine containing an open reading frame with homology to an ABC-type transporter present in the genomic island 3 of *Brucella abortus* in BALB/c mice. *Vaccine* **31**, 3663–3667.
- Ris, D. R., Hamel, K. L. & Long, D. L. (1984). Comparison of an enzyme-linked immunospecific assay (ELISA) with the cold complement fixation test for the serodiagnosis of *Brucella ovis* infection. *N Z Vet J* **32**, 18–20.
- Robles, C. & Olaechea, F. (2001). Salud y enfermedades de las majadas. *Ganadería Ovina Sustentable en la Patagonia*. Grupo de Salud Animal. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria Bariloche. Argentina.
- Roggenkamp, A., Neuberger, H. R., Flügel, A., Schmoll, T. & Heesemann, J. (1995). Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol Microbiol* **16**, 1207–1219.
- Rojas, N., Freer, E., Weintraub, A., Ramirez, M., Lind, S. & Moreno, E. (1994). Immunochemical identification of *Brucella abortus* lipopolysaccharide epitopes. *Clin Diagn Lab Immunol* **1**, 206–213.
- Rolán, H. G., Xavier, M. N., Santos, R. L. & Tsolis, R. M. (2009). Natural antibody contributes to host defense against an attenuated *Brucella abortus* *virB* mutant. *Infect Immun* **77**, 3004–3013.
- Roop, R. M., Bellaire, B. H., Valderas, M. W. & Cardelli, J. A. (2004). Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche. *Mol Microbiol* **52**, 621–630.
- Roop, R. M., Gaines, J. M., Anderson, E. S., Caswell, C. C. & Martin, D. W. (2009). Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol* **198**, 221–238.
- Roop, R. M., Robertson, G. T., Ferguson, G. P., Milford, L. E., Winkler, M. E. & Walker, G. C. (2002). Seeking a niche: putative contributions of the *hfq* and *bacA* gene products to the successful adaptation of the *brucellae* to their intracellular home. *Vet Microbiol* **90**, 349–363.
- Roset, M. S., Ciochini, A. E., Ugalde, R. A. & Iñón de Iannino, N. (2004). Molecular cloning and characterization of *cgt*, the *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan transporter gene, and its role in virulence. *Infect Immun* **72**, 2263–2271.
- Roset, M. S., Ciochini, A. E., Ugalde, R. A. & Iñón de Iannino, N. (2006). The *Brucella abortus* cyclic beta-1,2-glucan virulence factor is substituted with O-ester-linked succinyl residues. *J Bacteriol* **188**, 5003–5013.
- Rouot, B., Alvarez-Martinez, M.-T., Marius, C., Menanteau, P., Guilloteau, L., Boigegrain, R.-A., Zumbihl, R., O'Callaghan, D., Domke, N. & Baron, C. (2003). Production of the type IV secretion system differs among *Brucella* species as revealed with VirB5- and VirB8-specific antisera. *Infect Immun* **71**, 1075–1082.

S

- Salcedo, S. P., Marchesini, M. I., Degos, C., terwagne, M., Barga, von, K., Lepidi, H., Herrmann, C. K., Santos Lacerda, T. L., Imbert, P. R. C. & other authors. (2013). BtpB, a novel *Brucella* TIR-containing effector protein with immune modulatory functions. *Front Cell Infect Microbiol* **3**, 28.
- Salcedo, S. P., Marchesini, M. I., Lelouard, H., Fugier, E., Jolly, G., Balor, S., Muller, A., Lapaque, N., Demaria, O. & otros autores. (2008). *Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1. *PLoS Pathog* **4**, e21.
- Salhi, I., Boigegrain, R.-A., Machold, J., Weise, C., Cloeckert, A. & Rouot, B. (2003). Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *Infect Immun* **71**, 4326–4332.
- Samartino, L. E. & Enright, F. M. (1993). Pathogenesis of abortion of bovine brucellosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **16**, 95–101.
- Sangari, F. J., Cayón, A. M., Seoane, A. & García-Lobo, J. M. (2010). *Brucella abortus* *ure2* region contains an acid-activated urea transporter and a nickel transport system. *BMC Microbiol* **10**, 107.
- Sangari, F. J., Seoane, A., Rodríguez, M. C., Agüero, J. & García-Lobo, J. M. (2007). Characterization of the urease operon of *Brucella abortus* and assessment of its role in virulence of the bacterium. *Infect Immun* **75**, 774–780.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463–5467.
- Saraiva, M. & O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* **10**, 170–181.

- Sathiyaseelan, J., Goenka, R., Parent, M., Benson, R. M., Murphy, E. A., Fernandes, D. M., Foulkes, A. S. & Baldwin, C. L. (2006). Treatment of *Brucella*-susceptible mice with IL-12 increases primary and secondary immunity. *Cell Immunol* **243**, 1–9.
- Sá, J. C., Silva, T. M. A., Costa, E. A., Ana P.C. Silva, Tsolis, R. M., Paixão, T. A., Neta, A. V. C. & Santos, R. L. (2012). The *virB*-encoded type IV secretion system is critical for establishment of infection and persistence of *Brucella ovis* infection in mice. *Vet Microbiol* **159**, 130–140.
- Schmidt-Eisenlohr, H., Domke, N., Angerer, C., Wanner, G., Zambryski, P. C. & Baron, C. (1999). Vir proteins stabilize VirB5 and mediate its association with the T pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **181**, 7485–7492.
- Scholz, H. C., Hubalek, Z., Sedláček, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Dahouk, Al, S., Melzer, F., Kämpfer, P., Neubauer, H. & otros autores. (2008). *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 375–382.
- Scholz, H. C., Kämpfer, P. & Cloeckert, A. (2012). *Brucella*: Relationship to Other *Alphaproteobacteria*, Current Taxonomy and the Emergence of New Species. *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*, pp. 1–11. Editado por I. López-Goñi & D. O'Callaghan. Norfolk, UK.
- Scholz, H. C., Nöckler, K., Göllner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., Dahouk, Al, S., Kämpfer, P., Cloeckert, A. & otros autores. (2010). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 801–808.
- Schurig, G. G., Roop, R. M., Bagchi, T., Boyle, S., Buhman, D. & Sriranganathan, N. (1991). Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet Microbiol* **28**, 171–188.
- Schurig, G. G., Sriranganathan, N. & Corbel, M. J. (2002). Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol* **90**, 479–496.
- Shepard, C. C. (1959). Nonacid-fast bacteria and HeLa cells: their uptake and subsequent intracellular growth. *J Bacteriol* **77**, 701–714.
- Shin, S. & Roy, C. R. (2008). Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* **10**, 1209–1220.
- Sieira, R., Arocena, G. M., Bukata, L., Comerci, D. J. & Ugalde, R. A. (2010). Metabolic control of virulence genes in *Brucella abortus*: HutC coordinates *virB* expression and the histidine utilization pathway by direct binding to both promoters. *J Bacteriol* **192**, 217–224.
- Sieira, R., Arocena, G. M., Zorreguieta, A., Comerci, D. J. & Ugalde, R. A. (2012). A MarR-Type regulator directly activates transcription from the *Brucella abortus virB* promoter by sharing a redundant role with HutC. *J Bacteriol* **194**, 6431–6440.
- Sieira, R., Comerci, D. J., Sánchez, D. O. & Ugalde, R. A. (2000). A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J Bacteriol* **182**, 4849–4855.
- Silva, A. P. C., Macêdo, A. A., Costa, L. F., Turchetti, A. P., Bull, V., Pessoa, M. S., Araújo, M. S. S., Nascimento, E. F., Martins-Filho, O. A. & otros autores. (2013). *Brucella ovis* lacking a species-specific putative ATP-binding cassette transporter is attenuated but immunogenic in rams. *Vet Microbiol* **167**, 546–553.
- Silva, T. M. A., Paixão, T. A., Costa, E. A., Xavier, M. N., Sá, J. C., Moustacas, V. S., Hartigh, den, A. B., Carvalho Neta, A. V., Oliveira, S. C. & otros autores. (2011). Putative ATP-binding cassette transporter is essential for *Brucella ovis* pathogenesis in mice. *Infect Immun* **79**, 1706–1717.
- Skalsky, K., Yahav, D., Bishara, J., Pitlik, S., Leibovici, L. & Paul, M. (2008). Treatment of human brucellosis: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* **336**, 701–704.
- Snapper, C. M., McIntyre, T. M., Mandler, R., Pecanha, L. M., Finkelman, F. D., Lees, A. & Mond, J. J. (1992). Induction of IgG3 secretion by interferon gamma: a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens. *J Exp Med* **175**, 1367–1371.
- Snapper, C. M. & Paul, W. E. (1987). B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* **139**, 10–17.
- Sohlenkamp, C., López-Lara, I. M. & Geiger, O. (2003). Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. *Prog Lipid Res* **42**, 115–162.
- Sola-Landa, A., Pizarro-Cerdá, J., Grilló, M. J., Moreno, E., Moriyón, I., Blasco, J. M., Gorvel, J. P. & López-Goñi, I. (1998). A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol* **29**, 125–138.

- Starr, T., Child, R., Wehrly, T. D., Hansen, B., Hwang, S., López-Otin, C., Virgin, H. W. & Celli, J. (2012).** Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. *Cell Host Microbe* **11**, 33–45.
- Starr, T., Ng, T. W., Wehrly, T. D., Knodler, L. A. & Celli, J. (2008).** *Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment. *Traffic* **9**, 678–694.
- Stevens, M. G., Olsen, S. C., Pugh, G. W. & Brees, D. (1995).** Comparison of immune responses and resistance to brucellosis in mice vaccinated with *Brucella abortus* 19 or RB51. *Infect Immun* **63**, 264–270.
- Stoenner, H. G. & Lackman, D. B. (1957).** A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. *Am J Vet Res* **18**, 947–951.
- Struyvé, M., Moons, M. & Tommassen, J. (1991).** Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J Mol Biol* **218**, 141–148.
- Suarez, C. E., Pacheco, G. A. & Vigliocco, A. M. (1988).** Characterization of *Brucella ovis* surface antigens. *Vet Microbiol* **18**, 349–356.
- Suarez, C. E., Pacheco, G. A. & Vigliocco, A. M. (1991).** Immunochemical studies on a *Brucella ovis* specific protein antigen. *Vet Microbiol* **27**, 125–131.

T

- Takeda, K. (2005).** Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* **11**, 51–55.
- Takeda, K. & Akira, S. (2003).** Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol* **5**, 143–153.
- Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. (2003).** Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* **21**, 335–376.
- Taminiau, B., Daykin, M., Swift, S., Boschiroli, M. L., Tibor, A., Lestrade, P., De Bolle, X., O'Callaghan, D., Williams, P. & Letesson, J.-J. (2002).** Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Infect Immun* **70**, 3004–3011.
- Terradot, L. & Waksman, G. (2011).** Architecture of the *Helicobacter pylori* Cag-type IV secretion system. *FEBS J* **278**, 1213–1222.
- Terwagne, M., Bonnot, S. & Letesson, J.-J. (2012).** *Brucella* Quorum Sensing: Much more than sensing quorum. *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*, pp. 163–178. Editado por I. López-Goñi & D. O'Callaghan. Norfolk, UK.
- Thiele, O. W. & Schwinn, G. (1973).** The free lipids of *Brucella melitensis* and *Bordetella pertussis*. *Eur J Biochem* **34**, 333–344.
- Tibor, A., Decelle, B. & Letesson, J. J. (1999).** Outer membrane proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of *Brucella* spp. are lipoproteins. *Infect Immun* **67**, 4960–4962.
- Tibor, A., Saman, E., de Wergifosse, P., Cloeckaert, A., Limet, J. N. & Letesson, J. J. (1996).** Molecular characterization, occurrence, and immunogenicity in infected sheep and cattle of two minor outer membrane proteins of *Brucella abortus*. *Infect Immun* **64**, 100–107.
- Tibor, A., Weynants, V., Denoel, P., Lichtfouse, B., De Bolle, X., Saman, E., Limet, J. N. & Letesson, J. J. (1994).** Molecular cloning, nucleotide sequence, and occurrence of a 16.5-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus* with similarity to pal lipoproteins. *Infect Immun* **62**, 3633–3639.
- Tibor, A., Wansard, V., Bielartz, V., Delrue, R.-M., Danese, I., Michel, P., Walravens, K., Godfroid, J. & Letesson, J.-J. (2002).** Effect of *omp10* or *omp19* deletion on *Brucella abortus* outer membrane properties and virulence in mice. *Infect Immun* **70**, 5540–5546.
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.-J., Ludwig, W. & Kampfer, P. (2010).** Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 249–266.
- Tobias, L., Cordes, D. O. & Schurig, G. G. (1993).** Placental pathology of the pregnant mouse inoculated with *Brucella abortus* strain 2308. *Vet Pathol* **30**, 119–129.
- Tsolis, R. M. & O'Callaghan, D. (2012).** The *Brucella* VirB type IV secretion system. *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*, pp. 211–223. Editado por I. López-Goñi & D. O'Callaghan. Norfolk, UK.
- Tsolis, R. M., Seshadri, R., Santos, R. L., Sangari, F. J., Lobo, J. M. G., de Jong, M. F., Ren, Q., Myers, G., Brinkac, L. M. & otros autores. (2009).** Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *PLoS ONE* **4**, e5519.

U

- Uzureau, S., Godefroid, M., Deschamps, C., Lemaire, J., De Bolle, X. & Letesson, J.-J. (2007). Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*. *J Bacteriol* **189**, 6035–6047.
- Uzureau, S., Lemaire, J., Delaive, E., Dieu, M., Gaigneaux, A., Raes, M., De Bolle, X. & Letesson, J.-J. (2010). Global analysis of quorum sensing targets in the intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proteome Res* **9**, 3200–3217.

V

- Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev* **56**, 395–411.
- Velasco, J., Bengoechea, J. A., Brandenburg, K., Lindner, B., Seydel, U., González, D., Zähringer, U., Moreno, E. & Moriyón, I. (2000). *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. *Infect Immun* **68**, 3210–3218.
- Vemulapalli, R., Cravero, S., Calvert, C. L., Toth, T. E., Sriranganathan, N., Boyle, S. M., Rossetti, O. L. & Schurig, G. G. (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.
- Verger, J. M., Grimont, F., Grimont, P. A. & Grayon, M. (1984). *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic-acid hybridization. *Int J Syst Bacteriol* **35**, 292–295.
- Verger, J. M., Grimont, F., Grimont, P. A. & Grayon, M. (1987). Taxonomy of the genus *Brucella*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **138**, 235–238.
- 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.
- Viadas, C., Rodríguez, M. C., Sangari, F. J., Gorvel, J.-P., García-Lobo, J. M. & López-Goñi, I. (2010). Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system. *PLoS ONE* **5**, e10216.
- Vieira, A. L. S., Silva, T. M. A., Mol, J. P. S., Oliveira, S. C., Santos, R. L. & Paixão, T. A. (2012). MyD88 and TLR9 are required for early control of *Brucella ovis* infection in mice. *Res Vet Sci* **94**, 399–405.
- Vigliocco, A. M., Silva Paulo, P. S., Mestre, J., Briones, G. C., Draghi, G., Tossi, M. & Nielsen, K. (1997). Development and validation of an indirect enzyme immunoassay for detection of ovine antibody to *Brucella ovis*. *Vet Microbiol* **54**, 357–368.
- Vizcaíno, N., Caro-Hernández, P., Cloeckert, A. & Fernández-Lago, L. (2004). DNA polymorphism in the family of *Brucella* spp.: identification of a 1.7-kb inversion in and of a 15.1-kb genomic island, absent from , related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. *Microbes Infect* **6**, 821–834.
- Vizcaíno, N., Chordi, A. & Fernández-Lago, L. (1991). Characterization of smooth *Brucella* lipopolysaccharides and polysaccharides by monoclonal antibodies. *Res Microbiol* **142**, 971–978.
- Vizcaíno, N., Cloeckert, A., Verger, J., Grayon, M. & Fernández-Lago, L. (2000). DNA polymorphism in the genus *Brucella*. *Microbes Infect* **2**, 1089–1100.
- Vizcaíno, N., Cloeckert, A., Zygmunt, M. S. & Dubray, G. (1996). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* omp31 gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. *Infect Immun* **64**, 3744–3751.
- Vizcaíno, N., Cloeckert, A., Zygmunt, M. S. & Fernández-Lago, L. (1999). Molecular characterization of a *Brucella* species large DNA fragment deleted in *Brucella abortus* strains: evidence for a locus involved in the synthesis of a polysaccharide. *Infect Immun* **67**, 2700–2712.
- Vizcaíno, N., Cloeckert, A., Zygmunt, M. S. & Fernández-Lago, L. (2001a). Characterization of a *Brucella* species 25-kilobase DNA fragment deleted from *Brucella abortus* reveals a large gene cluster related to the synthesis of a polysaccharide. *Infect Immun* **69**, 6738–6748.
- Vizcaíno, N., Kittelberger, R., Cloeckert, A., Marín, C. M. & Fernández-Lago, L. (2001b). Minor nucleotide substitutions in the omp31 gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species. *Infect Immun* **69**, 7020–7028.

- Vizcaíno, N., Verger, J. M., Grayon, M., Zygmunt, M. S. & Cloeckaert, 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** (Pt 9), 2913–2921.
- Vizcaíno, N. & Cloeckaert, A. (2012). Biology and Genetics of the *Brucella* Outer Membrane. *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*, pp. 133-161. Editado por I. López-Goñi & D. O'Callaghan. Norfolk, UK.

W

- Wagner, M. A., Eschenbrenner, M., Horn, T. A., Kraycer, J. A., Mujer, C. V., Hagijs, S., Elzer, P. & DelVecchio, V. G. (2002). Global analysis of the *Brucella melitensis* proteome: Identification of proteins expressed in laboratory-grown culture. *Proteomics* **2**, 1047–1060.
- Wang, Y., Bai, Y., Qu, Q., Xu, J., Chen, Y., Zhong, Z., Qiu, Y., Wang, T., Du, X. & otros autores. (2011). The 16MvjbR as an ideal live attenuated vaccine candidate for differentiation between *Brucella* vaccination and infection. *Vet Microbiol* 1–9. Elsevier B.V.
- Wang, Z., Niu, J., Wang, S., Lv, Y. & Wu, Q. (2013). *In vivo* differences in the virulence, pathogenicity, and induced protective immunity of *wboA* mutants from genetically different parent *Brucella* spp. *Clin Vaccine Immunol* **20**, 174–180.
- Watanabe, K., Iwai, N., Tachibana, M., Furuoka, H., Suzuki, H. & Watarai, M. (2008). Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted (RANTES) contributes to abortion caused by *Brucella abortus* infection in pregnant mice. *J Vet Med Sci* **70**, 681–686.
- Watarai, M., Makino, S. I., Fujii, Y., Okamoto, K. & Shirahata, T. (2002a). Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol* **4**, 341–355.
- Watarai, M., Makino, S. I. & Shirahata, T. (2002b). An essential virulence protein of *Brucella abortus*, VirB4, requires an intact nucleoside-triphosphate-binding domain. *Microbiology* **148**, 1439–1446.
- Weeks, J. N., Galindo, C. L., Drake, K. L., Adams, G. L., Garner, H. R. & Ficht, T. A. (2010). *Brucella melitensis* VjbR and C12-HSL regulons: contributions of the N-dodecanoyl homoserine lactone signaling molecule and LuxR homologue VjbR to gene expression. *BMC Microbiol* **10**, 167.
- Weiss, D. S., Takeda, K., Akira, S., Zychlinsky, A. & Moreno, E. (2005). MyD88, but not toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. *Infect Immun* **73**, 5137–5143.
- Weynants, V., Gilson, D., Cloeckaert, A., Tibor, A., Denoel, P. A., Godfroid, F., Limet, J. N. & Letesson, J. J. (1997). Characterization of smooth lipopolysaccharides and O polysaccharides of *Brucella* species by competition binding assays with monoclonal antibodies. *Infect Immun* **65**, 1939–1943.
- Winter, A. J. (1987). Outer membrane proteins of *Brucella*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **138**, 87–89.
- WHO. (2006). *Brucellosis in humans and animals*. Editado por la Organización Mundial de la Salud.

X

- Xavier, M. N., Silva, T. M. A., Costa, E. A., Paixão, T. A., Moustacas, V. S., Carvalho, C. A., Sant'Anna, F. M., Robles, C. A., Gouveia, A. M. G. & otros autores. (2010). Development and evaluation of a species-specific PCR assay for the detection of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet Microbiol* **145**, 158–164.
- Xavier, M. N., Winter, M. G., Spees, A. M., Nguyen, K., Atluri, V. L., Silva, T. M. A., Bäumlner, A. J., Müller, W., Santos, R. L. & Tsolis, R. M. (2013). CD4+ T cell-derived IL-10 promotes *Brucella abortus* persistence via modulation of macrophage function. *PLoS Pathog* **9**, e1003454.

Y

Yuan, Q., Carle, A., Gao, C., Sivanesan, D., Aly, K. A., Höppner, C., Krall, L., Domke, N. & Baron, C. (2005). Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J Biol Chem* **280**, 26349–26359.

Z

- Zhan, Y. F., Stanley, E. R. & Cheers, C. (1991). Prophylaxis or treatment of experimental brucellosis with interleukin-1. *Infect Immun* **59**, 1790–1794.
- Zhan, Y. & Cheers, C. (1995). Differential induction of macrophage-derived cytokines by live and dead intracellular bacteria *in vitro*. *Infect Immun* **63**, 720–723.
- Zhan, Y. & Cheers, C. (1998). Control of IL-12 and IFN- γ production in response to live or dead bacteria by TNF and other factors. *J Immunol* **161**, 1447–1453.
- Zhan, Y., Liu, Z. & Cheers, C. (1996). Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms. *Infect Immun* **64**, 2782–2786.
- Zhan, Y., Yang, J. & Cheers, C. (1993). Cytokine response of T-cell subsets from *Brucella abortus*-infected mice to soluble *Brucella* proteins. *Infect Immun* **61**, 2841–2847.
- Zupan, J., Hackworth, C. A., Aguilar, J., Ward, D. & Zambryski, P. (2007). VirB1* promotes T-pilus formation in the vir-Type IV secretion system of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **189**, 6551–6563.
- Zwerdling, A., Delpino, M. V., Barrionuevo, P., Cassataro, J., Pasquevich, K. A., Samartino, C. G., Fossati, C. A. & Giambartolomei, G. H. (2008). *Brucella* lipoproteins mimic dendritic cell maturation induced by *Brucella abortus*. *Microbes Infect* **10**, 1346–1354. Elsevier Masson SAS.
- 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.
- Zygmunt, M. S., Dubray, G., Bundle, D. R. & Perry, M. P. (1988). Purified native haptens of *Brucella abortus* B19 and *B. melitensis* 16M reveal the lipopolysaccharide origin of the antigens. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **139**, 421–433.

Apéndices

AGID	Inmunodifusión en gel de agarosa (<i>Agar Gel Immunodiffusion</i>)
A-HSL	N-Acil-Homoserina Lactona
Amp	Ampicilina
BAB	Base de Agar Sangre N°2 (<i>Blood Agar Base N°2</i>)
BCCN	Colección de Cultivos de <i>Brucella</i> de Nouzilly (<i>Brucella Culture Collection of Nouzilly</i>)
BCV	Vacuola portadora de <i>Brucella</i> (<i>Brucella-Containing Vacuole</i>)
C β Gs	Glucanos cíclicos (<i>Cyclic β-Glucans</i>)
CDs	Células dendríticas
CITA	Centro de Investigación Tecnológica Agroalimentaria
D.E.	Desviación Estándar
DIG	Digoxigenina
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido
D.O.	Densidad Óptica
EEC	Compartimentos de los endosomas tempranos (<i>Early Endosomal Compartments</i>)
ERES	Dominios de salida del retículo endoplasmático (<i>Endoplasmic Reticulum Exit Sites</i>)
Estrep	Estreptomicina
FBS	Suero Bovino Fetal (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FC	Fijación de complemento
HS	Suero de Caballo (<i>Horse Serum</i>)
HBSS	Solución salina de Hanks (<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>)
HSE	Extracto salino caliente (<i>Hot Saline Extract</i>)
I-ELISA	Enzimoinmunoanálisis Indirecto (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleucina
IFN γ	Interferón gamma
IP	Intraperitoneal
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IV	Intravenosa
Kan	Kanamicina
KO	<i>Knockout</i>
LB	Medio Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido
OIE	Organización Mundial de Salud Animal
log	Logaritmo
ME	Membrana externa
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MOI	Multiplicidad de infección (<i>Multiplicity Of Infection</i>)

Abreviaturas, Acrónimos y Siglas

PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno (<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>)
PAL	Lipoproteína asociada al peptidoglicano (<i>Peptidoglycan-Associated Lipoprotein</i>)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
p.i.	Post-inoculación
PG	Peptidoglicano
PL	Fosfolípidos (<i>Phospholipids</i>)
PME	Proteínas de membrana externa
p/v	Peso/volumen
QS	Diálogo molecular (<i>Quorum Sensing</i>)
RE	Retículo endoplasmático
R-LPS	Lipopolisacárido en fase rugosa (<i>Rough-LPS</i>)
Sac	Sacarosa
SDS-I	Fracción insoluble en dodecil sulfato de sodio (<i>Sodium dodecyl sulfate-insoluble</i>)
S-LPS	Lipopolisacárido en fase lisa (<i>Smooth-LPS</i>)
Strep	Estreptomicina
T4SS	Sistema de secreción tipo IV (<i>Type IV Secretion System</i>)
Th	Linfocitos T colaboradores (<i>T helper</i>)
TIR	Receptor citoplasmático Toll/IL1 (<i>Toll/IL1 Receptor</i>)
TLR	Receptor tipo Toll (<i>Toll-Like Receptor</i>)
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral alpha (<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>)
TSA	Agar Tripticaseína de Soja (<i>Trypticasein Soy Agar</i>)
TSB	Caldo Tripticaseína de Soja (<i>Trypticasein Soy Broth</i>)
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
VLCFA	Ácidos grasos de cadena muy larga (<i>Very Long Chain Fatty Acid</i>)
v/v	Volumen/volumen
WT	<i>Wild Type</i>
WHO	Organización Mundial de Salud (<i>World Health Organization</i>)
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
YE	Extracto de Levadura (<i>Yeast Extract</i>)

