

Tesis Doctoral

Brucella abortus: tipificación molecular por MLVA en aislamientos locales, análisis in silico de sus lipoproteínas e implicancia de las lipoproteínas en virulencia

Hollender, Daiana

2015-07-14

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Hollender, Daiana. (2015-07-14). Brucella abortus: tipificación molecular por MLVA en aislamientos locales, análisis in silico de sus lipoproteínas e implicancia de las lipoproteínas en virulencia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Hollender, Daiana. "Brucella abortus: tipificación molecular por MLVA en aislamientos locales, análisis in silico de sus lipoproteínas e implicancia de las lipoproteínas en virulencia". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-07-14.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

***Brucella abortus*: tipificación molecular por MLVA en
aislamientos locales, análisis *in silico* de sus lipoproteínas e
implicancia de las lipoproteínas en virulencia**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Daiana Hollender

Director de tesis: Dr. Luis Samartino

Director Asistente: Bioq. Silvio Cravero

Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Artz

Lugar de trabajo: Institutos de Patobiología y Biotecnología, CICVyA, INTA
Buenos Aires

Fecha de defensa: 14 de julio de 2015.

***Brucella abortus*: tipificación molecular por MLVA en aislamientos locales, análisis *in silico* de sus lipoproteínas e implicancia de las lipoproteínas en virulencia**

Resumen

La brucelosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial, con un alto impacto en la salud pública y en la economía. De las 10 especies de *Brucella* reconocidas, *B. abortus* es la causante de la brucelosis bovina. La publicación del genoma de varias especies de *Brucella* facilitó el diseño de distintos esquemas basados en marcadores moleculares. El objetivo de la primera parte de la tesis fue emplear un esquema de análisis multilocus de VNTR (*Multiple Locus VNTR Analysis*, MLVA) en 58 aislamientos de *B. abortus* de Argentina. El empleo de este esquema de MLVA nos permitió discriminar entre las dos biovariedades de *B. abortus* analizadas y poner de manifiesto la gran diversidad de genotipos de esta especie circulantes en el país. Además, a través del análisis mediante goeBURST se pudo relacionar a todos los genotipos entre sí y proponer al genotipo de la biovariedad 2, E1, como genotipo fundador. Este hecho ya había sido propuesto por Margaret Meyer en los años 90 basándose únicamente evidencias bioquímicas, en este trabajo se aportan, además, evidencias moleculares.

Dada su localización expuesta, las lipoproteínas bacterianas cumplen una gran variedad de funciones, muchas de ellas asociadas a virulencia. En la actualidad, solo tres lipoproteínas de *B. abortus*, Omp10, Omp16 y Omp19, se encuentran bien caracterizadas. Como primer objetivo de la segunda parte de la tesis, nos propusimos conocer cuántas lipoproteínas están codificadas por el genoma de *B. abortus* S2308 y qué roles cumplen en la bacteria. Se identificaron 58 lipoproteínas de *B. abortus* mediante herramientas bioinformáticas. Para determinar su rol en virulencia, se generaron cepas mutantes mediante disrupción integrativa de los genes que codifican para 24 de ellas y posteriormente, se evaluó si presentan fenotipo atenuado en el modelo murino de infección esplénica. Una de las mutantes resultó atenuada (*B. abortus* Lp1, siendo BAB1_0009 el marco de lectura interrumpido) por lo que se realizaron diferentes estudios para caracterizarla. Posteriormente, se analizó la capacidad de generar una respuesta inmune protectora de la cepa mutante atenuada empleando el modelo de protección esplénica en ratones BALB/c. Los resultados mostraron una capacidad protectora superior a la generada por la cepa *B. abortus* S19, empleada como cepa vacunal en la actualidad en bovinos. Para determinar si la

atenuación en virulencia de la mutante en *B. abortus* también se observa al interrumpir los genes ortólogos de *B. suis* y *B. melitensis*, se construyeron las respectivas cepas mutantes, se evaluó su virulencia y se caracterizaron. Se confirmó el fenotipo atenuado sólo en la cepa mutante de *B. suis*. Esta parte de la tesis contribuyó a determinar los posibles roles que cumplirían las lipoproteínas en *B. abortus* y a identificar a una lipoproteína, OppA, codificada por BAB1_0009, que participaría en virulencia en *B. abortus* y *B. suis* y que, al menos la cepa mutante *B. abortus* Lp1, sería capaz de generar una respuesta inmune protectora en el modelo murino. Estos resultados sientan las bases para el diseño y evaluación de nuevas vacunas contra la brucelosis.

Palabras clave: *Brucella abortus*, brucelosis, MLVA, virulencia, lipoproteínas, vacunas.

***Brucella abortus*: molecular typing by MLVA of local isolates, *in silico* analysis of lipoproteins and study of their implication in virulence.**

Abstract

Brucellosis is a zoonotic disease, worldwide spread, which remains an important problem due to economic loss and public health concern. Of the ten species described, *B. abortus* is the causative agent of bovine brucellosis. Publication of microorganism genomes facilitates the design of molecular markers. The aim of the first part of the thesis was to employ Multiple Locus VNTR Analysis (MLVA) scheme for strains from Argentina isolated in our laboratory. This scheme allowed differentiating each isolate to *B. abortus* biovar 1 or biovar 2 and to show a wide diversity among the genotypes present in our country. Also, through goeBURST analysis all the genotypes were related and the genotype of biovar 2, E1, was proposed as founder genotype. This fact have been previously proposed by Margaret Meyer based only in biochemical evidence. Our work, also, provides molecular evidence in this sense.

Since lipoproteins are surface exposed, they accomplish a wide variety of roles, some of them related with virulence. Currently, only three lipoproteins of *B. abortus*, Omp10, Omp16 and Omp19, are well characterized. Our aim was to know how many lipoproteins are encoded by *B. abortus* S2308 genome and what their roles in the bacterium are. A total of 58 lipoproteins were identified by bioinformatic tools. To determine whether lipoproteins participate in functions related with virulence, 24 mutant strains were generated by integrative disruption of the genes that codes to the lipoproteins. Then, it was evaluated if they are attenuated in the murine model of splenic infection. One of them was attenuated (*B. abortus* Lp1, being BAB1_0009 the ORF interrupted) and therefore it was characterized. Also, the ability to induce a protective immune response was analyzed through the splenic protection model in BALB/c mice. The results show that the protection induced by *B. abortus* Lp1 was greater than the protection induced by *B. abortus* S19, which is the strain used as vaccine in bovine. In order to determine whether attenuation in virulence is also observed when the ortholog genes are interrupted in *B. suis* and *B. melitensis*, the corresponding mutant strains were constructed and characterized. Virulence of the mutant strains was evaluated. An attenuated phenotype was observed only in *B. suis* mutant strain. This part of the thesis contribute to determine the putative roles of lipoproteins in *B. abortus* and to identify a lipoprotein, OppA, encoded by BAB1_0009

that would be involved in virulence in *B. abortus* and *B. suis*. And, at least in *B. abortus* S2308, it would induce a protective immune response in the murine model. These results establish the basis for the development of new vaccines against brucellosis.

Key words: *Brucella abortus*, brucellosis, MLVA, virulence, lipoproteins, vaccines.

AGRADECIMIENTOS

A mis Directores, por haberme abierto las puertas de sus laboratorios para que pueda realizar esta tesis.

A mis compañeros del Instituto de Patobiología, especialmente a aquellos que formaron parte del Laboratorio de Brucelosis cuando empecé a trabajar allí y me enseñaron las técnicas básicas de laboratorio, Sandra, Estela y Eduardo. A Ceci y Sylvia por su amistad y humor. También quiero agradecer a María, Adriana, Bibiana, Carlos, Estelita y Norma por su colaboración en temas científicos y/o personales.

A los integrantes del Instituto de Biotecnología, especialmente a mis compañeros del Laboratorio de *Brucella*, Silvio, Marcos, Bernardo y Andrea, por haberme enseñado y ayudado tanto. Realmente fue un placer haber trabajado con ellos, en un ambiente cordial, ameno, respetuoso y de compañerismo. Infinitas gracias Andrea por tu inmensa colaboración en las correcciones de la tesis y acompañamiento en este momento final! También quiero agradecerles, por la ayuda que me brindaron, a integrantes de otros laboratorios y visitantes asiduos del nuestro, Karina, Paula y Martín.

A mi familia por su apoyo incondicional y estar siempre conmigo: mi mamá, mi tía Patricia, mis hermanos Ivana y Cristian, mi prima Martina y mi cuñada Jaqueline. Un agradecimiento extra a mi cuñada y a mi hermano por la sobrinita hermosa que tengo, Iris!. A los "Ales", a Emma, Marga y sus flías.

A mis amigas de siempre, Ana, Luli, Mechi y Pao, por ser una presencia constante en mi vida y por todos los sobrinos del corazón que me han dado.

A mis amigas de la Facultad, Caro y Ste con quienes comparto alegrías y decepciones del camino científico que hemos elegido.

A mi mamá, por la educación que me dió. Si no fuera por ella, no sería la persona que soy.

A mi hija Vicky, por ser la alegría de mi corazón. Y por cada minuto que no compartí con ella porque estaba escribiendo esta tesis.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	10
Generalidades de la brucelosis	11
Evolución del concepto de la enfermedad	11
El género <i>Brucella</i>	13
Estructura de la membrana	15
Biología de <i>Brucella spp.</i> : descripción de un patógeno sigiloso	18
Respuesta del sistema inmune ante la infección por <i>Brucella</i>	21
Epidemiología.....	24
Manifestaciones clínicas de la enfermedad	26
Diagnóstico, tratamiento y control	28
Reglamentación vigente en Argentina	30
Vacunas para la prevención de la brucelosis.....	32
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	36
Parte I.	37
Parte II.	38
MATERIALES Y MÉTODOS	39
PARTE I.....	40
Cepas bacterianas	40
Tipificación de las cepas mediante pruebas bioquímicas.....	42
Tipificación molecular mediante MLVA	42
Electroforesis en geles de poliacrilamida	44
Análisis del poder discriminatorio y de la relación genética.....	45
PARTE II.....	45
Análisis in silico.....	45
Bacterias: cepas y condiciones de crecimiento	46
Oligonucleótidos.....	47
Amplificaciones por PCR.....	48
Obtención del ADN.....	49
Electroforesis en geles de agarosa	50
Metodología del ADN recombinante	50
Obtención del fragmento a clonar	50
Construcción de los plásmidos.....	51
Transformación.....	51
Purificación de los plásmidos	52
Determinación de la orientación del inserto	52

Transformación de <i>Brucella</i>	53
Confirmación de la mutagénesis insercional.....	54
Caracterización de las mutantes	55
Curva de crecimiento.....	55
Sensibilidad a detergente, antibiótico y especies reactivas del oxígeno	55
Prueba de aglutinación con acriflavina.....	56
Sensibilidad al pH.....	56
Evaluación de la virulencia de las cepas mutantes en el modelo murino.....	57
Evaluación de la capacidad para generar una respuesta inmune protectora.....	58
Análisis estadístico	58
PARTE I: Tipificación molecular por MLVA de aislamientos de <i>B. abortus</i> de Argentina	60
INTRODUCCIÓN.....	61
RESULTADOS	67
Tipificación por métodos bioquímicos	68
Tipificación por MLVA	69
Análisis de la diversidad genética	72
Análisis de la relación entre los distintos genotipos.....	74
DISCUSIÓN.....	76
PARTE II: Lipoproteínas de <i>B. abortus</i>	84
INTRODUCCIÓN.....	85
Biosíntesis de lipoproteínas	87
Translocación de lipoproteínas a la membrana externa	91
Funciones de las lipoproteínas.....	97
Lipoproteínas de <i>B. abortus</i>	97
CAPÍTULO 1: Análisis <i>in silico</i> de las lipoproteínas de <i>B. abortus</i>	99
RESULTADOS	100
Predicción de las lipoproteínas de <i>B. abortus</i>	101
Clasificación funcional de las lipoproteínas de <i>B. abortus</i>	108
Lipoproteínas que participan en transporte.....	109
Lipoproteínas con actividad enzimática	110
Lipoproteínas involucradas en la estructura de membrana	111
Lipoproteínas que participan en otras funciones	112
Lipoproteínas sin rol funcional identificado	113
Lipoproteínas identificadas por un solo algoritmo.....	114
Análisis <i>in silico</i> de los componentes involucrados en la síntesis de lipoproteínas y su translocación a través de la membrana interna	115
DISCUSIÓN.....	118

CAPÍTULO 2: Evaluación del rol de las lipoproteínas de <i>B. abortus</i> en virulencia.....	121
RESULTADOS	126
Obtención de las cepas de <i>B. abortus</i> mutantes en los genes codificantes para posibles Lpps	127
Evaluación de la virulencia de las mutantes Lp de <i>B. abortus</i> en ratones	131
Caracterización de la mutante <i>B. abortus</i> Lp1	136
Evaluación de la capacidad protectora de la mutante atenuada <i>B. abortus</i> Lp1.....	143
Obtención de mutantes Lp1 en <i>B. suis</i> y <i>B. melitensis</i>	145
Evaluación de virulencia de <i>B. suis</i> Lp1 y <i>B. melitensis</i> Lp1	147
Caracterización de las mutantes <i>B. suis</i> Lp1 y <i>B. melitensis</i> Lp1.....	148
DISCUSIÓN.....	154
CONCLUSIONES & PERSPECTIVAS	166
ANEXOS.....	173
Anexo I: Total de Lpps identificadas por los dos predictores, Lipo (A) y LipoP (B) y presentes en la base de datos DOLOP (C).	174
Anexo II: ORFs que codifican para Lpps ortólogas en <i>B. abortus</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i> , <i>B. canis</i> y <i>B. ovis</i>	171
PUBLICACIONES.....	173
BIBLIOGRAFÍA.....	174

INTRODUCCIÓN GENERAL

Generalidades de la brucelosis

La brucelosis es una enfermedad infecciosa causada por bacterias del género *Brucella*, que afecta tanto a animales domésticos como salvajes, y que como puede ser transmitida al hombre, constituye una zoonosis. Esta enfermedad está mundialmente distribuida, siendo Medio Oriente, África, Asia, la cuenca del Mediterráneo y América Central y del Sur las regiones más afectadas. En nuestro país, la distribución de las distintas especies de *Brucella* se encuentra estrechamente relacionada a la actividad ganadera. Las infecciones por *Brucella melitensis* (*B. melitensis*) están asociadas al ganado caprino, localizado en el centro, oeste y norte del país, mientras que *Brucella suis* (*B. suis*) y *Brucella abortus* (*B. abortus*) tienen mayor incidencia en la región de la Pampa Húmeda donde predomina la explotación de ganado vacuno y porcino. La infección por *Brucella* en el ganado lleva a una reducción de la fertilidad, pérdida de peso y a una disminución en la producción lechera, resultando en grandes pérdidas económicas (Corbel, 1997; Samartino, 2002).

Evolución del concepto de la enfermedad (Beeson, 1956)

Si bien la brucelosis como enfermedad se definió a partir del aislamiento del agente causal, patrones compatibles con ésta ya habían sido descritos por Hipócrates en 450 A.C. Varios escritos médicos que datan de los siglos XVIII y XIX relatan casos de fiebre continua e intermitente que sugieren brucelosis. A esta enfermedad se la ha conocido con distintos nombres a lo largo de la historia: fiebre tifoidea intermitente, fiebre tifo-malaria, fiebre remitente, fiebre gástrica remitente del Mediterráneo, fiebre del Mediterráneo, fiebre de Gibraltar o Rock, fiebre de Malta, fiebre Napolitana, fiebre de Chipre y fiebre odulante. Sin embargo, la primera descripción apropiada de la enfermedad fue realizada por Jeffrey Marston en 1860, utilizando el nombre de fiebre remitente gástrica del Mediterráneo. En 1870, Henry Veale describió que un gran

número de personal militar británico con fiebre continua, de causas desconocidas, quedó inhabilitado en Malta, motivando una permanente necesidad de médicos. Dos de estos médicos, del Servicio Médico de la Armada Británica, quedaron inmortalizados en la historia de la medicina. El primero de ellos, David Bruce logró cultivar micrococos a partir del bazo de 4 casos fatales de fiebre de Malta y con estas observaciones publicó un trabajo en 1887 (Bruce, 1888). Tiempo después transmitió con éxito la enfermedad a monos, designó a esta enfermedad como fiebre de Malta y al agente etiológico como *Micrococcus melitensis*. Más tarde, Bruce fue trasladado a África, donde investigó la enfermedad llamada "Mukinyo" por los nativos de Uganda y descubrió que se trataba también de fiebre de Malta y que la fuente de la enfermedad eran las cabras. El segundo médico, M. Luis Hughes, hizo la descripción definitiva de la enfermedad, a la que decidió llamar fiebre ondulante debido al curso clínico de la misma. Hughes fue muerto en acción y sus estudios fueron continuados por Themistocles Zammit, un médico nativo con el cual trabajaba. En 1905 Zammit relacionó la leche de cabra con la brucelosis humana, esto provocó que un año después, la Comisión de la Fiebre de Malta prohibiera el consumo de leche de cabra y sus subproductos en establecimientos gubernamentales. Gracias a esta prohibición, hubo un descenso brusco de la enfermedad en personal del ejército, descenso que no se observó en la población civil. Esto demostró claramente que la brucelosis se contrae a través de la ingesta de leche sin pasteurizar de animales infectados.

La naturaleza del aborto contagioso en bovinos tuvo énfasis a principios del siglo XIX. Mediante el estudio de casos reportados de abortos bovinos, Nocard concluyó que el aborto se debe a la presencia de microorganismos entre la membrana fetal y el útero. Bernhard Bang logró aislar el microorganismo causante y lo nombró como *Bacillus abortus*. En 1895 Bang y su asistente Stribolt, en una necropsia de una vaca que había abortado encontraron abundante exudado gelatinoso e inodoro entre la pared

del útero y las membranas. Cuando lo observaron al microscopio descubrieron que estaba repleto de microorganismos intracelulares. Bang fue capaz de cultivar a estos microorganismos de forma bacilar. El hecho que Bruce haya descrito cocos y Bang bacilos fue un obstáculo para los trabajos posteriores ya que ocultaron la relación entre estos dos organismos. En 1918 Alice Evans relacionó *B. abortus* con *M. melitensis*. Ella identificó correctamente a *M. melitensis* como un bacilo y sugirió la designación de *B. melitensis*. Además, relacionó la enfermedad en humanos con la ingesta de leche de vaca.

Aunque las dos guerras mundiales obstaculizaron los avances en el estudio de la brucelosis, ya para ese entonces, las personas sabían que la brucelosis era principalmente una enfermedad de los animales domésticos, que resultaba en pérdidas económicas y que la enfermedad en humanos no se podía reducir o eliminar hasta tanto no se erradicara el reservorio de la enfermedad.

El género *Brucella*

De acuerdo con la secuencia del ARNr 16S, el género *Brucella* pertenece a la clase α -*proteobacteria*. Aunque *Brucella* es un patógeno animal de vida intracelular, está estrechamente relacionada con organismos del suelo, como *Ochrobactrum spp.*, con simbiontes de plantas, como *Rhizobium spp.*, y con patógenos de plantas, como *Agrobacterium spp.* (Moreno *et al.*, 1990).

Las bacterias del género *Brucella* son cocobacilos Gram negativos, intracelulares facultativos, inmóviles, que carecen de los factores de virulencia clásicos, como cápsulas, fimbrias, pili y plásmidos (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998b; Martirosyan *et al.*, 2011). Son resistentes a la desecación, en consecuencia, tienen una sobrevivencia en el medio ambiente muy elevada, por ejemplo 80 días en el suelo y hasta 8 meses en fetos abortados que se encuentran en oscuridad (Castro *et al.*, 2005). Los miembros

de este género no poseen plásmidos, probablemente debido a su estilo de vida intracelular.

Las diez especies reconocidas hasta el momento, se clasifican en terrestres y marinas, según el ambiente en que habita su hospedador preferencial. Recientemente, se ha reportado una nueva especie aislada de babuinos (*Papio spp.*), denominada *B. papionis*, que según análisis bioquímicos y moleculares pertenece a este género (Whatmore *et al.*, 2014). En la Tabla 1 se listan las distintas especies, su hospedador primario y grado de patogenicidad para el hombre. Además, *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* se encuentran subdivididas en biovariedades, según sus distintas características (Corbel, 1997). Estas biovariedades presentan variaciones locales en su distribución, con importancia epidemiológica.

Tabla 1: Especies de *Brucella*.

	Especie	Hospedador primario	Patogenicidad para el hombre
Especies terrestres	<i>B. abortus</i>	Bovinos	Media
	<i>B. melitensis</i>	Caprinos	Alta
	<i>B. suis</i>	Porcinos	Media
	<i>B. ovis</i>	Ovinos	Sin información
	<i>B. canis</i>	Cánidos	Media
	<i>B. microti</i>	Ratones de campo, zorros	Sin información
	<i>B. neotomae</i>	Roedores	Sin información
	<i>B. inopinata</i>	Desconocido	Media
	<i>B. papionis</i>	Babuinos	Sin información
Especies marinas	<i>B. pinnipedialis</i>	Focas	Sin información
	<i>B. ceti</i>	Cetáceos	Variada

Las especies de *Brucella* se caracterizan por tener una muy alta similitud en sus secuencias nucleotídicas. Sin embargo, tienen una amplia variedad en la preferencia de hospedadores, siendo variables también las características de la enfermedad que causan y la patogenicidad. Esta falta de diversidad ha dificultado el desarrollo de técnicas moleculares de tipificación, que ha sido muy gradual (Bricker y Halling, 1994;

Vizcaino *et al.*, 1997; Bricker *et al.*, 2003), pero gracias a la disponibilidad de las secuencias de los genomas de distintas especies de *Brucella*, este desarrollo se ha acelerado considerablemente en los últimos años. Históricamente, las especies de *Brucella* eran seis (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. suis*, *B. canis* y *B. neotomae*), pero la descripción de nuevas especies puso de manifiesto la necesidad de nuevos métodos de tipificación, ya que los métodos bioquímicos tradicionales (Alton *et al.*, 1988) tienen un alcance limitado para caracterizar a las nuevas especies.

Además de sus hospedadores primarios, *Brucella* puede infectar animales silvestres, que constituyen un reservorio importante de la enfermedad. Por ejemplo, se ha reportado la transmisión entre jabalíes y cerdos domésticos y entre ciervos y ganado (Pappas, 2010). Además de éstos reconocidos reservorios silvestres, se ha identificado la presencia de *Brucella spp.* en una gran variedad de especies, como en íbices (*Capra ibex*) de los Alpes franceses (Mick *et al.*, 2014), en bagres (*Clarias gariepinus*) del río Nilo en Egipto (El-Tras *et al.*, 2010) y hasta en armadillos (*Chaetophractus villosus*) de La Pampa, Argentina (Kin *et al.*, 2014). Sin lugar a dudas, los planes de erradicación de la brucelosis deberían contemplar el rol que tiene la fauna silvestre como reservorio de la enfermedad.

Estructura de la membrana

Al igual que otras bacterias Gram negativas, la envoltura celular (EC) de *Brucella* está formada por una membrana interna (MI), una membrana externa (ME) y un espacio periplasmático (EP) entre ambas, ocupado por una red de peptidoglicano (PG) y componentes solubles (Fig.1). Pero, a diferencia de otras Gram negativas, *Brucella* resiste la decoloración por ácidos débiles y los procedimientos clásicos de extracción de periplasma. Estas particularidades están dadas por la estructura peculiar de su ME. Los principales componentes de la membrana son el lipopolisacárido (LPS), las proteínas, las lipoproteínas y los fosfolípidos. El LPS es una molécula anfipática que

consta de tres partes, el lípido A, el núcleo o *core* y el polisacárido, cadena o antígeno O. El lípido A se encuentra inserto en la ME y está formado por un disacárido de dos unidades de glucosamina fosforilada, unidas por enlace β -1,6, esterificado con ácidos grasos de variada longitud de cadena. La heterogeneidad del lípido A está dada por las diferentes sustituciones de ácidos grasos. El lípido A de *Brucella* se encuentra fuertemente unido a proteínas de la ME. El *core* está compuesto por manosa, glucosa, 2-amino-2,6-dideoxi-D-glucosa (quinovosamina), 2-amino-2-deoxi-D-glucosa (glucosamina), ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico (KDO) y otros azúcares no identificados (Cardoso *et al.*, 2006). La presencia de grupos amino cargados positivamente en el *core* sería la responsable de la resistencia de *Brucella* a los péptidos catiónicos así como también evitaría el reconocimiento por parte de componentes de la inmunidad innata (Kubler-Kielb y Vinogradov, 2013). La cadena O es la porción más expuesta del LPS. Dependiendo de la presencia o ausencia de esta cadena, las cepas se denominan lisas (S-LPS por *smooth*) o rugosas (R-LPS por *rough*) debido a su apariencia morfológica. *B. canis* y *B. ovis* son especies de *Brucella* naturalmente rugosas y las restantes especies son lisas. El polisacárido O de las brucelas lisas es un homopolímero sin ramificar de N-fomil-perosamina, con un largo de cadena de 96 a 100 unidades glicosídicas (Bundle *et al.*, 1989).

Las proteínas de membrana externa de *Brucella* (*Outer membrane proteins*, Omp) se clasifican según sus pesos moleculares en tres grupos. El grupo 1 comprende proteínas de entre 89 y 94 kDa que participan de la biosíntesis de la envoltura celular. El grupo 2 incluye proteínas de entre 35 y 40 kDa que funcionan como porinas (Winter, 1987; Ficht *et al.*, 1989). El grupo 3 está compuesto por proteínas de menor tamaño (25 a 40 kDa) que interactúan fuertemente con el PG y con el LPS (Winter, 1987; Gamazo *et al.*, 1993; Cloeckert *et al.*, 1996a; Cloeckert *et al.*, 1996b). Estas proteínas, al estar expuestas en la membrana, son reconocidas por el sistema inmune

y dado que son inmunogénicas se ha estudiado su uso como antígenos vacunales (Moriyon y Lopez-Goni, 1998; Cloeckart *et al.*, 2002).

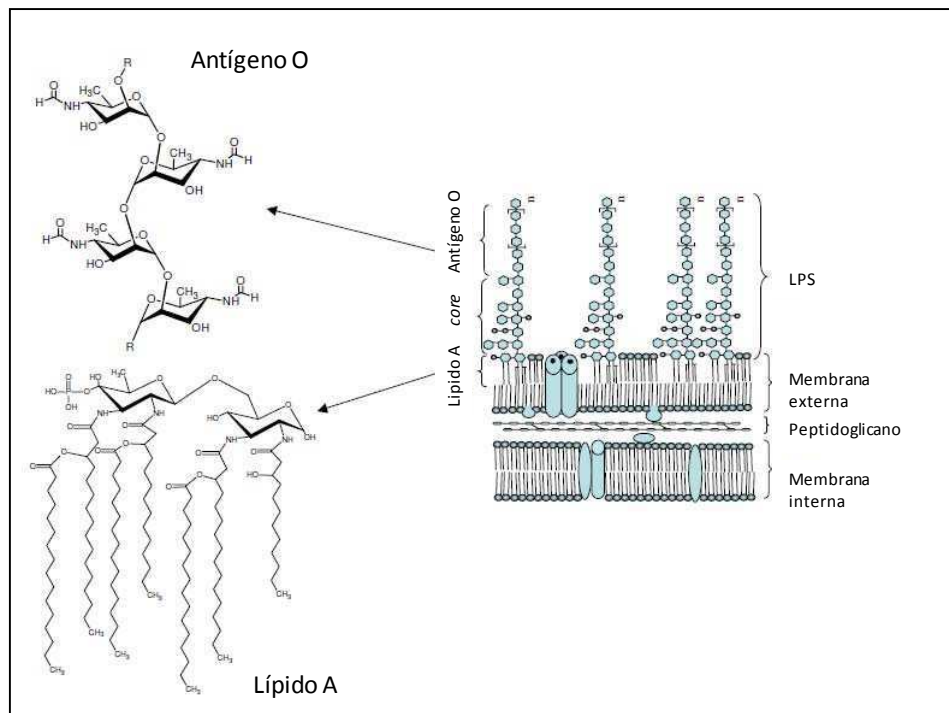


Figura 1: Estructura de la membrana de *Brucella* con énfasis en el LPS. El lípido A (lipid A) se encuentra inserto en la membrana externa y está formado por dos unidades de glucosamina esterificadas con cadenas de ácidos grasos de longitud variable. La cadena O (antígeno O) se encuentra únicamente en las cepas lisas de *Brucella*, es un homopolímero sin ramificar de N-fomil-perosamina. Tomado de Cardoso *et al.* (Cardoso *et al.*, 2006).

Las lipoproteínas (Lpps) son proteínas modificadas covalentemente por la adición de cadenas de ácidos grasos en su extremo amino terminal. Esta modificación lipídica les provee a las Lpps un anclaje a membrana. Tres Omp han sido caracterizadas como Lpps, Omp10, Omp16 y Omp19 (Tibor *et al.*, 1999), se ha estudiado el rol que cumplen en la bacteria (Tibor *et al.*, 2002; Giambartolomei *et al.*, 2004; Zwerdling *et al.*, 2008) y se ha evaluado su empleo como antígenos vacunales (Pasquevich *et al.*, 2009; Pasquevich *et al.*, 2010; Pasquevich *et al.*, 2011; Ibanez *et al.*, 2013).

Dentro de los fosfolípidos que componen la membrana de *Brucella* se encuentran la fosfatidilcolina (representa un 37 % de los fosfolípidos totales), fosfatidiletanolamina (33 %), cardiolipina (20 %) y fosfatidilglicerol (10 %) entre los más abundantes. La ME

se encuentra enriquecida en fosfatidilcolina, este fosfolípido tiende a formar bicapas más estables. Además, contiene lípidos de ornitina, que presentan carga negativa.

Biología de *Brucella spp.*: descripción de un patógeno sigiloso

Las bacterias ingresan en el organismo a través de las mucosas donde son fagocitadas por neutrófilos y monocitos y son transportadas a los sinusoides del hígado, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos, donde se multiplican en el interior de los macrófagos (Starr *et al.*, 2008). El blanco celular que posibilita la entrada de *Brucella* a las células aún no ha sido identificado (Gorvel, 2014). Un aspecto clave de la virulencia de *Brucella* es su habilidad para proliferar en las células fagocíticas, para esto ha desarrollado una estrategia sigilosa y furtiva que le permite escapar del reconocimiento por el sistema inmune y llegar a establecer su nicho replicativo dentro de los macrófagos (Barquero-Calvo *et al.*, 2007). *Brucella* resiste la acción bactericida de una gran cantidad de moléculas. Esta propiedad está relacionada con la composición particular de su ME, que genera una reducción en las cargas negativas de la superficie (Cardoso *et al.*, 2006) y como consecuencia, *Brucella* no une componentes del sistema de complemento ni péptidos catiónicos y es resistente a la acción de la mayoría de las sustancias bactericidas contenidas en los lisosomas (Barquero-Calvo *et al.*, 2007). Su particular LPS impide que las moléculas proinflamatorias se unan a la superficie bacteriana (Freer *et al.*, 1996). Otra característica de *Brucella* es que evita la fusión de la vacuola que contiene a *Brucella* (*Brucella*-containing vacuole, BCV) con los lisosomas, para esto altera la maduración de la BCV a lo largo de la vía endocítica. En su trabajo, Celli *et al.* (Celli *et al.*, 2003) postularon el siguiente modelo: luego de entrar en los macrófagos, *Brucella* reside en la BCV que interactúa con los endosomas tempranos. Esta BCV evita futuras interacciones con la vía endocítica perdiendo marcadores de endosomas tempranos y adquiriendo marcadores de endosomas tardíos/lisosomas como LAMP-1 y la pequeña

GTPasa Rab7 (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998a; Starr *et al.*, 2008) y se encuentra rodeada o en contacto cercano con el retículo endoplásmico (RE) en las primeras horas luego de la infección. La interacción se mantiene a lo largo del tiempo y lleva a eventos de fusión limitados que generan una organela derivada del ER, permisiva para la replicación de *Brucella*. Esta maduración de la BCV en macrófagos depende de VirB (que forma parte de un sistema de secreción tipo IV, involucrado en la secreción de proteínas efectoras de *Brucella*) y ocurre de manera similar a la descrita en células no fagocíticas (Pizarro-Cerda *et al.*, 1998a). La acidificación de la BCV es un paso esencial para la supervivencia intracelular de *Brucella* (Boschiroli *et al.*, 2002) y su tráfico hacia el RE (Starr *et al.*, 2008). El pH ácido en la BCV promueve la expresión del operon *virB* (Boschiroli *et al.*, 2002). Varios factores han sido implicados en el control del tráfico intracelular:

-Glucanos cíclicos: si bien se desconoce su mecanismo de acción, las cepas de *Brucella* mutantes que carecen de glucanos son incapaces de evitar la fusión de la BCV con los lisosomas (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005).

-LPS de *Brucella* (Br-LPS): el Br-LPS liberado intracelularmente podría unirse a la membrana y modificar la topología molecular de la vacuola requerida para la fusión lisosomal (Gonzalez *et al.*, 2008).

-Sistema regulatorio de dos componentes BvrS/BvrR: es crítico para la homeostasis y la estructura de la membrana externa de la bacteria (Manterola *et al.*, 2005; Manterola *et al.*, 2007). Una de sus acciones regulatorias la ejerce sobre el operon *virB* y también regula la expresión del activador transcripcional VjbR, que a su vez regula al operon *virB* (Delrue *et al.*, 2005; Viadas *et al.*, 2010).

Para establecer su nicho replicativo, *Brucella* tiene que adaptarse a la célula hospedadora sin despertar la respuesta del sistema inmune. La invasión por *Brucella* no induce cambios en la membrana de la célula hospedadora, no activa macrófagos ni

induce maduración de células dendríticas (Barquero-Calvo *et al.*, 2007; Salcedo *et al.*, 2008). *Brucella* no secreta sustancias que puedan dañar a la célula (exotoxinas, exozimas o moléculas endotóxicas), no invade el núcleo de la célula ni se escapa de la BCV al citoplasma (Gorvel y Moreno, 2002; Lamontagne *et al.*, 2009). *Brucella* es capaz de prolongar la vida de los macrófagos e inhibir la apoptosis en esas células sin inducir una activación significativa (Gross *et al.*, 2000; He *et al.*, 2006; Barquero-Calvo *et al.*, 2007). Otro factor propuesto como participante en la estrategia sigilosa de *Brucella* es la presencia de fosfatidilcolina en la envoltura celular. Este fosfolípido se encuentra en eucariotas y está ausente en procariotas. Un fosfolípido típico de eucariotas le permitiría a *Brucella* mimetizarse con la célula hospedadora para evitar ser reconocida como un agente extraño (Conde-Alvarez *et al.*, 2006).

Para evitar ser reconocida por el sistema inmune, *Brucella* tiene que desprenderse, modificar o esconder cualquier molécula que pueda ser considerada un patrón molecular asociado a patógeno (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs). *Brucella* está desprovista de muchas de las estructuras clásicas involucradas en la virulencia, como pili, fimbrias, cápsulas y plásmidos. Tanto *brucelas* vivas como muertas o fragmentos de su ME, que contienen grandes cantidades de Lpps, lípidos de ornitina, Br-LPS y polisacáridos, son débiles inductores de la respuesta inmune (Barquero-Calvo *et al.*, 2007). No hay acuerdo dentro de la comunidad científica acerca del rol de las Lpps de *Brucella* como moléculas proinflamatorias. Se ha visto que Omp19 clonada en *E. coli* es capaz de inducir la producción de citoquinas (Giambartolomei *et al.*, 2004). Con este resultado, se concluyó que las Lpps de *Brucella* son las responsables de disparar una respuesta proinflamatoria en la célula hospedadora. Pero Omp19 no acilada carece de actividad, por lo tanto, la actividad observada en la proteína recombinante se debería a sustituciones acilo propias de *E. coli* (Barquero-Calvo *et al.*, 2007). Además, fragmentos de ME de *Brucella*, que

contienen grandes cantidades de Lpps, son pobres activadores de macrófagos (Lamontagne *et al.*, 2007). *Brucella* muerta induce un nivel mayor de citoquinas que la bacteria viva en mutantes deficientes en TLR2 y TLR4 (Barquero-Calvo *et al.*, 2007), indicando que algún PAMP oculto se exhibiría cuando la bacteria se rompe. Otras evidencias sugieren que *Brucella* sería reconocida intracelularmente por un receptor desconocido, diferente del receptor convencional empleado para reconocer bacterias Gram negativas (Lapaque *et al.*, 2009).

Brucella también cuenta con un sistema de *quorum sensing* (QS), involucrado en la regulación de determinantes de virulencia (mayormente T4SS, Omps y LPS) (Letesson *et al.*, 2002) y que también sería útil para ajustar su metabolismo y de esa manera, evitaría multiplicarse hasta llegar a su nicho replicativo (Martin-Martin *et al.*, 2012; Terwagne *et al.*, 2013). Tanto el sistema de dos componentes BvrR/BvrS como el de QS contribuyen a la adaptación del metabolismo de *Brucella* durante el cambio en la disponibilidad de nutrientes que enfrenta la bacteria durante su tráfico intracelular (Barbier *et al.*, 2011).

Respuesta del sistema inmune ante la infección por *Brucella*

A pesar de su estrategia furtiva y sigilosa, *Brucella* no es completamente “invisible” para el sistema inmune que, aún así, puede detectarla y montar una respuesta de tipo *helper 1* (Th1) para controlar la infección (Murphy *et al.*, 2001a). Sin embargo, como la respuesta del sistema inmune no es suficiente para eliminar a la bacteria, se establece una infección crónica, caracterizada por un balance entre la virulencia del patógeno y la resistencia del hospedador.

La inmunidad innata es la responsable, en las etapas tempranas de la infección, de reducir el número de bacterias presentes y de proveer un ambiente para la generación de una respuesta Th1 por parte de la inmunidad adaptativa.

Inmunidad innata

-Sistema de complemento

Este sistema tiene un papel importante cuando las brucelas se encuentran en el medio extracelular y en bajo número. La interacción entre *Brucella* y el complemento estaría mediada por el Br-LPS. En general, las cepas lisas son más resistentes a los efectos bactericidas del complemento (Corbeil *et al.*, 1988).

-Neutrófilos

Los neutrófilos son la primera línea de defensa contra patógenos bacterianos, pero *Brucella* resiste la acción bactericida de los neutrófilos e induce su degranulación (Canning *et al.*, 1985). Como consecuencia, los neutrófilos constituyen el medio de diseminación de *Brucella* a los ganglios linfáticos, permitiendo luego su distribución por todo el sistema retículo endotelial (Laskay *et al.*, 2003). Además, se ha observado que los neutrófilos tienen un rol regulatorio en la inmunidad adaptativa, disminuyendo la respuesta Th1 contra *Brucella* (Barquero-Calvo *et al.*, 2013).

-Macrófagos

La actividad bactericida de los macrófagos comprende a las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, ambas son importantes para controlar la infección por *Brucella* en etapas tempranas (Ko *et al.*, 2002). Se ha demostrado que la ingestión y el estallido respiratorio dependen de la opsonización específica con anticuerpos y/o inespecífica con C3b (Young *et al.*, 1985) y que el interferon gama (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) influirían en el proceso de fagocitosis (Canning *et al.*, 1985).

-Células dendríticas

La maduración de las células dendríticas (CD) es un requisito para la inducción de una respuesta inmune del tipo Th1 (Colonna *et al.*, 2006). *Brucella spp.* es capaz de infectar y replicar en el interior de las CD (Billard *et al.*, 2005). Las Lpps de *Brucella*

pueden estimular la maduración de las CD (Macedo *et al.*, 2008; Zwerdling *et al.*, 2008) y de ésta manera modular la respuesta inmune hacia una del tipo Th1.

-Células *natural killer* (NK)

Se ha reportado que las células NK tienen un rol regulatorio en la producción de anticuerpos contra *Brucella* (Gao *et al.*, 2011).

Inmunidad adaptativa

Aunque la inmunidad innata es capaz de controlar la proliferación de *Brucella* durante las primeras etapas de la infección, es necesaria una respuesta inmune adaptativa eficiente para etapas posteriores (Baldwin y Goenka, 2006). No existen dudas sobre el rol fundamental del IFN- γ en la defensa contra *Brucella* (Murphy *et al.*, 2001b; Baldwin y Goenka, 2006). El IFN- γ producido por las células T activa la función bactericida de los macrófagos, que dificulta la sobrevivencia intracelular de la bacteria, siendo las células CD8⁺ las que juegan un rol crítico (Oliveira y Splitter, 1995; Murphy *et al.*, 2001a). Recientemente, se ha observado que también las células $\gamma\delta$ participan en etapas tempranas de la infección (Skyberg *et al.*, 2011). Además, el IFN- γ tiene influencia sobre el isotipo de los anticuerpos de la respuesta Th1 ante *Brucella*, siendo IgG2a e IgG3 los que predominan (Kurtz y Berman, 1986; Elzer *et al.*, 1994; Fernandes *et al.*, 1996). Estos anticuerpos opsonizan a la bacteria para facilitar su fagocitosis.

En humanos, se encuentran linfocitos T V γ pV δ 2 específicos anti *Brucella* que proliferan como consecuencia de la infección. Estos linfocitos dificultan el crecimiento intracelular de *Brucella* en cultivos de macrófagos infectados mediante la liberación de citoquinas y quimiocinas y también por actividad citolítica inducida por contacto directo (liberación de gránulos líticos y señales de muerte celular a través de Fas-L) y, más importante aún, por mediadores solubles como catelicidinas (Oliaro *et al.*, 2005; Dudal *et al.*, 2006).

Varias observaciones sugieren que ocurre una modulación del sistema inmune durante la brucelosis. El tratamiento con brucelas vivas o antígenos subcelulares durante la fase aguda o crónica de la brucelosis no modifica el curso de la infección en ratones por la cepa virulenta de *Brucella* (Jimenez de Bagues *et al.*, 1994). Por otra parte, se ha descrito un estado de inmunosupresión durante la brucelosis crónica y un aumento de células T CD4⁺CD25⁺ en el bazo, que estarían involucrados en la regulación de los linfocitos T efectores (Pasquali *et al.*; Oliveira y Splitter, 1995). Los eventos regulatorios podrían causar una eliminación deficiente de la bacteria de los órganos blanco debido a la baja activación de linfocitos citotóxicos CD8⁺ y el progresivo decrecimiento de la activación de macrófagos y CD, las células encargadas de eliminarla (Hort *et al.*, 2003). *Brucella* es capaz de interferir con el desarrollo de una respuesta inmune Th1 evitando la inducción de IL-12 y la actividad estimuladora de células T a las CD infectadas (Salcedo *et al.*, 2008). Las CD infectadas tienen una reducida capacidad para madurar y expresar MHCII (Salcedo *et al.*, 2008). En ratones, a través del contacto con CD inmaduras infectadas, los T CD4⁺ vírgenes inducen células T regulatorias específicas para *Brucella*, que pueden retrasar la respuesta adaptativa. También en humanos las CD inmaduras que interactúan con células T CD4⁺ vírgenes pueden inducir una actividad regulatoria e inhibir la respuesta Th1 de una manera dependiente del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) (Gandhi *et al.*, 2007). Estas observaciones sugieren que *Brucella* es capaz de dificultar la presentación de antígenos y luego interferir con la respuesta inmune innata y con la interrelación entre las respuestas innata y adaptativa.

Epidemiología

La distribución mundial de la enfermedad es muy variable, siendo mayor su prevalencia en países con bajos recursos económicos (Corbel, 1997). La brucelosis bovina se describe en casi todos los países que se dedican a la actividad ganadera

pero algunos países de Europa, Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda se consideran libres. En 2008, 12 países de la Unión Europea fueron declarados oficialmente libres de brucelosis en el ganado bovino, ovino y caprino y 15 países que no estaban declarados libres de la enfermedad informaron casos de brucelosis en el ganado bovino (prevalencia en rebaños afectados del 0,12 %) (Díaz Aparicio, 2013). En cuanto a Estados Unidos, todos los estados están clasificados como libres de *B. abortus* en ganado bovino, pero la infección persiste en animales salvajes de la zona de Yellowstone y sus alrededores, con una diseminación ocasional entre rebaños bovinos (Díaz Aparicio, 2013). En Argentina, la brucelosis es una enfermedad endémica pero la infección en humanos se encuentra subestimada y generalmente no es reportada. La prevalencia de la brucelosis bovina en países limítrofes es variable: 0,04 % en Uruguay, 10,20 % en el norte y 0,06 % en el sur de Brasil, 0,20 % en Chile, 3,15 % en Paraguay y 2,27 % en Bolivia (Aznar *et al.*, 2014). Un estudio realizado en 2004 arrojó que 12,40 % de los establecimientos ganaderos nacionales tienen serología positiva para *Brucella* y que la prevalencia aparente en el ganado es de 2,10 %.

En bovinos, la principal vía de entrada de *Brucella* es la oral, por la ingestión de alimento o agua contaminados por secreciones o restos de abortos de vacas infectadas, o bien por el lamido de las secreciones vaginales, los genitales, los fetos abortados y las crías recién nacidas de vacas infectadas. Se desestima a la vía venérea como relevante en la transmisión de la enfermedad, pero sí lo es el semen infectado y utilizado en la inseminación artificial. Aunque se ha demostrado que el ganado bovino presenta una considerable variación en su respuesta inmunitaria ante la exposición a las enfermedades y que ello en gran parte es atribuible a la genética, en general, las razas bovinas no presentan susceptibilidad ni resistencia genética a la brucelosis. La observación que las vacas lecheras tienen una mayor incidencia de la

enfermedad viene determinado por la convivencia cercana entre las reses, que se favorece en este tipo de explotación (Morris, 2007). La transmisión vertical fue demostrada por Plommet *et al.* (Plommet *et al.*, 1971), quienes mencionan que un 60% a 70% de los fetos nacidos de vacas infectadas nacen con la infección. Las terneras también pueden resultar infectadas durante el nacimiento en el momento de atravesar el canal del parto, o bien al mamar calostro o leche de vacas infectadas. La mayoría de ellas logran eliminar la bacteria, pero en un bajo porcentaje, pueden mantenerse infectadas hasta que son adultas, permaneciendo negativas a las pruebas serológicas de diagnóstico y abortando en la primera gestación. Estos animales suponen un serio problema para el control y la erradicación de la brucelosis (Wilesmith, 1978).

En humanos, las vías de transmisión pueden ser por contacto a través de la piel o mucosas con tejidos o productos infectados, por ingestión de alimentos no pasteurizados de origen animal (leche y sus derivados), por inhalación de polvo de lugares contaminados, por inoculación accidental de material infectado y perinatal, a través de la placenta, por ingestión de leche materna o por exposición a sangre, orina o las heces de la madre infectada durante el parto (Corbel, 2006).

Manifestaciones clínicas de la enfermedad

En las hembras, el síntoma principal es el aborto en periodos avanzados de la gestación, durante el cual se liberan grandes cantidades de bacterias. También se puede observar infertilidad, retención placentaria, nacimientos prematuros o a término de crías débiles o muertas, camadas pequeñas en el caso de las hembras politocas (perro y cerdo), metritis y disminución de la producción láctea. En los machos, la infección puede producir infertilidad, epididimitis y orquitis eliminando bacterias por semen y secundariamente por orina y dermatitis escrotal. También puede presentarse hepato y esplenomegalia, artritis y discoespondilitis, que se manifiestan con paresia o

ataxia, uveítis anterior como alteración oftalmológica, decaimiento y anorexia en periodos de bacteriemia.

Las vacas infectadas, luego de la parición, eliminan gérmenes en el calostro y la leche, sobre todo en la primera etapa de lactación, disminuyendo a medida que avanza la lactancia y pudiendo eliminar bacterias en forma intermitente hasta la tercera semana. En caso de mastitis intersticial, la liberación de *Brucella* es permanente. También se eliminan bacterias por heces y orina pero en menor número.

En el hombre, el cuadro clínico, la gravedad y la evolución de la infección varían en función de la especie de *Brucella* infectante, de la concentración del inóculo y del estado del paciente (Laplume *et al.*, 2013). El período de incubación en los humanos se estima que podría ser de 1 a 3 semanas, pero puede llegar a varios meses. Luego del periodo de incubación, la infección puede evolucionar a diferentes formas clínicas: asintomática o subclínica, aguda o crónica. Los síntomas característicos son fiebre continua, intermitente o irregular, de duración variable (10 a 30 días), cefalea, fatiga, diaforesis, mialgias, pérdida de peso, anorexia, malestar generalizado, con o sin signos de localización como: artritis /espondilitis, meningitis endocarditis, orquitis/epididimitis. El examen físico es inespecífico; el hallazgo más frecuente, en 30-50% de los casos es la hepatomegalia y/o esplenomegalia. La enfermedad osteoarticular es la complicación más común; se observa en 20 a 60% de los pacientes. El sistema genitourinario es el segundo sitio más común en la brucelosis focal, puede observarse en 2 al 20% de los casos. En el hombre se presenta como orquitis o epididimitis. La infección adquirida durante el embarazo constituye un riesgo de aborto espontáneo.

El concepto de brucelosis crónica considera la temporalidad de los síntomas (persistencia de manifestaciones clínicas mas allá de un año del episodio inicial aún luego del tratamiento adecuado) y la localización de la infección (con o sin enfermedad

localizada). La persistencia de altos títulos de anticuerpos IgG refuerza el diagnóstico pero no lo confirma ya que en pacientes con “cura clínica” los niveles de anticuerpos pueden persistir elevados durante períodos prolongados. La endocarditis sigue siendo la causa principal de mortalidad. En general, la válvula aórtica es la más afectada, y aunque la ausencia de signos de insuficiencia cardíaca permitiría hacer un tratamiento conservador, suele requerir el reemplazo quirúrgico de la válvula. Por lo general, los pacientes se recuperan, pero algunos pueden presentar lesiones persistentes e incapacidad severa. Sin tratamiento, la tasa de letalidad es menor al 2%. La forma crónica puede presentarse por recaídas sucesivas a partir de una forma aguda o asociarse a manifestaciones focales. También se ha descrito un síndrome de fatiga crónica. Las recaídas aparecen en el 10% de los casos, comunmente en el primer año después de la infección; presentan los mismos síntomas que la forma aguda aunque suelen ser menos intensos que el episodio inicial y pueden tratarse con cursos repetidos de los regímenes antibióticos habituales. La mayoría de los casos de recaída son causados por un tratamiento inadecuado.

Diagnóstico, tratamiento y control

El diagnóstico de la enfermedad se realiza por aislamiento de la bacteria o de manera indirecta, por métodos serológicos que detectan anticuerpos (Tabla 2). Ninguna prueba serológica aislada es adecuada en cualquiera de las situaciones epidemiológicas, presentando limitaciones en el diagnóstico de animales individuales (Godfroid *et al.*, 2002). Se deben considerar todos los factores que influyen en la relevancia del método de prueba y de sus resultados para una aplicación o interpretación diagnóstica específica.

Tabla 2: Métodos de diagnóstico serológico para brucelosis.

Pruebas de diagnóstico serológico para cepas lisas de <i>Brucella spp.</i>		
Utilidad	Prueba	Especificidad
Tamiz	Técnica de aglutinación en placa (Huddleson)	baja
	Técnica de aglutinación con antígeno tamponado (BPA)	muy alta
	Técnica de aglutinación con Rosa de Bengala (RBT)	alta
	Técnica de aglutinación en tubo (Wright)	baja
	Prueba de aglutinación 2-mercaptoetanol (2-ME)	baja
Confirmatoria	Técnica de fijación del complemento (FC)	alta
	C-ELISA (ELISA de competición)	muy alta
	I-ELISA (ELISA indirecto)	muy alta
	Polarización fluorescente (PF)	muy alta
Pruebas de diagnóstico serológico para cepas rugosas de <i>Brucella spp.</i>		
Utilidad	Prueba	Especificidad
Tamiz	Técnica de microaglutinación en portaobjeto (RSAT)	alta
Confirmatoria	C-ELISA (ELISA de competición)	alta
Pruebas de diagnóstico serológico para muestras de leche		
Utilidad	Prueba	Especificidad
Confirmatoria	I-ELISA (ELISA indirecto)	muy alta
	C-ELISA (ELISA de competición)	muy alta
Tamiz	Prueba del anillo de leche	baja

Las pruebas con antígeno tamponado de *Brucella*, es decir, la prueba con rosa de bengala (RBT) y la prueba de aglutinación tamponada en placa (BPAT), así como ELISA y FPA son adecuadas para el control de la brucelosis en un país o región . Las reacciones positivas deben verificarse utilizando una estrategia confirmatoria adecuada (OIE, 2008).

El objetivo de los programas de control de la brucelosis en animales es reducir el impacto de la enfermedad en humanos y las consecuencias económicas. Debe quedar en claro que eliminar la enfermedad de la población no es el fin de estos programas sino que está implícito que un nivel “aceptable” de infección queda remanente en la

población. En la mayoría de los países, los planes de control son establecidos por el gobierno. Los procedimientos de manejo de los rebaños/tropas infectados incluyen el análisis y el aislamiento o sacrificio de los animales positivos, higiene, control del movimiento de los animales y vacunación.

En humanos, el aislamiento de la bacteria es difícil, además, en las formas crónicas los aislamientos suelen ser negativos. Los métodos de diagnóstico serológicos más empleados en el hombre son las técnicas de aglutinación en placa (Huddleson) y en tubo (Wright).

En el hombre, el tratamiento incluye el uso de antimicrobianos y la administración de medicamentos sintomáticos. Las combinaciones más usadas son las propuestas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que contemplan dos opciones; ambas incluyen la doxiciclina durante 6 semanas, combinada con estreptomina durante 2 a 3 semanas, o rifampicina durante 6 semanas. Otros antimicrobianos que se pueden utilizar en combinación con los anteriores incluyen: trimetoprima-sulfametoxazol o quinolonas.

Reglamentación vigente en Argentina

El Programa de Brucelosis bovina define las estrategias y acciones a desarrollar en todo el territorio nacional, (Programa de Control y Erradicación de la Brucelosis Bovina, Resolución Senasa N° 150/2002), tiene el objetivo de consolidar en forma progresiva la condición de áreas libres de la enfermedad y permitir en forma coordinada su control y posterior eliminación. Las actividades del Programa incluyen:

-Vacunación

La vacunación antibrucélica es obligatoria para las terneras de tres a ocho meses de edad y debe realizarse con la cepa *B. abortus* S19.

-Control de egresos

Para la hacienda de carne, todo animal susceptible a la enfermedad deberá contar con un certificado de seronegatividad otorgado por un médico veterinario acreditado y pruebas serológicas realizadas en un laboratorio de la Red Nacional de Laboratorios.

Para la hacienda de tambo, todo movimiento de bovinos en las categorías susceptibles a la enfermedad que tengan un destino distinto al de faena, deberán contar con un certificado de seronegatividad otorgado por un médico veterinario acreditado y pruebas serológicas realizadas en un laboratorio de la Red.

-Vigilancia epidemiológica

Como componente de la vigilancia, se establece que todos los establecimientos procesadores de leche y fabricantes de productos lácteos deberán realizar seis monitoreos anuales a sus tambos proveedores, mediante pruebas del Anillo en Leche (PAL) en laboratorios de la Red. Aquel que detecte una prueba PAL positiva, deberá en forma inmediata comunicarle al productor y a su veterinario acreditado. Además, a través de la Resolución Senasa N° 79/2003, se incorporó la técnica de I-ELISA en leche, aplicada sobre las muestras de leche extraídas de la leche total del tambo.

La normativa vigente establece que todos los establecimientos lecheros, las cabañas y/o los establecimientos dedicados a la comercialización de reproductores machos, deberán estar incluidos en alguna de las categorías de estatus sanitario que se describen a continuación:

-Establecimiento en saneamiento: aquel que ha realizado un sangrado inicial a la totalidad de la hacienda en las categorías susceptibles con pruebas serológicas en laboratorios de la Red.

-Establecimiento saneado: aquel que ha alcanzado dos sangrados totales consecutivos negativos con sesenta a ciento veinte días de intervalo, con pruebas serológicas en laboratorios de la Red.

-Establecimiento oficialmente libre: aquel que ha alcanzado tres sangrados totales consecutivos negativos en las categorías susceptibles, realizando los dos primeros con sesenta a ciento veinte días de intervalo y el tercero en un plazo no mayor a trescientos sesenta y cinco días, con pruebas serológicas en laboratorios de la Red.

La recertificación, que permite a los establecimientos oficialmente libres continuar con el estatus sanitario adquirido, será realizada anualmente mediante una serología aplicada a la totalidad de los animales susceptibles.

La brucelosis humana es una enfermedad de denuncia obligatoria (Ley 15.465 del año 1960). Para la vigilancia y notificación de los casos sospechosos de brucelosis se debe utilizar el sistema de información del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS).

Vacunas para la prevención de la brucelosis

La vacunación es la medida de control más económica en áreas donde la brucelosis es endémica. En la actualidad, los programas de vacunación están basados en el control de la brucelosis causada por *B. abortus* y *B. melitensis*. Sólo tres vacunas vivas atenuadas están recomendadas para la infección del ganado por *B. abortus*: *B. abortus* 45/20 (poco difundida), *B. abortus* S19 y *B. abortus* RB51 (Schurig *et al.*, 2002). Se ha reportado la ocurrencia de abortos en ganado y una reducción significativa de la producción de leche con la vacunación con *B. abortus* S19. La vacunación con RB51 induce un nivel menor de abortos (Uza *et al.*, 2000) y, aunque también puede infectar a humanos, es menos virulenta que la cepa S19 (Ashford *et al.*, 2004). *B. melitensis* Rev.1 es la cepa empleada como vacuna para el control de la brucelosis en pequeños rumiantes y al igual que las vacunas basadas en *B. abortus*, también puede infectar al hombre. Al no implementarse vacunación alguna en el hombre, la vacunación de los animales es un factor crítico para el control y la erradicación de la enfermedad. A pesar de sus limitaciones, las vacunas mundialmente

más empleadas son las cepas vacunales *B. abortus* S19 y *B. melitensis* Rev.1, que se han utilizado en varios países en vías de desarrollo para erradicar la brucelosis. Sin embargo, su uso en los programas de erradicación tiene el inconveniente de no poder distinguir animales infectados de vacunados en las pruebas de diagnóstico. Aunque es importante resaltar que este problema tiene poca significancia en países que no pueden implementar los planes de análisis de los animales y sacrificio, ha sido considerado el mayor inconveniente de estas vacunas.

Una vacuna ideal para aplicar en humanos o animales debería conferir inmunidad a largo término, proteger de la infección por otras especies de *Brucella* además de las típicas, ser inócua en cualquier estado fisiológico, ser efectiva en una dosis única, no interferir con las pruebas diagnósticas, no ser virulenta para los humanos ni llevar resistencia a antibióticos, no debe distribuirse en el ambiente, debe ser estable y debe tener bajo costo económico (Perkins *et al.*, 2010; Godfroid *et al.*, 2011). Considerando estos requisitos, se están estudiando distintas alternativas, como vacunas a subunidades, vacunas de ADN y vesículas de membrana externa. Una breve y actualizada descripción de varias alternativas analizadas y en estudio se encuentra en el trabajo de Avila-Calderón *et al.* (Avila-Calderon *et al.*, 2013).

El estudio de la biología de *Brucella* y sus factores de virulencia así como los análisis proteómicos a gran escala y la ingeniería genética posibilitan el desarrollo de inmunógenos de nueva generación. Se han abordado distintas estrategias, como la obtención de mutantes atenuadas a partir de mutaciones en genes asociados a vías metabólicas o factores de virulencia presentes en cepas virulentas o bien, mediante la eliminación de algún antígeno en las cepas vacunales que pueda servir como marcador de infección (antígeno inmunodominante). Es decir, que disponiendo de una prueba serológica específica para detectar anticuerpos contra el antígeno en cuestión,

los animales infectados reaccionarían, en tanto que los vacunados no (Boschioli *et al.*, 1997; Tibor *et al.*, 1998; Campos *et al.*, 2002; Fiorentino *et al.*, 2008).

Otro enfoque consiste en la expresión heteróloga de antígenos de membrana, de esta manera se ha analizado la capacidad protectora de varias proteínas de *Brucella*, como Omp25, Omp31 en *E. coli* (Bowden *et al.*, 1998; Guilloteau *et al.*, 1999) y GroEL, GroES, SOD Cu-Zn, HtrA y YajC en virus vaccinia (Toth *et al.*, 1995), pero sin obtener niveles de protección importantes.

En los últimos años se ha evaluado el rol de algunas proteínas periplásmicas y citoplásmicas de *Brucella*, expresadas en vectores adecuados. Estas proteínas recombinantes purificadas formuladas con adyuvantes y/o citoquinas estimuladoras, han sido estudiadas en el modelo murino con distintos resultados (Estein, 2006). Recientemente, se ha analizado el empleo de Omp16 recombinante, expresada tanto en *E. coli* como en plantas de tabaco, y se encontró que es capaz de inducir una respuesta inmune Th1 en ratones y no requiere de adyuvantes (Pasquevich *et al.*, 2009; Pasquevich *et al.*, 2010; Ibanez *et al.*, 2013).

Otra alternativa consiste en las vacunas de ADN, que involucran la inoculación con un vector de expresión que codifica para una proteína antigénica. La expresión del antígeno se produce *in situ* y es capaz de generar una respuesta inmune. En *Brucella* se han analizado distintos candidatos en el modelo murino y si bien estas vacunas inducen una respuesta inmune de perfil Th1, hasta no hace mucho, no se habían logrado los niveles de protección obtenidos con las vacunas vivas atenuadas (Schurig *et al.*, 2002). Recientemente, se describieron dos vacunas de ADN que son inmunogénicas y además confieren protección frente al desafío con la cepa virulenta (Riquelme-Neira *et al.*, 2013; Jain *et al.*, 2014).

Las vacunas a subunidades, si bien son consideradas más seguras, requieren el uso de numerosos suplementos para generar un nivel de protección tan alto como el de

las vacunas vivas atenuadas y además, no suelen estimular la respuesta de todos los componentes de la inmunidad, por lo tanto, las vacunas vivas atenuadas continúan siendo la mejor opción (López-Goñi y O'Callaghan, 2012). Además, gracias a la replicación de la bacteria se produce una reestimulación del sistema inmune (Drabner y Guzman, 2001). Una crítica importante de estas se debe a la capacidad potencial para revertir a cepas virulentas y a su virulencia residual en hospedadores susceptibles (por ejemplo, abortos en hembras preñadas, disminución en la producción de leche, espleno y hepatomegalia). Gracias a estudios genómicos se ha determinado que *B. abortus* S19 difiere en al menos 24 *loci* relacionados con virulencia y en otros 200 *loci* más (Crasta *et al.*, 2008). Es altamente improbable, por no decir imposible, que estas mutaciones puedan revertir de manera espontánea. Por lo tanto, los esfuerzos actuales en el desarrollo de vacunas deberían estar enfocados a disminuir y/o eliminar la virulencia residual de la cepa vacunal atenuada.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Parte I.

La hipótesis que nos planteamos en esta parte del trabajo es:

“La tipificación molecular mediante MLVA (HOOF-Prints + VNTR) tiene el suficiente poder discriminatorio para la diferenciación de las distintas biovariedades y cepas de *Brucella abortus*”

Para contrastar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

Objetivo general

Determinar la diversidad genética de los aislamientos de *B. abortus* de Argentina mediante un esquema de MLVA y evaluar su desempeño.

Objetivos específicos

1. Tipificar los aislamientos de *B. abortus* mediante las pruebas bioquímicas convencionales.
2. Genotipificar los aislamientos de *B. abortus* mediante el empleo de un esquema de MLVA.
3. Analizar el poder discriminatorio del esquema MLVA empleado.
4. Establecer las relaciones filogenéticas entre los distintos genotipos identificados mediante el algoritmo goeBURST.

Parte II.

Las hipótesis que nos planteamos en esta parte del trabajo son:

“Los miembros del género *Brucella* codifican para varias lipoproteínas (Lpps) que se encuentran conservadas entre las distintas especies”

“Las Lpps de *B. abortus* tienen un rol importante en la virulencia de la bacteria”

“Los determinantes de virulencia de *Brucella* están conservados en el género”

“Las cepas de *B. abortus* atenuadas en su virulencia son inmunógenos eficientes”

Para contrastar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

Objetivo general

Identificar Lpps que contribuyen a la virulencia de *Brucella abortus*.

Objetivos Específicos

1. Identificar *in silico* las Lpps codificadas por el genoma de *Brucella* (número, funciones, etc)
2. Generar mutantes por el método de interrupción integrativa en marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifiquen para Lpps en la cepa *B. abortus* S2308.
3. Evaluar la virulencia de las cepas mutantes generadas en el Objetivo Específico 2, en el modelo de infección esplénica en ratones BALB/c.
4. Caracterizar fenotípicamente a las cepas mutantes atenuadas, generadas en el Objetivo Específico 3.
5. Evaluar la capacidad de generar una respuesta inmune protectora en ratones BALB/c por parte de las cepas atenuadas en su virulencia seleccionadas en el Objetivo Específico 3.
6. Evaluar la contribución a la virulencia en otras especies de *Brucella* de los ORFs cuya mutación produjo las cepas mutantes atenuadas de *B. abortus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

PARTE I

Cepas bacterianas

Se utilizaron los aislamientos y cepas de referencia de *B. abortus* conservados en el cepario del Laboratorio de Brucelosis del Instituto de Patobiología del CICVyA de INTA. De las cepas incluidas en este estudio, 37 fueron aisladas por el personal del laboratorio a partir de muestras de origen bovino, 12 fueron enviadas, ya aisladas, a nuestro laboratorio para su tipificación mediante pruebas bioquímicas y se desconoce la procedencia de 9 de ellas. Las cepas utilizadas en este trabajo se presentan en la Tabla 3. Las bacterias fueron cultivadas a 37°C en agar triptosa (AT, Difco). Los cultivos de las cepas de la biovariedad 2 se suplementaron con 10 % de suero bovino proveniente de animales de establecimientos libres de brucelosis y se incubaron en atmósfera con 5 % de CO₂.

Tabla 3: Panel de aislamientos y cepas utilizados en este estudio.

Aislamiento	Biovariedad	Origen	Procedencia	Año
S19	1	cepa vacunal	SENASA	-
RB51	1	cepa vacunal	Virginia Tech	-
2308	1	cepa de referencia	CPZ ^b	1992
Bab1 1	1	leche	9 de Julio, Buenos Aires	1999
Bab1 2 ^a	1	leche	V. Mackena, Córdoba	2002
Bab1 3	1	leche	Bell Ville, Córdoba	2004
Bab1 4	1	leche	Anguil, La Pampa	1994
Bab1 5	1	leche	25 de Mayo, Buenos Aires	1999
Bab1 6	1	cepa	Río Cuarto, Córdoba	2001
Bab1 7	1	leche	Tío Pujío, Córdoba	2002
Bab1 8	1	leche	Anguil, La Pampa	s.i ^c
Bab1 9	1	leche	V. Mackena, Córdoba	2002
Bab1 10	1	cepa	Mercedes, Corrientes	2002
Bab1 11	1	ternero	Buenos Aires	2003
Bab1 12	1	leche	Lobos, Buenos Aires	2007
Bab1 13	1	leche	9 de Julio, Buenos Aires	1999
Bab1 14	1	cepa	Río Cuarto, Córdoba	2001
Bab1 15	1	leche	Lobos, Buenos Aires	2007
Bab1 16	1	cepa	Santa Fé	2000

Bab1 17	1	pulmón feto	Mercedes, Buenos Aires	2005
Bab1 18 ^a	1	leche	V. Mackena, Córdoba	2002
Bab1 19 ^a	1	leche	25 de Mayo, Buenos Aires	1999
Bab1 20	1	leche	Buenos Aires	1998
Bab1 21	1	leche	Suipacha, Buenos Aires	1992
Bab1 22	1	feto bovino	Santa Rosa, La Pampa	2001
Bab1 23	1	leche	Chivilcoy, Buenos Aires	1992
Bab1 24	1	leche	Morrison, Córdoba	1996
Bab1 25	1	cepa	Río Cuarto, Córdoba	1997
Bab1 26	1	leche	Morrison, Córdoba	1996
Bab1 27	1	cepa	s.i	s.i
Bab1 28	1	cepa	Río Cuarto, Córdoba	2001
Bab1 29	1	cepa	Tandil, Buenos Aires	s.i
Bab1 30	1	leche	s.i	s.i
Bab1 31	1	cepa	Corrientes	2001
Bab1 32	1	cepa	Río Cuarto, Córdoba	2001
Bab1 33 ^a	1	cepa	Río Cuarto, Córdoba	2001
Bab1 34	1	feto bovino	Corrientes	2002
Bab1 35	1	cepa	Río Cuarto, Córdoba	2001
Bab1 36	1	leche	Suipacha, Buenos Aires	s.i
Bab1 37	1	leche	Bell Ville, Córdoba	2004
Bab1 38	1	leche	Chivilcoy, Buenos Aires	1992
Bab1 39 ^a	1	leche	Bell Ville, Córdoba	2004
Bab1 40	1	leche	Morrison, Córdoba	1996
Bab1 41	1	cepa	Río Cuarto, Córdoba	2001
Bab1 42	1	feto bovino	Mercedes, Buenos Aires	2005
Bab1 43	1	leche	V. Mackena, Córdoba	2002
Bab1 44	1	leche	Buenos Aires	1998
Bab1 45	1	cepa	s.i	s.i
Bab1 46	1	cepa	s.i	s.i
Bab1 47	1	cepa	s.i	s.i
Bab1 48	1	cepa	s.i	s.i
Bab1 49	1	cepa	s.i	s.i
Bab1 50	1	cepa	s.i	s.i
Bab1 51	1	cepa	s.i	s.i
Ba2 1	2	cepa	s.i	1994
Ba2 2	2	placenta	Luján, Buenos Aires	1993
Ba2 3	2	leche	Los Toldos, Buenos Aires	1983
Ba2 4	2	cont. est ^d	Chivilcoy, Buenos Aires	1979
Ba2 5	2	feto bovino	Los Toldos, Buenos Aires	1983
Ba2 6	2	leche	Luján, Buenos Aires	1992
Ba2 7	2	leche	Los Toldos, Buenos Aires	1983

^a. Aislamientos excluidos del análisis goeBURST; ^b. Centro Panamericano de Zoonosis; ^c. Sin información; ^d. Contenido estomacal.

Tipificación de las cepas mediante pruebas bioquímicas

La tipificación bioquímica de cada cepa se realizó según las técnicas habituales (Alton *et al.*, 1988):

-Crecimiento en presencia de colorantes: las bacterias se sembraron en AT en presencia de diluciones 1:50.000 de fucsina y 1:25.000 y 1:50.000 de tionina. Se observó la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano.

-Producción de H₂S: las bacterias se sembraron en tubos con AT en pico de flauta, entre el tubo y el tapón se colocó una tira de papel seca, previamente embebida en una solución 10 % de acetato de plomo. Las bacterias se crecieron durante 4 días, con un cambio diario de la tira del papel indicador. En presencia de H₂S el papel se oscurece, lo que indica positividad al ensayo.

-Prueba de ureasa: al medio de Christensen (peptona 0,1 %, NaCl 0,5 %, K₂HPO₄ 0,2 %, rojo de fenol (1:500) 0,6 %, dextrosa 0,1 %) suplementado con urea (2 %) se le agregó una ansada de cada cepa. Si la bacteria presenta actividad ureasa, se observa el cambio de color del medio, de amarillo a rosa.

Tipificación molecular mediante MLVA

Las estrías bacterianas crecidas 3-4 días en medio AT en tubos en pico de flauta fueron resuspendidas en 5 ml de NaCl 5 %. Las suspensiones se inactivaron a 82 °C por 60 min. Se sembró una alícuota en agar triptosa según los requerimientos de cada cepa para verificar su inactivación y se dejó crecer en estufa a 37 °C durante 72 h. Se utilizaron como templado para la amplificación por PCR 3 µl de la suspensión inactivada.

Las reacciones de PCR se realizaron empleando la enzima *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) en un termociclador Hybaid Px2 (Thermo Scientific). Los oligonucleótidos utilizados son los previamente descritos por Bricker *et al.* (Bricker *et al.*, 2003)

(HOOF-Prints) y Whatmore *et al.* (Whatmore *et al.*, 2006) (VNTR) (Tabla 4) y fueron adquiridos en Operon (EEUU). La amplificación de los HOOF-Prints se realizó en las siguientes condiciones: Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, 0,25 mM de cada dNTPs, MgCl₂ 2,5 mM, 0,2 μM de cada oligonucleótido, 0,6 unidades de *Taq* y 3 μL de templado. El programa de ciclado utilizado fue: 94 °C por 2 min, 32 ciclos de 94 °C por 15 s, 55 °C por 20 s y 72 °C por 90 s, con una extensión final de 72 °C durante 5 min. Para completar el esquema, se incorporaron los VNTR 7, 14, 21, 24, 26 y 27 descritos por Whatmore *et al.*, empleando los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 4. La amplificación de los mismos se realizó en las siguientes condiciones: *buffer* de la enzima 1X, 0,25mM de cada dNTPs, MgCl₂ 2 mM, 0,2 μM de cada oligonucleótido, 0,6 unidades de *Taq* y 1 μl de templado. Las condiciones de ciclado fueron: 95 °C por 5 min, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, con una extensión final de 72 °C por 10 min.

Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR.

Oligonucleótidos	Forward (5' a 3')	Reverse (5' a 3')
HOOF-Print 1	GGTGA TTGCCGCGTGGTTCGTTGAATGAG	Rev3 ^a
HOOF-Print 3	CAGGCGCTTGAGGATGAGGCGGCAG	Rev3
HOOF-Print 4	GCA GAA TTTTCGAGGCA TTCGGCGATG	Rev3
HOOF-Print 5	GTGCTCCAGGGCGCCGGAGGTATGTTTAG	Rev3
HOOF-Print 6	GCCGCA GAAAAGCAGGCGATCTGGAGATTATC	Rev3
HOOF-Print 2	CCCGCATGATCCGCGAACAGCTGGATG	Rev1 ^b
HOOF-Print 7	CAGAGCCGTCGGTGGTTACTTGAGTAGGGCAG	Rev1
HOOF-Print 8	GTGGGAAGCGTTATCCTTTAACGGGAGTAAGGG	Rev1
Rev1		GGGGAGTATGTTTTGGTTGCGCATGACCGC
Rev3		GGGGGCARTARGGCAGTATGTTAAGGGAATAGGG
VNTR 14	GATTGGGTTTCGCAAACCATG	AACCTGTGTCATGAAAGTG
VNTR 21	GCAAGTAAACCGATCACAGAC	CGAAAAGGGAGCAGACATTA
VNR 7	CATCGATTATACCAATCGCG	AACACAGAGGCGATCAGGAT
VNTR 24	TGGCGATGGACGGCGGCTT	ACCTGTCTATCCACTGC
VNTR 26	CGAAAAGCGTTGCTGTGCAG	ACCGTCTATCAGCCTGCCA
VNTR 27	CGAATAACAGCGCCGTCTT	ATGATCGCCGGGAATCGG

^a Combinación de oligonucleótidos *forward* con oligonucleótido Rev3. ^b Combinación de oligonucleótidos *forward* con oligonucleótido Rev1.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Los productos de amplificación se diluyeron 1:10 con agua y 5 µl de la dilución se sembraron en geles de poliacrilamida 8 % (poliacrilamida (Promega) 8%, N-N-metilenbisacrilamida (Sigma-Aldrich) 0,2 %, 15% de TBE 5 X (5,4 % de Tris, 2,75 % de ácido bórico, 2 % EDTA 0,5M), persulfato de amonio (BioRad Life Science) 0,075 %, TEMED (Sigma-Aldrich) 0,062 %). A los geles se les agregó 1,5 % de glicerol para disminuir la difusión y evitar que se sequen por evaporación durante su conservación. Para su visualización, los geles de poliacrilamida se tiñeron con plata. Primeramente se fijaron con una solución 10 % de etanol (Merck) y 0,5 % de ácido acético (Anedra) durante 10 min, luego se realizó la tinción con una solución 0,2 % de AgNO₃ (Merck) durante 10 min y se realizó un lavado con agua durante 5 min. El revelado se realizó con una solución NaOH 3 % (Mallinckrodt) y formol 0,6 % hasta aparición de las bandas, finalmente los geles se fijaron durante 5 min con la misma solución del primer paso. Luego se colocaron los geles teñidos entre dos hojas de papel celofán y se dejaron secar a temperatura ambiente. Para determinar el tamaño de las bandas se utilizaron los marcadores de 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) y O´RangeRuler 20 bp DNA Ladder (Fermentas). Mediante la tabla presentada en el trabajo de Whatmore *et al.* (Whatmore *et al.*, 2006), donde se indica el tamaño de las bandas según el número de repeticiones para cada alelo, se determinó el número de repeticiones presentes en cada alelo de nuestros aislamientos. En base a esto, se le asignó un código a cada perfil. Cada perfil diferente obtenido para los HOOF-Print (Bricker *et al.*, 2003) se identificó con una letra del alfabeto (la misma letra en mayúscula o minúscula indica perfiles diferentes). Los dos perfiles obtenidos para los VNTR (Whatmore *et al.*, 2006) se designaron 0 y 1. El código de cada perfil correspondiente a la combinación de HOOF-Print y VNTR y está formado por una letra y un número.

Análisis del poder discriminatorio y de la relación genética

Con la herramienta V-DICE disponible públicamente (<http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/DICI/DICI.pl>) se determinó el poder de discriminación de cada marcador utilizando el Índice de discriminación de Hunter-Gaston (IDHG) (Hunter y Gaston, 1988; Hunter, 1990) calculado mediante el Índice de Simpson de Diversidad según la siguiente fórmula:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s x_j(x_j - 1)$$

Siendo D el poder discriminatorio, N el número de cepas no relacionadas evaluadas, S el número de cepas distintas y x_j el número de cepas que pertenecen al genotipo j, asumiendo que las cepas se pueden clasificar en categorías mutuamente excluyentes. El IDHG de todo el método se estimó considerando cepas sin relación epidemiológica a través de un programa de la Universidad del País Vasco, públicamente disponible (http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/).

El análisis de la relación genética entre los aislamientos se realizó mediante el algoritmo goeBURST utilizando el software Phyloviz (<http://www.phyloviz.net/wiki/>) (Francisco et al.). Este algoritmo construye complejos clonales compuestos por aquellos genotipos relacionados entre sí y que solo varían en 1 a 3 marcadores del total de 13 estudiados.

PARTE II

Análisis *in silico*

Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de *Brucella* se obtuvieron del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), PATRIC (<http://patricbrc.org/>) y KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>). Se buscaron en la base de datos DOLOP (Madan Babu

y Sankaran, 2002) las Lpps probables para *B. abortus* 9-941. La predicción de Lpps se realizó con los programas LipoP (Juncker *et al.*, 2003) y Lipo (Berven *et al.*, 2006). El largo y la carga neta positiva del dominio N y el largo e índice de hidrofobicidad (GRAVY) (Kyte y Doolittle, 1982) del dominio H, ambos dominios del péptido señal, se calcularon mediante la herramienta ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2003). La localización subcelular se predijo utilizando los programas PSORTb (Gardy *et al.*, 2005) y CELLO (Yu *et al.*, 2004). Los sustratos del sistema TAT se identificaron mediante las herramientas TatP (Bendtsen *et al.*, 2005), TATFIND (Rose *et al.*, 2002) y PRED-TAT (Bagos *et al.*, 2010). Para identificar dominios funcionales en las Lpps se utilizó la base de datos Pfam (Bagos *et al.*, 2010) y se realizó una búsqueda de homología mediante BLASTp (Altschul *et al.*, 1997). Para predecir operones en el genoma de *B. abortus* se utilizaron las herramientas ProOpDB (Taboada *et al.*, 2011), DOOR (Mao *et al.*, 2009) y la base de datos disponible en la página web de Microbes OnLine (Dehal *et al.*, 2010). Para alinear las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se utilizó el programa ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007).

Las secuencias se “limpiaron” con la herramienta disponible *on line* Sequence Massager (<http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>). El análisis de los sitios de restricción para el clonado de genes se realizó con el programa Vector NTI (Invitrogen).

Bacterias: cepas y condiciones de crecimiento

Para el clonado y amplificación de las distintas construcciones se utilizó la cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α (Gibco). Las bacterias fueron crecidas a 37°C en caldo Luria-Bertani (LB) con agitación constante a 200 rpm o en placas de LB agar.

La cepa *B. abortus* S2308 y las mutantes generadas fueron crecidas en caldo tripticasa de soja (TSB, Difco) a 37°C y con agitación constante a 200 rpm o en medio agar triptosa (AT, Difco). Para obtener células electrocompetentes, las bacterias se

crecieron en un medio nutritivo con extracto de levadura, YENB, (0,75 % extracto de levadura (Difco), 0,8 % caldo nutritivo (Difco).

Cuando los medios de cultivo se suplementaron con antibióticos, se utilizaron las siguientes concentraciones:

Antibiótico	Proveedor	Concentración para el crecimiento de:	
		<i>E. coli</i>	<i>Brucella spp.</i>
Kanamicina (Km)	Sigma	25 mg/mL	25 mg/mL
Ampicilina (Amp)	USB	100 mg/mL	15 mg/mL

Las cepas bacterianas utilizadas fueron:

Cepas	Característica	Fuente
<i>E. coli</i> DH5 α	Cepa ingenierizada para el clonado de secuencias y amplificación de los plásmidos. Las mutaciones que contiene son: dlacZ Delta M15 Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1	Gibco
<i>B. abortus</i> S2308	Cepa de referencia empleada como parental	Cepario del laboratorio
<i>B. abortus</i> S19	Cepa vacunal, atenuada naturalmente en su virulencia.	Cepario del laboratorio
<i>B. abortus</i> Lp1	Cepa obtenida por mutagenesis insercional en ORF BAB1_0009, resistente a Km.	Este trabajo
<i>B. suis</i> 1330	Cepa de referencia empleada como parental	Cepario del laboratorio
<i>B. suis</i> Lp1	Inserción en ORF BR0009, resistente a Km.	Este trabajo
<i>B. melitensis</i> 16M	Cepa de referencia empleada como parental	Cepario del laboratorio
<i>B. melitensis</i> Lp1	Cepa obtenida por mutagénesis insercional en ORF BME11935, resistente a Km.	Este trabajo

Oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos empleados en este trabajo para el clonado de genes se realizó utilizando el programa Primer3Plus, de acceso libre en Internet (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>). Los oligonucleótidos se adquirieron a la empresa Alpha DNA (Tabla 5).

Las secuencias de los oligonucleótidos empleados para la PCR B4/B5 son (de 5' a 3') B4: TGGCTCGGTTGCCAATATCAA y B5: CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG.

Tabla 5: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados. Se indica el ORF para la cepa *B. melitensis* biovar abortus 2308. En letra minúscula negrita se encuentran los sitios de restricción incorporados a los oligonucleótidos.

Nombre del primer	ORF	Sitio BamHI	Oligonucleótido forward (5'--3')	Sitio BamHI	Oligonucleótido reverse (5'--3')	Tamaño del producto (bp)
Lp1	BAB1_0009		CCAATAGGCCACGAAGTGAT	g gatcc	GAAGCCTATACCCGGTCACA	675
Lp2	BAB2_0810		TGCGCATCGTTGATAACTTC	g gatcc	GCCGAAGCTGATTGGTGAAAT	668
Lp3	BAB1_0358	g gatcc	AAAGGTGTGCTGGTGCCTATC		ACATCGGTGATCTTGGCATT	637
Lp4	BAB1_2034	g gatcc	GCGTTCTGGAAGTCTGGAAG		COGCAAGACCOCTGATTGAT	675
Lp5	BAB1_1451		CCACGATAAAGGCCAAAAAGC	g gatcc	CGCCAGATTTTCTTCA TGGT	700
Lp6	BAB1_0038	g gatcc	GTGGTTGTTCCCGTCA TTCT		TGAAAATA TTGCACCGCATGT	646
Lp7	BAB1_2147	g gatcc	AACGGCGTCAAGACCTACAC		GATAAGCGGCAAGCTGAGTC	694
Lp8	BAB2_0017		ACCAGCTCGATGGATTTGAC	g gatcc	AGGTTCTCGAAAAGGCCAAT	586
Lp9	BAB1_0589		AGGCA CGCGATCGTAGAG		GTGTACCAAGGCCAAATGTG	554
Lp10	BAB2_0156	g gatcc	CAGAACAAATCCGCA GTTCAA		TTCCGCGATCTTGTGTAG	507
Lp11	BAB2_0195	g gatcc	GCTCAGCTCCTTGATGATGTC		CTCTTTCTGCGCCTCGTC	504
Lp12	BAB1_1226		ATAGGCTGGCTTGACCAATA	g gatcc	TATACGGGCCAGCAAAAAGT	518
Lp13	BAB1_0138		GACAGCGGCTCTTTTCTTG		AATGTCCTGGTTCA TCAGACG	544
Lp14	BAB1_1041	g gatcc	AATTTTGCTCACCGCATTTTC		ACAGTCTGGTCAAAAAGCCTTG	525
Lp15	BAB1_0804		GGCGAAGAAA TCAAGACAC	g gatcc	ATTTCTGGCTCTCGGTTTTG	502
Lp16	BAB1_0511		CCAGTCTTTGCAA CGGTTTT		TCTGCACATTCGCTGTGCC	502
Lp17	BAB1_1527	g gatcc	CAATGGTGTGTGCTGTGCT		GCTTGAATAATTCCTGCATGGT	500
Lp18	BAB2_0924		TAA TCCTCGGCA TCTCATC	g gatcc	CTTCTTCTCGCCCTGCTT	453
Lp19	BAB1_1930		AATAGAGCGAGGCAACCGTA	g gatcc	CTCCCGGCTGGTAATCTC	401
Lp20	BAB2_0057		ATATCCA CGCGCTGTTC	g gatcc	GTCTCTCTGGCCGCTGTG	470
Lp21	BAB1_1707		TCTGOGA CCAAGCATGTGT	g gatcc	ATCGCTATGCGCTTTTCAT	433
Lp22	BAB1_1773	g gatcc	CAGGAAAAGGAAGCCGAAAG		GGATCGAGTTTGATCAAGG	634
Lp23	BAB1_0064	g gatcc	TTACGCA GACCGACAACAAG		TATAGGCCCGGACAGATAG	501
Lp24	BAB1_0047	g gatcc	COGCA GATCAAGTGTGATAA		COGGA TGACATGGA CTGG	488
Lp25	BAB1_1227	g gatcc	CCACGGCAGGTCAATAATGT		GGTCA TGGCTTGCCTTTT	483

Amplificaciones por PCR

Para el clonado de genes, todas las reacciones de PCR se realizaron con las siguientes concentraciones finales de los reactivos: oligonucleótidos 0,5 μ M, dNTPs 200 μ M, $MgCl_2$ 1,5 μ M, ADN polimerasa HotStar Taq (Qiagen) 1U/25 μ l reacción, *buffer* de la enzima 1X.

Las reacciones de PCR para la obtención del inserto a clonar se realizaron en un volumen final de 65 μ l. Se utilizaron como templado 5 μ g de ADN cromosomal de *B. abortus* 2308 obtenido por tratamiento térmico. Se empleó el siguiente programa de amplificación: 95°C, 15 min, 35 ciclos de 94°C, 1 min, 60°C, 1 min y 72°C, 1 min 30 seg, con una extensión final 72°C por 10 min. Cuando no se logró amplificar con estas

condiciones, se agregó a la mezcla de reacción Buffer Q 1X final (Qiagen) y se bajó a 58°C la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos.

Para la amplificación de un fragmento específico de *Brucella*, que corresponde a una región conservada de una proteína inmunogénica de membrana (BCSP31), se utilizaron los oligonucleótidos B4/B5. La reacción se realizó en un volumen final de 25 µl y se utilizó como templado 1 µl del sobrenadante del lisado por tratamiento térmico de cada cepa a analizar. Programa de amplificación: 95°C, 15 min, 35 ciclos de 94°C, 1 min, 59°C, 1 min y 72°C, 1 min, con una extensión final 72°C, 10min.

Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador MyCycler (BioRad).

Obtención del ADN

a) Lisado por tratamiento térmico

Se tomó una colonia de la cepa mutante y se estrió por agotamiento en una placa AT^{Km}. Se creció en estufa a 37° C durante 4-5 días. Se tomó con un ansa una colonia y se la resuspendió en un tubo con 50 µl de agua. Luego, se colocó en baño María en ebullición por 5 min y luego a -70° C durante 10 min. Este ciclo repitió 3 veces. Finalmente, se centrifugó a 9.300 x g por 5 min y se obtuvo el ADN en el sobrenadante.

b) Extracción de ADN cromosomal por lisis química

Una colonia del clon a evaluar se inoculó en 2,5 ml de TSB y se creció en agitación a 37°C durante 2 días. El cultivo se inactivó a 60°C durante 4 hs. Se agregaron proteinasa K (concentración final 285 µg/ml, Invitrogen) y SDS 0,5% y se llevó a 60°C por 16 hs. El ADN se precipitó con el agregado de acetato de sodio 10% (3M, pH 5,2) y 0,6 volúmenes de isopropanol. El ADN se lavó 5 veces en etanol 70%, se disolvió en 600 µl de TE 1X (Tris 10 mM pH8, EDTA 1mM) y se llevó a 37°C con agitación hasta su resuspensión. Se agregaron 600 µl de fenol y se llevó a agitación durante 3 hs. Se

centrifugó 5 min a 9.300 x g. Se trasvasaron 600 µl del sobrenadante a un tubo tipo *ependorf* limpio. El ADN se precipitó con el agregado de acetato de sodio 10% y 0,6 volúmenes de isopropanol. Luego se lavó con etanol 70%, 5 veces. Finalmente, se resuspendió en 100 µl de TE 1X. Se determinó la calidad y la cantidad de ADN con el espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop).

Electroforesis en geles de agarosa

La concentración de agarosa utilizada fue de entre 0,8 y 1,5% según el tamaño del fragmento de restricción o del producto de amplificación a analizar. Las muestras de ADN se sembraron con *buffer* de siembra 1X (azul de bromofenol 0,025 %, glicerol 50 %, TAE 50X 20 %) en geles de agarosa con bromuro de etidio (0,5 µg/mL). La corrida se hizo a temperatura ambiente en *buffer* TAE 1X (Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) a 5-10 V/cm. Se visualizaron las bandas por fluorescencia a la luz ultravioleta (UV). Para estimar el tamaño de las moléculas se empleo 1kb Plus (Promega) como marcador molecular. Los geles se documentaron y analizaron usando el equipo Gel Doc XR (BioRad) y el programa Quantity One 1D (BioRad).

Metodología del ADN recombinante

La construcción y el análisis de los plásmidos recombinantes se realizaron mediante las técnicas clásicas de biología molecular (Sambrook y Russell, 2001). Las digestiones con enzimas de restricción se realizaron según las indicaciones del fabricante (Promega y NEB).

Obtención del fragmento a clonar

Los productos de amplificación de la PCR se purificaron con el sistema comercial QIAQUICK PCR Purification (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Los productos se resolvieron mediante electroforesis empleando un gel de agarosa 0,8% y se cuantificaron mediante espectrofotómetro.

Construcción de los plásmidos

El fragmento purificado se clonó en el vector p-Drive (Fig. 2) utilizando el sistema PCR Cloning (Qiagen) en una relación molar vector:inserto 1:5, siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema aprovecha la adenina que introduce en cada fragmento la polimerasa en la reacción de PCR para hibridar específicamente con el residuo uracilo libre que presenta el vector. La reacción de ligación se realizó a 16°C por 16 h en un termociclador (16C TRIO thermoblock, Biometra).

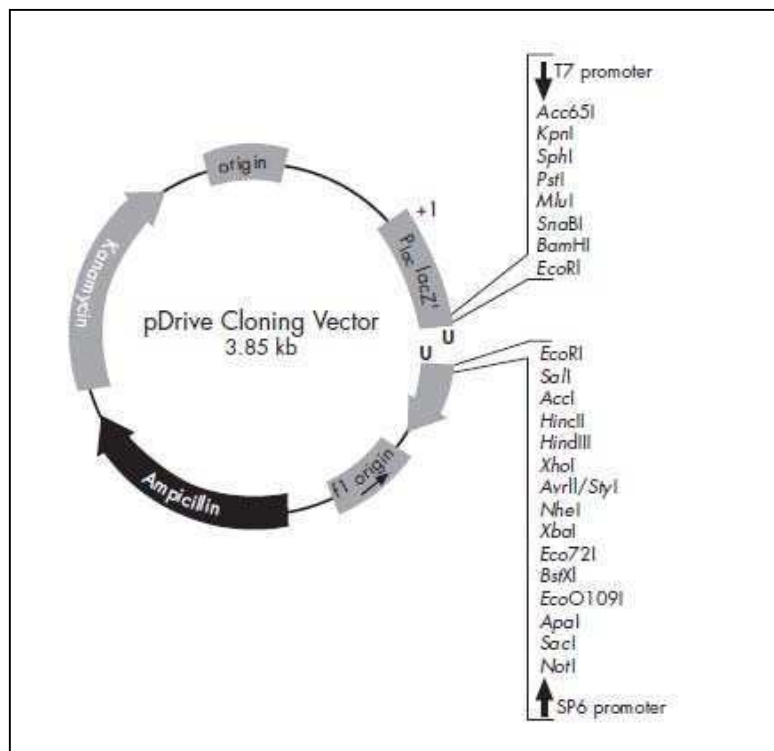


Figura 2: Esquema del vector pDrive(Qiagen). Se muestran los sitios únicos de restricción y los elementos que posee (resistencia a ampicilina y kanamicina, Plac lacZ para análisis de las colonias por coloración azul/blanco).

Transformación

Las células competentes de *E. coli* DH5 α se obtuvieron por incubación con CaCl₂ (Sambrook y Russell, 2001). Para la incorporación del plásmido, se incubaron 50 μ l de *E. coli* DH5 α competentes con 5 μ l del producto de ligación durante 30 min en hielo, luego se incubó por 2 min a 42°C y 5 min en hielo nuevamente. Las bacterias se recuperaron en medio SOC (Invitrogen) durante 1 h a 37°C con agitación y luego se

sembraron en placas AT^{Amp}. Luego, se seleccionó una colonia resistente al antibiótico, se la creció en presencia del mismo agente selectivo y se extrajo el ADN plasmídico por el método de lisis alcalina. El análisis de la obtención de los plásmidos recombinantes se realizó por la digestión de estos plásmidos con la enzima *Bam*HI (Promega).

Purificación de los plásmidos

Se picó una colonia de *E. coli* en 3 ml de LB^{Km} y se cultivó toda la noche con agitación. Las minipreparaciones de ADN plasmídico (minipreps) se realizaron por el método de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001).

Los plásmidos utilizados para transformar *Brucella* se purificaron mediante un protocolo que acopla la lisis alcalina tradicional con un sistema comercial de purificación. Para cada clon se largaron 2 cultivos en 3 ml LB^{Km}. Los plásmidos se purificaron por lisis alcalina y el último *pellet*, que contiene los plásmidos, se resuspendió en el *buffer* de lisis 7 del sistema comercial Illustra Plasmid Prep Mini Spin (GE Healthcare). Luego se siguieron las instrucciones del fabricante. Los plásmidos se precipitaron con n-butanol, en relación n-butanol:plásmido 9:1, se incubaron 2 min en hielo y se centrifugaron 15 min a 9.300 x g. Se descartó el sobrenadante, se dejó secar el *pellet* y luego se lo resuspendió en 10 µl de H₂O_{dd} estéril.

Determinación de la orientación del inserto

Para transformar *Brucella* se optó por plásmidos con el inserto clonado en la orientación antisentido, de esta manera se garantiza la no expresión del gen. Para determinar la orientación del inserto, se seleccionaron al azar 4 colonias resistentes a kanamicina para crecer en caldo y obtener los plásmidos. Estos se digirieron con *Bam*HI (Promega) y el producto se resolvió en gel de agarosa 1,5 %. La liberación del inserto del tamaño esperado confirma la orientación antisentido.

Transformación de *Brucella*

Las cepas mutantes se obtuvieron por mutagénesis insercional a través de un único evento de recombinación, basado en un método desarrollado por Haine *et al.* (Haine *et al.*, 2005) denominado mutagénesis asociada a plásmido (PTM), que luego de ser modificado y validado en nuestro laboratorio, se lo denominó PTM modificado (PTMm) (Trangoni, 2013).

a) Generación de las recombinantes de *Brucella spp.*

a.1. Preparación de cepas de *Brucella* electrocompetentes

Un inóculo de la bacteria se creció en YENB a 37°C con agitación hasta saturación (cultivo iniciador). Se inocularon cuatro tubos con 20 ml de YENB con 400 µl del cultivo iniciador y se crecieron a 37°C con agitación hasta llegar a OD_{600nm} 0,2. Los cultivos se centrifugaron a 4°C por 10 min a 12.000 x g. Se eliminó el sobrenadante, se agregó 20 ml de agua fría y se resuspendió el *pellet* suavemente. Se centrifugó a 4°C por 10 min a 12.000 x g. Se retiró el sobrenadante con pipeta. El *pellet* se resuspendió en 5 ml de H₂O_{dd}. Se centrifugó a 4°C por 10 min a 12.000 x g. Se retiró el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 800 µl de H₂O_{dd}. Las bacterias competentes se conservaron a -70°C hasta su uso.

a.2. Electroporación de *Brucella spp.*

Se descongelaron las bacterias en baño de hielo. A 50 µl de las bacterias competentes, se agregó de 3 a 4 µg de ADN plasmídico y se incubó durante 5 min en hielo. Luego se colocaron las células en una cubeta de electroporación preenfriada y se electroporaron (2,5 Kv, 25 µF y 400 Ω), en un electroporador ECM 630 (BTX). Las células se colocaron en 1 ml de medio SOC (Invitrogen) para recuperarlas durante 24 hs a 37°C con agitación. Luego se sembraron 150 µl en placas de AT suplementadas con el antibiótico correspondiente para la selección. Luego de incubar a 37°C por 3-4

días, se repicaron las bacterias transformadas en placas AT^{Km} y se conservaron alícuotas de las bacterias transformadas a -70°C.

Confirmación de la mutagénesis insercional

Previamente, se confirmó la identidad de las colonias transformadas seleccionadas mediante la PCR B4/B5, específica del género *Brucella* (Morata *et al.*, 2003). Luego, se procedió a determinar si la recombinación se produjo según lo esperado, mediante *Southern blot*. Se realizó un análisis bioinformático de las regiones involucradas utilizando el programa Vector NTI (Invitrogen). Este análisis permitió seleccionar las enzimas de restricción apropiadas y calcular el tamaño esperado de los productos de digestión en cada recombinante.

a) Digestión del ADN cromosómico

En cada caso, se digirieron 3 µg de ADN cromosómico con las enzimas *HindIII* (NEB) o *EcoRV* (Promega) según las condiciones indicadas por cada proveedor. Un µl del producto de digestión se resolvió en un gel de agarosa 0,8 % para confirmar la digestión.

b) Electroforesis

El producto de digestión se corrió en un gel de agarosa 0,8 % a 60 V durante 3 hs. Luego de la electroforesis el gel se fotografió bajo luz UV y se eliminó la calle correspondiente al marcador de peso molecular.

c) Transferencia

El gel se sometió a un proceso de depurinación mediante el lavado con una solución de NaCl 0,25N durante 30 min en agitación. Luego se incubó dos veces en una solución desnaturalizante (NaOH 0,5N; NaCl 1,5M) durante 20 min. Posteriormente, se incubó dos veces con una solución neutralizante (Tris-HCl 0,5M pH 7,5; NaCl 1,5 M) en agitación durante 20 min. Luego de dos lavados con agua, el ADN se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham Biosciences) durante

toda la noche. El ADN se fijó a la membrana mediante entrecruzamiento por exposición a luz UV (0,12 J/cm) (Vilber Lourmat).

d) Hibridación y revelado

Se utilizó el sistema comercial ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (GE Healthcare) para marcar, hibridar y detectar las sondas utilizadas. Se siguieron las indicaciones del fabricante en todos los procedimientos involucrados. Ambas sondas marcadas (inserto Lp1 y vector p-Drive) se utilizaron en una concentración final de 150 ng/ml. La hibridación se llevó a cabo en un horno rotatorio. Las membranas se revelaron por exposición a un film fotosensible (Amersham) durante 1 min, luego se sumergieron en una solución reveladora (Kodak) por 5 min, se lavaron con H₂O, se colocaron por 5 min en una solución fijadora (Kodak), se lavaron con H₂O nuevamente y se dejaron secar.

Caracterización de las mutantes

Curva de crecimiento

Como punto de partida, se emplearon cultivos saturados de las cepas mutante y parental, ajustados a una DO_{600nm} 0,5. A partir de una dilución 1/50 de éstos cultivos se inició el cultivo para la curva, en un volumen final de 30 ml. Se tomaron alícuotas de 0,8 ml cada 2 hs durante 72 hs y se leyó la DO_{600nm} en un espectrofotómetro (Novaspecll, LKB Biochrom). Los puntos se graficaron en una curva DO_{600nm} vs. tiempo (hs) y se realizó un ajuste a la función sigmoideal de Boltzmann. Un día antes de finalizar la toma de muestras, una alícuota del cultivo se sembró en placa AT para chequear la ausencia de contaminación.

Sensibilidad a detergente, antibiótico y especies reactivas del oxígeno

La sensibilidad a distintos agentes antimicrobianos se evaluó por inhibición del crecimiento en placa. Los cultivos saturados de la cepa mutante y parental crecidos

toda la noche se ajustaron a una DO_{600nm} 0,2. De esta dilución, se sembraron 150 μ l en placas AT (3 placas por cepa por tratamiento, suplementadas con Km en el caso de las cepas mutantes) y se colocaron 3 discos de papel de filtro Whatman de 6 mm de diámetro por placa conteniendo cada uno de los compuestos (SDS 10%, Polimixina B (PmB) 10mg/ml o H_2O_2 30%). Luego de incubar por 72 hs a 37°C, se midieron con un calibre dos diámetros de cada halo de inhibición y se promediaron los valores.

Prueba de aglutinación con acriflavina

Se realizó la prueba de aglutinación con acriflavina según la técnica descrita por Morozumi y Nicolet (Morozumi y Nicolet, 1986). Brevemente, se resuspendió una pequeña ansada de bacterias en 50 μ l de agua. En una placa de Petri, se colocaron 30 μ l de una solución de acriflavina (mezcla de cloruro de 3,6-diaminocridina y cloruro de 3,6-diamino-10-metilacridinium, Sigma) 0,1 X y se agregaron 30 μ l de la suspensión de bacterias. Se incubó 5 min a temperatura ambiente y se observó la presencia o ausencia de aglutinación.

Sensibilidad al pH

Los cultivos crecidos toda la noche de las cepas a evaluar se ajustaron a una DO_{600nm} 0,45. A cada tubo con 2,5 ml de TSB ajustado al pH correspondiente (pH 5 o 7) se le agregó 200 μ l de ésta suspensión bacteriana. Los cultivos se incubaron durante 5 hs a 37°C con agitación. Luego de este tiempo, se hicieron diluciones seriadas 1/10 y se sembraron 5 gotas de 10 μ l de cada dilución en placas de AT (suplementada con Km para las cepas mutantes). Se crecieron a 37°C y 4 días más tarde se realizó el recuento de colonias para calcular las UFC/ml. Cada punto se evaluó por triplicado. El límite de detección del recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) en placa fue estimado empíricamente por nosotros en 33 UFC/ml.

Evaluación de la virulencia de las cepas mutantes en el modelo murino

a) Preparación del inóculo

La cepa a inocular se creció en placa AT (suplementada con Km en el caso de las mutantes). Se resuspendió una ansada del cultivo en 5 ml de PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; NaH₂PO₄ 10mM; KH₂PO₄ 2mM; pH7,4) y se ajustó la concentración de la suspensión hasta lograr una lectura de DO_{600nm} \cong 0,3. Luego, se realizaron dos diluciones seriadas al 1/10, para utilizar finalmente la dilución 10⁻² como inóculo. Se realizaron todos los pasos en baño de hielo. Con este procedimiento se obtienen suspensiones bacterianas con una concentración aproximada de 5x10⁵ UFC/ml.

b) Titulación del inóculo

Para corroborar que el título del inóculo utilizado se encuentra dentro de los valores esperados se realizó un recuento con el sistema comercial Live/Dead (Baclight Molecular Probes) según las instrucciones del fabricante, empleando un microscopio de fluorescencia invertido (Nikon Eclipse TS100-F). Además, se realizó el recuento en placa como se indicó anteriormente.

c) Ensayo de virulencia en ratones

Para los ensayos con animales se emplearon ratones BALB/c hembras (6 semanas de edad). Los distintos grupos de ratones (n=3) fueron inoculados por vía intraperitoneal (i.p.) con 1x10⁵ UFC de la cepa recombinante en 200 μ l de PBS. Como control se inoculó, con la misma dosis y por la misma vía, un grupo con la cepa parental (*B. abortus* S2308, *B. suis* 1330 o *B. melitensis* 16M, según corresponda) y otro grupo con PBS (control negativo). Luego de 6 semanas post infección (p.i) los animales fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂. Se removieron los bazo, se pesaron y se procesaron para determinar la carga bacteriana de *Brucella* presente. Cada bazo se homogeneizó en 5 ml de PBS estéril, se realizaron 3 diluciones seriadas 1/10 y se sembraron 5 gotas de 10 μ l de cada dilución y del homogenato en placas AT

(suplementadas con Km para las cepas mutantes). Las placas se incubaron a 37°C por 72 hs y luego se realizó el recuento de las colonias para determinar las UFC por bazo.

Este protocolo cuenta con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) del CICVyA-INTA (Resolución 36/2011).

Evaluación de la capacidad para generar una respuesta inmune protectora

Se utilizó el modelo de protección esplénica para *B. abortus* (Boschioli *et al.*, 1997). Grupos de siete ratones fueron inoculados por vía i.p. con dos dosis (1×10^5 UFC y 1×10^6 UFC) de la cepa recombinante. Los inóculos se prepararon como se detalló anteriormente. Como control, se inoculó por la misma vía un grupo de ratones con la cepa vacunal *B. abortus* S19 (3×10^5 UFC) y otro grupo con PBS. Luego de 10 semanas p.i., todos los animales fueron desafiados por vía i.p. con 1×10^5 UFC de *B. abortus* S2308. Dos semanas post-desafío los ratones fueron sacrificados, sus bazos removidos, pesados y procesados para determinar la carga bacteriana presente. Cada bazo se homogeneizó en 5 ml de PBS estéril, se hicieron diluciones seriadas del homogenato y se realizó el recuento de las colonias para determinar las UFC por bazo.

Análisis estadístico

El peso de los bazos y el recuento de bacterias en bazo fueron analizados por el *test* no paramétrico Kruskal Wallis seguido de un *test* de comparación múltiple de datos utilizando el programa GraphPad.

Para los datos de sensibilidad a antimicrobianos y al pH se realizaron análisis de varianza y las medias fueron comparadas con el *test* de Tukey utilizando el programa InfoStat. Cuando no se cumplieron los supuestos de normalidad se realizó una transformación logarítmica de los datos. La significancia de los resultados se calculó fijando $\alpha=0,05$.

Los resultados se expresan como media \pm desvío estándar. En los gráficos, las barras de error corresponden al desvío estándar.

PARTE I

TIPIFICACIÓN MOLECULAR POR MLVA
DE AISLAMIENTOS DE *Brucella abortus*
DE ARGENTINA

INTRODUCCIÓN

Las especies de *Brucella* presentan una homología intraespecífica mayor al 80 % por estudios de hibridación ADN-ADN (Verger, 1985), una similitud de secuencia mayor al 98 % por genómica comparativa (Kattar *et al.*, 2008) y la secuenciación del ARNr 16S muestra un 100 % de identidad entre todas las especies de *Brucella* (Gee *et al.*, 2004). Asimismo, las especies *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* se subdividen en biovariedades por sus características de cultivo y serológicas. *B. abortus*, la especie causante de la brucelosis bovina cuenta con ocho biovariedades (Alton *et al.*, 1988). En Argentina, la biovariedad 1 es la más frecuente, pero también se suele aislar, en animales y en humanos (Lucero *et al.*, 2008) a la biovariedad 2 (Samartino, 2002). La biovariedad 2 se ha observado en infecciones naturales en bovinos, provocando además de la "tormenta" de abortos en los animales preñados infectados por *B. abortus*, terneros que nacen y mueren a las horas y también "natimortos" es decir, los terneros nacen en término pero muertos. En infecciones experimentales en cobayos, *B. abortus* biovariedad 2 produjo lesiones granulomatosas mucho más graves que la biovariedad 1 (Samartino L, comunicación personal).

Los métodos clásicos de tipificación incluyen requerimiento de suero y de CO₂, capacidad para producir H₂S y crecer en colorantes, actividad ureasa, lisis por fagos y aglutinación con sueros monoespecíficos (Alton *et al.*, 1988; Whatmore, 2009). Además de ser laboriosas, estas pruebas resultan insuficientes a medida que nuevas especies del género se van describiendo. En consecuencia, es sumamente útil contar con métodos de tipificación que tengan la resolución suficiente para permitir un seguimiento epidemiológico de los brotes de brucelosis y de los programas de control de la enfermedad. El desarrollo de herramientas moleculares para identificar y tipificar aislamientos del género *Brucella* ha sido un gran desafío debido a la falta de polimorfismo dentro del género. A la actualidad, se han planteado una variedad de abordajes diferentes. Los métodos basados en polimorfismos de longitud de

fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*, RFLP) se han aplicado a varios genes que codifican para Omps (Cloeckaert *et al.*, 1995; Vizcaino *et al.*, 1997; Al Dahouk *et al.*, 2005). Varias técnicas se basan en variaciones alélicas en sitios no identificados, por ejemplo los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*, AFLP), donde se hace una amplificación por PCR de fragmentos de restricción seleccionados (Whatmore *et al.*, 2005). Otros investigadores han examinado la utilidad de amplificar por PCR pequeñas repeticiones presentes en el ADN, como repeticiones consenso intergénicas de enterobacterias (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*, ERIC), repeticiones extragénicas palindrómicas (*Repetitive Extragenic Palindromic*, REP) y la amplificación aleatoria de fragmentos polimórficos (*Random Amplified Polymorphic DNA*, RAPD) (Fekete *et al.*, 1992; Tcherneva *et al.*, 1996; Tcherneva *et al.*, 2000). En general, la mayoría de estas pruebas carecen de reproducibilidad, tienen una limitada capacidad para diferenciar cepas aisladas y/o identificar biovariedades y no son apropiadas para una tipificación de rutina.

Dada la homogeneidad genética que se observa dentro del género *Brucella*, es de esperar que los marcadores basados en secuencias codificantes no provean la resolución suficiente para hacer un seguimiento epidemiológico. La presencia de unidades repetidas en tándem, que varían en su número dentro de regiones no codificantes del genoma, surgen de errores durante la replicación (Levinson y Gutman, 1987) o de eventos de recombinación desiguales (Paques *et al.*, 1998). Como consecuencia, estos lugares puntuales presentan una alta tasa de mutación, lo que los hace muy útiles para la búsqueda de polimorfismos que permitan tipificar especies bacterianas con genomas muy conservados, como *Bacillus anthracis* (Le Fleche *et al.*, 2001) y varias especies de micobacterias (Mazars *et al.*, 2001). La secuenciación de los genomas facilitó el desarrollo de nuevos métodos para tipificar *Brucella*, como la

tipificación *multilocus* de secuencias (*Multi Locus Sequence Typing*, MLST) y análisis *multilocus* de repeticiones en tándem de número variable (*Multiple Locus VNTR Analysis*, MLVA).

Los marcadores basados en repeticiones en tándem de número variable (*Variable Number Tandem Repeats*, VNTR) son, como su nombre lo indica, repeticiones en tándem de secuencias nucleotídicas que se encuentran en regiones no codificantes del genoma. Según el número de repeticiones, pueden clasificarse como microsatélites, de entre 1 y 5 pb de longitud, también llamados repeticiones cortas en tándem (*Short Tandem Repeats*, STR) o minisatélites, cuando las repeticiones tienen más de 5 pb. Estas repeticiones se han encontrado tanto en organismos eucariotas como en procariontes (Bennett, 2000). El análisis de VNTRs en múltiples loci, conocido como MLVA, es un método de tipificación molecular basado en marcadores VNTR que permite la identificación a nivel de biovariedad de aislamientos microbianos. El diseño racional de un esquema de tipificación mediante MLVA debería incluir marcadores con diferentes niveles de diversidad y poder discriminatorio. Así, se podrían agrupar los marcadores en 2 conjuntos: uno compuesto por marcadores muy variables que permitan diferenciar a las distintas cepas y otro formado por marcadores más estables, con baja diversidad, menos discriminativos, para poder tipificar a nivel de especie. Desde una perspectiva práctica, los primeros resultarían muy útiles a la hora de realizar un estudio epidemiológico en un brote puntual de la enfermedad, mientras que los segundos permitirían relacionar aislamientos en una escala regional o global. Ejemplos de este tipo de diseño se pueden encontrar en los trabajos de Whatmore *et al.* (Whatmore *et al.*, 2006) y Le Flèche *et al.* (Le Fleche *et al.*, 2006).

La utilidad de los MLVA en *Brucella* está bien documentada. García-Yoldi *et al.* (García-Yoldi *et al.*, 2007) compararon un esquema basado en MLVA con otros métodos basados en PCR para tipificar *B. suis*. Los resultados obtenidos con las

distintas metodologías fueron concordantes y además, los MLVA les permitieron realizar inferencias sobre la relación epidemiológica de las cepas. Empleando el mismo esquema de 10 *loci* VNTR Beja-Pereira *et al.* (Beja-Pereira *et al.*, 2009) sugirieron que un brote de brucelosis bovina en el área del Parque Yellowstone (Estados Unidos) se originó a partir de renos (*Cervus elaphus*) y no de bisones (*Bos bison*) como se postulaba hasta ese momento; e Higgins *et al.* (Higgins *et al.*, 2012) realizaron un estudio epidemiológico de *B. abortus* con aislamientos de ganado (*Bos primigenius*), renos y bisones que les permitió tomar decisiones sobre el manejo de estas tres especies de animales que conviven en el mismo área. En nuestro país, Lucero *et al.* (Lucero *et al.*, 2010) describieron dos brotes de brucelosis humana por consumo de queso sin pasteurizar (una familia de San Juan y otra de Buenos Aires) y determinaron mediante MLVA que los aislamientos obtenidos a partir de las personas infectadas de cada familia constituyen dos agrupamientos genéticos diferentes. Bricker *et al.* (Bricker *et al.*, 2003) describieron un esquema de MLVA que llamaron HOOFF-Prints basado en la repetición en tándem de una secuencia de 8 nucleótidos que se encuentra en ocho regiones del genoma de *B. abortus*. En un trabajo posterior, Bricker *et al.* (Bricker y Ewalt, 2005) evaluaron el desempeño de los HOOFF-Prints en cepas de *B. abortus* aisladas en Estados Unidos a través del análisis de características del método como capacidad de obtener un resultado en cada aislamiento procesado, reproducibilidad, estabilidad, poder discriminatorio y concordancia epidemiológica con otros métodos de tipificación, obteniendo resultados que superan el valor mínimo sugerido por el Grupo Europeo de Estudio de Marcadores Epidemiológicos (European Study Group on Epidemiological Markers, ESGEM) (Struelens, 1996). En 2009, Valdezate *et al.* (Valdezate *et al.*, 2009) reportaron el surgimiento de un linaje clonal de *B. abortus* biovariedad 3 en aislamientos clínicos en España, los HOOFF-Prints les permitieron revelar la relación genética entre dichos aislamientos.

En Argentina, los antecedentes de la aplicación de metodologías basadas en MLVA con fines de tipificación de *B. abortus* en el ámbito veterinario son inexistentes, por lo tanto se desconoce la estructura genética de las cepas circulantes en nuestro país. El objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad genotípica de aislamientos de *B. abortus* en Argentina utilizando un esquema de MLVA combinado, el cual incluye los HOOB-Prints (Bricker *et al.*, 2003) y algunos de los *loci* VNTR descritos por Whatmore (Whatmore *et al.*, 2006).

RESULTADOS

Tipificación por métodos bioquímicos

Para realizar un seguimiento epidemiológico de los brotes de brucelosis y de los programas de control de la enfermedad se requieren métodos de tipificación que tengan capacidad para resolver por debajo del nivel de especie. En esta parte se presentaran los resultados de la implementación de la tipificación mediante un esquema de MLVA en aislamientos de *B. abortus* de Argentina.

Primeramente, se tipificaron los aislamientos por los métodos bioquímicos convencionales. De las características bioquímicas analizadas, las cepas de la biovariedad 1 no requieren suero, no crecen en medio con tionina pero sí con fucsina, presentan actividad ureasa y producción de H₂S (Fig. 3) mientras que las de la biovariedad 2 requieren suero, no crecen en medio con colorantes y también presentan actividad ureasa y producción de H₂S. De los 58 aislamientos de *B. abortus* analizados, 51 pertenecen a la biovariedad 1 y 7 a la biovariedad 2. Por sus características, las cepas de referencia *B. abortus* S2308 y las vacunales *B. abortus* S19 y RB51 también pertenecen a la biovariedad 1.

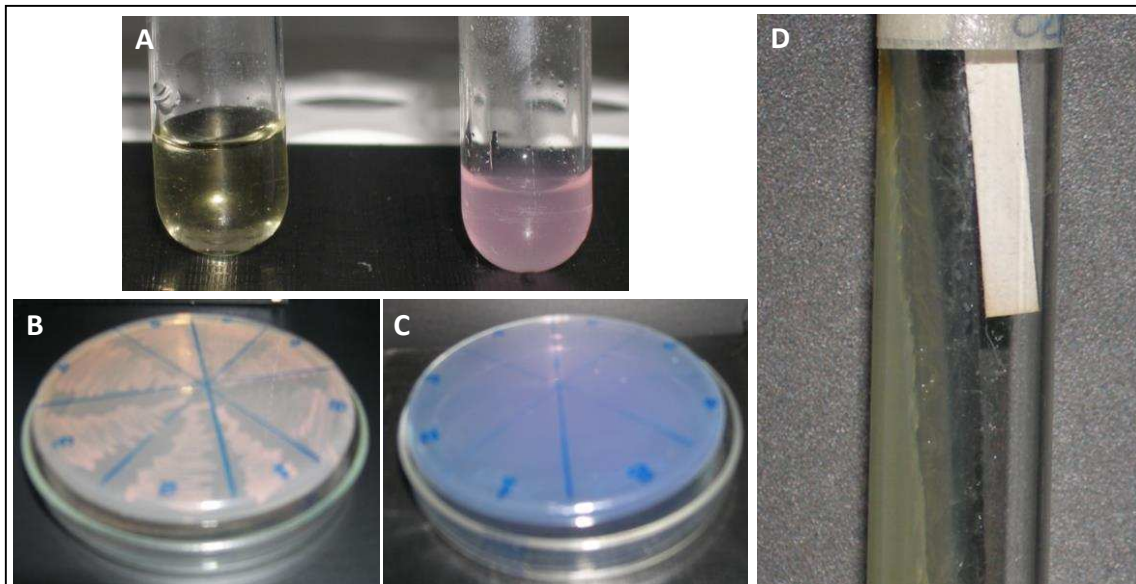


Figura 3: Tipificación bioquímica de un aislamiento de *B. abortus* biovariedad 1. El cambio de color de amarillo a rosa del medio de Christensen (A) indica actividad ureasa positiva, se observa crecimiento en medio AT suplementado con fucsina (B) pero no con tionina (C) y producción de H₂S (D) evidenciada por el oscurecimiento del papel previamente embebido en acetato de plomo.

Tipificación por MLVA

Los aislamientos se repicaron en medio AT en tubos en pico de flauta. Luego de 3-4 días las colonias se resuspendieron en solución salina y se inactivaron. El ADN liberado en la solución se empleó como templado para las reacciones de PCR. Los productos de amplificación se resolvieron en geles de poliacrilamida 8 % (Fig. 4). Se determinó el tamaño de las bandas por comparación con los marcadores de peso molecular y se asignó el alelo correspondiente. Las diferencias de tamaño están dadas por variaciones en el número de repeticiones presentes en cada aislamiento. Al considerar los alelos de cada aislamiento para cada uno de los 13 marcadores empleados se determinaron los perfiles genotípicos, formados por una letra (que indica el perfil de los marcadores HOOF-Print) y un número (que indica el perfil de los marcadores VNTR).

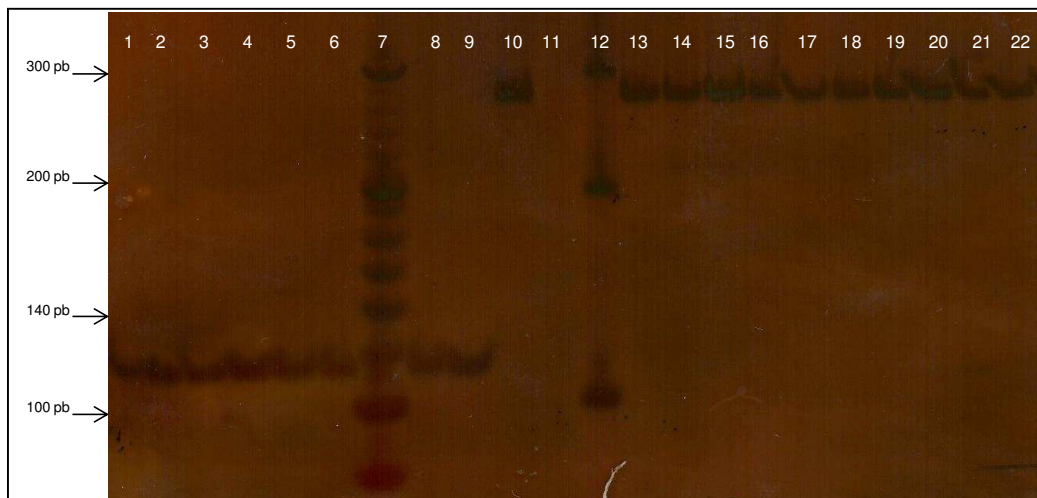


Figura 4: Resolución de los productos de amplificación mediante gel de poliacrilamida 8%. En esta figura se muestra a modo de ejemplo uno de los geles. Calles 1-6, 8 y 9: productos de amplificación correspondientes al VNTR 14, aislamientos Bab1 44 a Bab1 51. Calle 7: marcador 20 pb (O´RangeRuler DNA Ladder, Fermentas). Calle 11: sin muestra. Calle 12: marcador 100 pb (DNA Ladder, Invitrogen). Calles 10, 13-22: productos de amplificación correspondientes al VNTR 24, aislamientos Bab1 1 a Bab1 11.

Tabla 6: Perfiles genotípicos de los aislamientos. En el recuadro superior se encuentran las cepas de referencia, en el recuadro del medio, los aislamientos de la biovariedad 1 y en el recuadro inferior, los aislamientos de la biovariedad 2. Se encuentran resaltados los aislamientos que presentan igual genotipo.

Cepa	HOOF-Prints							VNTR						Perfil ^a	Biovariedad
	1	2	3	4	5	6	8	7	14	21	24	26	27		
S19	12	1	6	8	8	4	10	1	1	2	5	3	1	A1	1
RB51	12	1	6	8	8	4	10	1	1	2	5	3	1	A1	
2308	11	1	6	8	6	5	10	1	1	2	5	3	1	F1	
Bab1 1	11	1	6	8	6	4	10	0	1	2	5	3	1	G0	
Bab1 3	10	4	5	5	4	3	10	1	1	2	5	3	1	I1	
Bab1 4	10	2	6	9	6	4	13	0	1	2	5	3	1	J0	
Bab1 5	11	2	6	9	6	4	10	0	1	2	5	3	1	K0	
Bab1 6	11	2	6	4	4	4	10	0	1	2	5	3	1	L0	
Bab1 7	10	4	5	8	6	4	10	1	1	2	5	3	1	M1	
Bab1 8	11	2	6	5	4	3	13	0	1	2	5	3	1	NO	
Bab1 9	11	4	5	8	3	3	14	1	1	2	5	3	1	O1	
Bab1 10	9	4	6	5	5	3	7	1	1	2	5	3	1	P1	
Bab1 11	4	2	6	5	3	4	8	0	1	2	5	3	1	Q0	
Bab1 12	11	7	9	8	3	4	7	1	1	2	5	3	1	R1	
Bab1 13	3	4	4	6	3	3	13	1	1	2	5	3	1	S1	
Bab1 14	11	4	4	4	5	3	5	1	1	2	5	3	1	T1	
Bab1 15	8	2	6	5	5	4	9	0	1	2	5	3	1	U0	
Bab1 16	3	2	6	8	6	4	9	1	1	2	5	3	1	V1	
Bab1 17	10	2	6	8	5	4	8	1	1	2	5	3	1	W1	
Bab1 20	10	4	5	5	3	3	13	1	1	2	5	3	1	D1	
Bab1 21	10	4	5	5	3	3	13	0	1	2	5	3	1	D0	
Bab1 22	11	3	6	8	5	5	9	0	1	2	5	3	1	B0	
Bab1 23	11	3	6	8	5	5	9	1	1	2	5	3	1	B1	
Bab1 28	11	3	6	8	5	5	9	1	1	2	5	3	1	B1	
Bab1 24	2	3	6	6	3	5	8	0	1	2	5	3	1	Z0	
Bab1 25	11	3	6	5	5	5	9	1	1	2	5	3	1	a1	
Bab1 26	10	4	5	4	3	3	13	1	1	2	5	3	1	b1	
Bab1 27	8	4	4	3	3	3	9	0	1	2	5	3	1	c0	
Bab1 29	8	4	12	3	3	3	9	1	1	2	5	3	1	d1	
Bab1 30	6	7	4	4	3	3	7	0	1	2	5	3	1	e0	
Bab1 31	11	3	6	8	7	5	11	0	1	2	5	3	1	f0	
Bab1 32	11	3	5	8	6	5	11	0	1	2	5	3	1	g0	
Bab1 34	11	3	6	8	6	3	9	1	1	2	5	3	1	i1	
Bab1 35	11	2	5	8	6	3	2	1	1	2	5	3	1	j1	
Bab1 36	11	4	6	8	7	3	9	0	1	2	5	3	1	k0	
Bab1 37	10	2	5	5	3	3	13	1	1	2	5	3	1	l1	
Bab1 38	11	5	6	8	7	3	9	0	1	2	5	3	1	m0	
Bab1 40	10	2	5	5	3	3	12	1	1	2	5	3	1	o1	
Bab1 41	11	2	5	8	7	5	10	0	1	2	5	3	1	p0	

Bab1 42	11	4	6	8	7	5	10	0	1	2	5	3	1	q0	
Bab1 43	2	4	6	5	3	3	9	1	1	2	5	3	1	r1	
Bab1 44	10	2	4	5	3	3	13	1	1	2	5	3	1	s1	
Bab1 45	11	4	6	8	7	5	10	0	1	2	5	3	1	q0	
Bab1 46	10	4	5	5	3	3	14	1	1	2	5	3	1	u1	
Bab1 47	10	2	5	5	3	3	14	1	1	2	5	3	1	v1	
Bab1 48	11	2	6	8	8	5	10	0	1	2	5	3	1	C0	
Bab1 49	11	2	6	8	8	5	10	0	1	2	5	3	1	C0	
Bab1 50	11	2	6	8	8	5	9	0	1	2	5	3	1	w0	
Bab1 51	11	2	6	7	8	5	10	0	1	2	5	3	1	x0	
Bab1 2	11	1	6	7,8	4	3,4	10	0	1	2	5	3	1	nd ^b	
Bab1 18	10	2	6	6	5	3,4	8	1	1	2	5	3	1	nd	
Bab 19	3	4	5	5	3	3,4	13	1	1	2	5	3	1	nd	
Bab1 33	11	3	5	8	6	3	sa ^c	1	1	2	5	3	1	inc ^d	
Bab1 35	10	4	5	5	3	3	sa	1	1	2	5	3	1	inc	
Bab2 1	11	2	6	8	6	5	10	1	1	2	5	3	1	E1	2
Bab2 2	11	2	6	8	6	5	10	1	1	2	5	3	1	E1	
Bab2 3	11	2	6	8	6	5	10	1	1	2	5	3	1	E1	
Bab2 4	11	2	6	8	6	5	10	1	1	2	5	3	1	E1	
Bab2 5	11	2	6	8	6	5	10	1	1	2	5	3	1	E1	
Bab2 6	11	2	6	8	6	5	10	1	1	2	5	3	1	E1	
Bab2 7	11	2	6	8	6	5	10	1	1	2	5	3	1	E1	

a. Cada perfil diferente obtenido para los HOOF-Print (Bricker *et al.*, 2003) se identificó con una letra del alfabeto (la misma letra en mayúscula o minúscula indica perfiles diferentes). Los dos perfiles obtenidos para los VNTR (Whatmore *et al.*, 2006) se designaron 0 y 1. El código de cada perfil correspondiente a la combinación de HOOF-Print y VNTR y está formado por una letra y un número. b. no determinado. c. sin amplificación. d. incompleto.

En la Tabla 6 se muestran los perfiles genotípicos de los aislamientos de *B. abortus* para 7 marcadores HOOF-Prints y 6 marcadores VNTR. No se obtuvo producto de amplificación del HOOF-Print 7, por este motivo, no se muestran los resultados de este *locus*. A partir del MLVA, se pudieron determinar 56 perfiles genotípicos, de los cuales, 47 resultaron únicos. El genotipo E1 con el cual se tipificó a todos los aislamientos pertenecientes al biovariedad 2, resultó el más frecuente (n=7). Asimismo, ningún aislamiento de *B. abortus* biovariedad 1 presentó el perfil E1, por lo tanto E1 sería un genotipo exclusivo de la biovariedad 2. Los perfiles genotípicos B1 y C0, resultaron los segundos más frecuentes (con dos aislamientos cada uno). Las cepas vacunales *B. abortus* S19 y RB51 compartieron el mismo genotipo, A1.

Análisis de la diversidad genética

De los aislamientos analizados, tres poseen múltiples alelos para un *locus* dado (Bab1 2, Bab1 18 y Bab1 19). La presencia de más de un alelo podría explicarse por coexistencia de cepas distintas en la misma muestra. Sin embargo, es necesario re-aislar la bacteria y realizar el análisis de colonias individuales para poder confirmar esta observación. De Bab1 33 y Bab1 39 no se logró amplificar el alelo del HOOF-Print 8. Por lo tanto, estos cinco aislamientos fueron excluidos del análisis de los resultados. El número de alelos observado en cada *locus* en la población analizada está entre 1, en el caso de los VNTR, y 10 en el caso del HOOF-Print 8. Las frecuencias de los alelos HOOF-Prints se puede observar en la Figura 5.

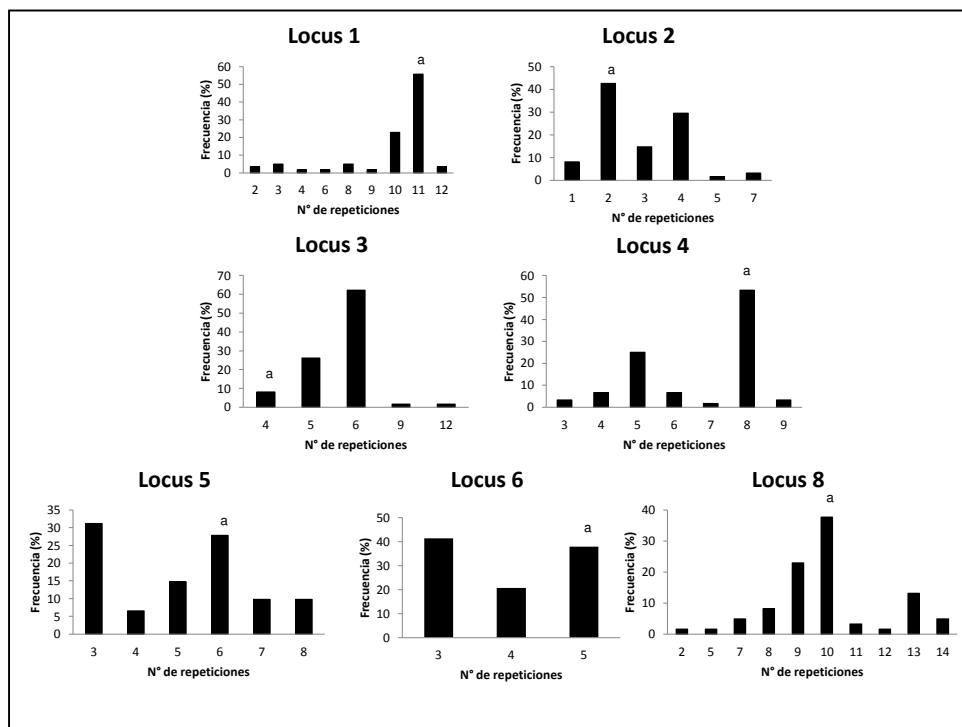


Figura 5: Frecuencia observada de los alelos HOOF-Prints en los aislamientos analizados en este trabajo. Los alelos correspondientes a la biovariedad 2 se indican con "a".

Para el esquema HOOF-Prints el número de repeticiones varió desde 1 (HOOF-Prints 2) hasta 14 (HOOF-Prints 8). Mientras que para los VNTR, este número varió de 0 (VNTR 7) a un máximo de 5 repeticiones (VNTR 24). Se calculó la diversidad alélica de cada *locus* (Tabla 7) como sugiere la ESGEM, siendo el HOOF-Print 8 el *locus* con

mayor poder discriminatorio (IDHG: 0,836). El resto de los *loci* HOOF-Prints tienen índices de diversidad mayores a 0,6. Por el contrario, para el esquema de VNTR, un único *locus* tiene capacidad discriminativa (VNTR 7, IDHG: 0,507). Los VNTR 14, 21, 24, 26 y 27 tienen un poder discriminatorio nulo dado que presentan un solo alelo en los aislamientos analizados. Esto indicaría que estos *loci* no son polimórficos en la población estudiada.

Con el objetivo de evaluar la capacidad discriminativa del método en la población local en estudio, se calculó el índice discriminatorio de Simpson, según Hunter y Gaston. El poder resolutivo del esquema de MLVA completo utilizado resultó muy cercano a 1 (IDHG: 0,9833) mientras que el índice discriminatorio para el esquema conformado únicamente por los HOOF-Print fue de 0,9825, resultando muy similar al del esquema completo (HOOF-Print + 6 VNTR). Por lo tanto, a partir de este resultado podemos concluir que los VNTR podrían ser eliminados del esquema para futuras genotipificaciones de aislamientos de *B. abortus*, sin restar capacidad discriminativa de forma significativa.

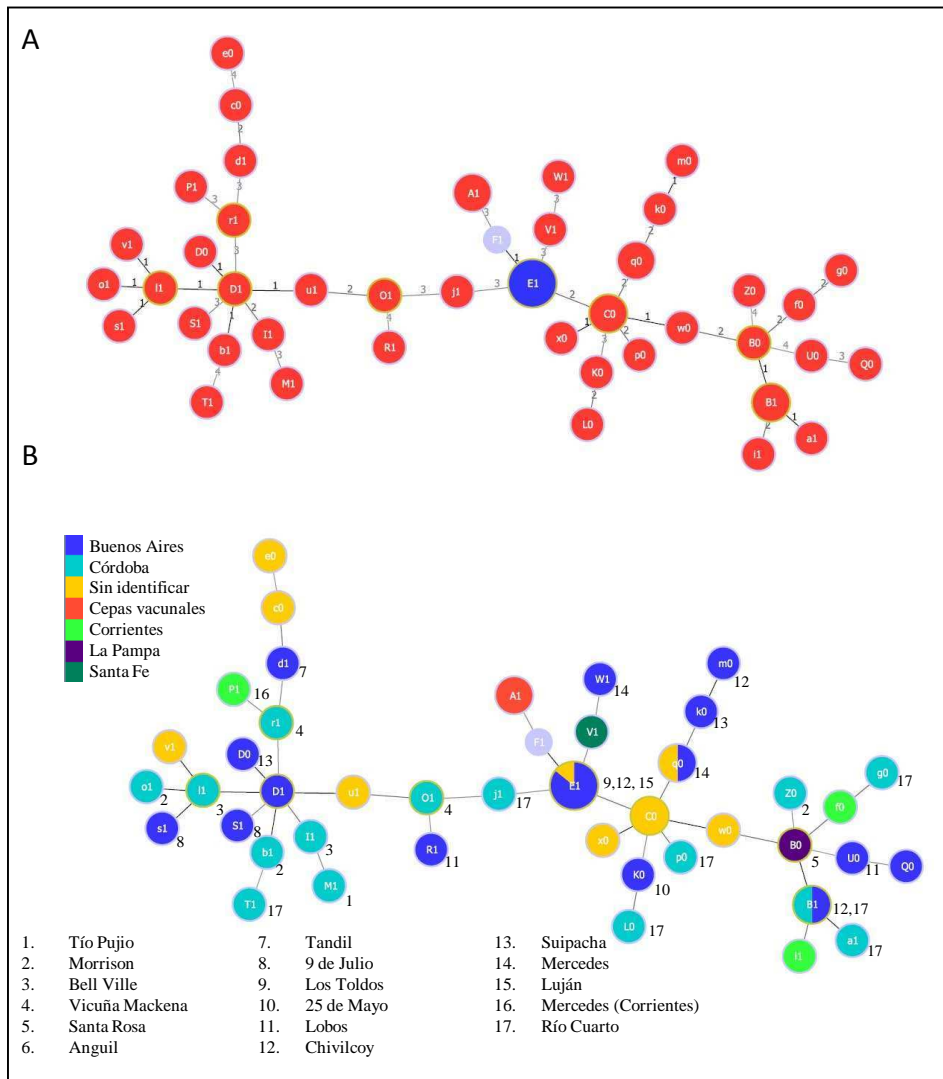
Tabla 7: Poder discriminatorio de los 13 *loci* analizados en este trabajo. El poder discriminatorio del conjunto de marcadores empleados es 0,9833.

Locus	IDHG ^a	IC ^b	Nº alelos	Alelos ^c	Rango de tamaño
HOOF-Print 8	0,84	0,78-0,88	10	2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14	91-187 pb
HOOF-Print 5	0,79	0,72-0,85	6	3, 4, 5, 6, 7, 8	146-186 pb
HOOF-Print 2	0,73	0,65-0,79	6	1, 2, 3, 4, 5, 7	93-141 pb
HOOF-Print 4	0,70	0,60-0,79	7	3, 4, 5, 6, 7, 8,9	147-195 pb
HOOF-Print 1	0,69	0,57-0,79	9	2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12	140-220 pb
HOOF-Print 6	0,65	0,58-0,71	3	3, 4, 5	166-182 pb
HOOF-Print 3	0,60	0,49-0,70	5	4, 5, 6, 9, 12	151-215 pb
VNTR 7	0,51	0,48-0,53	2	0, 1	260-279 pb
VNTR 24	0,00	0,00-0,14	1	5	275 pb
VNTR 14	0,00	0,0-0,14	1	1	113 pb
VNTR 26	0,00	0,00-0,14	1	3	214 pb
VNTR 21	0,00	0,00-0,14	1	2	171 pb
VNTR 27	0,00	0,00-0,14	1	1	212 pb

^aÍndice de discriminación de Hunter-Gaston (IDGH). Los marcadores se encuentran ordenados de mayor a menor poder discriminatorio. ^b Intervalo de confianza para el IDHG, con un nivel de confianza del 95%. ^c Los alelos se nombran según el número de repeticiones.

Análisis de la relación entre los distintos genotipos

La relación entre variantes genéticas descritas a partir de los 56 aislamientos analizados se determinó mediante el algoritmo goeBURST. Este algoritmo construye complejos clonales compuestos por aquellos genotipos relacionados entre sí y que solo varían en 1 a 3 marcadores del total de 13 estudiados. Los genotipos descritos en el presente estudio se relacionaron en un gran complejo clonal, dentro del cual se pueden observar tres grandes agrupamientos conectados por el genotipo E1, correspondiente a los aislamientos de la biovariedad 2 (Fig. 6A). De esta manera, E1 correspondería al genotipo fundador del gran complejo clonal definido según variantes de triples de alelos.



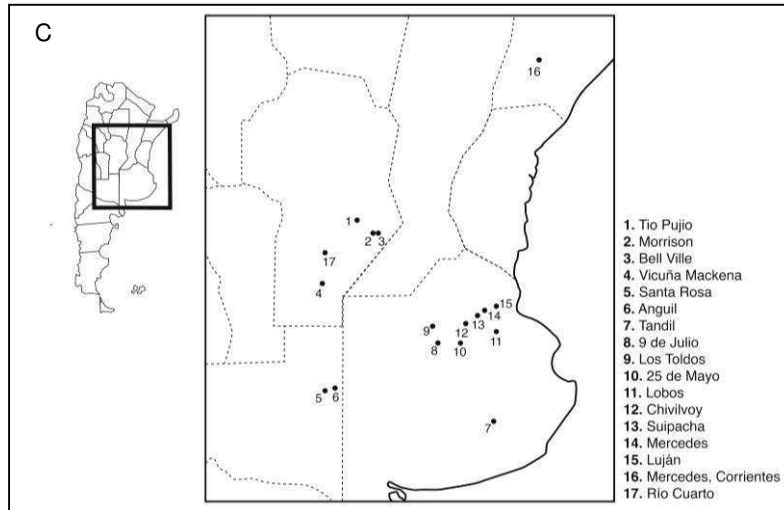


Figura 6: Relación entre los aislamientos y la cepa de referencia mediante goeBURST a partir de los 13 marcadores estudiados. F1 corresponde al genotipo de la cepa de referencia *B. abortus* 2308. (A) Se observan un complejo clonal con genotipo fundador E1. El genotipo F1 corresponde a la cepa 2308 de la cual derivan las cepas vacunales S19 y RB51 (genotipo A1). Cada círculo representa un único perfil, su tamaño refleja la frecuencia de ese genotipo. Los círculos rojos corresponden a aislamientos de la biovariedad 1 y los azules a la biovariedad 2. El número sobre las ramas indica en cuántos *loci* difieren los dos aislamientos conectados. (B) Relación geográfica entre los perfiles genotípicos de los aislamientos. Los colores de los círculos representan a las diferentes provincias y los números indican la localidad de dónde proviene la cepa. (C) Mapa de la Argentina donde están indicados, en la región ampliada, los lugares de procedencia de los aislamientos analizados. Se observa que la mayoría de los aislamientos provienen del sur de Córdoba y del noreste de Buenos Aires.

Por otro lado, el genotipo A1 (cepas vacunales) se encontró altamente relacionado con el F1 el cual corresponde a la cepa a partir de la cual las cepas vacunales fueron obtenidas (*B. abortus* S2308). El algoritmo goeBURST permite realizar un análisis de los complejos clonales según datos asociados a la colección de muestras genotificadas. De esta manera, los complejos clonales se evaluaron en el contexto espacial y temporal de la colección en estudio. El análisis, teniendo en cuenta el lugar de procedencia de las cepas, no mostró correlación entre la procedencia geográfica y los genotipos (Figuras 6B y 6C), mientras que resultó interesante observar que el genotipo fundador E1 no solo fue el más frecuente sino el que además pudo ser aislado en tiempos distintos (Tablas 6 y 7).

DISCUSIÓN

El esquema de MLVA utilizado en este trabajo se eligió en base a la disponibilidad de esquemas publicados al momento de diseñar el estudio, su poder discriminatorio, la disponibilidad de recursos, tecnología y experiencia requerida para realizar la técnica.

A pesar de varios intentos y modificaciones en las condiciones de la reacción, no se logró el producto de amplificación del HOOOF-Print 7. Bricker *et al.* (Bricker *et al.*, 2003) mencionan que esta amplificación se puede optimizar mediante PCR multiplex con los HOOOF-Prints 2 y 8, pero en nuestro caso no obtuvimos resultado positivo empleando esta estrategia. Por lo tanto, el esquema difiere del original propuesto por Bricker *et al.* (Bricker *et al.*, 2003) en la ausencia de un marcador.

Como los marcadores HOOOF-Prints son muy discriminatorios la gran mayoría de los perfiles obtenidos (47/56) son únicos. Analizando 22 aislamientos de *B. abortus* biovariedad 1, Bricker *et al.* (Bricker *et al.*, 2003) encontraron 15 genotipos diferentes (todos comparten el mismo alelo para los HOOOF-Print 5, 6 y 7), proviniendo de muestras tomadas de la misma tropa aquellos genotipos que resultaron iguales. Whatmore *et al.* (Whatmore *et al.*, 2006) genotipificaron 44 aislamientos de *B. abortus* biovariedad 1 procedentes de todo el mundo y todos los patrones genotípicos resultaron distintos.

Ningún aislamiento de *B. abortus* biovariedad 1 presentó el perfil E1, por lo tanto E1 sería un genotipo exclusivo de la biovariedad 2. De todas maneras, se necesitaría ampliar el panel de cepas con otras biovariedades para confirmar que dicho perfil es marcador de la biovariedad 2.

Los perfiles HOOOF-Prints obtenidos para las cepas S19 y RB51 son iguales entre sí pero difieren de aquellos publicados previamente (Whatmore *et al.*, 2006), que también resultaron iguales entre sí. En el perfil determinado por nosotros, para el HOOOF-Print 1 se obtuvieron 7 repeticiones más que las publicadas, para el HOOOF-Print 2, 3 repeticiones de más, mientras que para los HOOOF-Print 3, 4, 5, 6 y 8 se obtuvieron

respectivamente 2, 6, 6, 6 y 8 repeticiones de menos. Las discrepancias observadas entre los perfiles HOOF-Prints publicados y la obtenida en esta tesis para las cepas vacunales *B. abortus* S19 y RB51 son difíciles de fundamentar. Por un lado, podría argumentarse que los *loci* analizados en este esquema son muy poco estables, con lo cual, debilita su implementación con fines epidemiológicos. Sin embargo, el grupo del Dr. Whatmore realizó 13 pasajes de cepas de *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis* durante casi un año y los marcadores evaluados resultaron ser estables en ese período (Whatmore *et al.*, 2006). Por otro lado, podría cuestionarse la estabilidad genética de las cepas vacunales.

Recientemente, se analizó la estabilidad genética de estas dos cepas vacunales mediante el esquema MLVA-16 (Dorneles *et al.*, 2013). Se encontró baja diversidad entre las cepas vacunales estudiadas entre los distintos fabricantes y una alta estabilidad *in vitro*, al menos durante los 10 pasajes realizados. Restan conocer estudios a largo plazo o frente a distintas presiones de selección. Es importante mencionar que desconocemos la historia de estas cepas vacunales estudiadas (número de pasajes, año de entrada al país). Una alternativa posible, sería confirmar nuestros resultados en otros laboratorios, y de esta manera descartar una baja reproducibilidad de la técnica en los distintos laboratorios. Es importante considerar que los cambios genotípicos de las cepas vacunales podrían tener un impacto directo en la eficacia protectora de las mismas. Este es otro motivo fundamental que alienta a obtención de herramientas de tipificación rápidas y suficientemente discriminativas que permitan monitorear la producción de vacunas.

De acuerdo a la experiencia de otros autores, debido a su alta variabilidad, los HOOF-Prints son muy eficientes para distinguir cepas en un brote local pero, justamente por su alta variabilidad, tienen un uso acotado para predecir correctamente la especie de un aislamiento dado (Le Fleche *et al.*, 2006). Esta observación va en la misma línea

que nuestros resultados. Por este motivo, el análisis de los resultados debe realizarse con cautela y utilizar la genotipificación por MLVA mediante los marcadores HOOF-Prints como complemento de los estudios epidemiológicos tradicionales, no como único método de tipificación. Por ejemplo, ante un brote de brucelosis, se podría realizar una identificación inicial a nivel especie y/o biovariedad mediante alguno de los esquemas de PCR disponibles (Lopez-Goni *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2011) y luego identificar los genotipos circulantes mediante los HOOF-Prints.

Cuando se compara la diversidad alélica de los HOOF-Prints obtenido con los disponibles en la literatura no hay diferencias importantes, excepto en el HOOF-Print 8. En el presente trabajo, obtuvimos una diversidad alélica máxima en este *locus* (0,83) mientras que tanto para Bricker *et al.* (Bricker y Ewalt, 2005) como para Higgins *et al.* (Higgins *et al.*, 2012), quienes analizaron aislamientos de la misma procedencia, fue de 0. Cabe mencionar que en esos estudios, fueron incluidos aislamientos de distintas regiones de Estados Unidos. El análisis de aislamientos de regiones geográficas diferentes, que además fueron elegidos con distintos criterios puede explicar esta discrepancia.

Dado que la diversidad global del panel de VNTR muy variables diseñados por Whatmore *et al.* (no incluidos en esta tesis) es similar a la de los HOOF-Prints para una misma población, tienen el mismo poder de discriminación (Whatmore *et al.*, 2006). El tiempo implementado en el procesamiento de 7 *loci* adicionales y el costo que esto acarrea, no se traduce en un incremento significativo del poder discriminatorio del esquema de MLVA. Por este motivo se decidió que el grupo de marcadores hipervariables estaría compuesto únicamente por los *loci* HOOF-Prints (excluyendo los marcadores muy variables de Whatmore *et al.*) y el grupo de marcadores más estable lo formarían los *loci* VNTR seleccionados. Los *loci* VNTR empleados en nuestro trabajo presentan escasa o nula variabilidad ya que fueron

diseñados con el objeto de diferenciar entre las distintas especies. Pese a esto, se incluyeron en el estudio para comparar el perfil genotípico obtenido por estos autores con el publicado por otros para aislamientos de *B. abortus* del resto del mundo. Sorprendentemente, hemos encontrado diferencias respecto de los alelos publicados previamente. En el trabajo de Whatmore *et al.* (Whatmore *et al.*, 2006) el alelo de las cepas de *B. abortus* para el *locus* VNTR 7 es el 2 y para el *locus* VNTR 26 el 4, mientras que en el presente trabajo los alelos obtenidos fueron 0 y 1 para el *locus* VNTR 7 y 1 para el *locus* VNTR 26. Si bien estos marcadores son muy estables, no están exentos de sufrir mutaciones. En este sentido, los autores mencionados anteriormente encontraron una delección de 3 pb en una de las copias de la repetición en un alelo del VNTR 7.

Se han descrito en la literatura ejemplos del uso combinado de un grupo de marcadores HOOOF-Prints y VNTR. El esquema de 10 *loci* VNTR utilizado por Beja-Pereira *et al.* (Beja-Pereira *et al.*, 2009) e Higgins *et al.* (Higgins *et al.*, 2012) está compuesto por una combinación de 4 marcadores HOOOF-Prints y 6 VNTR que surgió de un estudio llevado a cabo por la Dra. Harris en 2008 (Higgins *et al.*, 2012). A partir de la genotipificación de 82 aislamientos de *Brucella* utilizando el esquema completo de 21 marcadores, seleccionó aquellos 10 que permitían diferenciar los aislamientos en agrupamientos relevantes desde el punto de vista epidemiológico. A partir del procesamiento de aislamientos locales en nuestro estudio con el esquema seleccionado, y de acuerdo a los valores de poder discriminatorio obtenidos en nuestro trabajo (IDHG= 0,9833 para el esquema HOOOF-Prints + 6 VNTR; IDHG= 0,9825 para HOOOF-Prints), se podrían genotipificar los aislamientos únicamente con los marcadores HOOOF-Prints, simplificando de esta manera el trabajo y abaratando costos.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, el genotipo E1 se describió únicamente en aislamientos de la provincia de Buenos Aires. Sin embargo, el muestreo realizado en el presente estudio es un muestreo por conveniencia, considerando entonces que la mayoría de los aislamientos provienen de dicha provincia, esta distribución del genotipo E1 podría deberse al sesgo de la muestra.

Por otro lado, es posible que la rápida evolución de los *loci* Hoof-Prints enmascare las diferencias regionales en la composición de los genotipos, es decir, se podrían obtener dos genotipos iguales en aislamientos no relacionados y viceversa, dos genotipos distintos en aislamientos relacionados epidemiológicamente. Cabe destacar la permanencia temporal del genotipo E1, perteneciente a todos los aislamientos de a biovariedad 2. Esto indicaría que este genotipo tendría una alta eficacia biológica (*fitness*). Que sea el genotipo más frecuente, sólo por un hecho matemático, aumenta la probabilidad que sufra mutaciones y que, de esta manera, se generen nuevas cepas y/o especies. Este trabajo aporta evidencias a favor de la teoría de Margaret Meyer (Meyer, 1990), que postuló en la década de los 80, basándose en evidencias bioquímicas, que la biovariedad 2 de *B. abortus* podría haber dado origen a todo el género. Sin embargo, es importante el tipo de marcadores que se seleccionan para describir las cepas. Muy recientemente se ha analizado el efecto de seleccionar ciertos marcadores VNTR en un esquema de tipificación para micobacterias basado en secuencias repetitivas (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number Tandem Repeats*, MIRU-VNTR) y se ha observado que el agrupamiento de los distintos aislamientos depende del número de *loci* que se consideren en el panel (Mears *et al.*, 2015), indicando que hay que proceder con mucha cautela a la hora de extraer conclusiones a partir de este tipo de estudios. La aparición de nuevas tecnologías posibilitó en paralelo el desarrollo de mejores métodos de tipificación, es

de esperar entonces, que las modernas metodologías de secuenciación masiva sean próximamente empleadas con estos fines en *B. abortus*.

Como herramienta epidemiológica, el MLVA ofrece una resolución significativa comparado con los métodos de tipificación convencionales, que generalmente no tienen poder discriminativo por debajo del nivel biovariedad. Los marcadores que se incluyen en un estudio de MLVA de forma separada no son informativos, son muy variables o muestran un alto nivel de homoplasia, pero la combinación de un grupo bien seleccionado de estos marcadores podría ser muy discriminativo. Actualmente, está siendo empleado el esquema de MLVA-16 propuesto por Le Flèche *et al.* (Le Fleche *et al.*, 2006), los agrupamientos de las cepas de *B. abortus* en biovariedades 1, 2 y 4 generados por este esquema concuerdan con los resultados de la tipificación bioquímica y el patrón de PCR-RFLP para el gen *omp2a*. Este esquema de MLVA-16 ha sido utilizado para establecer la estabilidad genética de las cepas vacunales S19 y RB51 de *B. abortus* (Dorneles *et al.*), para tipificar aislamientos humanos de *B. melitensis* en Egipto, Qatar y Libia (Tiller *et al.*, 2009), para tipificar aislamientos de *B. suis* en China realizados entre 1960 y 2010 (Li *et al.*) y para determinar la diversidad genética de aislamientos de *B. ovis* del estado de Río Grande del Sur (Brasil), por nombrar sólo algunos ejemplos. Dorneles *et al.* (Dorneles *et al.*, 2014) mostraron la estabilidad genética *in vivo* de este esquema compuesto por 16 marcadores VNTR y en el mismo trabajo determinaron la existencia de únicamente tres genotipos en un brote de brucelosis causado por *B. abortus* (dos genotipos de campo y el de la cepa vacunal RB51).

La técnica de MLVA es relativamente sencilla ya que sólo requiere determinar el tamaño del producto de amplificación de la PCR (que puede automatizarse mediante electroforesis capilar en un secuenciador de ADN o procesarse con los métodos de electroforesis tradicionales en geles de agarosa o poliacrilamida) y además permite el

fácil intercambio de información entre grupos, por ejemplo mediante la construcción de bases de datos *on-line* con los perfiles genotípicos de todos los aislamientos, como el MLVA Bank (Grissa *et al.*, 2008), donde se pueden obtener y actualizar los genotipos de *Brucella* procesados mediante el esquema MLVA-16 (Le Fleche *et al.*, 2006).

El uso de marcadores VNTR para realizar estudios filogenéticos y taxonómicos en bacterias es criticado debido a su rápida evolución y a una potencial homoplasia que pueden llevar a conclusiones erróneas. Pero, en especies tan homogéneas como *Brucella*, donde es difícil detectar variabilidad por otros métodos, el empleo de VNTRs constituye una alternativa viable.

En Argentina, no existen antecedentes de la aplicación de metodologías de tipificación basadas en MLVA de *B. abortus* en el ámbito veterinario, por lo tanto se desconoce la estructura genética de las cepas circulantes en nuestro país. El empleo de este esquema de MLVA en aislamientos de Argentina constituye un trabajo pionero en el área, que permitió discriminar entre dos biovariedades de *B. abortus* y poner de manifiesto la gran diversidad de genotipos de esta especie circulantes. A través del análisis goeBURST se pudo relacionar a todos los genotipos entre sí y además, proponer al genotipo E1, que contiene a todos los aislamientos de *B. abortus* de la biovariedad 2, como fundador. Si bien de acuerdo a la bibliografía, el esquema que empleamos se puede optimizar, también es conveniente trabajar en forma conjunta dentro de la comunidad científica para lograr el mejor esquema que permita realizar análisis globales y dilucidar la estructura poblacional de *B. abortus*.

PARTE II

LIPOPROTEÍNAS DE *Brucella abortus*

INTRODUCCIÓN

En 1973, Hantke y Braun (Hantke y Braun, 1973) reportaron evidencias experimentales sobre la presencia de lípidos unidos covalentemente a una pequeña proteína de *E. coli* muy abundante. Además, determinaron la localización de los ácidos grasos en la proteína, que luego fue nombrada lipoproteína de Braun en su honor. Este trabajo pionero marcó el inicio del estudio de las lipoproteínas (Lpps) bacterianas. Los genes para Lpps están universalmente distribuidos en el dominio bacteria y constituyen 1-3 % del genoma (Babu *et al.*, 2006). Las Lpps bacterianas maduras se caracterizan por tener en su extremo amino terminal (N-terminal) una cisteína (Cys) modificada covalentemente por motivos lipídicos, a través de los cuales se anclan a la membrana celular. Tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas, las Lpps se traducen como prelipoproteínas, las cuales poseen un péptido señal en el extremo N-terminal de alrededor de 20 aminoácidos, con las características típicas de los péptidos señal de las proteínas de secreción. El péptido señal está compuesto por tres dominios: N, H y C. El dominio N, se extiende desde la primera metionina (Met) hasta el último residuo cargado y presenta una carga positiva ≥ 2 . El dominio H, se extiende desde el aminoácido siguiente al último de la región N hasta el aminoácido situado en la posición +5 con respecto al sitio de clivaje. Esta es una región hidrofóbica y generalmente tiene 6 aminoácidos de longitud. Finalmente, el dominio C corresponde a los últimos 4 residuos del péptido señal. Este dominio C junto a la Cys presente en el +1 constituyen el lipobox. El lipobox es una secuencia conservada [(Leu/Val/Ile)(Ala/Ser/Thr/Val/Ile)(Gly/Ala/Ser)|Cys] (Babu *et al.*, 2006), la cual contiene a la Cys que sufrirá la modificación lipídica y que será el aminoácido N-terminal de la Lpp madura (Fig. 7).

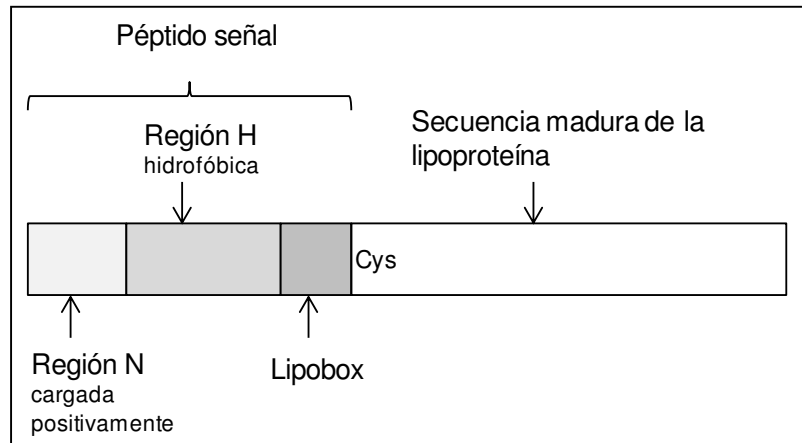


Figura 7: Péptido señal de las lipoproteínas. El péptido señal de las lipoproteínas presenta tres regiones de amino a carboxiterminal: la N con carga positiva, la H, hidrofóbica y la C formada por el lipobox y la Cys que sufre la modificación lipídica.

Biosíntesis de lipoproteínas

La vía a través de la cual se sintetizan las Lpps se encuentra bien estudiada en *E. coli* y es la que aquí se describe (Sankaran y Wu, 1994). La cadena polipeptídica naciente, llamada prelipoproteína, se exporta por las translocasas Sec o TAT (Fig. 8). La maquinaria Sec exporta las cadenas desplegadas usando la energía química generada por la hidrólisis de ATP, mientras que el sistema TAT exporta proteínas plegadas que contienen un motivo arginina gracias a la fuerza protón motriz (Natale *et al.*, 2008). La mayoría de las prelipoproteínas son translocadas por el sistema Sec.

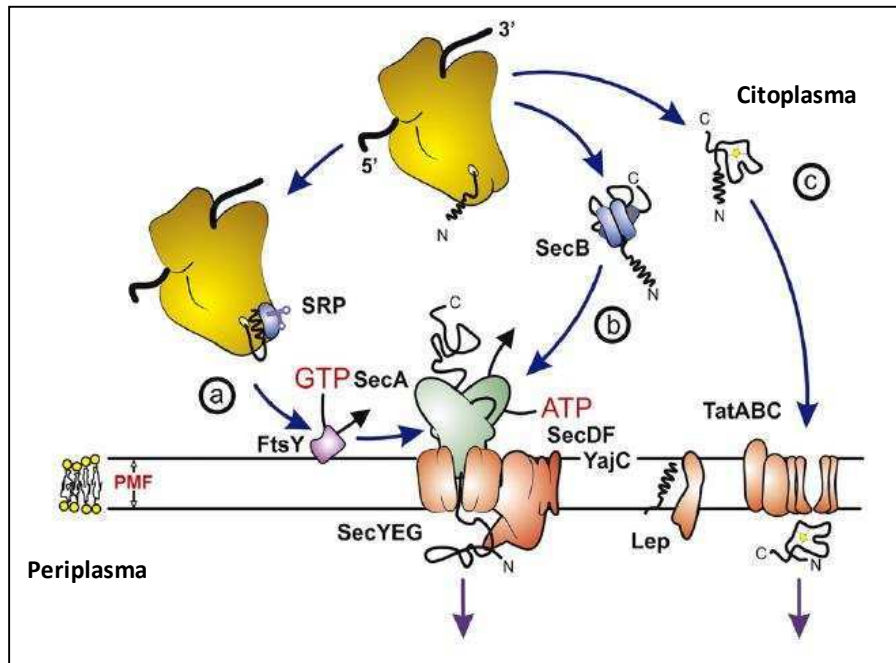


Figura 8: Sec y Tat translocasas de *E. coli*. Translocación de proteínas desplegadas por el sistema Sec (a) Co-traduccional y (b) post traduccional. (c) Translocación de proteínas plegadas por el sistema Tat. Tomado de Natale *et al.* (Natale *et al.*, 2008).

Luego de la translocación de la prelipoproteína a la cara externa de la membrana interna, la enzima diacilgliceril transferasa de lipoproteínas (*Lipoprotein diacylglycerol transferase*, Lgt) transfiere un grupo diacilglicerol de un fosfolípido de membrana a la Cys en la posición +1 del lipobox de la prelipoproteína, generando un enlace tioéster y dando origen a la prolipoproteína. Luego, la peptidasa del péptido señal (*Lipoprotein signal peptidase*, Lsp) corta al péptido señal. Como resultado, la Cys modificada constituye el primer aminoácido del extremo N-terminal de la apolipoproteína. Finalmente, la enzima N-acil transferasa de lipoproteínas (*Lipoprotein N-acyl transferase*, Lnt) transfiere otro grupo acilo de un fosfolípido a la Cys en la posición +1 generando la Lpp madura triacilada. Estas tres enzimas se encuentran altamente conservadas en bacterias Gram negativas y son esenciales para el crecimiento de *E. coli*. En la Figura 9 se muestra un esquema de la biosíntesis de Lpps.

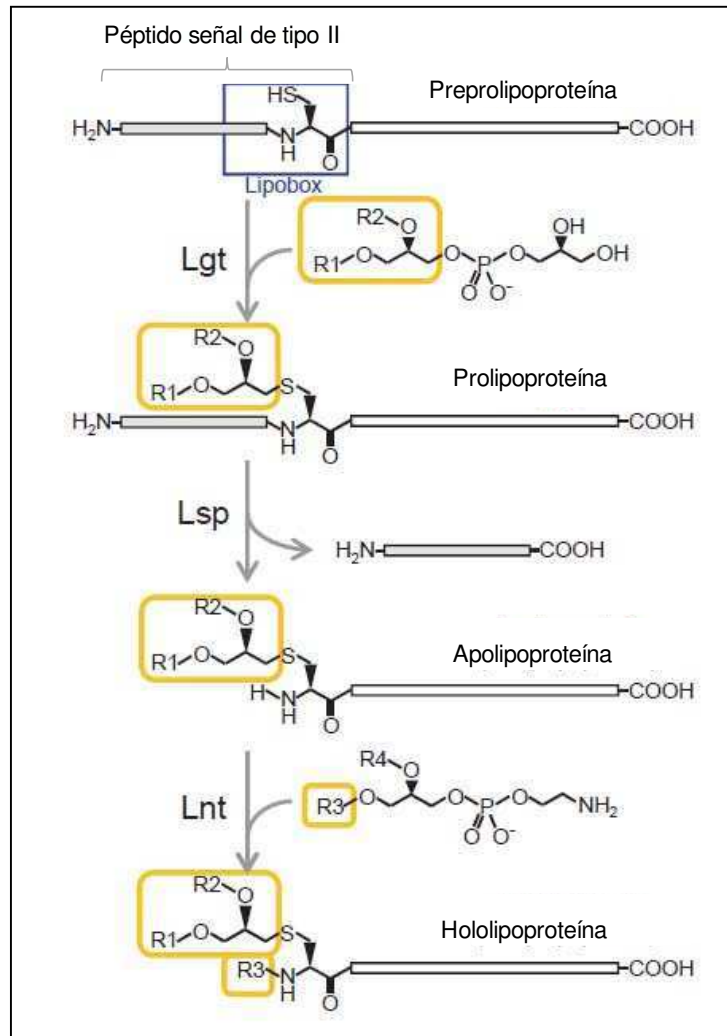


Figura 9: Vía biosintética de las lipoproteínas bacterianas. El lipobox es reconocido por una acil transferasa (Lgt) que genera un enlace tioéster entre la C del extremo amino terminal y el diacilglicerol. Luego, el péptido señal es clivado por la peptidasa del péptido señal (LspA). Finalmente, la C es N-acilada por la N-acil transferasa (Lnt). Tomado de Nakayama *et al.* (Nakayama *et al.*, 2012).

Lgt tiene siete dominios transmembrana, con sus extremos N-terminal y C-terminal en periplasma y citoplasma respectivamente (Pailler *et al.*). Se ha demostrado que varias regiones altamente conservadas son importantes para el reconocimiento del sustrato (Qi *et al.*, 1995). Al contrario de lo que ocurre en *E. coli* y otras bacterias Gram negativas, Lgt no es indispensable en los Firmicutes y en las Actinobacterias con alto contenido de GC, excepto *Mycobacterium tuberculosis* y *Streptomyces coelicolor*. La ausencia de Lgt en *M. tuberculosis* resulta en la incorrecta localización de Lpps esenciales (Sasseti *et al.*, 2003), por lo tanto, Lgt podría ser un blanco para el

desarrollo de drogas anti tuberculosas. La mayoría de las bacterias contienen un solo gen *lgt*.

Lsp es una peptidasa de péptido señal de tipo II que corta al péptido señal inmediatamente antes de la Cys lipidada de la prolipoproteína. Lsp de *E. coli* es una proteína integral con 4 segmentos transmembrana, ambos extremos terminales se encuentran en la cara citoplasmática (Munoa *et al.*, 1991) de la membrana. Esta enzima es altamente resistente a las altas temperaturas y a un amplio rango de pH pero es muy sensible a los detergentes (Hussain *et al.*, 1982). La actividad enzimática de Lsp se inhibe de manera no competitiva por el antibiótico globomicina, causando la acumulación de prolipoproteínas en la membrana interna. La mayoría de las bacterias presentan una sola copia del gen *lsp*, mientras que algunas poseen dos copias parálogas del mismo (Kovacs-Simon *et al.*; Sutcliffe *et al.*, 2012).

Lnt de *E. coli* transfiere un grupo acilo de los fosfolípidos al grupo α -amino de la Cys lipidada de la apolipoproteína. Los fosfolípidos fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol y cardiolipina son los más utilizados como fuente de ácidos grasos. Lnt es una proteína integral de membrana, con seis segmentos transmembrana y ambos extremos terminales en la cara citoplasmática de la membrana (Robichon *et al.*, 2005). La N-acilación por Lnt es esencial para el crecimiento de las células bacterianas (Robichon *et al.*, 2005). Si bien se creía que Lnt se encontraba únicamente en bacterias gram negativas, se encontró una proteína homóloga a Lnt en *Mycobacterium* spp., LppX y en bacterias gram positivas con alto contenido de GC (Tschumi *et al.*, 2009).

Los tres grupos acilo de la Lpp madura le proveen un fuerte anclaje a la membrana. En las Lpps que se encuentran expuestas en la superficie bacteriana, las modificaciones lipídicas podrían tener funciones adicionales a las de proveer un punto de fijación a la membrana.

Dado que la tinción de gram simplifica la diversidad de estructuras de envoltura celular de las bacterias, se ha propuesto que las envolturas de las células bacterianas se clasifiquen según tengan una (monodermas) o dos (didermas) membranas celulares (Sutcliffe *et al.*, 2012). La importancia del procesamiento de las Lpps parecería estar relacionada a la estructura de la envoltura celular de las bacterias. El correcto procesamiento de las Lpps es necesario para la virulencia de *M. tuberculosis* (Sander *et al.*, 2004), mientras que la inhibición del procesamiento de las Lpps no afecta la viabilidad ni el crecimiento de bacterias monodermas como *Bacillus subtilis* (Tjalsma *et al.*, 1999). En bacterias didermas, como *E. coli*, tanto el procesamiento de Lpps como su tráfico intracelular, son esenciales para el crecimiento de la bacteria (Tokuda, 2009). La biogénesis de la membrana externa depende fuertemente de la correcta localización de sus Lpps constituyentes.

Translocación de lipoproteínas a la membrana externa

En las Proteobacterias didermas, la mayoría de las Lpps maduras son translocadas de la cara externa de la membrana interna a la cara interna de la membrana externa mediante el sistema de localización de lipoproteínas (Lol). El sistema Lol ha sido extensivamente estudiado por el grupo de Tokuda y el mecanismo propuesto para su funcionamiento se encuentra descrito en detalle en una revisión de su autoría (Okuda y Tokuda, 2011). Brevemente, el sistema Lol en *E. coli* consta del complejo LolCDE embebido en la membrana interna, que es un transportador ABC, una proteína chaperona soluble, LolA, en el periplasma y una proteína receptora en la membrana externa, LolB. La Lpp es reconocida por LolCDE y transferida a LolA gracias a la hidrólisis de ATP por LolCDE. La Lpp y LolA forman un complejo soluble que atraviesa el periplasma hasta la membrana externa mediante difusión simple. Luego, LolA transfiere la Lpp a LolB en la membrana externa. Finalmente, la Lpp es translocada a

la membrana externa por un mecanismo desconocido (Fig. 10). Todos los componentes del sistema Lol son esenciales para el crecimiento de *E. coli*.

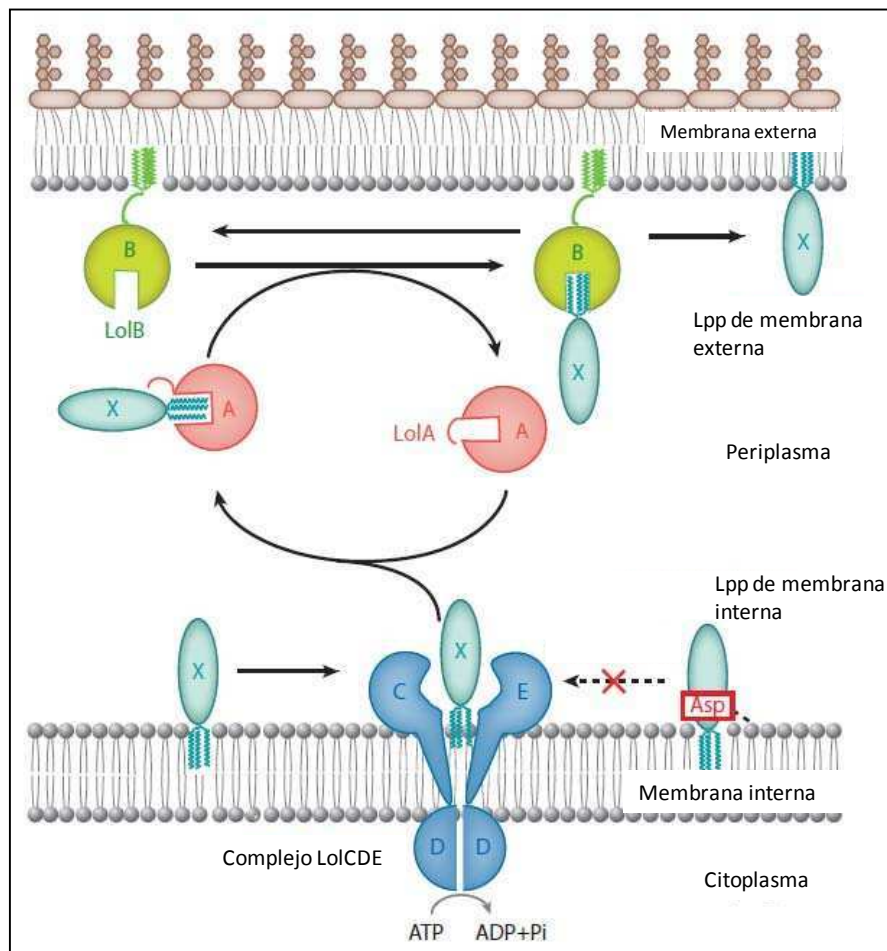


Figura 10: Localización de lipoproteínas mediante el sistema Lol en *E. coli*. El sistema Lol está formado por el transportador ABC LolCDE, la chaperona periplásmica LolA y el receptor de membrana externa LolB. La Lpp de membrana externa es liberada de la membrana interna por el LolCDE, forma un complejo con LolA, atraviesa el periplasma y para luego ser transferida a LolB e insertada en la membrana. El residuo Asp en la posición +2 evita el reconocimiento de la Lpp por LolCDE, causando su retención en la membrana interna. X representa un aminoácido distinto a Asp. Tomado de Tokuda *et al.* (Okuda y Tokuda, 2011).

El complejo LolCDE se encuentra formado por LolC, LolD y LolE en una relación 1:2:1.

LolC y LolE son subunidades de membrana, cada una contiene cuatro regiones transmembrana y un *loop* periplásmico entre la primera y la segunda región transmembrana. Las secuencias aminoacídicas de ambas proteínas son similares. LolD es la subunidad con capacidad de unión a nucleótidos y presenta los motivos típicos de los transportadores ABC, los motivos Walker A y Walker B. Los

transportadores ABC median el transporte dependiente de ATP de diversos sustratos a través de la membrana lipídica en numerosos organismos. Están compuestos por cuatro dominios: dos dominios transmembrana (TMD) y dos de unión a nucleótidos (NBD). En bacterias, muchos de los transportadores ABC actúan como importadores, que funcionan con una proteína específica de unión al sustrato y los cuatro dominios suelen expresarse en diferentes cadenas polipeptídicas. Algunos exportadores de bacterias pueden formar homo o heterodímeros en los cuales un TMD y un NBD se encuentran fusionados. El complejo LolCDE está considerado como un derivado de un exportador bacteriano y presenta sólo 8 regiones transmembrana en total. Según el mecanismo propuesto para explicar su funcionamiento, la unión de LolCDE a una Lpp específica de membrana externa aumenta la afinidad de LolD por el ATP. La unión del ATP a LolD debilita la interacción entre LolCDE y la Lpp. La hidrólisis de ATP causa la transferencia de la Lpp de LolCDE a LolA y al mismo tiempo, la apertura de la cavidad hidrofóbica de LolA.

LolA es un factor crítico para el transporte de Lpps hidrofóbicas a través del ambiente hidrofílico del periplasma hasta la membrana externa. LolB es el factor que transfiere las Lpps desde LolA hasta la membrana externa y ella misma es una Lpp de membrana externa. Tanto LolA como LolB son esenciales para el crecimiento de *E. coli* y la depleción de LolB causa la acumulación de Lpps de membrana externa en el periplasma y en membrana interna (Tanaka *et al.*, 2001). La versión soluble de LolB (no acilada) forma complejos con las Lpps de igual manera que LolA, indicando una similitud funcional entre LolA y LolB. A pesar de tener secuencias aminoacídicas diferentes, LolA y LolB presentan similitudes estructurales: una especie de barril incompleto, formado por once láminas β antiparalelas con una "tapa" formada por 3 α -hélices, esta estructura forma una cavidad hidrofóbica que sería el sitio de unión de las cadenas acílicas de la Lpp. Las Lpps son transferidas de la cavidad de LolA a la

cavidad de LolB de una manera “boca a boca”, siendo la afinidad de las Lpps por LolB mayor que por LolA, ocurriendo en este sentido la transferencia. El mecanismo de localización de Lpps es complejo y varía dependiendo de la bacteria de estudio. Sin embargo, el sistema Lol se encuentra conservado dentro de las bacterias gram negativas y es importante, si no esencial, para su crecimiento, por lo tanto podría ser un blanco interesante para el desarrollo de compuestos antibacterianos.

Okura y Tokuda (Okuda y Tokuda, 2011) estudiaron la conservación de las proteínas involucradas en la síntesis y translocación de Lpps mediante STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) y hallaron que en un 97 % se encuentra Lgt, en un 90% Lsp, en un 70 % Lnt, en un 59 % LolCDE, en un 58% LolA y en un 30 % LolB, sobre 529 bacterias analizadas. Claramente se puede ver que la conservación de proteínas que participan en pasos tempranos del procesamiento y/o translocación es mayor que la de aquellas involucradas en pasos más tardíos. La conservación de LolB es baja, esta proteína sólo se encuentra en β -proteobacterias y γ -proteobacterias. Para Sutcliffe *et al.* (Sutcliffe *et al.*, 2012) esta baja conservación en las proteínas del sistema Lol sugiere que deben existir variantes del sistema o vías alternativas para la translocación de Lpps a la membrana externa.

En *E. coli*, el aminoácido que se encuentra en la posición +2 de la Lpp determina su ubicación en membrana. Si en +2 se encuentra una Asp, la Lpp quedará retenida en la membrana interna, mientras que la sustitución de esta Asp por cualquier otro aminoácido determinará la translocación a membrana externa de la Lpp. Esto se conoce como la “regla del +2”. Luego se encontró que los aminoácidos que ocupan la posición +3 también tienen un papel importante en la localización de las Lpps ya que la presencia de His o Lys en esta ubicación causan una retención parcial de las Lpps en la membrana interna aunque posean Asp en +2 (Gennity y Inouye, 1991). La regla del +2 también se verifica en otras enterobacterias como *Salmonella enterica* serovar

Typhimurium, *Shigella flexneri*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Klebsiella oxytoca* (Lewenza *et al.*, 2006). En algunas bacterias gram negativas la localización de las Lpps no sigue la regla del +2, por ejemplo, en *Pseudomonas aeruginosa*, Lys en la posición +3 y Ser en + 4 resultan en la retención de la Lpp en la membrana externa (Narita y Tokuda, 2007). La señal específica de las Lpps de membrana interna se puede pensar como una señal que evita el reconocimiento por LolCDE.

Aunque en *E. coli* todas las Lpps conocidas miran al periplasma, en otras bacterias, incluyendo espiroquetas patogénicas, las Lpps también están presentes en la cara externa de la membrana externa, siendo desconocido el mecanismo que las transloca a través de esta membrana. Se ha postulado que la ausencia de un sistema Lol completo sería la causante de la localización en la cara externa de la membrana externa de varias Lpps de la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* (Schulze y Zuckert, 2006). Trabajos más recientes en *Borrelia* han llevado a proponer que la liberación de membrana interna de las Lpps y su posterior translocación a la externa serían eventos separados y que existirían señales que determinan la translocación a membrana externa distintas a las que causan su retención o liberación de membrana interna (Schulze *et al.*, 2010). Si bien esta translocación a la cara externa de la membrana externa es un evento poco frecuente en bacterias didermas, existen varios ejemplos y se han postulado diferentes modelos según el caso, revisados por Zückert (Zuckert, 2014). El sistema de secreción de tipo II (T2SS) usa el ensamblado de un pseudo-pili que atraviesa el periplasma para secretar Lpps expuestas en la superficie a través de un poro en la membrana externa, por ejemplo PulA de *K. oxytoca*. Otro mecanismo es a través del sistema de secreción de tipo V (TVSS), que involucra al complejo BAM en la membrana externa y chaperonas integrales de membrana como Skp, SurA y DegP para facilitar la inserción en membrana del dominio translocador (T) para la posterior translocación del dominio N-terminal pasajero (P) de NalP de *Neisseria*

gonorrhoeae, que luego se libera de la célula por un clivaje autocatalizado. Para OspA de *B. burgdorferi* se ha postulado un modelo que requiere una chaperona en periplasma y una flipasa en membrana externa (Fig. 11).

En bacterias gram positivas, la localización de Lpps es más sencilla debido a la ausencia de membrana externa. Una revisión de este mecanismo se encuentra en el trabajo de Hutchings *et al.* (Hutchings *et al.*, 2009). Brevemente, la prelipoproteína es translocada a través de la membrana citoplasmática gracias al péptido señal de su extremo N-terminal y sufre la acción de las enzimas mencionadas anteriormente. La Lpp resultante se expone en el ambiente extracelular, anclada a la cara externa de la membrana por interacciones hidrofóbicas.

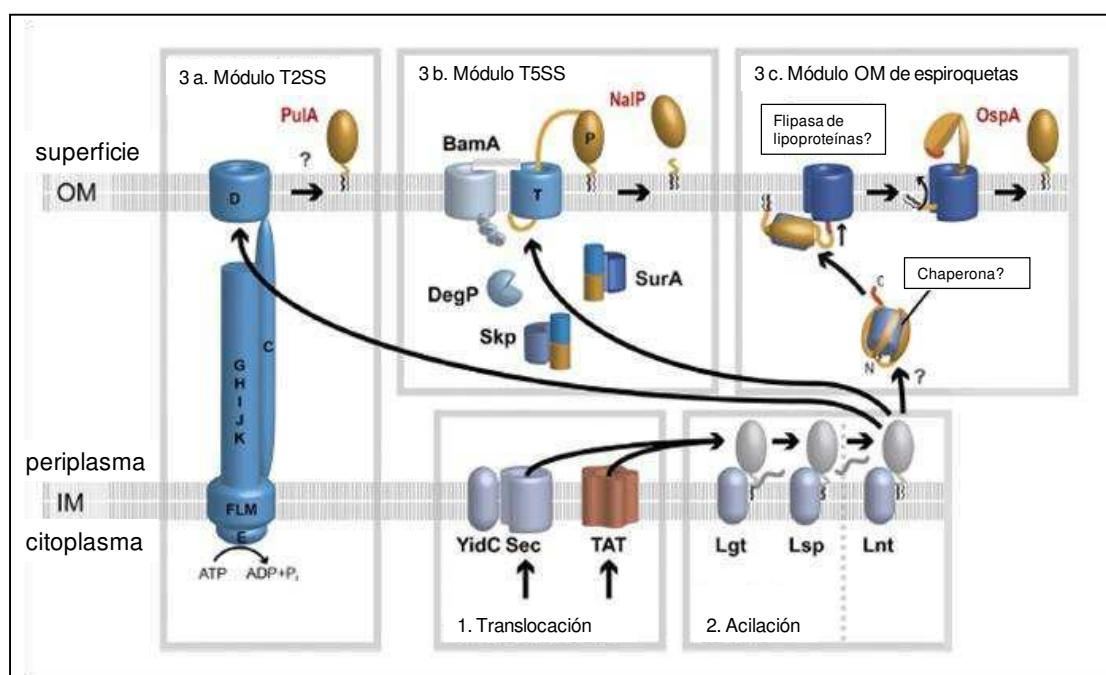


Figura 11: Modelos de translocación de Lpps a la cara externa de la membrana externa.

El módulo 1 se refiere a la translocación de la prelipoproteína a través de la membrana interna mediante los sistemas Sec o TAT. En el módulo 2 se muestran las enzimas que participan en la acilación. El módulo 3a corresponde a la exportación mediada por el sistema de secreción de tipo II, por ejemplo para la Lpp PulA de *Klebsiella oxytoca*. El módulo 3b corresponde al sistema de secreción de tipo V, que media la exportación de NalP de *Neisseria gonorrhoeae*. El módulo 3c corresponde a un modelo propuesto para la Lpp OspA de *Borrelia burgdorferi*. Tomado de Zückert (Zuckert, 2014).

Funciones de las lipoproteínas

Las Lpps bacterianas participan en varios procesos fisiológicos, como absorción de nutrientes, transducción de señales, adhesión, conjugación, esporulación, resistencia a antibióticos, unión al sustrato en sistemas de transporte ABC y plegado extracitoplasmático de proteínas (Lampen y Nielsen, 1984; Mathiopoulos *et al.*, 1991; Perego *et al.*, 1991; Alloing *et al.*, 1994; Sutcliffe y Harrington, 2004). Además, las Lpps juegan un rol importante en funciones asociadas a virulencia, como colonización, invasión, evasión de las defensas del hospedador, supervivencia intracelular (Borezee *et al.*, 2000) e inmunomodulación (Jenkinson, 1994; Giambartolomei *et al.*, 1998; Khandavilli *et al.*, 2008; Hutchings *et al.*, 2009; Dasgupta *et al.*, 2010).

Lipoproteínas de *B. abortus*

Tres Lpps de *B. abortus*, Omp10, Omp16 y Omp19, han sido objeto de numerosos estudios. Tibor *et al.* (Tibor *et al.*, 1999) demostraron experimentalmente que las tres son Lpps y que están presentes en todas las especies del género *Brucella* y sus biovars. Cloeckert *et al.* (Cloeckert *et al.*, 1990) probaron que se encuentran expuestas en la superficie. Tibor *et al.* (Tibor *et al.*, 2002) demostraron que la delección de Omp10 y Omp19, por separado, resulta en la atenuación de *B. abortus* en el modelo murino. Además, la mutante para Omp19 muestra una sensibilidad incrementada a la polimixina B, observación que indicaría alteraciones en la membrana de la bacteria.

El grupo del Dr. Giambartolomei ha dedicado mucho esfuerzo a estudiar la participación de Lpps en el desarrollo de la respuesta inflamatoria en la brucelosis. Demostraron que Omp16 y Omp19 de *B. abortus*, y no el LPS, son responsables de la activación de monocitos y macrófagos y de la inducción de la respuesta proinflamatoria dada por *B. abortus* muerta por calor (Giambartolomei *et al.*, 2004). Además, observaron que la producción de citoquinas depende del motivo lipídico de

las Omps dado que la versión no acilada (U-Omp) de Omp16 y Omp19 no induce su producción. El mismo grupo observó que la Omp19 inhibe la expresión de MHC-II y la presentación antigénica (Barrionuevo *et al.*, 2008) e induce la maduración de células dendríticas (Zwerdling *et al.*, 2008). En los tres trabajos mencionados se encontró que el efecto causado por las Lpps depende de TLR2.

La localización específica de las Lpps y su potencial rol en virulencia las hace una buena opción para el diseño racional de vacunas. La idoneidad de las Lpps como candidatos vacunales ha sido evaluada en varias especies de bacterias, como *Streptococcus pneumoniae* (Ogunniyi *et al.*, 2000), *Yersinia pestis* (Tanabe *et al.*, 2006) y *Moraxella catarrhalis* (Yang *et al.*), con resultados prometedores. En el caso de *B. abortus*, Cassataro *et al.* (Pasquevich *et al.*, 2009; Pasquevich *et al.*, 2010; Pasquevich *et al.*, 2011; Ibanez *et al.*, 2013) han analizado el posible empleo de las Omps como inductoras de la respuesta inmune, encontrando que la inmunización de ratones con L-Omp16 y L-Omp19 (versiones lipidadas de las Omps) induce respuesta humoral y protección frente al desafío con *B. abortus*. Como la acilación de estas Omp recombinantes disminuye 30 veces el rendimiento en relación a la purificación de las U-Omp (versiones no lipidadas), los autores analizaron si las U-Omp también confieren protección. Y no sólo U-Omp16 y U-Omp19 confieren protección, sino que además, el grado de protección es levemente mayor al obtenido con las L-Omp (Pasquevich *et al.*, 2009). Más importante aún es el hecho que Omp16, a través de TLR4, induce protección sin necesidad de adjuvantes (Ibanez *et al.*, 2013). En este mismo trabajo también se analiza la conservación de Omp16. Los autores encontraron que Omp16 se encuentra muy conservada en las α -Proteobacterias; reconociendo esta proteína, el sistema inmune innato también podría censar la presencia de bacterias de este tipo, de tal manera que Omp16 podría ser considerada un PAMP (Pasquevich *et al.*, 2010).

CAPÍTULO 1

ANÁLISIS *in silico* DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE *B. abortus*

RESULTADOS

Predicción de las lipoproteínas de *B. abortus*

La disponibilidad de las secuencias de los genomas de muchas especies de *Brucella* ha permitido la realización de análisis bioinformáticos con distintos objetivos. A partir de la secuencia de ADN de los genes fácilmente se puede determinar la secuencia de aminoácidos de las proteínas, y a partir de ésta, predecir su estructura y función. Todas aquellas proteínas que, una vez maduras, van a ser Lpps tienen en su extremo amino terminal ciertas características que permiten identificarlas como tales. Si bien existen diversas herramientas bioinformáticas que analizan estas características para predecir Lpps, en este trabajo se emplearon aquellas dos que mostraron mejor desempeño para la predicción de Lpps en bacterias gram negativas, Lipo (<http://services.cbu.uib.no/tools/lipo>) (Berven *et al.*, 2006) y LipoP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>) (Juncker *et al.*, 2003).

En una primera instancia, se predijeron las Lpps presentes en el proteoma de 15 cepas pertenecientes a 6 especies de *Brucella* cuyo genoma se encontraba completamente secuenciado al momento de hacer el análisis. En la página web de cada programa empleado se analizó de manera individual el proteoma de cada cepa. Las salidas de los dos programas son diferentes. Lipo muestra directamente una lista con las Lpps probables, mientras que LipoP arroja un resultado para cada proteína, clasificándolas como proteínas con dominio transmembrana, con señal para peptidasa de tipo I o con señal para peptidasa de tipo II (Lpps), por lo que resulta necesario filtrar este resultado para analizar únicamente a las Lpps. El número de Lpps predichas para las diferentes especies varió entre 27 y 50 para LipoP y entre 39 y 62 para Lipo (Tabla 8). Se puede estimar a partir de estos resultados que entre 1,2 y 1,8 % del genoma de *Brucella* codificaría para Lpps.

Haciendo un análisis dentro del resultado de cada programa, se observa que todas las especies analizadas codifican para un porcentaje similar de Lpps, siendo *B. melitensis*

bv.1 st 16M la única cepa que presenta una diferencia llamativa. Si bien se va a discutir más adelante, vale la pena mencionar que ésta diferencia se debería a discrepancias en la anotación de los genes de *B. melitensis* en comparación con los genes de las otras cepas.

Tabla 8. Lipoproteínas predichas mediante análisis bioinformático. Comparación entre el número de proteínas obtenido por Lipo (sitio) y LipoP (sitio) para las diferentes especies y biovariedades de *Brucella*. Para cada predictor se muestra el número de Lpps probables identificadas y el porcentaje del genoma que representan.

Organismo	N° ORFs	LipoP		Lipo	
		N° lpps	%	N° lpps	%
<i>B. abortus</i> A13334	3308	41	1,2	53	1,6
<i>B. abortus</i> bv1. st 941	3476	43	1,2	56	1,6
<i>B. abortus</i> S19	3476	50	1,4	62	1,8
<i>B. canis</i> ATCC 23365	3435	47	1,4	60	1,7
<i>B. canis</i> KSK A52141	3269	42	1,3	50	1,5
<i>B. melitensis</i> bv. 1 st 16M	3499	27	0,8	39	1,1
<i>B. melitensis</i> ATCC 23457	3486	45	1,3	60	1,7
<i>B. melitensis</i> M28	3331	42	1,3	56	1,7
<i>B. melitensis</i> NI	3321	42	1,3	55	1,7
<i>B. melitensis</i> biovar abortus 2308	3494	50	1,4	57	1,6
<i>B. microti</i> CCM4915	3410	46	1,3	58	1,7
<i>B. ovis</i> ATCC 25840	3543	36	1,0	55	1,6
<i>B. suis</i> 1330	3432	46	1,3	55	1,6
<i>B. suis</i> ATCC 23445	3591	43	1,2	57	1,6
<i>B. suis</i> VBI22	3292	46	1,4	55	1,7

Posteriormente, se enfocó el análisis en las Lpps de *B. abortus*, incorporándose las probables Lpps de *B. abortus* 9-941 de la base de datos DOLOP (<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/dolop/>) (Madan Babu y Sankaran, 2002), para complementar la información obtenida a partir de los predictores. Según esta base de datos, 33 de los 3.476 marcos abiertos de lectura (Chain *et al.*, 2005) (Open ReadinG Frame, ORFs) de la bacteria codifican para Lpps potenciales. A partir de estas Lpps de *B. abortus* 9-941, se confirmó mediante alineamiento de secuencias la presencia de las Lpps ortólogas en *B. abortus* 2308. Sólo el producto del ORF BruAb2_0192 no tiene su correspondiente ortólogo en *B. abortus* 2308, de esta manera se obtuvieron 32 probables Lpps. Estos resultados se compararon con los obtenidos mediante Lipo y

LipoP. Entre los dos predictores y la base de datos DOLOP se obtuvieron 69 Lpps candidatas. De éstas, sólo 23 fueron identificadas por los tres métodos como Lpps y 22 por combinaciones de dos de ellos (Figura 12).

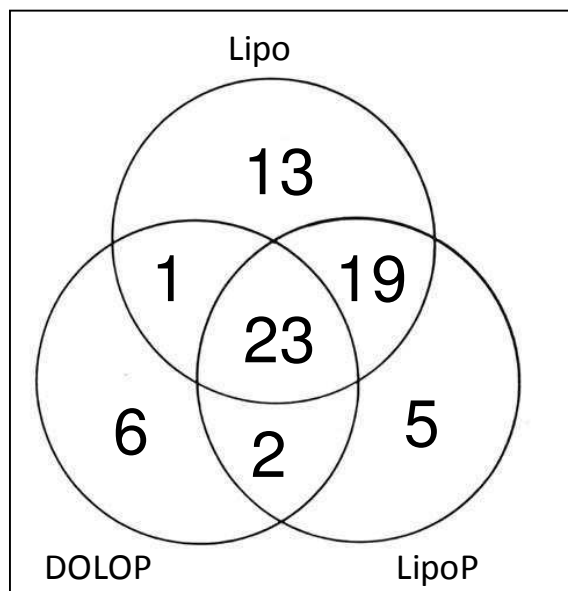


Figura 12: Diagrama de Venn que muestra las coincidencias en la identificación de lipoproteínas de *B. abortus* entre las tres herramientas utilizadas.

Para eliminar candidatos falsos positivos se determinaron el largo y la carga neta positiva del péptido señal, el número de aminoácidos de la región H y su índice de hidrofobicidad (*grand average of hydropathicity index*, GRAVY) (<http://web.expasy.org/protparam/>). Si bien los distintos predictores utilizados tienen en cuenta las posiciones de algunos aminoácidos, la presencia de aminoácidos cargados y la distancia entre el lipobox y la Met inicial, muchas veces aparecen secuencias que no cumplen todos los supuestos, entonces se realizó este chequeo de manera individual a cada Lpp identificada por los métodos masivos.

A partir de este análisis se removieron 9 proteínas que presentaron un GRAVY negativo y 2 que no tienen aminoácidos negativos en la región N de péptido señal. La lista completa con las 69 Lpps predichas y las características del péptido señal se puede ver en el Anexo I.

Para determinar si algunas Lpps de *B. abortus* no fueron identificadas como tales debido a errores de anotación, se agruparon junto con las Lpps ortólogas de *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* y *B. melitensis*. La tabla con las Lpps ortólogas para las cinco especies se encuentra en el Anexo II.

Mediante esta comparación se encontraron discrepancias en la anotación del producto de varios ORFs entre las distintas especies estudiadas. Se observó que el producto de BAB1_0009 carece de 11 aminoácidos en el extremo amino terminal, utilizando como aminoácido N terminal una Met interna (Figura 13). Esta diferencia de 11 aminoácidos impide que el péptido señal sea reconocido como tal por los programas Lipo y LipoP.

```

BOV_0009      MTFLCMNRHRHFMGLSGSAALVACLPGQAFADQPTGKALHGLSAFGDLKYGPDFSDFDYAN 60
BR0009      -----MGLSGSAALVACLPGQAFADQPTGKALHGLSAFGDLKYGPDFSDFDYAN 49
BCAN_A0009   MTFLCMNRHRHFMGLSGSAALVACLPGQAFADQPTGKALHGLSAFGDLKYGPDFSDFDYAN 60
BAB1_0009   -----MGLSGSAALVACLPGQAFADQPTGKALHGLSAFGDVKYGPDFSDFDYAN 49
BMEI1935    MTFLCMNRHRHFMGLSGSAALVACLPGQAFADQPTGKALHGLSAFGDVKYGPDFSDFDYAN 60
                *****:*****
    
```

Figura 13: Alineamiento de los primeros 60 aminoácidos de la proteína codificada por BAB1_0009 en *B. abortus* 2308 y sus ortólogos en *B. ovis* (BOV_0009), *B. suis* (BR0009), *B. canis* (BCAN_A0009) y *B. melitensis* (BMEI1935) mediante Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). El resto de la secuencia es idéntica para las cinco especies analizadas.

Por otro lado, cabe aclarar que la proteína codificada por el gen BAB1_1384, pese a ser identificada por los predictores y estar anotadas como Lpp sus ortólogas en otras especies, se encuentra anotada como ADN ligasa dependiente de ATP. Según KEGG (http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?bmf:BAB1_1384), para las 5 especies analizadas, la proteína pertenece al grupo de ortólogos K02009 (proteína transportadora de níquel/cobalto), por lo tanto, en base a esta discordancia se puede inferir que no sería correcta la definición con la que se encuentra anotado este ORF.

Los productos de los ORFS ortólogos de BAB2_0320 en *B. melitensis*, *B. suis* y *B. canis* se identificaron como Lpps pero no así el producto de BAB2_0320, que aparece anotado como pseudogen. Al realizar un alineamiento de las secuencias nucleotídicas de este ORF y sus ortólogos, se observó que BAB2_0320 presenta una delección interna de 87 nucleótidos, resultando una proteína truncada (Figura 14). Por otra parte,

el ortólogo en *B. ovis* (BOV_A0858) también se encuentra anotado como pseudogen, pero no se observan diferencias entre las secuencias nucleotídicas de éste y los correspondientes a *B. melitensis*, *B. suis* y *B. canis*.

```

BAB2_0320      AAGGCGCAGGCCGGTTTGGCGCAAGGCCGAAGACCAGCGGGGATATGCCGTGCTGCG---- 536
BCAN_B0934    AAGGCGCAGGCCGGTTTGGCGCAAGGCCGAAGACCAGCGGGGATATGCCGTGCTGCGTCCC 540
BOV_A0858     AAGGCGCAGGCCGGTTTGGCGCAAGGCCGAAGACCAGCGGGGATATGCCGTGCTGCGTCCC 539
BMEII0381     AAGGCGCAGGCCGGTTTGGCGCAAGGCCGAAGACCAGCGGGGATATGCCGTGCTGCGTCCC 528
BRA0915       AAGGCGCAGGCCGGTTTGGCGCAAGGCCGAAGACCAGCGGGGATATGCCGTGCTGCGTCCC 540
                *****

BAB2_0320     -----
BCAN_B0934    GATTTCGATGGCGTGATCTCCGCAACGGCTGCCGAAGTCGGGCAGGTGGTTTCGGCGGGT 600
BOV_A0858     GATTTCGATGGCGTGATCTCCGCAACGGCTGCCGAAGTCGGGCAGGTGGTTTCGGCGGGT 599
BMEII0381     GATTTCGATGGCGTGATCTCCGCAACGGCTGCCGAAGTCGGGCAGGTGGTTTCGGCGGGT 588
BRA0915       GATTTCGATGGCGTGATCTCCGCAACGGCTGCCGAAGTCGGGCAGGTGGTTTCGGCGGGT 600

BAB2_0320     -----TCCCGATGTCCGGGAAGCGGTGGTGGATATTCCCGAC 573
BCAN_B0934    CAGGCGATCGTGACCGTGGCGCGTCCCGATGTCCGGGAAGCGGTGGTGGATATTCCCGAC 660
BOV_A0858     CAGGCGATCGTGACCGTGGCGCGTCCCGATGTCCGGGAAGCGGTGGTGGATATTCCCGAC 659
BMEII0381     CAGGCGATCGTGACCGTGGCGCGTCCCGATGTCCGGGAAGCGGTGGTGGATATTCCCGAC 648
BRA0915       CAGGCGATCGTGACCGTGGCGCGTCCCGATGTCCGGGAAGCGGTGGTGGATATTCCCGAC 660
    
```

Figura 14: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas ortólogas a BAB2_0320 de *B. abortus*. Se alinearon las bases 480 y 573 del ORF BAB2_0320 de *B. abortus* y sus ortólogos en *B. canis* (BCAN_B0934), *B. ovis* (BOV_A0858), *B. melitensis* (BMEII0381) y *B. suis* (BRA0915) mediante Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Otra observación interesante que surgió de la comparación de las Lpps predichas para estas cinco especies es la elevada utilización de codones de inicio alternativos (UUG y GUG), mayormente para las Lpps de *B. melitensis*. Este hecho no tiene correlato con la frecuencia real de uso de dichos codones, más bien se debería a errores en la anotación de las mencionadas proteínas. Por otro lado, en el caso del producto de BAB1_1464 y sus ortólogos en *B. suis*, *B. canis* y *B. ovis*, GUG figura como codón de inicio mientras que en *B. melitensis* es AUG. Todas las Lpps identificadas en *B. abortus* tienen sus correspondientes proteínas ortólogas en las demás especies estudiadas.

La identidad de las 58 Lpps predichas en *B. abortus*, su tamaño (en número de aminoácidos) y programas que las identificaron se encuentran en la Tabla 9. Estas Lpps representan el 1,66 % de los 3.494 ORF de *B. abortus*. De las Lpps identificadas, sólo 8 están anotadas como Lpps o Lpps hipotéticas en el genoma de *B. abortus* 2308.

Para confirmar que estas proteínas son Lpps, se requiere una aproximación experimental, sin embargo el presente análisis constituye un primer acercamiento para conocer el número de potenciales Lpps de *B. abortus* y el rol que podrían tener en la célula. En la bibliografía se encontraron evidencias de expresión para 30 de las 58 Lpps predichas (Connolly *et al.*, 2006; Lamontagne *et al.*, 2007; Lamontagne *et al.*, 2009; Viadas *et al.*, 2009; Sandalakis *et al.*, 2012), 6 de las cuales son consideradas proteínas hipotéticas (Tabla 9). De acuerdo a nuestros resultados, este último número podría incrementarse significativamente.

El análisis del lipobox realizado a partir de cada una de las Lpps predichas, revela que las posiciones mayoritarias están ocupadas por Gly (68%) o Ala (28%) en -1; Ala (62%) o Ser (14%) en -2 ; Leu (72%), Ala y Val (8%) en -3 y la posición -4 es la más flexible y puede estar ocupada por Leu (32%), Ala (16%), Val (14%) o Phe (10%) (Figura 15). No se mencionan los aminoácidos que aparecen con baja frecuencia. Esta secuencia consenso obtenida coincide mayormente con la descrita para bacterias gram negativas (Babu *et al.*, 2006).

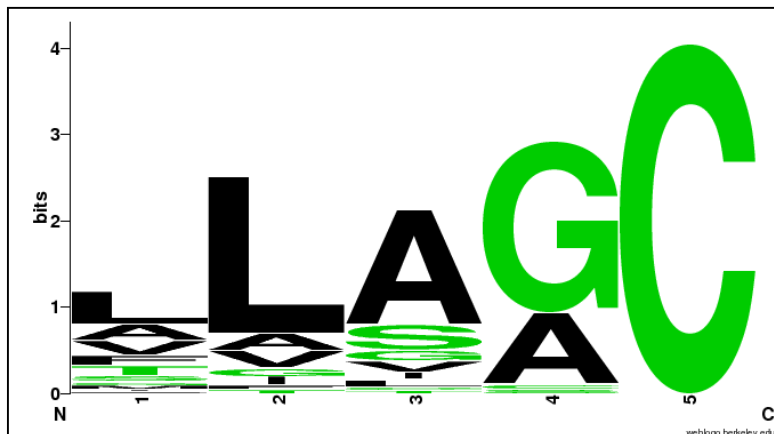


Figura 15: Secuencia consenso para el lipobox de *B. abortus* S2308. El gráfico que representa las frecuencia de bases en cada posición se realizó utilizando el programa WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

Tabla 9. Lipoproteínas predichas para *B. abortus* 2308. Se indica el nombre del ORF, la definición, el tamaño (en número de aminoácidos), la herramienta a través de la cual se identificó (A: Lipo; B: LipoP y C; DOLOP) y referencias de publicaciones donde se demostró experimentalmente su expresión. Se resaltan con * las que se ha demostrado experimentalmente su acilación.

ORF	Definición	Tamaño	Identificada por	Evidencias de expresión
BAB1_0009	ABC transporter periplasmic substrate-binding protein	615	C	
BAB1_0038	Ubiquinol oxidase, subunit II	344	AC	
BAB1_0047	Hypothetical protein	241	AB	55
BAB1_0064	Transglycosylase SLT D-containing protein	287	AB	215
BAB1_0138	Hypothetical protein	206	ABC	55
BAB1_0358	Estearase	415	ABC	215
BAB1_0511	Lipoprotein	192	ABC	55, 215
BAB1_0526	Polysaccharide deacetylase	272	AB	
BAB1_0589	ErfK/YbiS/YcfS/YnhG:Tat pathway signal	238	ABC	55, 215
BAB1_0758	Hypothetical protein	82	ABC	214 , 55
BAB1_0794	SmpA/OmlA domain-containing protein	172	AB	51, 215
BAB1_0804	Capsule polysaccharide export protein	195	ABC	
BAB1_0819	Hypothetical protein	133	BC	
BAB1_0858	Cytoplasmic protein	133	ABC	
BAB1_0891	Exopolysaccharide production negative regulator precursor	267	AB	
BAB1_0907	Peptidoglycan-binding LysM:Peptidase M23/M37	427	AB	215
BAB1_1009	Rare lipoprotein A	421	B	
BAB1_1035	Proline-rich extensin	250	AB	
BAB1_1041	Protein of unknown function DUF330	200	ABC	214, 215
BAB1_1208	Hypothetical protein	58	ABC	
BAB1_1226	OmpA family protein	220	ABC	55, 51
BAB1_1227	Transcriptional regulatory protein	194	AB	55
BAB1_1308	Hypothetical protein	155	AB	214, 55, 51, 215
BAB1_1336	Hypothetical protein	44	AB	
BAB1_1350	Binding-protein dependent transport system inner membrane protein	288	A	
BAB1_1384	ATP-dependent DNA ligase	252	A	215
BAB1_1441	Outer membrane protein assembly factor BamD	287	AB	215
BAB1_1451	Cell cycle protein:phosphopantetheine attachment site	385	C	
BAB1_1464	Antifreeze protein, type I	117	B	215
BAB1_1465	Glycosyl hydrolase, family 25	277	AB	215
BAB1_1508	Carbamoyl phosphate synthase large subunit	1662	A	51
BAB1_1527	Hypothetical protein	303	AB	
BAB1_1548	Lipoprotein	184	ABC	
BAB1_1653	Glucose-methanol-choline oxidoreductase	538	A	
BAB1_1707	Omp 16*	168	ABC	214, 55, 51
BAB1_1773	Peptidase	493	AB	51
BAB1_1814	Hypothetical protein	193	AB	215
BAB1_1830	LemA protein	207	AB	51, 215

BAB1_1930	Omp19 *	177	ABC	55
BAB1_1983	Hypothetical protein	62	ABC	
BAB1_1999	Hypothetical protein	73	A	
BAB1_2001	Aquaporin Z	228	A	
BAB1_2034	Lipoprotein	403	ABC	
BAB1_2147	Lipoprotein	326	ABC	51
BAB1_2148	Lipoprotein	107	AB	
BAB2_0017	Oxidoreductase molybdopterin binding domain protein	262	ABC	
BAB2_0057	Outer membrane protein OprF	172	ABC	
BAB2_0062	Vir7	57	ABC	213
BAB2_0076	Omp10*	126	ABC	
BAB2_0156	Flagellar L-ring protein precursor	242	ABC	213
BAB2_0195	Hypothetical protein	223	ABC	214, 55, 215
BAB2_0446	Molybdopterin dinucleotide binding domain	770	A	
BAB2_0452	Peptide ABC transporter, permease protein	332	AB	
BAB2_0499	Hypothetical protein	58	A	
BAB2_0562	Iron compound ABC transporter, permease protein	317	AB	215
BAB2_0810	N-acetylmannosamine-6-phosphate epimerase	525	C	
BAB2_0924	Protein disulfide isomerase NosL	179	ABC	213
BAB2_1102	Chemotaxis protein	430	A	213

Clasificación funcional de las lipoproteínas de *B. abortus*

Se identificaron los dominios funcionales mediante Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) y se buscaron homologías con otras proteínas utilizando BLASTp con el objetivo de asignarles roles posibles a las Lpps predichas. De las 49 Lpps identificadas por combinaciones de dos y tres predictores, se encontró que el 26,6 % tienen actividad enzimática, 12,2 % participan en transporte, 18,4 % están involucradas en la estructura de la membrana celular, 30,6 % tienen función desconocida y 12,2 % se agrupan en otras funciones (Fig. 16). Las 9 proteínas identificadas como Lpps por solo uno de los tres algoritmos utilizados se excluyeron de la clasificación funcional por haber fuertes evidencias que sugieren que no son Lpps.

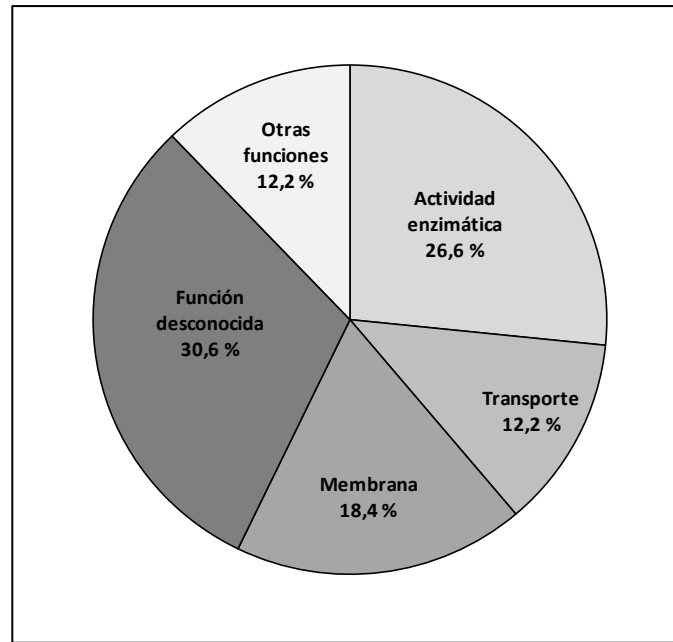


Figura 16. Clasificación funcional de las Lpps identificadas en *B. abortus* 2308. El porcentaje de las Lpps que participan en cada función se calculó sobre las 49 Lpps identificadas por combinaciones de dos y tres predictores.

Lipoproteínas que participan en transporte

De las seis Lpps involucradas en transporte, cinco corresponden a componentes de transportadores ABC (*ATP binding cassette transporter*). Los transportadores ABC tienen un gran impacto en la fisiología bacteriana dada su participación en viabilidad, virulencia y patogenicidad. El estudio de la organización genética de estos ORFs, reveló que los cinco se encuentran en operones que codifican para el sistema completo de cada transportador ABC (compuesto por proteínas de unión al sustrato, permeasas y proteínas de unión a ATP). Se conoce el sustrato de cuatro de ellos: BAB1_0009 codifica para la proteína de unión al sustrato del transportador de oligopéptidos OppA, BAB2_0562 para la permeasa del transportador de Fe, BAB1_1384 para la permeasa del transportador de Co/Ni y BAB2_0452 para la permeasa del transportador de péptidos/Ni. Según se encuentra anotado, BAB1_1041 codifica para una proteína hipotética. Al analizar la región genómica, se observa que formaría parte de un operon

que codifica para un sistema de transporte ABC de sulfato. El ORF BAB1_0804 codifica para una proteína exportadora de polisacáridos y formaría un operon con BAB1_0803 (anotado como proteína hipotética). El producto de BAB1_0804 pertenece a una familia de proteínas periplásmicas involucradas en la biosíntesis y/o exportación de polisacáridos. Esta proteína es homóloga de Wza de *E. coli*, AmsH de *Erwinia amylovora*, cps ORF4 de *Klebsiella pneumoniae* K2, EpsA de *Pseudomonas solanacearum* y ExoF de *Rhizobium meliloti*, todas éstas participan de la exportación de polisacáridos (Stevenson *et al.*, 1996).

Lipoproteínas con actividad enzimática

Según el análisis realizado, trece Lpps presentan actividad enzimática. La Lpp codificada por BAB1_1773 pertenece a la familia de peptidasas M48 (proteasas dependientes de Zn). Esta Lpp es homóloga a la proteína HtpX de *E. coli*, que es inducida por choque térmico y participaría en la degradación de proteínas anormales (Kornitzer *et al.*, 1991). Las proteínas codificadas por BAB1_0047, BAB1_0138, BAB1_0589 y BAB1_2034 tienen un dominio catalítico de L, D-transpeptidasa, que se encuentra en distintas bacterias y origina una vía alternativa para el entrecruzamiento del peptidoglicano (Biarrotte-Sorin *et al.*, 2006).

El producto de BAB1_0526 presenta un dominio de acetilasa de polisacáridos. Este dominio está presente en la proteína NodB de *Rhizobium*, la cual es una quitooligosacárido de acetilasa (Freiberg *et al.*, 1997). En la proteína codificada por BAB1_0907 se reconocieron dos dominios: un motivo lisina (LysM) y otro correspondiente a la familia de peptidasas M23. El dominio LysM consta de aproximadamente 40 aminoácidos, se uniría al peptidoglicano y se encuentra en una gran variedad de enzimas que participan en la degradación de la pared celular bacteriana (Joris *et al.*, 1992). Los miembros de la familia M23 son metalopeptidasas dependientes de Zn con un gran rango de especificidad. El producto de BAB1_1035

tiene un dominio S-adenosil-L-metionina metiltransferasa. BAB1_1465 codifica para una proteína que presenta un dominio correspondiente a la familia 25 de las glucosidasas, los miembros de esta familia tienen actividad lisozima. En la proteína codificada por BAB2_0017 se encuentra un dominio presente en una gran variedad de oxidoreductasas. Esta Lpp es ortóloga a la subunidad catalítica de la sulfóxido reductasa YedY de *E. coli* (Loschi *et al.*, 2004). BAB1_2147 codifica para una Lpp que tiene un dominio hidrolasa, las enzimas con esta clase de dominio participan en la hidrólisis de la pared celular. Los productos de BAB1_0064 y BAB1_1227 presentan un dominio SLT transglicosilasa. Las transglicosilasas degradan peptidoglicano a través del clivaje de la unión β -1-4 glucosídica entre el ácido N-acetil-muramínico y la N-acetil -glucosamina.

Lipoproteínas involucradas en la estructura de membrana

Nueve de las Lpps identificadas participan en la estructura de la membrana. El ORF BAB1_1441 codifica para una Lpp que se encontraría en la membrana externa y pertenece a la familia Yfio. Yfio de *E. coli* es una de las tres proteínas que forman el complejo YaeT de la membrana externa, encargado de direccionar y plegar aquellas proteínas que forman un barril beta en la membrana externa de la bacteria. YfiO es el único componente esencial del complejo, indispensable para el correcto direccionamiento y ensamblado de las proteínas en la membrana externa (Malinverni *et al.*, 2006). Las proteínas codificadas por BAB1_1226, BAB1_1707 y BAB2_0057 presentan un dominio OmpA. Este dominio está conservado y tiene la estructura beta/alfa/beta/alfa-beta (2) que se encuentra típicamente en el extremo carboxilo terminal de muchas proteínas de membrana externa en bacterias Gram negativas. OmpA de *E. coli* se requiere para la patogenia de la bacteria y puede interactuar con moléculas receptoras del hospedador (Selvaraj *et al.*, 2007). El producto de BAB1_1814 es ortólogo a la proteína LptE de *E. coli*, que cumple un rol en el

ensamblado del LPS en la membrana externa de las bacterias Gram negativas (Sperandeo *et al.*, 2008). La proteína codificada por BAB1_0794 pertenece a la familia SmpA/OmlA. En *Pseudomonas aeruginosa*, OmlA está involucrada en el mantenimiento de la integridad de la estructura de la envoltura celular (Ochsner *et al.*, 1999). El producto de BAB1_1527 tiene un motivo del tipo extensina (extensin-like protein C-terminous). Las extensinas son glicoproteínas de la pared celular de células vegetales, que fortalecen la pared en respuesta al estrés mecánico (Kieliszewski y Lamport, 1994). Si bien este motivo se encuentra presente en todo el filo *Proteobacteria*, se desconoce el rol que tiene en estas bacterias. El producto de BAB1_1464 presenta un dominio conservado pero de función desconocida (DUF1542), que se encuentra en varias proteínas de la superficie celular. Particularmente, en el caso de *Staphylococcus aureus* participa en la resistencia a antibióticos (Wu y De Lencastre, 1999) y/o en la adhesión celular (Clarke *et al.*, 2002). El producto de BAB1_1930 es la muy estudiada Lpp Omp19. Omp19 se encuentra en la membrana externa y su participación en virulencia ha sido objeto de numerosos trabajos (Giambartolomei *et al.*, 2004; Barrionuevo *et al.*, 2008; Zwerdling *et al.*, 2008). Se ha observado que Omp19 estimula la síntesis de citoquinas (Giambartolomei *et al.*, 2004) e inhibe el procesamiento y la presentación antigénica (Barrionuevo *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado que Omp19 inhibe proteasas (Delpino *et al.*, 2010).

Lipoproteínas que participan en otras funciones

Seis de las Lpps identificadas tienen funciones que no se pueden clasificar dentro de los grupos mencionados anteriormente. BAB2_0062 codifica para VirB7, miembro del *locus VirB*, operon constituido por otros 13 ORFs. Este operon pertenece a la familia de los sistemas de secreción de tipo IV y es uno de los principales determinantes de la virulencia de *B. abortus* (Sieira *et al.*, 2000). VirB7 es una Lpp de membrana externa que interacciona consigo misma y con VirB9, por formación de puentes disulfuro. Los

heterodímeros VirB7-VirB9 se localizan en la membrana externa y pueden iniciar el ensamble del transportador. Deleciones en *virB7* reducen los niveles celulares de VirB4, 5, 8, 9 y 10, por lo que se considera que es esencial para la síntesis o la estabilidad de estos productos durante el ensamble del complejo (Zupan *et al.*, 1998). El producto de BAB2_0076 es la Lpp Omp10, que también se encuentra bien caracterizada (Tibor *et al.*, 1999). En *B. abortus*, las mutantes para Omp10 presentan alterado su crecimiento en medio mínimo pero no muestran modificaciones evidentes en las propiedades de su membrana externa (Tibor *et al.*, 2002). BAB2_0156 codifica para la Lpp FlgH, que forma el anillo L del flagelo en bacterias gram negativas y cuya modificación lipídica es importante para su funcionalidad (Schoenhals y Macnab, 1996). Este gen se encuentra formando parte de un operon que codifica para varias proteínas del aparato flagelar. El producto de BAB1_0038 tiene un dominio ortólogo al dominio citoplasmático de la subunidad II de la enzima citocromo c oxidasa. En procariontes, este complejo enzimático consta de 3 a 4 subunidades. La proteína codificada por BAB1_1336 pertenece a la familia de las entericidinas. En *E. coli*, el locus de las entericidinas codifica para genes parálogos *ecnA* y *encB* que producen dos pequeñas Lpps de la envoltura celular (entericidina A y B) que pueden mantener plásmidos en una población bacteriana mediante muerte post-segregacional (Bishop *et al.*, 1998). BAB2_0924 codifica para una proteína que presenta el motivo NosL. NosL es una proteína accesoria del operon nos (óxido nítrico reductasa), que actuaría como chaperona dependiente de Cu involucrada en el ensamblado del centro metálico (McGuirl *et al.*, 2001).

Lipoproteínas sin rol funcional identificado

El ORF BAB1_0358 codifica para una Lpp que presenta un dominio conservado de función desconocida (DUF900). Las proteínas que presentan este dominio están anotadas como hipotéticas y se encuentran principalmente en especies del género

Rhizobium. El producto de BAB1_0758 tiene un dominio de 32 aminoácidos del tipo YMGG (cierre de glicina). BAB1_0891 presenta 3 repeticiones Sel 1, estas repeticiones pertenecen a una subfamilia de secuencias repetitivas de tetratricopéptidos (TPR). El producto de BAB1_1009 tiene una región conservada con la estructura doble *psi* barril *beta* (DPBB), presente en la Lpp A (RlpA). Si bien la función de esta proteína no está bien descrita, las evidencias sugieren que actúa como supresora de la mutación *pcr* en *E. coli* (Bass *et al.*, 1996), desconociéndose el rol que tiene en *Brucella*. BAB1_1830 tiene un dominio similar a la proteína LemA. Esta proteína, de función desconocida, contiene un dominio terminal con una estructura predicha de hélice transmembrana.

Diez de las probables Lpps no presentan homología con ningún dominio conocido o conservado: BAB1_0511, BAB1_0819, BAB1_0858, BAB1_1208, BAB1_1308, BAB1_1548, BAB1_1983, BAB1_2148, BAB2_0195 y BAB2_0499.

Lipoproteínas identificadas por un solo algoritmo

Luego de eliminar los falsos positivos, quedaron como Lpps probables nueve proteínas identificadas solo por uno de los tres algoritmos utilizados. De la identificación de dominios conservados y/o funcionales y de los predictores de sustratos para el sistema TAT surge que varias de estas proteínas no serían Lpps. Sin embargo, carecemos de evidencias experimentales que así lo demuestren. El ORF BAB1_1350 codifica para una permeasa del sistema transportador de sulfato, que presenta varias hélices transmembrana. El producto de BAB1_1451 pertenece a la familia FtsW, los miembros de esta familia tienen 10 dominios transmembrana. La proteína FtsW de *E. coli* participa en el ensamblado del peptidoglicano durante el crecimiento celular, la división y la esporulación (Pastoret *et al.*, 2004). BAB1_2001 codifica para aquaporin Z, miembro de la familia MIP (Major Intrinsic Proteins). Los miembros de esta familia suelen contener 6 dominios transmembrana. Un miembro de esta familia es la proteína

facilitadora de glicerol (gen *glpF* en *E. coli*), que facilita el movimiento de glicerol a través de la membrana citoplasmática. En resumen, los productos de BAB1_1350, BAB1_1451 y BAB1_2001 tendrían varios dominios transmembrana que causarían la retención de las proteínas en la membrana interna de la bacteria, por ende no podrían ser translocadas a través de la misma para ser aciladas. Las proteínas codificadas por BAB1_1508 (carbamoyl phosphate synthase large subunit), BAB1_1653 (glucose-methanol-choline oxidoreductase) y BAB2_0810 (N-acetylmannosamine-6-phosphate epimerase) son enzimas que participan de vías metabólicas y cuya localización es citoplasmática. Además, existe evidencia experimental de la ubicación en citoplasma del producto de BAB1_1508 (Lamontagne *et al.*, 2009). La proteína codificada por BAB1_1102 muestra homología con MotC de *Sinorhizobium meliloti*, proteína involucrada en el ensamblado del flagelo (Eggenhofer *et al.*, 2006). Los productos de BAB1_1999 y BAB2_0446 no presentan homología con ningún dominio conocido y su ubicación predicha es el periplasma. Este análisis sugiere que las mencionadas candidatas no serían en realidad Lpps.

Análisis *in silico* de los componentes involucrados en la síntesis de lipoproteínas y su translocación a través de la membrana interna

Con el objetivo de conocer la similitud del sistema de síntesis y translocación de Lpps de *Brucella* con los descritos en otras bacterias, analizamos los principales componentes involucrados en cada proceso.

Mediante BLASTp se realizó una búsqueda de las proteínas de *B. abortus* S2308 homólogas a las de *E. coli* que participan en la síntesis de Lpps. Las enzimas Lgt, Lsp y Lnt se encuentran codificadas en *B. abortus* por BAB1_1544, BAB1_0148 y BAB1_2158 y muestran una identidad con las proteínas homólogas de *E. coli* del 44%, 41 % y 29 % respectivamente.

Las proteínas son translocadas a través de la membrana interna principalmente por dos mecanismos: el sistema Sec y el sistema TAT. Se buscaron péptidos señal para el sistema TAT en las 58 Lpps probables con los programas Tat P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>), TATFIND (<http://signalfind.org/tatfind.html>) y PRED-TAT (<http://www.compgen.org/tools/PRED-TAT/>). Las proteínas que serían sustrato del sistema TAT son las codificadas por BAB2_0017, BAB1_0009, BAB1_0047 y BAB1_0589 para PRED-TAT; BAB2_0017, BAB1_0047 y BAB1_0589 para TATFIND; y BAB1_1308 para TatP. Sólo tres de las Lpps fueron identificadas como sustratos del sistema TAT por dos de los programas. A partir de este análisis se puede concluir que, al igual que en otras bacterias, el transporte de la mayor parte de las Lpps a través de la membrana plasmática estaría mediado por el sistema Sec.

Dependiendo del residuo aminoacídico en la posición 2 (regla del +2), las Lpps maduras son emplazadas en la membrana externa por el sistema Lol o permanecen en la membrana interna. En *E. coli*, el sistema Lol está conformado por las proteínas LolA, LolB, LolCDE y se encuentra bien caracterizado (Okuda y Tokuda, 2011). Mediante BLASTp se identificaron en *B. abortus* las proteínas ortólogas a las de *E. coli*, estando codificadas por los ORF BAB1_2003 (LolA), BAB1_0843 (LolC y E) y BAB1_0844 (LolD), con una identidad de 27 %, 30 % (ambas) y 47 %. Como era de suponer, dado que LolB se encuentra únicamente en β y γ proteobacterias, no se encontró en *B. abortus* la proteína ortóloga a LolB de *E. coli*. No hay disponible en la bibliografía información referida al sistema Lol en *Brucella* spp, por lo tanto resta determinar si estos genes se expresan y son funcionales.

Las 58 Lpps predichas se analizaron con distintos programas para predecir localización subcelular. Este análisis permitió la identificación de Lpps con varios dominios transmembrana, por ejemplo, BAB1_0038 y BAB1_1226 con 3, BAB2_0452 con 6 y BAB2_0562 con 9 dominios transmembrana. En base a las características de

síntesis y secreción, la presencia de dominios transmembrana determinaría la retención en la membrana interna. Por lo tanto, no serán aciladas.

DISCUSIÓN

La síntesis de lipoproteínas (Lpps) es un proceso fundamental de las células procariontas. La abundancia de las Lpps codificadas por los diferentes genomas bacterianos refleja su diversidad funcional y significancia fisiológica. En *Proteobacteria*, del 0,4 al 6,7 % del proteoma corresponde a Lpps (Sutcliffe *et al.*, 2012). Según nuestro trabajo, dentro del género *Brucella*, las Lpps representan alrededor del 1,4 % del genoma.

Las herramientas utilizadas para predecir o identificar a las Lpps se basan en el reconocimiento de un patrón: el lipobox. Esta secuencia consenso contiene un aminoácido particular, la cisteína, blanco de la enzima Lsp, y los aminoácidos que la preceden, que mantienen una distancia particular entre el residuo Cys y el extremo amino terminal de la proteína. El patrón utilizado por Lipo para reconocer al lipobox es [GAVLISTCMQFWHP][GAVLISTMF][GAVLISTMNFYPQDWC][GAS][C][GAVLSTCMD NEQKH] mientras que el de DOLOP es [LVI][ASTVI][ASG][C]. El algoritmo empleado por LipoP es un modelo general escondido de Markov (hidden Markov model approach), “entrenado” con proteínas de bacterias Gram negativas. La secuencia propuesta inicialmente como consenso para el lipobox ha ido degenerando a medida que más Lpps se han identificado, debido principalmente al crecimiento exponencial del número de los genomas bacterianos secuenciados y a los consiguientes análisis proteómicos asociados (Zuckert, 2014). De esta manera, surge la necesidad de diseñar algoritmos específicos para cada filo, por ejemplo SpLip, para la identificación de Lpps en espiroquetas (Setubal *et al.*, 2006).

El número de Lpps identificadas para *B. abortus* varía según el algoritmo utilizado (Lipo identifica 56 Lpps, LipoP 49 y en la base de datos DOLOP sólo hay 33 Lpps). Según Juncker *et al.* (Juncker *et al.*, 2003), LipoP es el mejor de los métodos desarrollados hasta ese momento. En su estudio, comparó las Lpps identificadas con métodos bioinformáticos para *E. coli* K12 con las Lpps verificadas experimentalmente

y encontró que la mayoría (94,6 %) de las Lpps caracterizadas con métodos experimentales también son identificadas como Lpps por LipoP. En el presente trabajo, 44 de las 49 Lpps (90 %) identificadas por LipoP también fueron identificadas por los otros algoritmos. Las Lpps no han sido demasiado estudiadas en el género *Brucella*. Sólo para tres de ellas se encuentra demostrada experimentalmente la acilación, Omp10, Omp16 y Omp19 (Tibor *et al.*, 1999). Todas ellas fueron correctamente identificadas por los tres algoritmos.

Si bien este trabajo está enfocado en las Lpps de *B. abortus*, algunos comentarios surgen de la comparación entre las cinco especies. El número total de Lpps es similar para todas las especies y no se encontraron Lpps que sean específicas de alguna especie en particular. Es remarcable el bajo número de Lpps identificadas para *B. melitensis* 16M. Según el análisis realizado, este hecho se debería en parte a errores de anotación, dado que se observó una alta frecuencia de uso de codones alternativos, que no se relaciona con la frecuencia real de uso. El empleo de estos codones modifica la distancia entre el extremo amino terminal y la Cys +1, evitando el reconocimiento por Lipo y LipoP.

Shruthi *et al.* (Shruthi *et al.*, 2010) postularon que la utilización del sistema TAT para la translocación de Lpps a través de la membrana interna podría surgir como adaptación a hábitats complejos. Estos autores encontraron que el empleo de TAT se encuentra asociado al estilo de vida de la bacteria más que al nivel taxonómico al que pertenece. Los organismos de vida libre hacen un uso moderado de TAT mientras que las bacterias patógenas lo utilizan mínimamente. Al analizar las funciones de las Lpps que dependen del sistema TAT se encuentra que son enzimas y proteínas de unión al sustrato en bacterias de vida libre, mientras que en bacterias patogénicas son predominantemente enzimas, principalmente hidrolasas y oxidoreductasas. Nuestros resultados son consistentes con las observaciones realizadas por estos autores, dado

que de las 5 Lpps predichas dependientes de TAT, tres son enzimas (BAB1_0047, BAB1_0589 y BAB2_0017), una es una proteína de unión al sustrato (BAB1_0009) y la restante (BAB1_1308) no muestra homología con ningún dominio conservado conocido.

La obtención de Omp10, Omp16 y Omp19 de forma recombinante en *E. coli* (Tibor *et al.*, 1996; Giambartolomei *et al.*, 2004) habla de vías comunes de biosíntesis de Lpps entre *E. coli* y *B. abortus* (Tibor *et al.*, 1996).

Aunque la mayoría de los fila están compuestos por bacterias didermas, el sistema Lol no se encuentra bien conservado en este nivel (Narita; Narita y Tokuda, 2006; Sutcliffe *et al.*, 2012), la proteína LolB se encuentra únicamente en *Betaproteobacteria* y *Gammaproteobacteria* (Okuda y Tokuda, 2011). El género *Brucella* cuenta con las proteínas homólogas a LolA y LolCDE, LolB está ausente, de esta manera, la vía descrita y bien caracterizada para localizar Lpps en *E. coli* se encuentra incompleta en *Brucella*. La exposición en superficie de Omp10, Omp16 y Omp19 se determinó por *immunogold* y ELISA (Cloeckaert *et al.*, 1990). Adicionalmente, mediante estudios proteómicos se determinó la ubicación en membrana externa de 12 de las 58 Lpps identificadas (Connolly *et al.*, 2006; Lamontagne *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren la existencia de una vía alternativa al sistema Lol para translocar Lpps a través del periplasma y/o dentro de la membrana externa en *Brucella*. Distintas evidencias sugieren que LolA podría tener un rol similar al de LolB en sistemas que carecen de esta última proteína. Por un lado, se ha observado una similitud funcional entre LolA y LolB en su interacción con Lpps, debido al alto grado de homología estructural a pesar de tener diferentes secuencias aminoacídicas (Takeda *et al.*, 2003). En el mismo sentido, Tsukahara *et al.* (Tsukahara *et al.*, 2009) demostraron que la versión soluble, no acilada, de LolB puede compensar la pérdida de LolB salvaje aunque con una eficiencia menor. El reemplazo funcional de LolB por LolA en *Brucella*

queda pendiente de estudio. Si bien varios autores concuerdan con la existencia teórica de mecanismos diferentes al sistema Lol para la translocación de Lpps, hasta la fecha no se ha reportado evidencias concretas de los mismos.

Determinar la localización en membrana interna o externa de las Lpps resulta importante para identificar las señales de localización de las Lpps. En la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* se desarrollaron diferentes estrategias experimentales para asignar la ubicación de sus Lpps y además, en el análisis, se tuvo en consideración la función biológica de dichas Lpps (Remans *et al.*). Un análisis similar se podría realizar para determinar la localización de las Lpps de *Brucella* y así conocer sus señales de localización. En este trabajo se emplearon herramientas bioinformáticas para predecir la ubicación subcelular de las Lpps, pero únicamente sirvieron para identificar Lpps con dominios transmembrana, que causarían la retención de las proteínas en la membrana interna impidiendo que pasen a la cara periplásmica para sufrir las modificaciones lipídicas. La retención de las Lpps en membrana ocurre gracias a los grupos acilo y no por la secuencia de aminoácidos de la proteína, que es lo que analizan los distintos predictores de localización subcelular. La presencia de dominios transmembrana en algunas de las Lpps predichas también se evidenció mediante el análisis funcional por homología con proteínas previamente caracterizadas. Nuevamente, estos hallazgos *in silico* necesitan ser corroborados experimentalmente. Los estudios proteómicos permiten tener evidencias de expresión de las Lpps y además, brindan información sobre la regulación de los genes que codifican para Lpps, permitiendo determinar aquellas condiciones o etapas de la infección donde las Lpps se expresan. Viadas *et al.* (Viadas *et al.*, 2009) analizaron la expresión de genes en condiciones de laboratorio, es decir *B. abortus* creciendo en medio TSB, y encontraron que entre los genes con baja expresión se encuentran los que codifican para las Lpps VirB7, FlgH y NosL. Este hallazgo es coherente con la evidencia de que

estas tres Lpps no son esenciales para el crecimiento de *B. abortus in vitro*. Por otra parte, Lamontagne *et al.* (Lamontagne *et al.*, 2009) investigaron las adaptaciones fisiológicas llevadas a cabo por *B. abortus* 2308 durante la infección de macrófagos murinos de la línea RAW264.7 y observaron cambios en la expresión de algunas Omps durante el transcurso de la infección. Dentro de las Omps que cambian su expresión, se encuentran las Lpps OmpA y Omp16. La expresión de OmpA se reduce en los momentos tempranos de la infección pero luego aumenta a los niveles previos a la infección a las 20 y 44 h p.i., una vez que *Brucella* llega al retículo endoplasmático. Por el contrario, los niveles de Omp16 permanecen estables a las 3 y 20 h p.i. pero se reducen considerablemente a las 44 h p.i.. Estos cambios en la expresión de las Omps indican ajustes en la topología de la membrana externa, los cuales pueden ser considerados como adaptaciones fisiológicas a los diferentes ambientes intracelulares. Además, en relación con los cambios en la topología de la membrana, pudimos identificar un gran número de Lpps probables que participan en la remodelación de la envoltura celular, por lo que refuerzan el rol de estas proteínas en la adaptación de la bacteria

Dos cuestiones relacionadas con las Lpps de bacterias patógenas son de gran interés para la salud pública: su potencial uso como antígenos para el desarrollo de vacunas y su vía de síntesis como blanco de antibacterianos. Por un lado, la exposición de las Lpps y su participación en virulencia las hace candidatas como antígenos para el desarrollo racional de vacunas. En este sentido se han realizado estudios en *Streptococcus pneumoniae* (Ogunniyi *et al.*, 2000), *Yersinia pestis* (Tanabe *et al.*, 2006) y *Moraxella catarrhalis* (Yang *et al.*) con resultados prometedores. Por otro lado, la vía de síntesis de las Lpps es única para bacterias, por lo tanto, se podrían desarrollar antimicrobianos que tengan como blanco enzimas involucradas en esta vía.

Distintas líneas se han direccionado en este sentido pudiendo describir varios compuestos que están siendo estudiados (Ito *et al.*, 2007; Pathania *et al.*, 2009).

Si bien en esta parte del trabajo se identificaron mediante herramientas bioinformáticas Lpps probables de *B. abortus*, para poder confirmar estos resultados, son necesarios estudios bioquímicos para corroborar experimentalmente la existencia de la modificación lipídica en cada proteína.

CAPÍTULO 2

IMPLICANCIA DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE

B. abortus EN VIRULENCIA

RESULTADOS

Obtención de las cepas de *B. abortus* mutantes en los genes codificantes para posibles Lpps

En el capítulo I del presente trabajo, identificamos *in silico* un total de 58 lipoproteínas (Lpps) en *B. abortus*. A partir de esa selección nos planteamos evaluar su implicancia en la virulencia de la bacteria. Una de las maneras de hacerlo, es mutando el gen codificante y evaluar el fenotipo de la cepa mutante. De esta manera, se han descrito distintos genes asociados a la virulencia de *Brucella* (Hong *et al.*, 2000; Haine *et al.*, 2005). Dado que la descripción del rol de las Lpps en virulencia es escasa, el objetivo de este capítulo fue obtener cepas mutantes en genes que codifican para Lpps, evaluar su virulencia en el modelo murino y estudiar si las cepas atenuadas en su virulencia confieren protección ante el desafío por la cepa salvaje.

Dentro del espectro de opciones disponibles para mutar *Brucella spp.*, se eligió el método de interrupción integrativa por recombinación homóloga. Si bien genera mutantes polares, este es un método rápido y experimentalmente sencillo que permite la obtención de gran cantidad cepas mutantes en poco tiempo, permitiendo de esta manera un análisis a gran escala.

En la Figura 17, se muestra un esquema del procedimiento utilizado para la construcción de las mutantes. La base del mismo, fue inicialmente descrita por Haine *et al.* (Haine *et al.*, 2005) y en nuestro laboratorio se hicieron distintas modificaciones tendientes a adaptarlo según nuestras necesidades. De esta manera, se reemplazó el vector utilizado, se agregó la secuencia de restricción a los oligonucleótidos, el plásmido se incorporó a la bacteria por electroporación y se modificó el método utilizado para evaluar la virulencia. De las Lpps identificadas en el capítulo anterior se seleccionaron 25 como blanco de mutagénesis (Tabla 10). El criterio utilizado fue que el marco abierto de lectura tuviera una secuencia nucleotídica mayor a 500 pb, debido a restricciones del método de mutagénesis.

Utilizando oligonucleótidos internos a la secuencia del gen y empleando el ADN genómico de *B. abortus* S2308 como molde, se amplificó una región de aproximadamente 500 pb del gen que codifica cada una de las Lpp seleccionadas, que posteriormente se ligó en el vector p-Drive. Los plásmidos resultantes se amplificaron en *E. coli* DH5 α , se purificaron por el método de lisis alcalina y se electroporaron en distintas cepas de *Brucella* electrocompetentes.

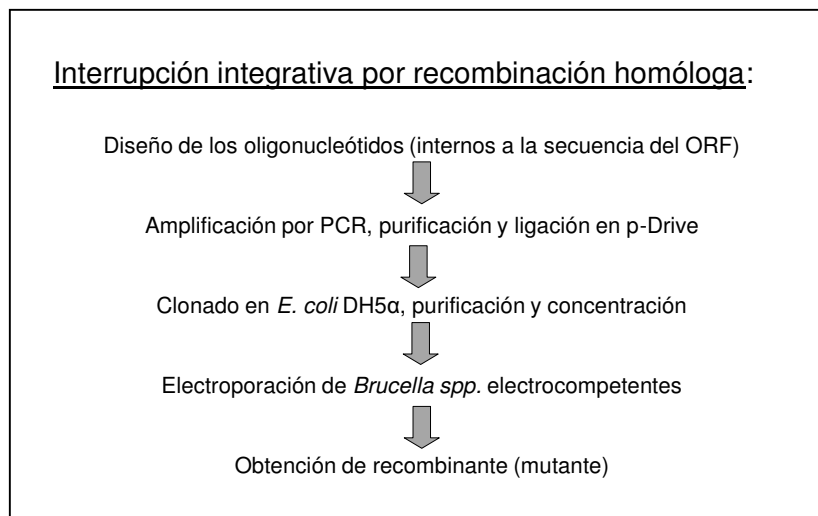


Figura 17: Diagrama de flujo para obtener las mutantes. La explicación detallada sobre los distintos procedimientos se encuentra en la sección Materiales y Métodos.

En el método de interrupción integrativa (Fig. 18), el fragmento clonado en el plásmido se integra en el genoma de la bacteria mediante recombinación homóloga, generando dos copias truncadas del gen que se encuentran flanqueando la secuencia del vector. La resistencia a kanamicina, otorgada por la inserción del plásmido, se utilizó como criterio de selección positivo. Dado que p-Drive es un plásmido “suicida” en *Brucella* spp., sólo aquellos clones en los que haya ocurrido recombinación serán resistentes a éste antibiótico.

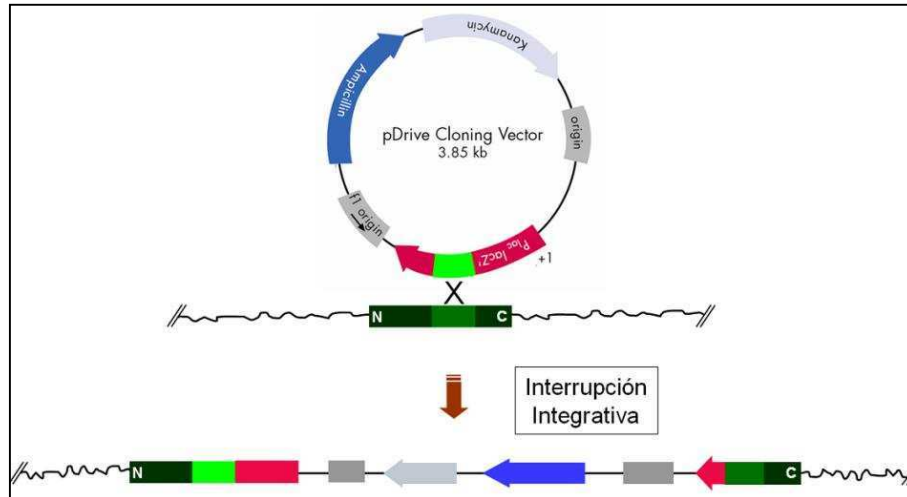


Figura 18: Estrategia empleada para la generación de las mutantes. La región blanco a ser interrumpida es amplificada mediante oligonucleótidos específicos generando el inserto, el cual es clonado en el vector pDRIVE (Qiagen), que lleva una resistencia a kanamicina, empleada en este caso como marcador de selección. Mediante recombinación homóloga se produce la integración del plásmido en el genoma bacteriano. De esta manera, se van a obtener dos copias incompletas del gen blanco, una que carece de la región 3' del gen y la otra que carece del extremo 5' del gen. Entre dichas copias trunca se encuentra la secuencia de vector.

Para evitar la posibilidad que la región clonada se exprese por medio del promotor *pLac* presente en el vector, se seleccionaron aquellos clones con el inserto clonado en orientación anti sentido respecto del promotor. La selección se realizó mediante restricción con *Bam*HI de 4 clones de bacterias recombinantes. Esta digestión permite que los clones con el inserto orientado en anti sentido liberen al fragmento clonado (aproximadamente 500 pb, varía según la mutante de la que se trate). En figura 19 se muestra la digestión con *Bam*HI para seleccionar los clones de cuatro de las mutantes de *B. abortus*. La digestión de los 4 clones de *B. abortus* Lp11 liberó un fragmento de alrededor de 500 pb, indicando que en los 4 clones el inserto clonado se encuentra en la posición antisentido. En las calles 8 (clon c de *B. abortus* Lp18) y 16 (clon c de *B. abortus* Lp20) no se observa producto de digestión, en estos clones el inserto se encuentra en la posición sentido, por lo tanto se descartaron.

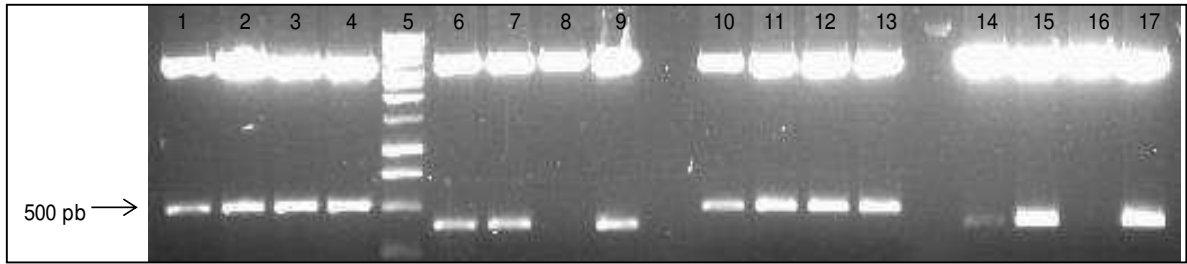


Figura 19: Selección de los clones con el inserto en la orientación antisentido. Los productos de la digestión con BamHI se resolvieron en gel de agarosa 0,8 %. Calles 1 a 4: clones a, b, c y d de *B. abortus* Lp11; calle 5: marcador de peso molecular 1kb ladder (Promega); calles 6 a 9: clones a, b, c y d de *B. abortus* Lp 18; calles 10 a 13: clones a, b, c y d de *B. abortus* Lp17; calles 14 a 17: clones a, b, c y d de *B. abortus* Lp20.

Aplicando la metodología mencionada, se lograron obtener mutantes para 24 de las 25 Lpps seleccionadas. Las cepas resultantes se denominaron Lp1 a Lp25. En la Tabla 10 se indica cuál es el marco abierto de lectura mutado en cada cepa. No se logró obtener el producto de amplificación del ORF BAB1_1707a pesar de las numerosas modificaciones introducidas en el protocolo de la reacción PCR.

Para corroborar que las cepas mutantes obtenidas corresponden a *Brucella*, se realizó una PCR con los oligonucleótidos B4/B5. Este par de oligonucleótidos permite la amplificación de una región conservada que corresponde a una proteína inmunogénica de membrana (BCSP31), específica del género *Brucella* (Morata *et al.*, 2003). Para todas las mutantes se obtuvo un producto de amplificación de 223 pb, según lo esperado (Fig. 20).

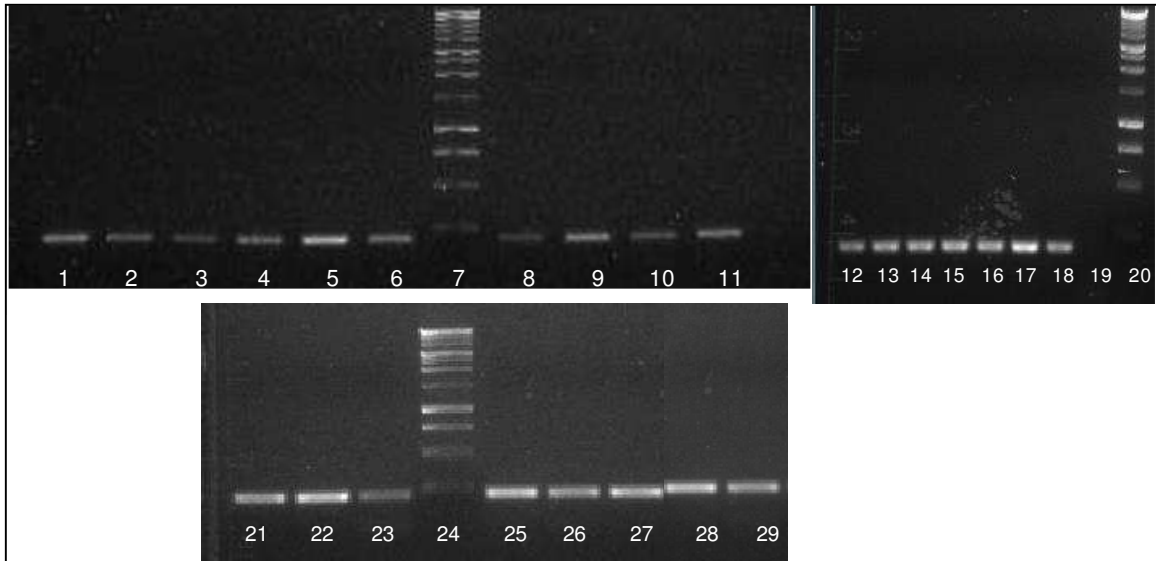


Figura 20: Productos de amplificación de la PCR B4/B5. Gel de agarosa 1,5 %. Calles 1 a 6: *B. abortus* Lp1 a *B. abortus* Lp6 Lp1 a LP6, calles 7, 20 y 24: marcador de peso molecular 1kb ladder (Promega), calles 8 a 11: *B. abortus* Lp7 a *B. abortus* Lp10, calles 12 a 28: *B. abortus* Lp11 a *B. abortus* Lp17, calle 19: blanco de PCR (sin ADN), calles 21 a 23: *B. abortus* Lp18 a *B. abortus* Lp20, calles 25 a 28: *B. abortus* Lp22 a *B. abortus* Lp25, calle 29: *B. abortus* S2308.

A partir de la aplicación del método PTMm, se han generado posibles mutantes de *B. abortus* en genes que codifican para Lpps (*B. abortus* Lp1 a *B. abortus* Lp 25). Dado que el objetivo del trabajo es hacer un análisis a gran escala para determinar el rol de las Lpps en virulencia, la estrategia elegida fue la de caracterizar en profundidad únicamente aquellas mutantes que resulten atenuadas en su virulencia en el modelo murino.

Evaluación de la virulencia de las mutantes Lp de *B. abortus* en ratones

El modelo murino es el modelo animal más empleado para identificar factores de virulencia de *Brucella* y estudiar la respuesta inmune del huésped. Si bien varias cepas de ratones se han caracterizado como modelos para estudiar la infección por *Brucella*, hembras de entre 4 y 9 semanas de edad de la cepa BALB/c constituyen el modelo más utilizado para evaluar la distribución sistémica de *Brucella sp.* durante el curso de la infección (Enright *et al.*, 1990; Stevens *et al.*, 1994; Fernandes *et al.*, 1996).

También se lo emplea para analizar la expresión genética durante la infección con *Brucella sp.* (Baldwin y Parent, 2002; Kahl-McDonagh *et al.*, 2007; Roux *et al.*, 2007). Se utiliza la vía de infección intraperitoneal ya que al establecerse una infección persistente en el ratón, se obtiene una rápida distribución sistémica de *Brucella sp.* y cargas bacterianas altas en hígado y bazo (Enright *et al.*, 1990; Stevens *et al.*, 1994; Baldwin y Parent, 2002).

Para evaluar la virulencia de las cepas mutantes se utilizó el modelo murino de infección esplénica. Grupos de 3 ratones BALB/c de 6 semanas de edad fueron inoculados i.p. con 1×10^5 UFC de la cepa mutante, un grupo se inoculó con *B. abortus* S2308 y otro con PBS como controles. A las seis semanas p.i., los animales fueron sacrificados, sus bazos removidos y procesados según se indicó previamente. De las 24 cepas mutantes analizadas, sólo para dos de ellas, Lp1 y Lp19, el recuento de UFC/bazo resultó significativamente menor ($p < 0,001$ y $p < 0,002$, respectivamente) respecto de *B. abortus* S2308 (Fig. 21). El recuento de UFC/bazo en cada caso fue $\log_{10}(3,42 \pm 0,30)$ para *B. abortus* Lp1, $\log_{10}(3,25 \pm 0,06)$ para *B. abortus* Lp19 y $\log_{10}(6,04 \pm 0,23)$ para *B. abortus* S2308.

En concordancia con esto, al analizar el peso de los bazos de los ratones de los distintos grupos, se observó que el peso de los bazos de los ratones infectados con *B. abortus* Lp1 y *B. abortus* Lp19 es significativamente menor ($p < 0,001$) que el de los infectados con la cepa parental. Más aún, ambas mutantes no produjeron esplenomegalia (Fig. 22), no mostrando diferencias significativas respecto de animales sin infectar (control con PBS). Estos resultados permiten concluir que ambas cepas mutantes resultan atenuadas en su virulencia comparadas con la cepa salvaje *B. abortus* S2308.

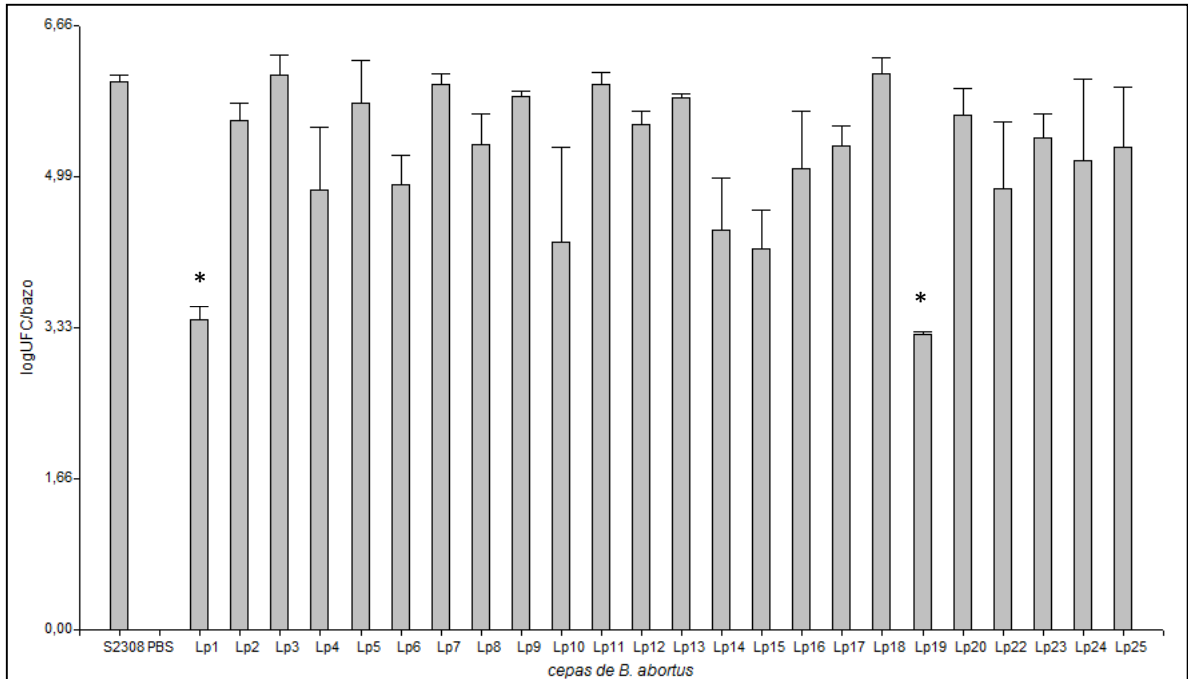


Figura 21: Evaluación de la virulencia de las cepas mutantes y parental de *B. abortus*. Grupos de 3 ratones BALB/c de 6 semanas de edad fueron inoculados i.p con 1×10^5 UFC de la cepa mutante, un grupo se inoculó con *B. abortus* S2308 y otro con PBS como controles. Los animales fueron sacrificados a las 6 semanas p.i., sus bazo removidos y procesados según se indicó. Las barras corresponden al desvío estándar. * indica diferencias significativas con respecto al control *B. abortus* S2308.

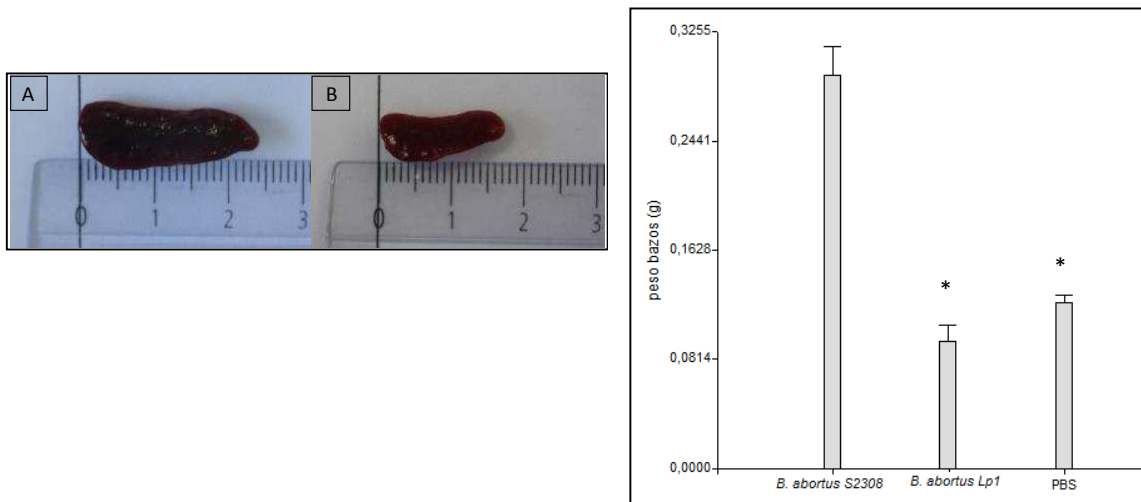


Figura 22: Colonización del bazo por *B. abortus*. Bazos de ratón infectado con *B. abortus* S2308 (A) y *B. abortus* Lp1 (B), donde se observa la esplenomegalia causada por la cepa parental. (C) Peso promedio de los bazo de ratones infectados con *B. abortus* S2308, *B. abortus* Lp1 y control con PBS (n=3). Las barras corresponden al desvío estándar. * indica diferencias significativas con respecto a *B. abortus* S2308.

Tabla 10: Mutantes de *B. abortus* obtenidas y evaluación de su virulencia en el modelo murino. Las mutantes generadas se denominaron *B. abortus* Lp1 a *B. abortus* Lp25, se indica el ORF interrumpido en cada caso y, a modo de resumen, el fenotipo observado al evaluar la virulencia de cada cepa en el modelo murino. SD: sin determinar.

Nombre de la cepa mutante de <i>B. abortus</i>	ORF interrumpido	Resultado
Lp1	BAB1_0009	Atenuada
Lp2	BAB2_0810	No atenuada
Lp3	BAB1_0358	No atenuada
Lp4	BAB1_2034	No atenuada
Lp5	BAB1_1451	No atenuada
Lp6	BAB1_0038	No atenuada
Lp7	BAB1_2147	No atenuada
Lp8	BAB2_0017	No atenuada
Lp9	BAB1_0589	No atenuada
Lp10	BAB2_0156	No atenuada
Lp11	BAB2_0195	No atenuada
Lp12	BAB1_1226	No atenuada
Lp13	BAB1_0138	No atenuada

Nombre de la cepa mutante de <i>B. abortus</i>	ORF interrumpido	Resultado
Lp14	BAB1_1041	No atenuada
Lp15	BAB1_0804	No atenuada
Lp16	BAB1_0511	No atenuada
Lp17	BAB1_1527	No atenuada
Lp18	BAB2_0924	No atenuada
Lp19	BAB1_1930	Atenuada
Lp20	BAB2_0057	No atenuada
Lp21	BAB1_1707	SD
Lp22	BAB1_1773	No atenuada
Lp23	BAB1_0064	No atenuada
Lp24	BAB1_0047	No atenuada
Lp25	BAB1_1227	No atenuada

B. abortus Lp1 es la mutante en la que se ha interrumpido el ORF BAB1_0009 por disrupción integrativa, el cual codificaría para una proteína de unión al sustrato de un transportador ABC. En *B. abortus* Lp19 se interrumpió el ORF BAB1_1930, que corresponde a la lipoproteína Omp19. La atenuación de la cepa mutante en Omp19 ya ha sido descrita por otros autores (Tibor *et al.*, 2002). Esto representa una evidencia a favor de la eficiencia del método utilizado por nosotros en este trabajo. En consecuencia, en este trabajo nos enfocamos en el estudio de la cepa mutante *B. abortus* Lp1.

El ORF BAB1_0009 tiene 1.815 pb de extensión y se localiza en la cadena complementaria del cromosoma I. Se encuentra formando parte de un operon, de aproximadamente 7,7kb, que codifica para un transportador ABC completo (ATPasa, dos proteínas de unión al sustrato y dos permeasas), específicamente se trata de un importador de oligopéptidos (Fig. 23). Este transportador ABC de oligopéptidos se encuentra presente en otras especies del género *Brucella* (Jenner *et al.*, 2009). BAB1_0009 codifica para una proteína de 604 aminoácidos que corresponde a la

proteína de unión al sustrato del transportador. Esta proteína se encuentra representada en todo el dominio *Bacteria*, tiene una identidad del 37 % con sus ortólogas en *E. coli*, OppA, y en otros miembros del orden *Rhizobiales*, teniendo un 80 % de identidad con sus ortólogas del género *Ochrobactrum*, según surge del alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas mediante Blastp. Dentro del género *Brucella*, la proteína se encuentra altamente conservada (98-100 % de identidad entre las proteínas de las distintas especies).

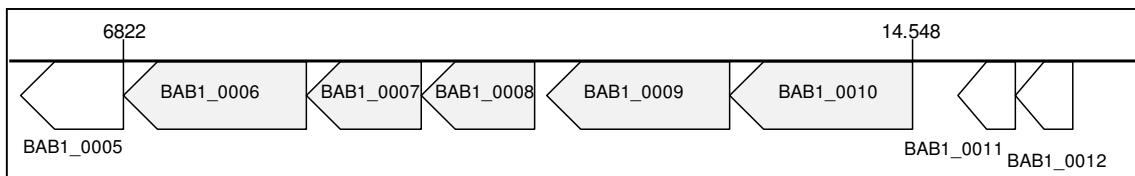


Figura 23: Región génica de BAB1_0009. Se muestra el operón que codifica para el transportador ABC de oligopéptidos, constituido por ATPasa (BAB1_0006), dos permeasas (BAB1_0007 y BAB1_0008) y dos proteínas de unión al sustrato (BAB1_0009 y BAB1_0010). Se indica la posición en el cromosoma I en la que se extiende el operón.

Con la intención de confirmar el resultado del primer análisis se realizó un segundo ensayo de infección de ratones con *B. abortus* Lp1. En esta oportunidad se utilizaron 5 animales por grupo. Los valores de \log_{10} UFC/bazo \pm desvío estándar en cada caso fueron $6,11 \pm 0,21$ para *B. abortus* S2308 y $3,28 \pm 0,08$ para *B. abortus* Lp1 (Fig.24). Las cargas bacterianas de los bazos de los ratones de los dos grupos resultaron ser significativamente diferentes ($p < 0,0001$). Se confirmó de esta manera que *B. abortus* Lp1 es atenuada en su virulencia comparada con la cepa parental en el modelo murino.

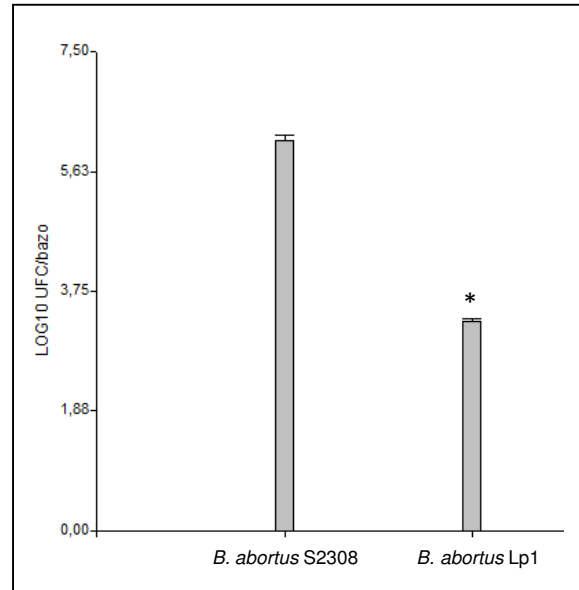
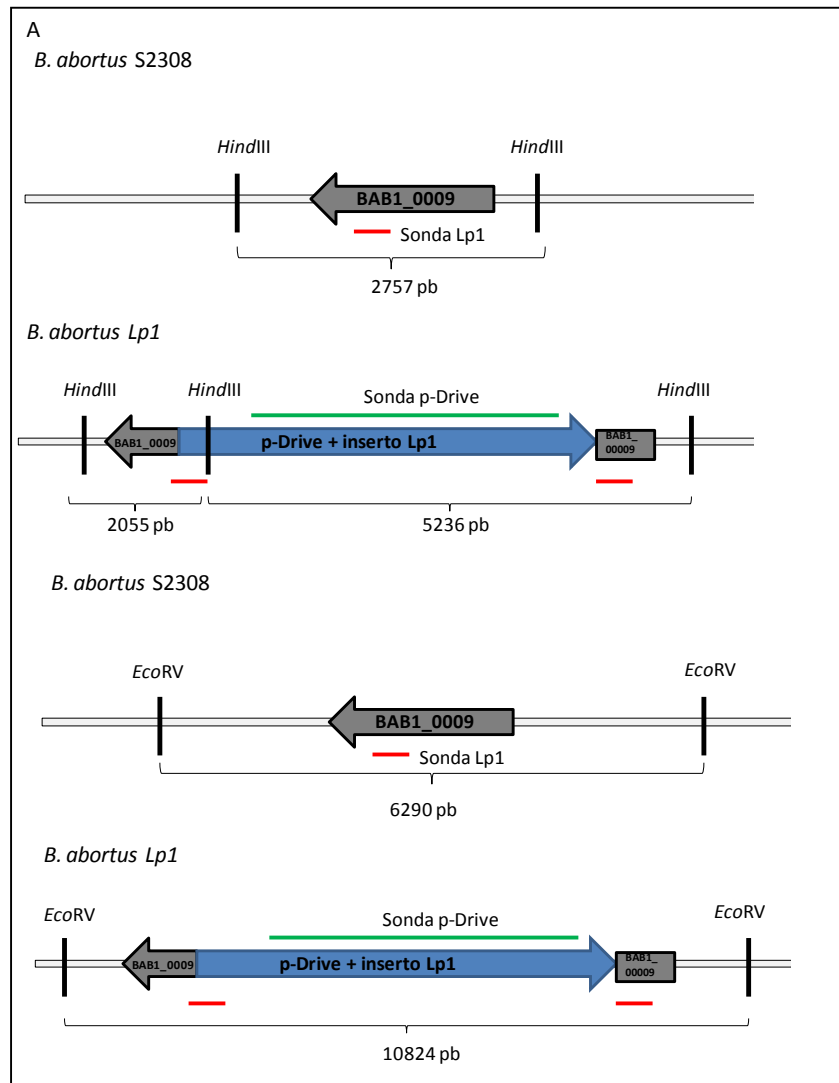


Figura 24: Ensayo confirmatorio de la virulencia de Lp1. Grupos de 5 ratones BALB/c de 6 semanas de edad fueron inoculados i.p con 1×10^5 UFC de *B. abortus* Lp1, un grupo se inoculó con *B. abortus* S2308 y otro con PBS como controles. Seis semanas p.i, los animales fueron sacrificados, sus bazos removidos y procesados según se indicó. Las barras corresponden al desvío estándar. * indica diferencias significativas con respecto al control *B. abortus* S2308.

Caracterización de la mutante *B. abortus* Lp1

Para confirmar la inserción sitio-dirigida del vector plasmídico en el gen de interés de *B. abortus* S2308 se realizó un *Southern blot*. Para ello, se analizaron las regiones genómicas involucradas utilizando el programa Vector NTI, este análisis permitió seleccionar las enzimas de restricción apropiadas y calcular el tamaño esperado de los productos de digestión en cada recombinante. La estrategia utilizada consistió en buscar enzimas de restricción que tuvieran sitios de corte por fuera del gen de interés y que a su vez fueran capaces de cortar al plásmido. De esta manera, la restricción por la enzima seleccionada, *HindIII*, produce un fragmento en la cepa parental y dos en la cepa mutante, que se evidencian utilizando como sonda al inserto Lp1 marcado. Además, se digirió con otra enzima, *EcoRV*, que posee sitios de corte únicamente por fuera del gen de interés. En la Figura 25A, se observa el esquema de la región génica y los tamaños de los fragmentos producidos en cada digestión. Así, con la sonda Lp1 se revela un solo fragmento en cada cepa, siendo el de *B. abortus* Lp1 de mayor

tamaño que el *B. abortus* S2308, debido a la inserción del plásmido. De acuerdo al análisis del patrón de restricción, se confirmó que la inserción se produjo según lo esperado (Fig. 25B).



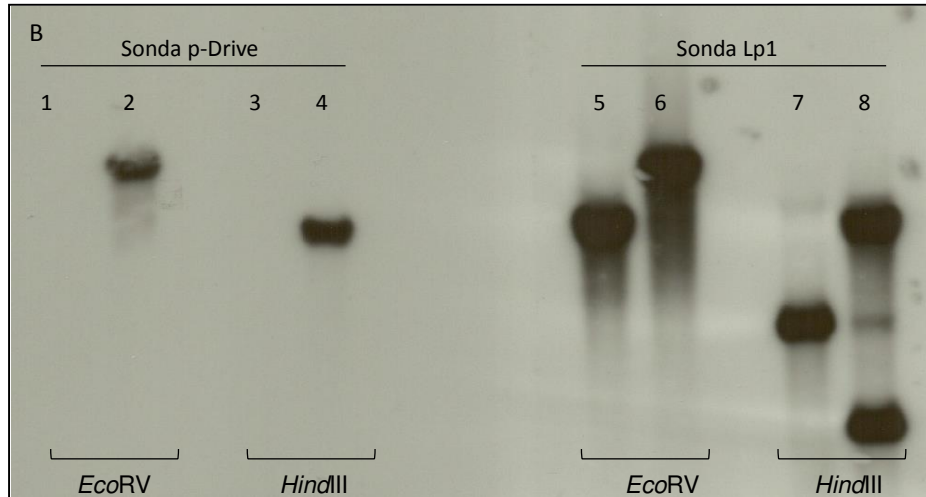


Figura 25: Confirmación de la correcta integración del plásmido mediante Southern blot. (A) Esquema de la estrategia empleada para confirmar la inserción sitio-dirigida del plásmido en el genoma de *B. abortus* S2308. Mediante el programa Vector NTI se realizó el análisis bioinformático del ORF BAB1_0009, de sus regiones adyacentes y del vector p-Drive. Se indica el tamaño de los fragmentos de restricción esperados al digerir con cada enzima. (B) El ADN genómico de *B. abortus* S2308 (calles 1, 3, 5 y 7) y *B. abortus* Lp1 (calles 2,4, 6 y 8) se digirió con *EcoRV* e *HindIII* y los fragmentos se resolvieron en un gel de agarosa 0,8 %. Se utilizaron como sonda el vector p-Drive y el inserto Lp1 marcados con el sistema comercial ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (GE Healthcare).

Un vez confirmada su atenuación y verificada la mutagénesis insercional de Lp1, nos preguntamos si la mutación modifica el crecimiento *in vitro* de *B. abortus* Lp1. En la bibliografía se encuentran descritas varias posibilidades. Se han reportado trabajos con mutantes atenuadas de *B. abortus* cuya curva de crecimiento es igual a la de la cepa parental (Céspedes *et al.*; Tibor *et al.*, 2002), otros donde la curva de crecimiento difiere a partir de un tiempo determinado (Zhang *et al.*, 2003) y finalmente, aquellos donde las curvas de crecimiento de la cepa parental y mutante son distintas en todos sus puntos (Tibor *et al.*, 2002). Para evaluar si esta mutación afecta el crecimiento *in vitro* de la bacteria, se comparó el crecimiento en medio TSB de las cepas mutante y parental (Fig.26). Se tomaron alícuotas del cultivo cada 2 hs y se evaluaron por turbidimetría. Se realizó el ajuste de los resultados a una función sigmoideal de Boltzmann. Ambas cepas presentaron una cinética similar, con igual velocidad de crecimiento en las primeras 20 hs del cultivo, luego *B. abortus* Lp1 crece a una tasa mayor y finalmente, alrededor de las 40 hs de cultivo, ambas cepas llegan a la fase estacionaria, pero con valores de DOs marcadamente distintos (2,21 vs. 1,72). Los

resultados obtenidos permiten concluir que la atenuación en la virulencia observada en *B. abortus* Lp1 no se debe a defectos en el crecimiento *in vitro* ya que la mutante es capaz de replicar de forma comparable a la cepa parental *B. abortus* S2308.

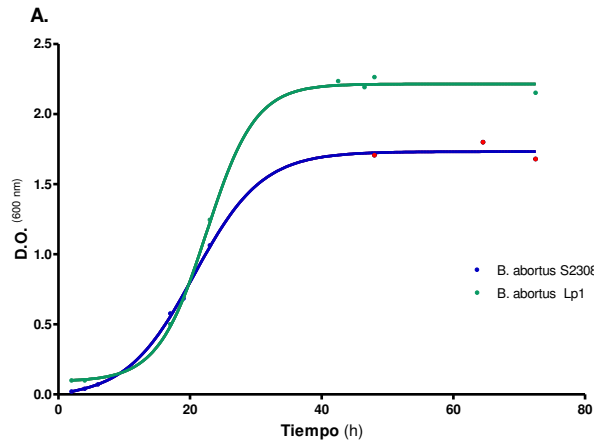


Figura 26: Crecimiento *in vitro* de *B. abortus* Lp1. Curvas de crecimiento. Para cada cepa se graficaron los valores de las lecturas de la densidad óptica (DO) medidos a intervalos de tiempo expresados en horas (h) y la función sigmoide de Boltzmann ajustada por regresión no lineal a los valores de la curva. Se representan con azul la cepa parental (*B. abortus* S2308) y con verde la cepa mutante (*B. abortus* Lp1).

Las especies de *Brucella* se caracterizan de acuerdo con el aspecto de su membrana externa en lisas y rugosas. Esta diferencia se produce por el tipo de LPS que predomina en la membrana. El LPS de las cepas rugosas carece de la cadena O. Se ha reportado que la cadena O del LPS participa de la sobrevivencia de *B. abortus in vivo* (Godfroid *et al.*, 1998; Ugalde *et al.*, 2000; Vemulapalli *et al.*, 2000). Si bien las dos especies naturalmente rugosas de *Brucella*, *B. ovis* y *B. canis*, presentan una alta virulencia en sus hospedadores primarios, las mutantes rugosas son menos virulentas que las correspondientes cepas parentales (Smith y Ficht, 1990). Para determinar el fenotipo liso o rugoso de la mutante se realizó la prueba de acriflavina (Fig. 27). La cepa mutante *B. abortus* Lp1, al igual que *B. abortus* S2308, no mostró aglutinación, por lo tanto, la mutación generada no altera el fenotipo liso de la bacteria.

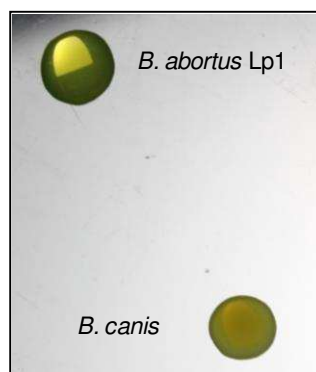


Figura 27: Prueba de aglutinación con acriflavina. Sobre una placa de Petri se colocó una gota de la solución de acriflavina y se le agregó una gota de la suspensión bacteriana. Se incubó 5 min a temperatura ambiente y se observó la presencia (cepa rugosa) o ausencia (cepa lisa) de aglutinación. Como control de aglutinación se utilizó una resuspensión de *B. canis* del cepario del laboratorio.

Las Lpps son proteínas de membrana externa, y según surge del análisis bioinformático realizado en este trabajo y en otros (en otras bacterias), muchas de ellas estarían involucradas en procesos de remodelación de la envoltura celular. Para caracterizar si la interrupción del gen que codifica OppA (BAB1_0009) modifica alguna característica asociada a la integridad de la membrana, se evaluó la resistencia/sensibilidad al antibiótico polimixina B (PmB) y al detergente dodecil sulfato de sodio (SDS). Esta prueba se realizó mediante el ensayo de inhibición del crecimiento en discos. Para el caso del tratamiento con SDS, el diámetro del halo de inhibición del crecimiento fue $24,53 \pm 0,85$ mm para *B. abortus* S2308 y $27,29 \pm 2,2$ mm para *B. abortus* Lp1, resultando significativa esta diferencia ($p < 0,05$). Sin embargo, ambas cepas son igualmente sensibles a PmB, al menos a la concentración evaluada (halos de inhibición de $29,43 \pm 1,22$ mm para *B. abortus* S2308 y $29,61 \pm 2,87$ para *B. abortus* Lp1) (Fig. 28). Esto podría indicar algún tipo de alteración a nivel de la envoltura, aunque no sería severa.

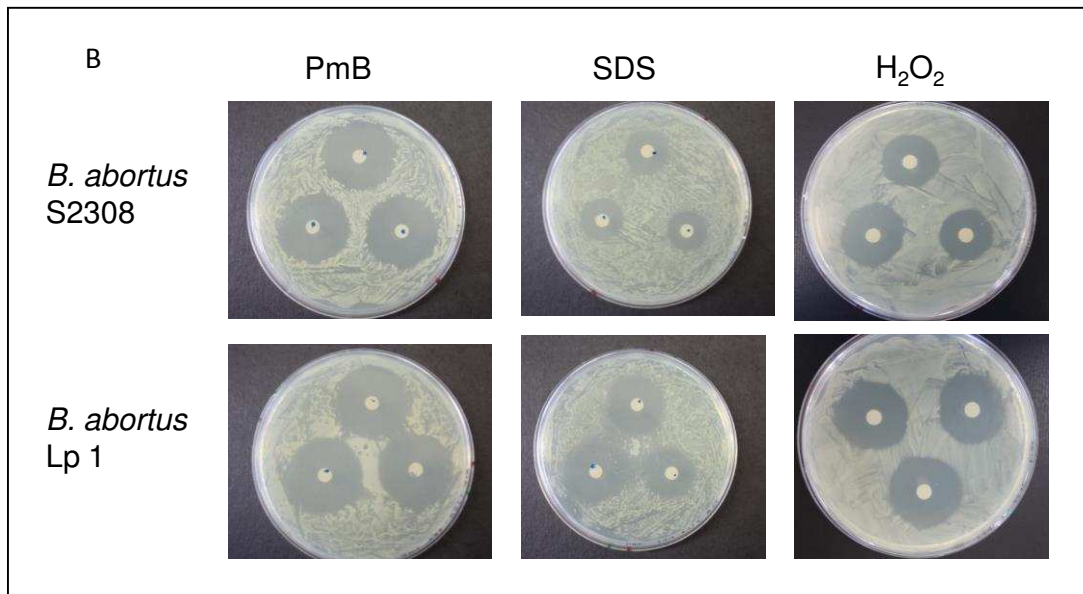
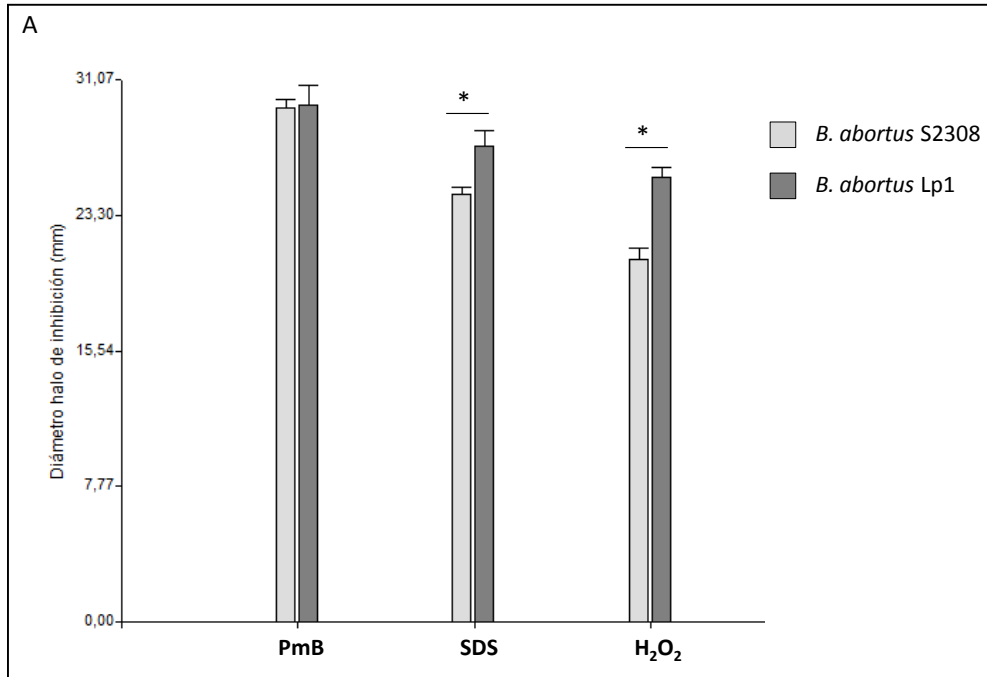


Figura 28. Evaluación de la sensibilidad a PmB, SDS y H₂O₂. La sensibilidad a distintos agentes antimicrobianos se evaluó por inhibición del crecimiento en placa. Una suspensión de bacterias de DO_{600nm} 0,2 se sembró en placas AT y se colocaron 3 discos de papel de filtro Whatman de 6 mm de diámetro por placa conteniendo cada uno de los compuestos (SDS 10%, Polimixina B (PmB) 10mg/mL o H₂O₂ 30%). Luego de incubar por 72 hs a 37 °C, se midieron con un calibre dos diámetros de cada halo de inhibición y se promediaron los valores. Cada compuesto se evaluó por triplicado. (A) Diámetro de los halos de inhibición. Las barras corresponden al desvío estándar. * indica diferencias significativas. (B) Fotos de las placas donde se aprecian los halos de inhibición del crecimiento de las bacterias por los distintos compuestos evaluados.

La fagocitosis es el primer paso para la eliminación de agentes infecciosos. Las células fagocíticas endocitan al patógeno, formando fagosomas que luego se van a fusionar con los lisosomas. De esta manera, se forma el fagolisosoma, un compartimento con pH ácido y enzimas hidrolíticas, donde se matan, degradan y procesan los microorganismos para luego presentar sus antígenos en la superficie celular. Sin embargo, *Brucella* es capaz de replicar y sobrevivir dentro de células fagocíticas profesionales, donde está expuesta a distintos estreses ambientales: especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, pH ácido, carencias nutricionales y péptidos líticos de los lisosomas (Roop *et al.*, 2009). Es más, la acidificación temprana a pH 4,0-4,5 de la vacuola que contiene a *Brucella* es esencial para su supervivencia (Porte *et al.*, 1999). La sensibilidad a especies reactivas del oxígeno se evaluó mediante el ensayo de inhibición del crecimiento en discos en presencia de H₂O₂. Al evaluar la sensibilidad a este compuesto se observó que el diámetro del halo de inhibición fue de $20,81 \pm 1,93$ mm para la cepa parental y $25,46 \pm 1,71$ mm para la cepa mutante, siendo significativa la diferencia ($p < 0,0001$) (Fig. 28). La evaluación de la sensibilidad al pH ácido de *B. abortus* Lp1 se realizó en cultivo líquido. Al comparar el crecimiento a pH5 ($\log_{10} (8,32 \pm 0,25)$ UFC/ml vs. $\log_{10} (8,26 \pm 0,24)$ UFC/ml) y a pH7 ($\log_{10} (9,39 \pm 0,33)$ UFC/ml vs. $\log_{10} (9,56 \pm 0,30)$ UFC/ml) de *B. abortus* Lp1 y *B. abortus* S2308 respectivamente, no se observan diferencias significativas (Fig. 29). Además, se puede comparar el crecimiento de cada cepa en cada uno de los dos valores de pH analizados. En este caso, tanto para *B. abortus* Lp1 como para *B. abortus* S2308, existen diferencias significativas en el crecimiento entre cada valor de pH ($p < 0,0001$ para ambas cepas).

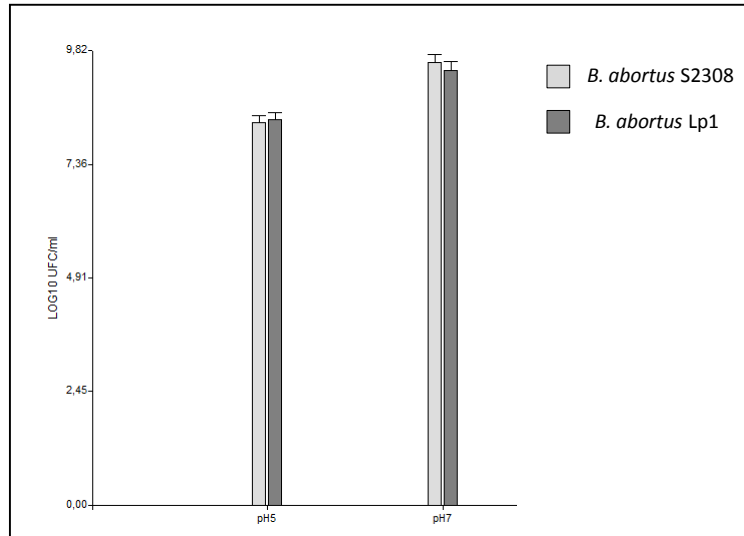


Figura 29: Efecto del pH en el crecimiento de las cepas de *B. abortus* mutante Lp1 y salvaje 2308. La evaluación de la sensibilidad al pH ácido de *B. abortus* Lp1 se realizó en cultivo líquido. Las bacterias se crecieron en medio TSB ajustado a pH 5 y 7 durante 5 hs y luego se sembraron diluciones seriadas en placas AT para 4 días después hacer recuento de colonias y calcular las UFC/ml.

En resumen, la cepa mutante *B. abortus* Lp1 resulta más sensible a SDS y H₂O₂ que la cepa parental y no hay diferencias entre la cepa mutante y la parental en cuanto a la sensibilidad a PmB y a los distintos pH analizados. Por lo tanto, podemos inferir que la proteína codificada por BAB1_0009 podría otorgar una ventaja adaptativa a la bacteria frente a ambientes hostiles.

Evaluación de la capacidad protectora de la mutante atenuada *B. abortus* Lp1

Confirmada la atenuación de *B. abortus* Lp1, nos preguntamos si dicha cepa es capaz de generar una respuesta inmune protectora. Para responder esta pregunta, nuevamente se recurrió a un modelo murino. Los distintos grupos de ratones BALB/c fueron vacunados i.p. con dos dosis de inóculo [1×10^5 UFC, baja (b); y 1×10^6 UFC, alta (a)] de *B. abortus* Lp1. Además, se inocularon mediante la misma vía, un grupo con 3×10^5 UFC de *B. abortus* S19, como control vacunal y otro con el mismo volumen de PBS, como control de vehículo. *B. abortus* S19 es la cepa que actualmente se utiliza como vacuna y según el Manual de la OIE sobre brucelosis bovina, todos los candidatos vacunales deberían compararse con ésta (OIE, 2008). Diez semanas p.i.,

todos los grupos fueron desafiados por vía i.p. con 1×10^5 UFC de *B. abortus* S2308. Dos semanas más tarde, los ratones fueron sacrificados, sus bazos removidos y homogeneizados con PBS. Para calcular la carga bacteriana residual, distintas alícuotas del homogenato de bazo y sus respectivas diluciones se sembraron en placas AT con y sin kanamicina. En las placas sin kanamicina creció *B. abortus* Lp1 y *B. abortus* S2308, mientras que en las placas con kanamicina sólo creció *B. abortus* Lp1. La diferencia entre los recuentos de ambas placas, representa las UFC que corresponden sólo a *B. abortus* S2308, es decir, la carga bacteriana residual (CBR). La CBR resultó ser significativamente menor ($p < 0,05$) en los grupos de ratones vacunados con *B. abortus* Lp1 respecto los inoculados con el vehículo (PBS), para las dos dosis ensayadas (*B. abortus* Lp1a: $\log_{10}(2,96 \pm 0,65)$ UFC/bazo, *B. abortus* Lp1b: $\log_{10}(2,07 \pm 0,59)$ UFC/bazo y PBS $\log_{10}(5,44 \pm 0,60)$ UFC/bazo). Al comparar la protección generada por ambas dosis de la cepa mutante con la vacuna actualmente en uso (*B. abortus* S19, $\log_{10}(3,43 \pm 1,34)$ UFC/bazo) sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas con la dosis baja de *B. abortus* Lp1 ($p < 0,05$) (Fig. 30). La disminución en la CBR de los ratones vacunados con *B. abortus* Lp1 comparada con la de los ratones inoculados con PBS sugiere que ésta cepa sería capaz de generar una respuesta inmune protectora. Además, la protección obtenida en respuesta a la vacunación con la dosis baja de *B. abortus* Lp1 sería mayor que la inducida por *B. abortus* S19.

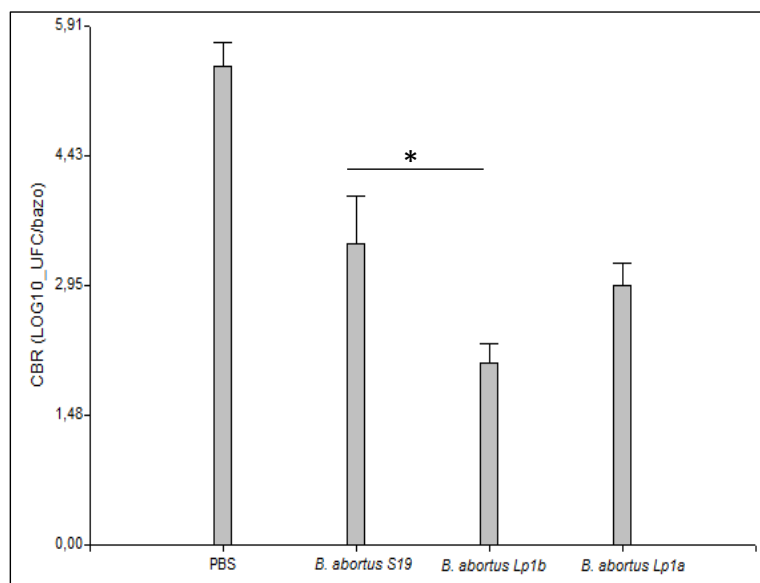


Figura 30: Ensayo de protección. Se evaluó la capacidad para generar una respuesta inmune protectora de dos dosis de *B. abortus* Lp1, a (alta: 1×10^6 UFC) y b (baja: 1×10^5 UFC) inoculadas i.p. Como controles, un grupo se inoculó con 3×10^5 UFC de *B. abortus* S19 y otro con PBS. Luego de 10 semanas todos los animales fueron desafiados i.p. con 1×10^5 UFC de *B. abortus* S2308. Dos semanas post desafío, los ratones fueron sacrificados, sus bazos extraídos y procesados. La carga bacteria residual (CBR) se determinó restando a las UFC/ml de placas AT, las UFC/ml crecidas en las placas AT^{Km}. * indica diferencias significativas.

Estos ensayos permiten postular a la mutante *B. abortus* Lp1 como candidata vacunal, ya que presenta atenuación en su virulencia en el modelo murino y además, confiere protección ante el desafío por la cepa virulenta.

Obtención de mutantes Lp1 en *B. suis* y *B. melitensis*

Para determinar si la atenuación en la virulencia de la mutante en BAB1_0009 también se observa al mutar los genes ortólogos de *B. suis* 1330 (BR0009) y *B. melitensis* 16M (BMEI1935), se construyeron las respectivas cepas mutantes empleando la misma metodología. *B. suis* 1330 y *B. melitensis* 16M electrocompetentes fueron electroporadas con el mismo vector (p-Drive + inserto Lp1) que se utilizó para *B. abortus*. Las mutantes obtenidas se denominaron *B. suis* Lp1 y *B. melitensis* Lp1. Las cepas parentales a partir de las cuales se obtuvieron las correspondientes mutantes fueron *B. suis* 1330 y *B. melitensis* 16M.

Para confirmar la inserción sitio-dirigida del vector plasmídico en los genes de interés de *B. suis* y *B. melitensis* se realizó un *Southern blot*. Se empleó la misma estrategia y

las mismas enzimas de restricción que al analizar la inserción en *B. abortus*, ya que las regiones involucradas se encuentran conservadas. De acuerdo al análisis de los patrones de restricción, se confirmó que las inserciones, tanto en *B. suis* como en *B. melitensis*, se produjeron según lo planificado, interrumpiendo los genes de interés (Fig. 31).

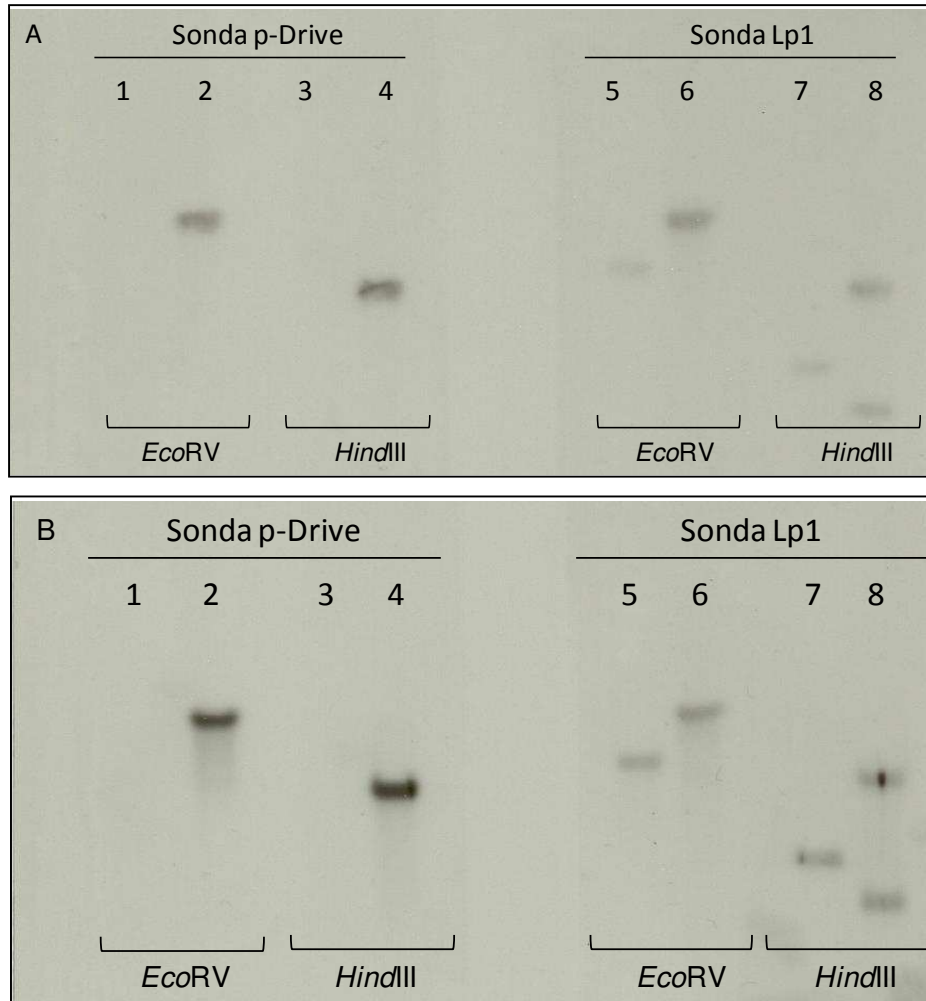


Figura 31: Confirmación de la correcta integración del plásmido mediante Southern blot. La estrategia empleada para confirmar la inserción sitio-dirigida del plásmido en el genoma de *B. suis* 1330 y *B. melitensis* 16M fue la misma que se empleó para *B. abortus*. Mediante el programa Vector NTI se realizó el análisis bioinformático de los ORFs BR0009 y BMEI1935, de sus regiones adyacentes y del vector p-Drive. (A) El ADN genómico de *B. suis* 1330 (calles 1, 3, 5 y 7) y *B. suis* Lp1 (calles 2, 4, 6 y 8) se digirió con *EcoRV* e *HindIII* y los fragmentos se resolvieron en gel de agarosa. (B) El ADN genómico de *B. melitensis* 16M (calles 1, 3, 5 y 7) y *B. melitensis* Lp1 (calles 2, 4, 6 y 8) se digirió con *EcoRV* y *HindIII* y los fragmentos se resolvieron en gel de agarosa. En ambos casos se utilizaron como sonda el vector p-Drive y el inserto Lp1.

Evaluación de virulencia de *B. suis* Lp1 y *B. melitensis* Lp1

Se evaluó la virulencia de estas cepas de la misma manera que se hizo con *B. abortus* Lp1, empleando el modelo murino de infección esplénica, inoculando i.p. con 1×10^5 UFC de cada cepa mutante y analizando la carga bacteriana de los bazos 6 semanas p.i.

La carga bacteriana del bazo de los ratones infectados con *B. suis* Lp1 resultó significativamente menor a la de los ratones infectados con *B. suis* 1330 ($\log_{10} (1,15 \pm 0,15)$ UFC/ml vs. $\log_{10} (2,7 \pm 0,17)$ UFC/ml, $p < 0,005$). Mientras que la carga bacteriana de los ratones infectados con *B. melitensis* Lp1 resultó ser mayor a la de los ratones infectados con *B. melitensis* 16M ($\log_{10} (2,82 \pm 0,49)$ UFC/ml) vs. $\log_{10} (1,88 \pm 0,62)$ UFC/ml, pero estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p = 0,1$) debido a la gran variabilidad observada en la respuesta dentro de cada grupo de ratones (Fig. 32). Al analizar el peso de los bazos de los ratones de los distintos grupos, se observó que el de los ratones infectados con *B. suis* Lp1 es significativamente menor que el de los infectados con su correspondiente cepa parental ($0,16 \pm 0,01$ g vs. $0,54 \pm 0,11$ g, $p < 0,005$), es decir, en los grupos infectados con cepa la mutante no se observó la esplenomegalia que sí se dio en aquellos infectados con *B. suis* 1330. En el caso de *B. melitensis*, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el peso de los bazos de los ratones infectados con la cepa mutante y la parental ($0,43 \pm 0,14$ g vs. $0,24 \pm 0,16$ g; $p = 0,2$). Estos resultados permiten concluir que la interrupción del gen ortólogo a BAB1_0009 en *B. suis* también resulta en la obtención de una cepa mutante atenuada en su virulencia comparada con la cepa salvaje. En el caso de *B. melitensis* Lp1, dado que las diferencias entre los recuentos de las bacterias recuperadas y el peso de los bazos no resultaron ser significativas, se requieren más estudios para poder realizar afirmaciones concluyentes.

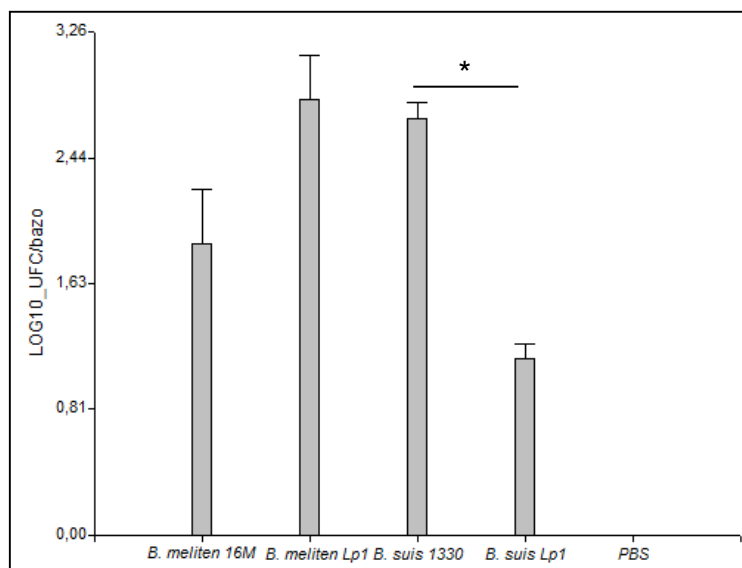


Figura 32: Evaluación de la virulencia de *B. suis* Lp1 y *B. melitensis* 16M. Grupos de 3 ratones BALB/c de 6 semanas de edad fueron inoculados i.p con 1×10^5 UFC de la cepa mutante, de sus cepas parentales, *B. suis* 1330 y *B. melitensis* 16M y otro grupo con PBS como control. A las seis semanas p.i, los animales fueron sacrificados, sus bazoos removidos y procesados según se indicó. Las barras corresponden al desvío estándar. * indica diferencias significativas.

Caracterización de las mutantes *B. suis* Lp1 y *B. melitensis* Lp1

Se comparó el crecimiento *in vitro* de las cepas mutantes *B. suis* Lp1 y *B. melitensis* Lp1 con sus parentales respectivas en medio TSB (Fig.33). *B. suis* Lp1 y *B. suis* 1330 presentaron una cinética similar en las primeras 30 hs del cultivo, pocas horas después la cepa parental alcanza la fase estacionaria, mientras que *B. suis* Lp1 continúa creciendo y aproximadamente a las 60 hs de cultivo llega a la fase estacionaria. Esta diferencia en el crecimiento genera que las DOs a las que llegan los cultivos sean marcadamente diferentes (3 vs. 2). Cuando se compara el crecimiento de *B. melitensis* Lp1 con el de *B. melitensis* 16M se observa que ambas cepas presentan una cinética similar hasta las 33 hs de cultivo, pero *B. melitensis* Lp1 alcanza antes la fase estacionaria, a las 40 hs aproximadamente, mientras que *B. melitensis* 16M crece lentamente hasta las 52 hs, cuando alcanza la fase estacionaria. En este caso, no hay diferencias en las DOs de los cultivos en fase estacionaria (1,3 vs. 1,5). Los resultados obtenidos permiten concluir que la atenuación en la virulencia

observada en *B. suis* Lp1 no se debe a defectos en el crecimiento *in vitro* ya que la mutante es capaz de crecer igual, y más, que la cepa parental.

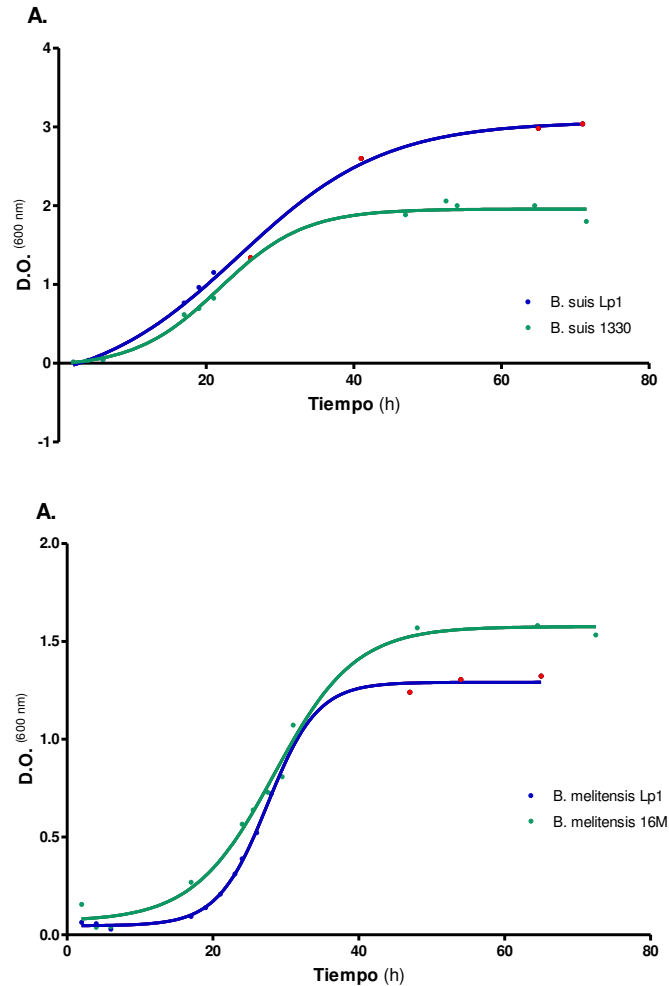


Figura 33: Curvas de crecimiento (a) *B. suis* y (b) *B. melitensis*. Para cada cepa se graficaron los valores de las lecturas de la densidad óptica (DO) medidos a intervalos de tiempo expresados en horas (h) y la función sigmoideal de Boltzmann ajustada por regresión no lineal a los valores de la curva. Se representan con azul las cepas parentales y con verde las cepas mutantes.

Mediante la prueba de aglutinación con acriflavina se determinó que las cepas mutantes *B. suis* Lp1 y *B. melitensis* Lp1 presentan fenotipo liso al igual que sus respectivas cepas parentales (Fig.34), por lo tanto, nuevamente, la alteración del gen no modificó el fenotipo liso de las cepas.

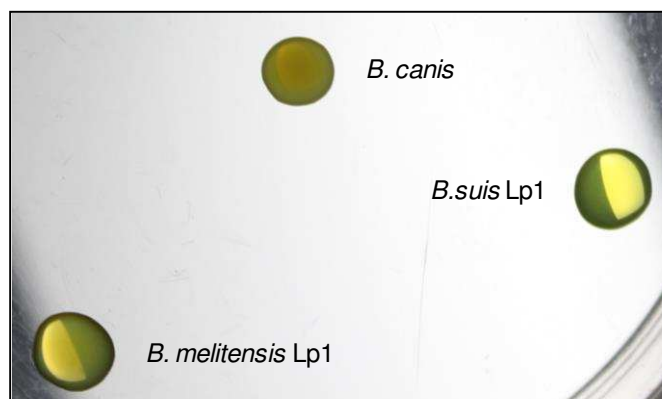


Figura 34: Prueba de aglutinación con acriflavina. Sobre una placa de Petri se colocó una gota de la solución de acriflavina y se le agregó una gota de la suspensión bacteriana. Se incubó 5 min a temperatura ambiente y se observó la presencia (cepa rugosa) o ausencia (cepa lisa) de aglutinación. Se utilizó una suspensión de *B. canis* del cepario del laboratorio como control rugoso.

La resistencia/sensibilidad a PmB, SDS y H₂O₂ se evaluó mediante el ensayo de inhibición del crecimiento en discos. En presencia de SDS, el diámetro del halo de inhibición del crecimiento fue $42,26 \pm 2,32$ mm para *B. suis* Lp1 y $32,58 \pm 1,57$ mm para *B. suis* 1330, resultando significativa esta diferencia ($p < 0,0001$). Al evaluar la sensibilidad a PmB se determinó que el halo fue de $24,27 \pm 2,04$ mm para la cepa mutante y $21,70 \pm 2,60$ mm para la cepa parental, siendo significativa la diferencia ($p = 0,0247$). Ambas cepas fueron igualmente sensibles a H₂O₂ (halos de inhibición de $23,16 \pm 1,96$ mm para *B. suis* Lp1 y $19,92 \pm 3,92$ para *B. suis* 1330) (Fig. 35A). Para *B. melitensis*, el diámetro del halo de inhibición del crecimiento en presencia de SDS fue $26,31 \pm 1,57$ mm para la mutante Lp1 y $33,12 \pm 3,11$ mm para la cepa parental 16M, resultando significativa esta diferencia ($p < 0,0001$). Al evaluar la sensibilidad a H₂O₂ se observó que el halo fue de $36,51 \pm 1,86$ mm para la cepa mutante y $23,72 \pm 2,10$ mm para la cepa parental, siendo significativa la diferencia ($p < 0,0001$). También resultaron significativas las diferencias cuando se estudió el efecto de la PmB ($p = 0,0025$), siendo $25,06 \pm 1,44$ mm el diámetro del halo de inhibición del crecimiento para *B. melitensis* Lp1 y $21,68 \pm 3,64$ mm para *B. melitensis* 16M (Fig. 35B). Estos resultados muestran que *B. suis* Lp1 presentaría algún tipo de alteración en su membrana, evidenciada por

su sensibilidad a SDS y PmB. *B. melitensis* Lp1 también tendría algún tipo de alteración, pero sería más bien leve, evidenciada por su sensibilidad a PmB. Los resultados obtenidos al evaluar la sensibilidad a PmB, SDS y H₂O₂ varían según la especie de la que se trate, estas diferencias en los fenotipos de sensibilidad/resistencia a los agentes antimicrobianos sugiere que en las distintas especies se generan distintas respuestas en las que participarían diferentes actores.

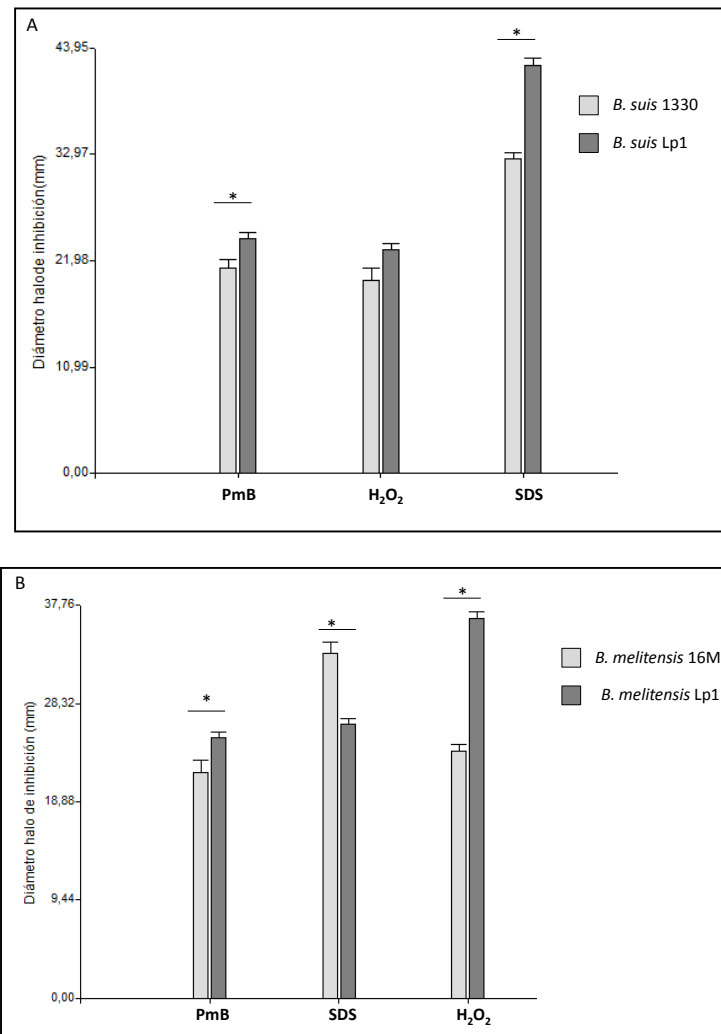
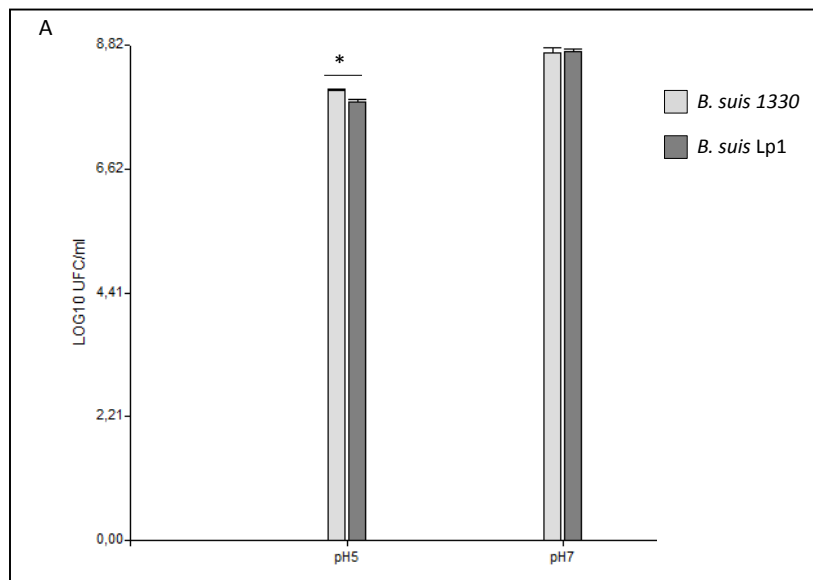


Figura 35: Evaluación de la sensibilidad a PmB, SDS y H₂O₂ de *B. suis* Lp1(A) y *B. melitensis* Lp1 (B). La sensibilidad a distintos agentes antimicrobianos se evaluó por inhibición del crecimiento en placa. Una suspensión de bacterias de DO_{600nm} 0,2 se sembró en placas AT y se colocaron 3 discos de papel de filtro Whatman de 6 mm de diámetro por placa conteniendo cada uno de los compuestos (SDS 10%, Polimixina B (PmB) 10mg/mL o H₂O₂ 30%). Luego de incubar por 72 hs a 37 °C, se midieron con un calibre dos diámetros de cada halo de inhibición y se promediaron los valores. Cada compuesto se evaluó por triplicado. Las barras corresponden al desvío estándar. * indica diferencias significativas.

La evaluación de la sensibilidad al pH ácido de las distintas cepas se realizó en cultivo líquido. Para *B. suis* a pH 5 se encontraron diferencias significativas en el crecimiento entre la cepa mutante Lp1 y la cepa parental 1330 ($\log_{10} (7,81 \pm 0,07)$ UFC/ml vs. $\log_{10} (8,01 \pm 0,06)$ UFC/ml, $p=0,0195$) (Fig. 36A). El crecimiento a pH7 de las cepas mutante y parental no difiere de manera significativa ($\log_{10} (8,71 \pm 0,08)$ UFC/ml vs. $\log_{10} (8,69 \pm 0,16)$ UFC/ml). Al comparar el crecimiento a pH5 de *B. melitensis* Lp1 y *B. melitensis* 16M se encontró que difieren de manera significativa ($\log_{10} (7,94 \pm 0,63)$ UFC/ml vs. $\log_{10} (8,11 \pm 0,02)$ UFC/ml, $p=0,0014$) mientras que a pH7 las diferencias no resultaron estadísticamente significativas ($\log_{10} (8,68 \pm 0,32)$ UFC/ml vs. $\log_{10} (8,37 \pm 0,22)$ UFC/ml, respectivamente) (Fig. 36B). Además, se puede comparar el crecimiento de cada cepa en cada uno de los dos valores de pH analizados. En este caso, para *B. suis* 1330 ($p=0,0026$), *B. suis* Lp1 ($p=0,0001$) y *B. melitensis* Lp1 ($p=0,0168$) existen diferencias significativas en el crecimiento entre cada valor de pH, no así en el caso de *B. melitensis* 16M.



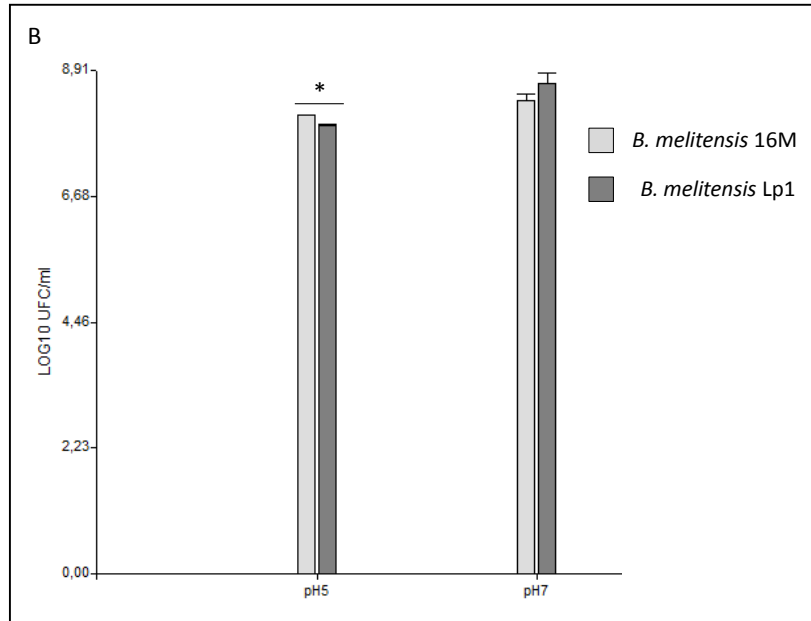


Figura 36: Evaluación de la sensibilidad al pH de las cepas de *B. suis* (A) y *B. melitensis* (B). Cultivos de las cepas se crecieron en TSB ajustado a pH 5 y 7 durante 5 hs. Luego se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en placas AT para 4 días después realizar el recuento de colonias y cálculo de las UFC/ml. Las barras corresponden al desvío estándar. * indica diferencias significativas.

Los resultados hasta aquí presentados sugieren que *B. abortus* y *B. suis* requerirían la expresión de BAB1_0009 y BR0009, respectivamente, para manifestar su plena virulencia, al menos en ratones. Más estudios se requieren para hacer afirmaciones sobre el rol de BME11935 en la virulencia de *B. melitensis*.

DISCUSIÓN

B. abortus es una bacteria intracelular facultativa, que puede establecer una infección crónica en su huésped. Se dice que es un patógeno sigiloso dado que, al carecer de los factores clásicos de virulencia, evita ser reconocido por el sistema inmune del hospedador, logrando establecer su nicho replicativo en el interior de los macrófagos. Si bien se han logrado identificar muchos de los factores que participan de la virulencia de *Brucella* aún es mucho lo que resta por conocer de la biología de esta bacteria. En esta Tesis nos enfocamos también en estudiar las lipoproteínas (Lpps) de *B. abortus* y el rol que cumplen en su virulencia.

En la parte I del presente trabajo, identificamos *in silico* un total de 58 lipoproteínas (Lpps) en *B. abortus*. A partir de esa selección nos planteamos el objetivo de evaluar su implicancia en la virulencia de la bacteria. Una de las maneras clásicas de hacerlo, es mutando el gen que codifica para la proteína de interés y analizando el fenotipo de la cepa mutante resultante. De esta manera, se han descrito distintos genes asociados a la virulencia de *Brucella*, una compilación de los factores de virulencia así identificados hasta 2004 se encuentra en el trabajo de Delrue *et al.* (Delrue *et al.*, 2004). La publicación de la secuencia de los genomas de distintas especies de *Brucella* permitió diseñar nuevas estrategias para identificar factores de virulencia, por ejemplo a través de la búsqueda de proteínas homólogas a factores de virulencia conocidos de especies relacionadas. Gracias a esta aproximación, se identificó al operon *virB* (Sieira *et al.*, 2000). Los enfoques más novedosos para identificar factores de virulencia incluyen los basados en análisis proteómicos (Lamontagne *et al.*, 2007; Lamontagne *et al.*, 2009; Sandalakis *et al.*, 2012) y microarreglos (Mol *et al.*, 2004; Rossetti *et al.*, 2012; Petersen *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2013), donde se compara la expresión de proteínas y genes en distintas condiciones y/o cepas de la bacteria.

Dentro del espectro de opciones disponibles para generar cepas mutantes de *Brucella spp.*, se eligió el de interrupción integrativa por recombinación homóloga. Al método

descrito por Haine *et al.* (Haine *et al.*, 2005) se le realizaron varias modificaciones para adaptarlo a nuestras necesidades y/o posibilidades. A los oligonucleótidos diseñados para amplificar las secuencias de interés, se les agregó en un extremo un sitio de restricción para la enzima *Bam*HI. Este sitio, junto con el presente en el sitio de clonado del vector, permitió seleccionar clones con el inserto en la orientación antisentido (aquellos cuya digestión con *Bam*HI liberan al inserto), para asegurar la no expresión del gen interrumpido. Otra modificación importante que se introdujo fue en relación al método de evaluación y selección de las mutantes en ratones. En el trabajo original, se evaluaron grupos de entre 8 y 12 cepas mutantes por ratón. Una semana p.i., se removieron los bazos, se recuperaron las bacterias y se extrajo el ADN cromosómico. Se amplificaron y marcaron regiones blanco para cada cada grupo de mutantes utilizadas para infectar (inóculo) y las recuperadas de bazo, se hibridaron en membranas y comparando ambas membranas (inóculo y recuperadas) se determinaron aquellas mutantes que no fueron capaces de sobrevivir en el ratón. Este método permitió el análisis simultáneo de un gran número de mutantes y una reducción importante en el número de ratones empleados. Pero, por otro lado, resulta más laborioso que simplemente sembrar en placas AT alícuotas del homogenato de bazo para evaluar la carga bacteriana recuperada. Además, dado el breve lapso de infección, con este método sólo se pueden identificar aquellos factores involucrados en tiempos de infección relativamente tempranos (a primera semana) pero no se consideran aquellos necesarios para mantener una infección persistente, característica de este género. El método utilizado en este trabajo para generar las cepas mutantes es rápido y experimentalmente sencillo, resultando muy apropiado para hacer un análisis y selección inicial para determinar el rol de los genes mutados en la virulencia de *B. abortus*. Este método se utiliza de rutina en nuestro laboratorio y ha sido validado por el Dr. Trangoni en su tesis (Trangoni, 2013). La principal desventaja que

presenta es que la mutación es polar y marcada (por la resistencia a kanamicina), pero se puede emplear para una primera aproximación y luego generar mutantes no polares y/o no marcadas en el gen de interés. Además, este método requiere que la secuencia blanco tenga un tamaño mayor a 500 pb para que ocurra el evento de recombinación.

Aunque los modelos celulares son invaluableles en el estudio de la patogénesis de *Brucella*, éstos son simplistas comparados con el uso de modelos animales (Delrue *et al.*, 2004). Es reconocida la necesidad de las aproximaciones *in vivo* para un entendimiento completo de la patogenia. El ambiente *in vivo* influye en la patogenia bacteriana a través del control de la tasa de crecimiento y por ende, del tamaño poblacional, afectando la producción de factores de virulencia (Smith, 1998). Además, existe una compleja interacción entre distintas células y mediadores del sistema inmune para tratar de controlar la infección por *Brucella* (Martirosyan *et al.*, 2011), que sólo se pueden estudiar con modelos animales. Inicialmente, *Brucella* se multiplica durante la primera semana y luego el número de bacterias decrece lentamente. En ratones BALB/c, después de 5 a 6 semanas p.i. con 1×10^6 UFC de *B. abortus* S19 aun queda un número estable de bacterias, que pueden ser aisladas hasta dos meses p.i. Por otro lado, la infección de ratones BALB/c con *B. abortus* 2308 persiste por más de 6 meses (Enright *et al.*, 1990). Los modelos murinos de infección intraperitoneal con *Brucella sp.* permiten la identificación de factores de virulencia requeridos para establecer una infección crónica (Hong *et al.*, 2000; Celli *et al.*, 2003). El tracto digestivo es la vía principal de infección por *Brucella* en humanos, asociada a la ingesta de leche o productos lácteos sin pasteurizar fabricados a partir de leche de animales infectados. Los modelos murinos de infección intestinal permiten identificar factores de virulencia necesarios para establecer la infección a través del tracto digestivo (Bandara *et al.*, 2007; Delpino *et al.*, 2007; Sangari *et al.*, 2007; Paixao *et al.*,

2009). Como además la brucelosis se puede adquirir por inhalación, se han desarrollado modelos murinos, con vía de infección nasal, para evaluar candidatos vacunales (Izadjoo *et al.*, 2004; Pasquevich *et al.*, 2010). Luego de atravesar las mucosas, *Brucella* llega a los ganglios linfáticos regionales, replica en el interior de los macrófagos y establece una infección sistémica y persistente. En la fase de bacteriemia, la bacteria coloniza bazo, hígado y tejidos osteoarticulares, pudiendo también establecerse en glándula mamaria y sistema reproductivo según la especie de *Brucella* de la que se trate (Carvalho Neta *et al.*; Ko y Splitter, 2003).

En general, el principal inconveniente que presenta el modelo murino para estudiar a la brucelosis es que los ratones no presentan sintomatología típica de los humanos, por ejemplo, fiebre. Esta desventaja no constituye un impedimento para utilizar el modelo murino en el presente trabajo.

Otros modelos animales para estudiar brucelosis son rata, cobayo y mono, pero siendo más difícil su manejo y costoso su mantenimiento se los emplea con fines específicos. Por ejemplo, la rata se utiliza como modelo para estudiar el curso de la brucelosis cuando existe un desorden metabólico previo, por ejemplo, diabetes (Yumuk *et al.*, 2003). El cobayo probablemente sea el animal más susceptible a la brucelosis y es el mejor modelo para evaluar candidatos vacunales (Zhao *et al.*, 1989; Oliveira *et al.*, 1996). La enfermedad en monos cursa de manera muy similar a la brucelosis humana, por este motivo, se utilizan monos como modelo para estudiar el tratamiento y manejo de pacientes luego de la exposición a *Brucella sp.* como arma biológica (Yingst *et al.*).

De las 24 cepas mutantes obtenidas, dos resultaron atenuadas en su virulencia en el modelo murino, aquellas donde se han interrumpido el ORF BAB1_0009 (proteína de unión al sustrato de un transportador ABC) y BAB1_1930 (Omp19). Los transportadores ABC bacterianos están asociados a la captación de nutrientes y la

eliminación de toxinas y antibióticos, pudiendo tener además, un rol en la expresión génica. Varios ejemplos demuestran el rol de estos transportadores en la patogenia de *Brucella spp.* (Rosinha *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2011; Riquelme-Neira *et al.*, 2013). La mayoría de los transportadores ABC de *Brucella* son del tipo importadores, principalmente de minerales e iones inorgánicos, monosacáridos, oligosacáridos y polioles, taurina, cianato, nitrato, oligopéptidos y níquel, siendo la adquisición de nutrientes la principal función de todos ellos (Jenner *et al.*, 2009). Es más, es probable que las especies de *Brucella* utilicen los transportadores ABC para proveerse de la mayoría de los nutrientes que requieren (DeIVecchio *et al.*, 2002; Harland *et al.*, 2005). Los transportadores de oligopéptidos están formados por cinco subunidades: una proteína extracelular de unión al sustrato que capta los oligopéptidos (OppA), dos proteínas transmembrana que forman el poro (OppB y OppC) y dos proteínas que participan en la hidrólisis de ATP (OppD y OppF) (Monnet, 2003). Estos transportadores tienen un rol esencial en la nutrición y el censado de condiciones extracelulares ya que, al ser responsables de la captación de péptidos, le proveen a la bacteria nutrientes y al mismo tiempo, información sobre el ambiente.

La atenuación en la virulencia de *B. abortus* por la delección de Omp19, ya ha sido reportada previamente en el modelo murino por Tibor *et al.* (Tibor *et al.*, 2002). Esto representa una evidencia a favor de la eficiencia del método utilizado en nuestro laboratorio. En el mismo trabajo de Tibor *et al.*, también se reportó el fenotipo atenuado de las mutantes en el gen que codifica para Omp10, otra Lpp reconocida dentro de *Brucella spp.* Dada la restricción de tamaño del gen blanco del método empleado para generar las cepas mutantes no fue posible generar la cepa mutante para Omp10 en nuestro trabajo, cuyo gen consta tan solo de de 381 pb. Omp16 es otra de las Lpps “famosas” de *Brucella*. Recientemente se ha descubierto que es capaz de generar una respuesta inmune protectora sin necesidad de adyuvantes, ya

que la misma proteína sería un PAMP (Pasquevich *et al.*, 2010). La cepa mutante que no se pudo generar en nuestro trabajo fue en la que se hubiera interrumpido el gen que codifica para Omp16. Sorprendentemente, el impedimento ocurrió en el primer paso del procedimiento, cuando no se logró amplificar el fragmento a pesar de numerosos cambios de las condiciones de la PCR y chequeo de oligonucleótidos y demás reactivos.

En nuestro ensayo, si bien se ha recuperado de los bazos de ratones infectados con *B. abortus* Lp16 (interrupción del ORF BAB1_0511) un número menor de bacterias que de los bazos de ratones infectados con la cepa parental, estas diferencias no resultan estadísticamente significativas. En el trabajo de Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2013) se analizó una cepa mutante ortóloga a BAB1_0511, en *B. abortus* 544, la codificada por BruAb1_0508. Los autores reportaron que dicha mutante presenta una disminución en el crecimiento intracelular en las líneas HeLa y RAW 264.7 comparada con su cepa parental y además es atenuada en su virulencia en el modelo murino (Kim *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013). Al comparar la carga bacteriana a las 6 semanas p.i, en nuestro trabajo encontramos que la de la cepa parental era 10 veces mayor que la de la mutante Lp16, mientras que en el trabajo de Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2013) la carga bacteriana de los bazos de los ratones infectado con *B. abortus* 544 era 7 veces mayor que la de la mutante. Probablemente si se repitiera el análisis con un número mayor de animales se obtendrían diferencias significativas, pero en esta etapa del trabajo se consideraron únicamente aquellas mutantes marcadamente distintas con respecto a la cepa parental para continuar con su estudio. En ambos trabajos se utilizaron distintas cepas de *B. abortus* y las dos dosis de las mutantes empleadas para infectar los ratones difieren en un logaritmo. Se debe remarcar que en el trabajo de Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2013) no se indica la significancia de los resultados, que podrían resultar no significativos como los nuestros.

Según nuestro conocimiento, no hay reportes en la bibliografía sobre otras mutantes que se hayan generado en los genes que codifican para las Lpps que fueron evaluados en este trabajo.

Llama la atención que las dos cepas atenuadas, *B. abortus* Lp1 y *B. suis* Lp1 presenten un crecimiento *in vitro* mayor al de sus cepas parentales y que al contrario, *B. melitensis* Lp1, más virulenta que *B. melitensis* 16M, tenga un crecimiento *in vitro* menor que su cepa parental. Este crecimiento mayor *in vitro*, ¿es un reflejo de lo que ocurre *in vivo*? De ser así, ¿el mayor número de bacterias causaría que el sistema inmune las elimine más eficazmente que a la cepa parental?. También podría ocurrir que las mutantes no puedan establecer la infección o sobrevivir intracelularmente de forma adecuada. O tal vez, sea un balance entre todas las opciones mencionadas.

La membrana externa de *Brucella* conforma una estructura altamente estable que trae como consecuencia una mayor resistencia a policationes, iones divalentes y agentes hidrofóbicos que la membrana de otras bacterias (Moriyon y Lopez-Goni, 1998). La resistencia a agentes hidrofóbicos se debería a la baja permeabilidad del LPS presente en la cara externa de la membrana, que al tener ácidos grasos saturados produce una disminución en su fluidez. Por otro lado, se ha propuesto que la mayor resistencia a policationes de *Brucella* se debe al enmascaramiento de las cargas negativas por presencia de ornitina entre los lípidos y a que el *core* tiene cantidades reducidas de ácido 3-desoxi-D-manooctulosónico y ausencia de fosfatos (Moriyon y Lopez-Goni, 1998). Para evaluar si la mutación en BAB1_0009 genera alguna alteración en la membrana externa se estudió la sensibilidad a SDS (agente anfipático) y polimixina B (PmB; antibiótico policatiónico). No se obtuvieron diferencias entre las cepas mutante y parental en cuanto a la sensibilidad a PmB. Sin embargo; *B. abortus* Lp1 resultó más sensible a SDS que *B. abortus* S2308, lo que indicaría cierta alteración en la envoltura.

La exposición *in vitro* a 30% de H₂O₂ reveló que *B. abortus* Lp1 resultó más sensible a este compuesto bactericida que la cepa parental. Esta mayor sensibilidad podría explicar la atenuación en virulencia de *B. abortus* Lp1, dado que podría ser más sensible a los mecanismos bactericidas de los macrófagos, especialmente aquellos mediados por especies reactivas del oxígeno. El tripéptido glutatión (GSH) participa directamente en la neutralización de radicales libres y compuestos reactivos del oxígeno. En *M. smegmatis* y en *M. tuberculosis* se ha reportado que las mutantes para el importador de oligopéptidos, presentan menor captación de GSH que la cepa parental (Dasgupta *et al.*, 2010). Se podría postular que la mutante *B. abortus* Lp1, al tener afectado el sistema importador de oligopéptidos, tendría una menor captación de GSH y por lo tanto, un poder de detoxificación menor, que resultaría en una mayor sensibilidad a H₂O₂.

Tanto la cepa mutante como la parental fueron capaces de sobrevivir en un medio ácido, de hecho la acidificación temprana a pH 4,0-4,5 de la vacuola que contiene a *Brucella* es esencial para su sobrevivencia (Porte *et al.*, 1999).

Según los resultados obtenidos al evaluar la sensibilidad a PmB, SDS, H₂O₂ y pH, el efecto de interrumpir el gen que codifica para BAB1_0009 en *B. abortus* y sus ortólogos en *B. suis* y *B. melitensis* es diferente según la especie de la que se trate. En *B. suis*, la mutante Lp1 es más sensible a SDS y Pm que la cepa parental 1330 mientras que en *B. melitensis*, la mutante Lp1 es más sensible a PmB y H₂O₂ y más resistente para SDS que la cepa parental 16M. Estas diferencias en los fenotipos de sensibilidad/resistencia a los agentes antimicrobianos sugiere que en las distintas especies se orquestarían distintas respuestas en las que participarían distintos actores. Y dado que la homogeneidad genética entre las especies es extremadamente alta (Verger, 1985; Kattar *et al.*, 2008), gran parte de las diferencias encontradas entre las especies se explicarían a nivel regulatorio.

Se ha postulado que el efecto microbicida de la PmB se da por interacciones electroestáticas, las cargas positivas de la PmB se unen a las cargas negativas de la membrana y la desestabilizan (Nikaido y Vaara, 1985). Sin embargo, se podría pensar que la PmB, al ser un decapeptido podría ser translocada al interior de la bacteria a través del transportador ABC de oligopeptidos y que las mutantes, al no contar con una de las subunidades del transportador, no podrían importar este compuesto y que por lo tanto serían resistentes al mismo. Para comprobar esta hipótesis se requieren estudios funcionales del transportador.

Un control clásico que se suele realizar con las cepas mutantes que presentan alterado un fenotipo particular consiste en complementar en *trans* mediante una copia intacta del gen afectado y observar si el fenotipo revierte al de la cepa parental. En el caso de BAB1_0009, como se trata de un gen que forma parte de un operon de alrededor de 7,7 kb, el planteo de la complementación requiere un análisis cuidadoso para seleccionar la mejor estrategia. Como punto de partida se requiere amplificar el fragmento por *longPCR* y luego clonarlo en un vector pBB. Otra posibilidad, puede ser mediante el empleo de un cosmido de alto rango de hésped. Se analizará en un futuro la factibilidad de realizar esta complementación.

En la literatura abundan los ejemplos sobre la importancia de las Lpps en la virulencia bacteriana tanto de organismos Gram positivos como Gram negativos así como también abundan los ejemplos sobre el uso de Lpps como antígenos vacunales. Aquí se mencionaran algunas Lpps que participan de sistemas de transporte ABC, familia a la que pertenece la lipoproteína codificada por BAB1_0009 descrita por nosotros en este trabajo. Un 2,5 % del proteoma de *M. tuberculosis* corresponde a Lpps, entre ellas PstS y ModA, ambas son proteínas de unión al sustrato. Las Lpps PstS participan del transporte específico de fosfatos, PstS-1 y PstS-3 muestran ser buenos candidatos vacunales (Baldwin *et al.*, 1999; D'Souza *et al.*, 2002). ModA forma parte de un

transportador de molibdeno, que tendría un rol en virulencia (Camacho *et al.*, 1999). Las Lpps PiaA y PiuB de *Streptococcus pneumoniae* son homólogas a transportadores ABC de hierro, se ha observado que los anticuerpos anti PiaA y anti PiuB promueven la opsonofagocitosis de *S. pneumoniae* (Jomaa *et al.*, 2005). PsaA es una permeasa del transportador ABC de Mn²⁺ (Novak *et al.*, 1998), tiene efectos pleiotrópicos en la fisiología bacteriana participando en adherencia (Romero-Steiner *et al.*, 2003), protección contra el estrés oxidativo (Tseng *et al.*, 2002) y competencia y por lo tanto, constituye un blanco ideal a la hora de desarrollar vacunas. La espiroqueta *B. burgdorferi* posee un transportador ABC de oligopéptidos con especificidad para un amplio rango de sustratos (Fraser *et al.*, 1997). Este transportador presenta un alto grado de similitud con el sistema de transporte de oligopéptidos Opp de *E. coli* (Payne y Smith, 1994) pero además de OppA-1, presenta dos copias cromosómicas similares a OppA (OppA-2 y OppA-3) (Kornacki y Oliver, 1998) y al menos dos plásmidos con productos homólogos (OppA-4 y OppA-5) (Lin *et al.*, 2001). Esta multiplicidad de proteínas de unión al sustrato ampliaría el rango de oligopéptidos que puede importar la bacteria (Kornacki y Oliver, 1998).

Dada su localización expuesta en la superficie celular y su rol en funciones fisiológicas y de virulencia, la subunidad OppA de los transportadores de oligopéptidos constituye un buen candidato vacunal. De hecho, el uso de transportadores de oligopeptidos como antígenos vacunales se encuentra reportado en la bibliografía con resultados prometedores (Yang *et al.*; Borezee *et al.*, 2000; Dasgupta *et al.*, 2010). En este trabajo, se evaluó la capacidad de la cepa mutante para la subunidad de unión al sustrato, *B. abortus* Lp1, de inducir una respuesta inmune protectora. Nuestros resultados permiten concluir que la dosis de 1x10⁵ UFC de *B. abortus* Lp1 es capaz de generar una inmunidad mayor a la que genera la cepa vacunal actualmente en uso *B.*

abortus S19 en el modelo murino. Estos resultados son prometedores y alientan a proponer futuras líneas que permitan la evaluación en el bovino.

CONCLUSIONES & PERSPECTIVAS

Los objetivos propuestos permitieron corroborar la hipótesis planteada para la primera parte del trabajo. El empleo de un esquema de MLVA para genotipificar aislamientos de *B. abortus* de Argentina permitió discriminar entre dos biovariedades de *B. abortus* y poner de manifiesto la gran diversidad de genotipos circulantes en el país.

A partir del procesamiento de aislamientos locales en nuestro estudio con el esquema seleccionado, y de acuerdo a los valores de poder discriminatorio obtenidos en nuestro trabajo (IDHG= 0,9833 para el esquema HOOOF-Prints + 6 VNTR; IDHG= 0,9825 para HOOOF-Prints), se podrían genotipificar los aislamientos únicamente con los marcadores HOOOF-Prints, simplificando de esta manera el trabajo y abaratando costos. Por lo tanto, recomendamos su uso como complemento de otros métodos de tipificación. Por ejemplo, ante un brote de brucelosis, se podría realizar una identificación inicial a nivel especie y/o biovariedad mediante alguno de los esquemas de PCR disponibles y luego identificar los genotipos circulantes mediante los HOOOF-Prints.

A través del análisis goeBURST se pudo relacionar a todos los genotipos entre sí en un gran complejo clonal y además, proponer al genotipo E1, exclusivo de los aislamientos de *B. abortus* de la biovariedad 2, como fundador. Este trabajo aporta evidencias a favor de la teoría de Margaret Meyer, quién postuló en la década de los 80, basándose en evidencias bioquímicas, que la biovariedad 2 de *B. abortus* podría haber dado origen a todo el género.

Aunque distintos trabajos de nuestro país mostraron que las biovariedades de *B. abortus* distintas a 1 y 2 son de muy baja frecuencia, sería interesante incorporarlas para analizar si este esquema de MLVA basado en los marcadores HOOOF-Prints es capaz de discriminar entre todas ellas. Por otro lado, sería apropiado contar con un mayor número de aislamientos de *B. abortus* biovariedad 2 y de las otras especies para poder aportar más evidencias en relación a la teoría de M. Meyer.

Las discrepancias observadas entre nuestros resultados y los publicados para los perfiles genotípicos de las cepas vacunales *B. abortus* S19 y RB51 requieren mayor análisis. Sabemos que los *loci* analizados son muy variables y que las cepas vacunales, según otro panel de MLVA utilizado, son genéticamente estables (al menos durante 13 pasajes *in vitro*). Es importante considerar también las variaciones entre distintos laboratorios para la obtención de los perfiles genotípicos, por ejemplo, el uso de métodos completamente automatizados, con baja probabilidad de error, con perfiles logrados de manera muy artesanal, cuya interpretación tiene un factor subjetivo debido a la percepción del investigador. Con estas consideraciones y con el objeto de descubrir el origen de las discrepancias entre los perfiles, sería apropiado realizar comparaciones inter laboratorios para resolver la incógnita. Por otro lado, resultaría de utilidad determinar si hay asociación entre alguno de los marcadores y el fenotipo. De esta manera, podrían aportar información clave a la hora de controlar las cepas en la producción de vacunas.

Siguiendo los lineamientos de los objetivos propuestos, en este trabajo se predijeron por primera vez las Lpps codificadas por el genoma de *B. abortus* y se postularon sus posibles roles. Mediante un análisis *in silico* se predijeron 58 lipoproteínas (Lpps) codificadas por el genoma de *B. abortus* S2308 y si bien en la bibliografía se encontraron evidencias de expresión para 30 de las 58 Lpps predichas, sólo para tres de ellas se ha demostrado experimentalmente la acilación (Omp10, Omp16 y Omp19). Además, se predijeron las Lpps para 15 cepas pertenecientes a 6 especies de *Brucella* y se encontró que las Lpps corresponden a un 1,2-1,8 % de sus genomas. A través del alineamiento de secuencias, se encontraron los genes ortólogos a estas Lpps en otras especies, *B. melitensis* 16M, *B. suis* 1330, *B. canis* ATCC23365 y *B. ovis* ATCC25840. Gracias a este análisis bioinformático pudimos corroborar la primera hipótesis y afirmar

que los miembros del género *Brucella* codifican para diferentes Lpps que se encuentran conservadas entre las distintas especies.

Por otro lado, se identificaron los dominios funcionales mediante Pfam y se buscaron homologías con otras proteínas utilizando BLASTp con el objetivo de asignarles roles posibles a las Lpps predichas. Gracias a este estudio se propuso que el 26,6 % tienen actividad enzimática, 12,2 % participan en transporte, 18,4 % están involucradas en la estructura de la membrana celular, 30,6 % tienen función desconocida y 12,2 % se agrupan en otras funciones. Estas evidencias demuestran que si bien, esta familia es funcionalmente heterogénea, hay indicios que un alto porcentaje de Lpps estaría involucrado en el remodelado y mantenimiento de la integridad de la envoltura celular.

Una sección de esta Tesis giró en torno a la hipótesis que las Lpps tienen un rol en virulencia. La estrategia para ponerla a prueba consistió en la generación de cepas mutantes de *B. abortus* por interrupción integrativa de los ORFs que codifican para 23 de las Lpp predichas y la evaluación de la virulencia de las mutantes obtenidas en el modelo murino de infección esplénica. Se encontró que dos de ellas presentan atenuación significativa en su virulencia con respecto a la cepa parental, *B. abortus* Lp1 y *B. abortus* Lp19, siendo BAB1_0009 y BAB1_1930, respectivamente, los ORFs interrumpidos.

BAB1_0009 codifica para la proteína de unión al sustrato del transportador ABC de oligopéptidos, OppA y BAB1_1930 codifica para Omp19. Ambas proteínas serían requeridas por *B. abortus* para exhibir su plena virulencia, al menos en el modelo murino. La atenuación en la virulencia de las mutantes en Omp19 se encuentra reportada en la bibliografía y numerosos estudios se han realizado en relación a esta Lpp. La mutante *B. abortus* Lp1 no presenta alteraciones en su crecimiento *in vitro* y conserva el fenotipo liso de la cepa parental. Al analizar la integridad de su membrana mediante ensayos de sensibilidad a SDS y PmB, se observa que mientras *B. abortus*

Lp1 y *B. abortus* S2308 son igualmente sensibles a PmB, *B. abortus* Lp1 se ve más afectada en su crecimiento por el SDS que su cepa parental, este último resultado indicaría alguna alteración en su membrana, aunque no sería severa. La cepa mutante Lp1 es resistente al pH5 al igual que la cepa parental. Es conocido que el pH ácido es esencial para la sobrevivencia de *Brucella* ya que induce la expresión del operon *virB*, determinante clave para la patogenia bacteriana. Por otro lado, *B. abortus* Lp1 muestra también una mayor sensibilidad a la exposición *in vitro* al H₂O₂. Se podría postular que la mutante *B. abortus* Lp1, al tener afectado el sistema importador de oligopéptidos, tendría una menor captación de glutatión (GSH), como se ha reportado en micobacterias, y por lo tanto, un poder de detoxificación menor, que resultaría finalmente en una mayor sensibilidad a H₂O₂.

En relación a lo mencionado, nos queda pendiente demostrar la acilación de la Lpp codificada por BAB1_0009 y también caracterizar a esta proteína, para obtener evidencias experimentales sobre su función, que apoyen su identificación bioinformática por homología de secuencias y/o dominios funcionales.

Teniendo en cuenta los resultados de nuestro trabajo y el de otros, de las 58 Lpps predichas en *B. abortus*, hasta la fecha se ha demostrado que un 7 % son requeridas para manifestar su plena virulencia. Esto indica que la identidad de la proteína, más allá de su modificación postraducciona, cumpliría un rol importante, ya que de otra manera se habría obtenido un número mayor de mutantes atenuadas en el modelo murino. Del total de Lpps identificadas, resta evaluar la participación en virulencia del 60% de ellas, por lo tanto, no descartamos que de futuros análisis surjan nuevos factores de virulencia. La asombrosa estrategia sigilosa y la gran capacidad de adaptación a ambientes cambiantes y/o hostiles que ha desarrollado *Brucella* a lo largo de la evolución para lograr una infección persistente, hacen pensar que su éxito se debe a una multitud de factores que actúan orquestadamente. Nuestro trabajo nos

permitió corroborar que algunas de las Lpps de *Brucella* tienen un rol importante en la virulencia de la bacteria.

Otra de las hipótesis planteadas fue que las cepas de *Brucella* atenuadas en su virulencia son inmunógenos eficientes, pudiendo conferir protección frente al desafío con una cepa virulenta. La capacidad de *B. abortus* Lp1 de generar una respuesta inmune protectora se evaluó en el modelo murino de protección en ratones BALB/c. Se encontró que a dosis de inóculo baja, *B. abortus* Lp1 es capaz de inducir una respuesta inmune protectora, mayor a la generada por la cepa que actualmente se emplea como vacuna, *B. abortus* S19. De esta manera, podemos concluir que la mutante atenuada es capaz de inducir una respuesta inmune protectora eficiente.

Para evaluar si los determinantes de la virulencia de *Brucella* están conservados dentro del género, se generaron las cepas mutantes en los ORFs ortólogos a BAB1_0009 en *B. suis* (BR0009) y *B. melitensis* (BMEI1935). La cepa mutante *B. suis* Lp1 presentó atenuación en su virulencia en el modelo murino; sin embargo, se requieren más ensayos para determinar si la virulencia de *B. melitensis* Lp1 es significativamente diferente a la de su cepa parental, *B. melitensis* 16M.

Al caracterizar fenotípicamente a estas mutantes se observa que no presentan defectos en su crecimiento y que la sensibilidad a SDS, PmB y H₂O₂ varía entre las cepas y especies analizadas. Estas diferencias en los fenotipos de sensibilidad/resistencia a los agentes antimicrobianos sugiere que las distintas especies modularían distintas respuestas. Esto es apoyado por la extremadamente alta homogeneidad genética entre las especies, por lo que gran parte de las diferencias encontradas entre las mismas se explicarían a nivel transcripcional. Obtuvimos evidencias parciales a favor de la hipótesis que plantea que los determinantes de virulencia de *Brucella* están conservados en el género. Por un lado, confirmamos la presencia de los mismos a partir del análisis genómico, pero su rol parecía depender

de la especie analizada. Se requieren ensayos adicionales con un grupo mayor de ratones para rechazar fundadamente que el producto de BMEI1935 no tiene una participación en virulencia.

Nuestros resultados permiten postular a la mutante *B. abortus* Lp1 como candidata vacunal, ya que presenta atenuación en su virulencia en el modelo murino y además, confiere protección ante el desafío por la cepa virulenta.

Uno de los requisitos que debe tener una vacuna recombinante ideal es no tener resistencia a antibióticos, para cumplirlo, planteamos en un futuro la construcción de la cepa mutante sin marcador de selección, utilizando el mismo sistema de plásmido suicida y posteriormente contraselección por *sacB*.

Otro aspecto interesante a explotar sería mutar el gen ortólogo a BAB1_0009 en *B. abortus* S19 (BAbS19_I00090) y analizar si la virulencia de esta cepa es menor que la de *B. abortus* S19, sin alterar la capacidad de generar protección. Por otro lado, es importante remarcar que el ratón es sólo un modelo y que en última instancia la efectividad de la cepa que proponemos como vacuna debería ser analizada en el hospedador en el cual se la pretende emplear, en este caso el bovino.

En resumen, en el presente trabajo se empleó por primera vez un esquema de MLVA para conocer la variabilidad genética de las cepas de *B. abortus* circulantes en el país y por otro lado, hemos profundizado el conocimiento en torno a un grupo poco descrito, las lipoproteínas. De esta manera, en consonancia con la frase popular “la mejor manera de vencer al enemigo, es conociéndolo”, aportamos información con capacidad de impacto en el control y prevención de la brucelosis en nuestro país.

ANEXOS

Anexo I: Total de Lpps identificadas por los dos predictores, Lipo (A) y LipoP (B) y presentes en la base de datos DOLOP (C).

ORF	Identificación	Identificada por	LIPOBOX + C	Características del péptido señal				
				Region N	Region H	Region C	Cor te	GRA VY de región H
BAB1_009	solute-binding family 5 protein	C	ALVAC	MTFLCMNRR	HFMGLSGSA	ALVA	23-24	0,522
BAB1_038	copper center Cu(A):cytochrome o ubiquinol oxidase subunit II	AC	FLAGC	MERQMKHGT PR	TIVSFAVLALSA	FLAG	28-29	2,22
BAB1_047	ErfK/YbiS/YcfS/YnhG:twin-arginine translocation pathway signal	AB	GAAGC	MSKLNDLSR RR	FLLGTGAVLLT	GAAG	28-29	1,982
BAB1_064	SLT domain-containing protein	AB	ALSAC	MRFALSSSSA AFARK	GFMLVGCAV	ALSA	28-29	2,27
BAB1_102	formate/nitrite transporter	A	LGQSC	MRPGSGLR	GQVFSPG	LGQS	21-22	- 0,222
BAB1_138	ErfK/YbiS/YcfS/YnhG	ABC	ALAGC	MDSR	VKLTAALFLGA	ALAG	20-21	1,883
BAB1_200	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	A	GINGC	MVQEK	QDFIFIIGG	GING	18-19	- 0,315
BAB1_358	esterase/lipase/thioesterase, active site	ABC	LLAGC	MRRIVLR	FAPALLVCFSL	LLAG	21-22	2,264
BAB1_511	putative lipoprotein	ABC	LAGCC	MQKASQNR	SSLFPVFATVLL ASLAG	LLAG	24-25	1,736
BAB1_526	polysaccharide deacetylase	AB	VGIAC	MFQK	FSAAGAALLFT	VGIA	19-20	1,682
BAB1_589	ErfK/YbiS/YcfS/YnhG:twin-arginine translocation pathway signal	ABC	GLAGC	MQTTLTRR	SFLTAMTATAAT	GLAG	24-25	0,9
BAB1_758	hypothetical protein	ABC	ALSGC	MRK	MALGLVALMA	ALSG	16-17	2,44
BAB1_794	SmpA/OmlA	AB	ALVGC	MERSLLQRFF PGARKQR	ALLAGTAILVSV	ALVG	33-32	2,317
BAB1_804	polysaccharide export protein	ABC	TLAGC	MATTIQSKRK	SHIIFLALGFAAM T	TLAG	27-28	1,743
BAB1_819	hypothetical protein	BC	MLAGC	MKK	LFILAAGMM	MLAG	15-16	2,433
BAB1_858	putative lipoprotein	ABC	LLAAC	MKTK	TFALLALPAIAL	LLAA	19-20	2,511
BAB1_891	Sel1 repeat-containing protein	AB	LALAC	MRSR	SFSCSAIAMALG LVLT	LALA	24-25	1,825
BAB1_907	peptidoglycan-binding LysM:peptidase M23/M37	AB	FGAGC	MRLPILQHTSE RLLR	NVAIVLIA	FGAG	28-29	2,663
BAB1_1009	rare lipoprotein A	B	TLAGC	MNLKRGKAS VNGIVLRKKR	GSAAMLALMAV AV	TLAG	37-38	2,123
BAB1_1940	hypothetical protein	C	AISAC	MTDK	PTYEQTLRGNAI RA	AISA	21-22	- 0,336
BAB1_1035	proline-rich extensin	AB	IVAGC	MAIIFTKKS	LSFILAAVAATG	IVAG	25-26	2,033
BAB1_1041	hypothetical protein	ABC	FLAGC	MKSRRMFRH R	GSVAILLTAF	FLAG	23-24	2,08
BAB1_1208	hypothetical protein	ABC	VLSGC	MKK	LVILMSLAV	VLSG	15-16	3,022
BAB1_1226	outer membrane protein MotY	ABC	FLAGC	MLKK	TGIALICATF	FLAG	17-18	1,99
BAB1_1227	transcriptional regulatory protein	AB	TLGGC	MKR	VFLVALL	TLGG	15-16	3,52
BAB1_1308	hypothetical protein	AB	LAAAC	MYGRARSGA R	FLAIAMLAP	LAAA	23-24	2,3
BAB1_1336	hypothetical protein	AB	TLASC	MKLTR	LVPIALVLCFA	TLAS	20-21	0,543
BAB1_1350	binding-protein dependent transport system inner membrane protein	A	LTLGC	MLPSCFWKNS VSLLSMKR	NSVLPFGF	LTLG	30-31	0,512
BAB1_1384	ATP-dependent DNA ligase	A	STAAC	MKK	LFYSGLCMLWF	STAA	18-19	1,636
BAB1_1441	TPR repeat-containing protein	AB	PLAGC	MTSFKFTGVT K	TALLSGTIAVLI	PLAG	27-28	2,133
BAB1_1451	cell cycle protein:phosphopantetheine attachment site	C	FLAAC	MVSRVDR	GPVANWWWTTID RFF	FLAA	24-25	0,769

BAB1_1 464	antifreeze protein	B	ALAAC	MRFACLNTGF LALWLFVMNR	NFLFFVSAIVLF	ALAA	36- 37	2,433
BAB1_1 465	glycoside hydrolase family protein	AB	LLCAC	MNR	LASSTILALGAF	LLCA	19- 18	1,783
BAB1_1 508	carbamoyl phosphate synthase large subunit	A	IGQAC	MPKRTDIK	SILIIGAGPIV	IGQA	23- 24	2,223 6
BAB1_1 527	hypothetical protein	AB	LLAGC	MSFALSATACI GHARFLSR	HLTPILLLA	LLAG	32- 33	1,778
BAB1_1 548	putative lipoprotein	ABC	LLAAC	MKPNMNK	AHLSMVLLLAGL	LLAA	22- 23	2,025
BAB1_1 592	hypothetical protein	BC	LLAAC	MKMTDK	ISWTR	LLAA	15- 16	-0,48
BAB1_1 653	glucose-methanol-choline oxidoreductase:GMC oxidoreductase	A	GSSGC	MEK	FDYIIIIGA	GSSG	15- 16	1,613
BAB1_1 707	outer membrane protein MotY	ABC	AVAGC	MRRIQSIAR	SPIAIALFMSLA	AVAG	24- 25	1,958
BAB1_1 773	M48 family peptidase	AB	LISGC	MPAWTQYNW RK	TASGIGLLALA	LISG	26- 27	1,73
BAB1_1 814	hypothetical protein	AB	LIAGC	MSLPDRFLSAI K	AFCIGFFALGAA V	LIAG	29- 30	2,992
BAB1_1 817	fusaric acid resistance protein FusB / fusaric acid resistance protein FusC	A	TFIGC	MAFVHFSNPG K	ALHYASQ	TFIG	22- 23	-0,2
BAB1_1 830	LemA family protein	AB	LLSAC	MTAQTVATSF SFRR	IFIALGLTVLVP	LLSA	30- 31	2,558
BAB1_1 846	peptidase M23/M37	A	GALAC	MNSIGLFRFL GGFAPLRAGR	LLAGFALA	GALA	32- 33	- 0,293
BAB1_1 930	lipoprotein Omp19	ABC	VLAGC	MGISK	ASLLSLAAAGIV	VLAG	20- 21	1,918
BAB1_1 983	hypothetical protein	ABC	VLAAC	MPMTGR	TAISSMLLIAALS L	VLAA	24- 25	2,029
BAB1_1 999	hypothetical protein	A	ALSGC	MTIDLKAGTK RLIWR	TAMAVPFVA	ALSG	28- 29	1,8
BAB1_2 001	aquaporin Z	A	VFGGC	MLNK	LSAEFFGTFWL	VFGG	19- 20	1,045
BAB1_2 034	Pollen allergen Poa pIX/Phl pVI, C-terminal	ABC	LLAGC	MKIK	TALLGSILATAL	LLAG	19- 20	1,875
BAB1_2 147	putative lipoprotein	ABC	VVTGC	MTRAVTWK	LPLLAGLIAAPF	VVTG	24- 25	2,025
BAB1_2 148	putative lipoprotein	AB	LLAGC	MRYSKSAAIYI RKAMAMNKK	MLILLGLAS	LLAG	33- 34	2,467
BAB2_0 017	molybdopterin oxidoreductase:twin-arginine translocation pathway signal	ABC	LLSGC	MTGPRLSRRR	FLTFTGMAGSAV	LLSG	26- 27	1,342
BAB2_0 057	outer membrane protein OprF	ABC	SLAAC	MR	TLVMVACAV	SLAA	15- 16	2,633
BAB2_0 062	type IV secretion system protein VirB7	ABC	FLAGC	MKK	VILAFVATA	FLAG	16- 17	2,689
BAB2_0 076	lipoprotein Omp10	ABC	ALAAC	MKRFR	IVAPLALMSL	ALAA	19- 20	2,32
BAB2_0 147	hypothetical protein	C	QIAAC	MQEIQTIK	GSFRQL	QIAA	18- 19	- 0,198
BAB2_0 156	flagellar basal body L-ring protein	ABC	LLAGC	MNK	AILAVAMVL	LAGC	20- 21	3,089
BAB2_0 195	hypothetical protein	ABC	SLSGC	MKIEGR	VLVLMTALAGL	LSGC	21- 22	2,545
BAB2_0 292	sugar transporter	C	HVAAC	MLRLVQFR	DERGEA	HVAA	18- 19	- 0,136
BAB2_0 316	molybdopterin oxidoreductase	B	ALKSC	MSKGKKTGFI GKR	SSAAGGWG	ALKS	25- 26	- 0,013
BAB2_0 362	hypothetical protein	B	ITTAC	MNIHCVL	IAHGAF	ITTA	17- 18	0,199
BAB2_0 446	proline-rich extensin	A	GSLAC	MMQRREK	SHAHFVF	GSLA	18- 19	0,629
BAB2_0 452	binding-protein dependent transport system inner membrane protein	AB	VVIGC	MYLADVQKILA LLRKR	LVGSMVLLI	VVIG	30- 31	2,92
BAB2_0 499	hypothetical protein	A	GLAGC	MSQVVEYLSQ LVPAIDFR	GITITIG	GLAG	28- 29	1,95
BAB2_0 562	iron ABC transporter	AB	TLLAC	MHKR	PAIVIALGALTL LA	LLAC	19- 20	2,447
BAB2_0 773	secretion protein HlyD	B	LFAAC	MSLLCV	IPFVSS	LFAA	16- 17	0,007
BAB2_0 810	N-acetylmannosamine-6- phosphate epimerase	C	LIVSC	MRGSPRNLC R	VQGMIEEIVNRL RGK	LIVS	29- 30	0,228
BAB2_0 924	protein disulfide isomerase NosL, putative	ABC	LLAGC	MKR	ALFLAPFFFA	LLAG	17- 18	2,26
BAB2_1 102	chemotaxis protein	A	GGTAC	MKRPALR	PLLVLMASLSFA GVA	GGTA	25- 26	2,007

Anexo II: ORFs que codifican para las Lpps ortólogas en *B. melitensis* biovar abortus 2308 (*B. abortus*), *B. melitensis* 16M, *B. suis* 1330, *B. canis* ATCC 23365 y *B. ovis* ATCC 25840. Los ORFs ortólogos se obtuvieron de la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>). s.i.: sin información disponible.

<i>B. abortus</i>	<i>B. canis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. ovis</i>	<i>B. suis</i>
BAB1_0009	BCAN_A0009	BMEI1935	BOV_0009	BR0009
BAB1_0038	s.i.	BMEI1901	s.i.	s.i.
BAB1_0047	BCAN_A0051	BMEI1893	BOV_0049	BR0050
BAB1_0064	BCAN_A0068	BMEI1878	BOV_0066	BR0067
BAB1_0138	BCAN_A0144	BMEI1809	BOV_0133	BR0139
BAB1_0358	BCAN_A0337	BMEI1594	BOV_0343	BR0328
BAB1_0511	BCAN_A0493	BMEI1449	BOV_0490	BR0486
BAB1_0526	s.i.	BMEI1435	BOV_0505	pseudogen
BAB1_0589	BCAN_A0577	BMEI1369	pseudogen	BR0564
BAB1_0758	BCAN_A0752	BMEI1214	s.i.	BR0737
BAB1_0794	BCAN_A0785	BMEI1184 167	BOV_0765	BR0772
BAB1_0804	BCAN_A0797	BMEI1175	s.i.	BR0783
BAB1_0819	BCAN_A0812	s.i.	s.i.	BR0799
BAB1_0858	BCAN_A0853	BMEI1126	BOV_0830	BR0838
BAB1_0891	BCAN_A0886	BMEI1094	BOV_0863	BR0872
BAB1_0907	BCAN_A0902	BMEI1079	BOV_0884	BR0888
BAB1_1009	BCAN_A1007	BMEI0991	BOV_0958	BR0990
BAB1_1035	s.i.	s.i.	BOV_0982	s.i.
BAB1_1041	BCAN_A1037	BMEI0962	BOV_0989	BR1022
BAB1_1208	BCAN_A1206	no esta	BOV_1145	BR1185
BAB1_1226	BCAN_A1226	BMEI0786	BOV_1167	BR1204
BAB1_1227	BCAN_A1227	BMEI0785	BOV_1168	BR1205
BAB1_1308	BCAN_A1313	BMEI0711	BOV_1253	BR1290
BAB1_1336	BCAN_A1341	BMEI0687	s.i.	BR1316
BAB1_1350	BCAN_A1354	BMEI1375	BOV_1282	BR1329
BAB1_1384	BCAN_A1391	BMEI0641	BOV_1320	BR1364
BAB1_1441	BCAN_A1455	BMEI0587	BOV_1378	BR1422
BAB1_1451	BCAN_A1465	BMEI0578	s.i.	BR1432
BAB1_1464	BCAN_A1480	BMEI0563	BOV_1402	BR1446
BAB1_1465	BCAN_A1481	BMEI0564	BOV_1403	BR1447
BAB1_1508	BCAN_A1526	BMEI0522	s.i.	BR1488
BAB1_1527	BCAN_A1546	BMEI0504	BOV_1459	BR1509
BAB1_1548	BCAN_A1569	BMEI0484	BOV_1481	BR1532
BAB1_1707	BCAN_A1734	s.i.	s.i.	BR1695
BAB1_1773	BCAN_A1799	BMEI0282	BOV_1699	BR1761
BAB1_1814	BCAN_A1844	BMEI0243	BOV_1739	BR1806
BAB1_1830	BCAN_A1860	BMEI0228	BOV_1754	BR1822
BAB1_1930	BCAN_1974	BMEI0135	BOV_1858	BR1930

BAB1_1983	BCAN_A2027	BMEI0085	BOV_1907	BR1982
BAB1_1999	BCAN_A2045	BMEI0071	BOV_1924	BR1999
BAB1_2001	s.i.	s.i.	s.i.	BR2001
BAB1_2034	BCAN_A2079	BMEI0038	BOV_1955	BR2033
BAB1_2147	BCAN_A2189	BMEI1983	BOV_2059	BR2145
BAB1_2148	BCAN_A2190	BMEI1982	BOV_2060	BR2146
BAB2_0017	BCAN_B0020	BMEII0075	BOV_A0015	BRA0018
BAB2_0057	BCAN_B0061	BMEII0036	BOV_A0053	BRA0058
BAB2_0062	BCAN_B0063	BMEII0031	s.i.	BRA0063
BAB2_0076	BCAN_B0080	BMEII0017	BOV_A0072	BRA0077
BAB2_0156	BCAN_B0159	BMEII0082	BOV_A0142	BRA0158
BAB2_0195	BCAN_B0201	BMEII1042	BOV_A0182	BRA0203
BAB2_0446	BCAN_B0805	BMEII0499	BOV_A0742	BRA0791
BAB2_0452	BCAN_B0799	BMEII0505	BOV_A0736	BRA0785
BAB2_0499	BCAN_B0749	s.i.	s.i.	BRA0741
BAB2_0562	BCAN_B0676	BMEII0605	BOV_A0634	BRA677
BAB2_0810	BCAN_B0414	BMEII0857	BOV_A0354	BRA0411
BAB2_0924	BCAN_B0281	BMEII0929	BOV_A0255	BRA0279
BAB2_1102	BCAN_B1172	BMEII0155	BOV_A1048	s.i.

Parte de los resultados de esta tesis han sido publicados en el siguiente artículo:

“Detección de un complejo clonal con el genotipo de *Brucella abortus* biovariedad 2 como fundador en aislamientos de *B. abortus* de Argentina”.

Hollender D, Conde SB, Salustio E y Samartino LE. Rev Argent Microbiol. 2013;45(4):229-39.

BIBLIOGRAFÍA

- Al Dahouk, S., H. Tomaso, E. Prenger-Berninghoff, W. D. Splettstoesser, H. C. Scholz and H. Neubauer (2005). "Identification of brucella species and biotypes using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)." Crit Rev Microbiol **31**(4): 191-6.
- Alton, G. G., L. M. Jones, R. D. Angus and J. M. Verger (1988). Techniques for the brucellosis laboratory, Institut National de la recherche Agronomique (INRA).
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res **25**(17): 3389-402.
- Alloing, G., P. de Philip and J. P. Claverys (1994). "Three highly homologous membrane-bound lipoproteins participate in oligopeptide transport by the Ami system of the Gram-positive *Streptococcus pneumoniae*." J Mol Biol **241**(1): 44-58.
- Arellano-Reynoso, B., N. Lapaque, S. Salcedo, G. Briones, A. E. Ciocchini, R. Ugalde, E. Moreno, I. Moriyon and J. P. Gorvel (2005). "Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival." Nat Immunol **6**(6): 618-25.
- Ashford, D. A., J. di Pietra, J. Lingappa, C. Woods, H. Noll, B. Neville, R. Weyant, S. L. Bragg, R. A. Spiegel, J. Tappero and B. A. Perkins (2004). "Adverse events in humans associated with accidental exposure to the livestock brucellosis vaccine RB51." Vaccine **22**(25-26): 3435-9.
- Avila-Calderon, E. D., A. Lopez-Merino, N. Sriranganathan, S. M. Boyle and A. Contreras-Rodriguez (2013). "A history of the development of *Brucella* vaccines." Biomed Res Int **2013**: 743509.
- Aznar, M. N., L. E. Samartino, M. F. Humblet and C. Saegerman (2014). "Bovine brucellosis in Argentina and bordering countries: update." Transbound Emerg Dis **61**(2): 121-33.
- Babu, M. M., M. L. Priya, A. T. Selvan, M. Madera, J. Gough, L. Aravind and K. Sankaran (2006). "A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins." J Bacteriol **188**(8): 2761-73.
- Bagos, P. G., E. P. Nikolaou, T. D. Liakopoulos and K. D. Tsirigos (2010). "Combined prediction of Tat and Sec signal peptides with hidden Markov models." Bioinformatics **26**(22): 2811-7.
- Baldwin, C. L. and R. Goenka (2006). "Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection?" Crit Rev Immunol **26**(5): 407-42.
- Baldwin, C. L. and M. Parent (2002). "Fundamentals of host immune response against *Brucella abortus*: what the mouse model has revealed about control of infection." Vet Microbiol **90**(1-4): 367-82.
- Baldwin, S. L., C. D. D'Souza, I. M. Orme, M. A. Liu, K. Huygen, O. Denis, A. Tang, L. Zhu, D. Montgomery and J. B. Ulmer (1999). "Immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccines encoding secreted and non-secreted forms of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85A." Tuber Lung Dis **79**(4): 251-9.
- Bandara, A. B., A. Contreras, A. Contreras-Rodriguez, A. M. Martins, V. Dobrea, S. Poff-Reichow, P. Rajasekaran, N. Sriranganathan, G. G. Schurig and S. M. Boyle (2007). "*Brucella suis* urease encoded by ure1 but not ure2 is necessary for intestinal infection of BALB/c mice." BMC Microbiol **7**: 57.
- Barbier, T., C. Nicolas and J. J. Letesson (2011). "*Brucella* adaptation and survival at the crossroad of metabolism and virulence." FEBS Lett **585**(19): 2929-34.
- Barquero-Calvo, E., E. Chaves-Olarte, D. S. Weiss, C. Guzman-Verri, C. Chacon-Diaz, A. Rucavado, I. Moriyon and E. Moreno (2007). "*Brucella abortus* uses a stealthy strategy

- to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection." PLoS One **2**(7): e631.
- Barquero-Calvo, E., A. Martirosyan, D. Ordonez-Rueda, V. Arce-Gorvel, A. Alfaro-Alarcon, H. Lepidi, B. Malissen, M. Malissen, J. P. Gorvel and E. Moreno (2013). "Neutrophils exert a suppressive effect on Th1 responses to intracellular pathogen *Brucella abortus*." PLoS Pathog **9**(2): e1003167.
- Barrionuevo, P., J. Cassataro, M. V. Delpino, A. Zwerdling, K. A. Pasquevich, C. Garcia Samartino, J. C. Wallach, C. A. Fossati and G. H. Giambartolomei (2008). "*Brucella abortus* inhibits major histocompatibility complex class II expression and antigen processing through interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2." Infect Immun **76**(1): 250-62.
- Bass, S., Q. Gu and A. Christen (1996). "Multicopy suppressors of prc mutant *Escherichia coli* include two HtrA (DegP) protease homologs (HhoAB), DksA, and a truncated R1pA." J Bacteriol **178**(4): 1154-61.
- Beeson, P. B. (1956). "The Nature of Brucellosis." The Yale Journal of Biology and Medicine **29**(2): 162-162.
- Beja-Pereira, A., B. Bricker, S. Chen, C. Almendra, P. J. White and G. Luikart (2009). "DNA genotyping suggests that recent brucellosis outbreaks in the Greater Yellowstone Area originated from elk." J Wildl Dis **45**(4): 1174-7.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, D. Widdick, T. Palmer and S. Brunak (2005). "Prediction of twin-arginine signal peptides." BMC Bioinformatics **6**: 167.
- Bennett, P. (2000). "Demystified ... microsatellites." Mol Pathol **53**(4): 177-83.
- Berven, F. S., O. A. Karlsen, A. H. Straume, K. Flikka, J. C. Murrell, A. Fjellbirkeland, J. R. Lillehaug, I. Eidhammer and H. B. Jensen (2006). "Analysing the outer membrane subproteome of *Methylococcus capsulatus* (Bath) using proteomics and novel biocomputing tools." Arch Microbiol **184**(6): 362-77.
- Biarrotte-Sorin, S., J. E. Hugonnet, V. Delfosse, J. L. Mainardi, L. Gutmann, M. Arthur and C. Mayer (2006). "Crystal structure of a novel beta-lactam-insensitive peptidoglycan transpeptidase." J Mol Biol **359**(3): 533-8.
- Billard, E., C. Cazevieuille, J. Dornand and A. Gross (2005). "High susceptibility of human dendritic cells to invasion by the intracellular pathogens *Brucella suis*, *B. abortus*, and *B. melitensis*." Infect Immun **73**(12): 8418-24.
- Bishop, R. E., B. K. Leskiw, R. S. Hodges, C. M. Kay and J. H. Weiner (1998). "The entericidin locus of *Escherichia coli* and its implications for programmed bacterial cell death." J Mol Biol **280**(4): 583-96.
- Borezee, E., E. Pellegrini and P. Berche (2000). "OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival." Infect Immun **68**(12): 7069-77.
- Boschiroli, M. L., S. L. Cravero, A. I. Arese, E. Campos and O. L. Rossetti (1997). "Protection against infection in mice vaccinated with a *Brucella abortus* mutant." Infect Immun **65**(2): 798-800.
- Boschiroli, M. L., S. Ouahrani-Bettache, V. Foulongne, S. Michaux-Charachon, G. Bourg, A. Allardet-Servent, C. Cazevieuille, J. P. Liautard, M. Ramuz and D. O'Callaghan (2002). "The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1544-9.
- Bowden, R. A., A. Cloeckert, M. S. Zygmunt and G. Dubray (1998). "Evaluation of immunogenicity and protective activity in BALB/c mice of the 25-kDa major outer-membrane protein of *Brucella melitensis* (Omp25) expressed in *Escherichia coli*." J Med Microbiol **47**(1): 39-48.

- Bricker, B. J. and D. R. Ewalt (2005). "Evaluation of the HOOF-Print assay for typing *Brucella abortus* strains isolated from cattle in the United States: results with four performance criteria." BMC Microbiol **5**: 37.
- Bricker, B. J., D. R. Ewalt and S. M. Halling (2003). "*Brucella* 'HOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs)." BMC Microbiol **3**: 15.
- Bricker, B. J. and S. M. Halling (1994). "Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR." J Clin Microbiol **32**(11): 2660-6.
- Bruce, D. (1888). "The micrococcus of Malta fever." Practitioner **40**: 241-249.
- Bundle, D. R., J. W. Cherwonogrodzky, M. A. Gidney, P. J. Meikle, M. B. Perry and T. Peters (1989). "Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides." Infect Immun **57**(9): 2829-36.
- Camacho, L. R., D. Ensergueix, E. Perez, B. Gicquel and C. Guilhot (1999). "Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis." Mol Microbiol **34**(2): 257-67.
- Campos, E., S. L. Cravero, L. Delgui, I. Mora, N. Kahn, A. I. Arese and O. L. Rossetti (2002). "*Brucella abortus* INTA2, a novel strain 19 (Delta)bp26::luc (Delta)bmp18 double mutant lacking drug resistance markers." Vet Microbiol **87**(1): 1-13.
- Canning, P. C., J. A. Roth, L. B. Tabatabai and B. L. Deyoe (1985). "Isolation of components of *Brucella abortus* responsible for inhibition of function in bovine neutrophils." J Infect Dis **152**(5): 913-21.
- Cardoso, P. G., G. C. Macedo, V. Azevedo and S. C. Oliveira (2006). "*Brucella spp* noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system." Microb Cell Fact **5**: 13.
- Carvalho Neta, A. V., J. P. Mol, M. N. Xavier, T. A. Paixao, A. P. Lage and R. L. Santos "Pathogenesis of bovine brucellosis." Vet J **184**(2): 146-55.
- Castro, H. A., S. R. González and M. I. Prat (2005). "Brucellosis: una revisión práctica." Acta bioquímica clínica latinoamericana **39**: 203-216.
- Celli, J., C. de Chastellier, D. M. Franchini, J. Pizarro-Cerda, E. Moreno and J. P. Gorvel (2003). "*Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum." J Exp Med **198**(4): 545-56.
- Cespedes, S., P. Salgado, A. Retamal-Díaz, R. Vidal and A. Onate "Roles of genomic island 3 (GI-3) BAB1_0278 and BAB1_0263 open reading frames (ORFs) in the virulence of *Brucella abortus* in BALB/c mice." Vet Microbiol **156**(1-2): 1-7.
- Clarke, S. R., L. G. Harris, R. G. Richards and S. J. Foster (2002). "Analysis of Ebh, a 1.1-megadalton cell wall-associated fibronectin-binding protein of *Staphylococcus aureus*." Infect Immun **70**(12): 6680-7.
- Cloekaert, A., P. de Wergifosse, G. Dubray and J. N. Limet (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**(12): 3980-7.
- Cloekaert, A., J. M. Verger, M. Grayon and O. Grepinet (1995). "Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*." Microbiology **141** (Pt 9): 2111-21.
- Cloekaert, A., J. M. Verger, M. Grayon and N. Vizcaino (1996a). "Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*." FEMS Microbiol Lett **145**(1): 1-8.

- Cloeckaert, A., N. Vizcaino, J. Y. Paquet, R. A. Bowden and P. H. Elzer (2002). "Major outer membrane proteins of *Brucella spp.*: past, present and future." Vet Microbiol **90**(1-4): 229-47.
- Cloeckaert, A., M. S. Zygmunt, G. Bezard and G. Dubray (1996b). "Purification and antigenic analysis of the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*." Res Microbiol **147**(4): 225-35.
- Colonna, M., B. Pulendran and A. Iwasaki (2006). "Dendritic cells at the host-pathogen interface." Nat Immunol **7**(2): 117-20.
- Conde-Alvarez, R., M. J. Grillo, S. P. Salcedo, M. J. de Miguel, E. Fugier, J. P. Gorvel, I. Moriyon and M. Iriarte (2006). "Synthesis of phosphatidylcholine, a typical eukaryotic phospholipid, is necessary for full virulence of the intracellular bacterial parasite *Brucella abortus*." Cell Microbiol **8**(8): 1322-35.
- Connolly, J. P., D. Commerci, T. G. Alefantis, A. Walz, M. Quan, R. Chafin, P. Grewal, C. V. Mujer, R. A. Ugalde and V. G. DelVecchio (2006). "Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development." Proteomics **6**(13): 3767-80.
- Corbeil, L. B., K. Blau, T. J. Inzana, K. H. Nielsen, R. H. Jacobson, R. R. Corbeil and A. J. Winter (1988). "Killing of *Brucella abortus* by bovine serum." Infect Immun **56**(12): 3251-61.
- Corbel, M. J. (1997). "Brucellosis: an overview." Emerg Infect Dis **3**(2): 213-21.
- Corbel, M. J. (2006). Brucellosis in humans and animals. W. H. Organization. Switzerland, World Health Organization: 1-102.
- Crasta, O. R., O. Folkerts, Z. Fei, S. P. Mane, C. Evans, S. Martino-Catt, B. Bricker, G. Yu, L. Du and B. W. Sobral (2008). "Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes." PLoS One **3**(5): e2193.
- Chain, P. S. G., D. J. Commerci, M. E. Tolmasky, F. W. Larimer, S. A. Malfatti, L. M. Vergez, F. Agüero, M. L. Land, R. A. Ugalde and E. Garcia (2005). "Whole-Genome Analyses of Speciation Events in Pathogenic *Brucellae*." Infect Immun **73**(12): 8353-61.
- D'Souza, S., V. Rosseels, O. Denis, A. Tanghe, N. De Smet, F. Jurion, K. Palfliet, N. Castiglioni, A. Vanonckelen, C. Wheeler and K. Huygen (2002). "Improved tuberculosis DNA vaccines by formulation in cationic lipids." Infect Immun **70**(7): 3681-8.
- Dasgupta, A., K. Sureka, D. Mitra, B. Saha, S. Sanyal, A. K. Das, P. Chakrabarti, M. Jackson, B. Gicquel, M. Kundu and J. Basu (2010). "An oligopeptide transporter of *Mycobacterium tuberculosis* regulates cytokine release and apoptosis of infected macrophages." PLoS One **5**(8): e12225.
- Dehal, P. S., M. P. Joachimiak, M. N. Price, J. T. Bates, J. K. Baumohl, D. Chivian, G. D. Friedland, K. H. Huang, K. Keller, P. S. Novichkov, I. L. Dubchak, E. J. Alm and A. P. Arkin (2010). "MicrobesOnline: an integrated portal for comparative and functional genomics." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D396-400.
- Delpino, M. V., A. E. Ibañez, L. M. Coria, P. Barrionuevo, C. G. Samartino, G. H. Giambartolomei and J. Cassataro (2010). A bacterial protease inhibitor is a mucosal adjuvant. 6th Annual Grand Challenges in Global Health Meeting, Seattle, USA.
- Delpino, M. V., M. I. Marchesini, S. M. Estein, D. J. Commerci, J. Cassataro, C. A. Fossati and P. C. Baldi (2007). "A bile salt hydrolase of *Brucella abortus* contributes to the establishment of a successful infection through the oral route in mice." Infect Immun **75**(1): 299-305.
- Delrue, R. M., C. Deschamps, S. Leonard, C. Nijskens, I. Danese, J. M. Schaus, S. Bonnot, J. Ferooz, A. Tibor, X. De Bolle and J. J. Letesson (2005). "A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*." Cell Microbiol **7**(8): 1151-61.

- Delrue, R. M., P. Lestrade, A. Tibor, J. J. Letesson and X. De Bolle (2004). "Brucella pathogenesis, genes identified from random large-scale screens." *FEMS Microbiol Lett* **231**(1): 1-12.
- DelVecchio, V. G., V. Kapatral, R. J. Redkar, G. Patra, C. Mujer, T. Los, N. Ivanova, I. Anderson, A. Bhattacharyya, A. Lykidis, G. Reznik, L. Jablonski, N. Larsen, M. D'Souza, A. Bernal, M. Mazur, E. Goltsman, E. Selkov, P. H. Elzer, S. Hagius, D. O'Callaghan, J. J. Letesson, R. Haselkorn, N. Kyrpides and R. Overbeek (2002). "The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 443-8.
- Diaz Aparicio, E. (2013). "Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*." *Rev Sci Tech* **32**(1): 43-51, 53-60.
- Dorneles, E. M., A. P. de Faria, R. B. Pauletti, J. A. Santana, G. A. Caldeira, M. B. Heinemann, R. Titze-de-Almeida and A. P. Lage "Genetic stability of *Brucella abortus* S19 and RB51 vaccine strains by multiple locus variable number tandem repeat analysis (MLVA16)." *Vaccine* **31**(42): 4856-9.
- Drabner, B. and C. A. Guzman (2001). "Elicitation of predictable immune responses by using live bacterial vectors." *Biomol Eng* **17**(3): 75-82.
- Dudal, S., C. Turriere, S. Bessoles, P. Fontes, F. Sanchez, J. Liautard, J. P. Liautard and V. Lafont (2006). "Release of LL-37 by activated human Vgamma9Vdelta2 T cells: a microbicidal weapon against *Brucella suis*." *J Immunol* **177**(8): 5533-9.
- Eggenhofer, E., R. Rachel, M. Haslbeck and B. Scharf (2006). "MotD of *Sinorhizobium meliloti* and related alpha-proteobacteria is the flagellar-hook-length regulator and therefore reassigned as FliK." *J Bacteriol* **188**(6): 2144-53.
- El-Tras, W. F., A. A. Tayel, M. M. Eltholth and J. Guitian (2010). "Brucella infection in fresh water fish: Evidence for natural infection of Nile catfish, *Clarias gariepinus*, with *Brucella melitensis*." *Vet Microbiol* **141**(3-4): 321-5.
- Elzer, P. H., R. H. Jacobson, K. H. Nielsen, J. T. Douglas and A. J. Winter (1994). "BALB/c mice infected with *Brucella abortus* express protracted polyclonal responses of both IgG2a and IgG3 isotypes." *Immunol Lett* **42**(3): 145-50.
- Enright, F. M., L. N. Araya, P. H. Elzer, G. E. Rowe and A. J. Winter (1990). "Comparative histopathology in BALB/c mice infected with virulent and attenuated strains of *Brucella abortus*." *Vet Immunol Immunopathol* **26**(2): 171-82.
- Estein, S. M. (2006). "Brucelosis: Inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica)." *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET* **VII**(5): 1-25.
- Fekete, A., J. A. Bantle, S. M. Halling and R. W. Stich (1992). "Amplification fragment length polymorphism in *Brucella strains* by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers." *J Bacteriol* **174**(23): 7778-83.
- Fernandes, D. M., X. Jiang, J. H. Jung and C. L. Baldwin (1996). "Comparison of T cell cytokines in resistant and susceptible mice infected with virulent *Brucella abortus* strain 2308." *FEMS Immunol Med Microbiol* **16**(3-4): 193-203.
- Ficht, T. A., S. W. Bearden, B. A. Sowa and L. G. Adams (1989). "DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*." *Infect Immun* **57**(11): 3281-91.
- Fiorentino, M. A., E. Campos, S. Cravero, A. Arese, F. Paolicchi, C. Campero and O. Rossetti (2008). "Protection levels in vaccinated heifers with experimental vaccines *Brucella abortus* M1-luc and INTA 2." *Vet Microbiol* **132**(3-4): 302-11.
- Francisco, A. P., C. Vaz, P. T. Monteiro, J. Melo-Cristino, M. Ramirez and J. A. Carrico "PHYLOViZ: phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods." *BMC Bioinformatics* **13**: 87.

- Fraser, C. M., S. Casjens, W. M. Huang, G. G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K. A. Ketchum, R. Dodson, E. K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J. F. Tomb, R. D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A. R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M. D. Adams, J. Gocayne, J. Weidman, T. Utterback, L. Wathley, L. McDonald, P. Artiach, C. Bowman, S. Garland, C. Fuji, M. D. Cotton, K. Horst, K. Roberts, B. Hatch, H. O. Smith and J. C. Venter (1997). "Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*." Nature **390**(6660): 580-6.
- Freer, E., E. Moreno, I. Moriyon, J. Pizarro-Cerda, A. Weintraub and J. P. Gorvel (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**(20): 5867-76.
- Freiberg, C., R. Fellay, A. Bairoch, W. J. Broughton, A. Rosenthal and X. Perret (1997). "Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes." Nature **387**(6631): 394-401.
- Gamazo, C., A. I. Vitas, I. Moriyon, I. Lopez-Goni and R. Diaz (1993). "*Brucella* group 3 outer membrane proteins contain a heat-modifiable protein." FEMS Microbiol Lett **112**(2): 141-6.
- Gandhi, R., D. E. Anderson and H. L. Weiner (2007). "Cutting Edge: Immature human dendritic cells express latency-associated peptide and inhibit T cell activation in a TGF-beta-dependent manner." J Immunol **178**(7): 4017-21.
- Gao, N., P. Jennings, Y. Guo and D. Yuan (2011). "Regulatory role of natural killer (NK) cells on antibody responses to *Brucella abortus*." Innate Immun **17**(2): 152-63.
- Garcia-Yoldi, D., P. Le Fleche, M. J. De Miguel, P. M. Munoz, J. M. Blasco, Z. Cvetnic, C. M. Marin, G. Vergnaud and I. Lopez-Goni (2007). "Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with other PCR-based methods for typing *Brucella suis* isolates." J Clin Microbiol **45**(12): 4070-2.
- Gardy, J. L., M. R. Laird, F. Chen, S. Rey, C. J. Walsh, M. Ester and F. S. Brinkman (2005). "PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis." Bioinformatics **21**(5): 617-23.
- Gasteiger, E., A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R. D. Appel and A. Bairoch (2003). "ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis." Nucleic Acids Res **31**(13): 3784-8.
- Gee, J. E., B. K. De, P. N. Levett, A. M. Whitney, R. T. Novak and T. Popovic (2004). "Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid confirmatory identification of *Brucella* isolates." J Clin Microbiol **42**(8): 3649-54.
- Gennity, J. M. and M. Inouye (1991). "The protein sequence responsible for lipoprotein membrane localization in *Escherichia coli* exhibits remarkable specificity." J Biol Chem **266**(25): 16458-64.
- Giambartolomei, G. H., V. A. Dennis and M. T. Philipp (1998). "*Borrelia burgdorferi* stimulates the production of interleukin-10 in peripheral blood mononuclear cells from uninfected humans and rhesus monkeys." Infect Immun **66**(6): 2691-7.
- Giambartolomei, G. H., A. Zwerdling, J. Cassataro, L. Bruno, C. A. Fossati and M. T. Philipp (2004). "Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*." J Immunol **173**(7): 4635-42.
- Godfroid, F., B. Taminiau, I. Danese, P. Denoel, A. Tibor, V. Weynants, A. Cloeckert, J. Godfroid and J. J. Letesson (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**(11): 5485-93.

- Godfroid, J., C. Saegerman, V. Wellemans, K. Walravens, J. J. Letesson, A. Tibor, A. Mc Millan, S. Spencer, M. Sanna, D. Bakker, R. Pouillot and B. Garin-Bastuji (2002). "How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing." *Vet Microbiol* **90**(1-4): 461-77.
- Godfroid, J., H. C. Scholz, T. Barbier, C. Nicolas, P. Wattiau, D. Fretin, A. M. Whatmore, A. Cloeckeaert, J. M. Blasco, I. Moriyon, C. Saegerman, J. B. Muma, S. Al Dahouk, H. Neubauer and J. J. Letesson (2011). "Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century." *Prev Vet Med* **102**(2): 118-31.
- Gonzalez, D., M. J. Grillo, M. J. De Miguel, T. Ali, V. Arce-Gorvel, R. M. Delrue, R. Conde-Alvarez, P. Munoz, I. Lopez-Goni, M. Iriarte, C. M. Marin, A. Weintraub, G. Widmalm, M. Zygmunt, J. J. Letesson, J. P. Gorvel, J. M. Blasco and I. Moriyon (2008). "Brucellosis vaccines: assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export." *PLoS One* **3**(7): e2760.
- Gorvel, J. P. (2014). ""If you bring an alarm, we will destroy it," said *Brucella* to the host cell." *Virulence* **5**(4): 460-2.
- Gorvel, J. P. and E. Moreno (2002). "*Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication." *Vet Microbiol* **90**(1-4): 281-97.
- Grissa, I., P. Bouchon, C. Pourcel and G. Vergnaud (2008). "On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing." *Biochimie* **90**(4): 660-8.
- Gross, A., A. Terraza, S. Ouahrani-Bettache, J. P. Liautard and J. Dornand (2000). "In vitro *Brucella suis* infection prevents the programmed cell death of human monocytic cells." *Infect Immun* **68**(1): 342-51.
- Guilloteau, L. A., K. Laroucau, N. Vizcaino, I. Jacques and G. Dubray (1999). "Immunogenicity of recombinant *Escherichia coli* expressing the omp31 gene of *Brucella melitensis* in BALB/c mice." *Vaccine* **17**(4): 353-61.
- Haine, V., A. Sinon, F. Van Steen, S. Rousseau, M. Dozot, P. Lestrade, C. Lambert, J. J. Letesson and X. De Bolle (2005). "Systematic targeted mutagenesis of *Brucella melitensis* 16M reveals a major role for GntR regulators in the control of virulence." *Infect Immun* **73**(9): 5578-86.
- Hantke, K. and V. Braun (1973). "Covalent binding of lipid to protein. Diglyceride and amide-linked fatty acid at the N-terminal end of the murein-lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane." *Eur J Biochem* **34**(2): 284-96.
- Harland, D. N., H. S. Garmory, K. A. Brown and R. W. Titball (2005). "An association between ATP binding cassette systems, genome sizes and lifestyles of bacteria." *Res Microbiol* **156**(3): 434-42.
- He, Y., S. Reichow, S. Ramamoorthy, X. Ding, R. Lathigra, J. C. Craig, B. W. Sobral, G. G. Schurig, N. Sriranganathan and S. M. Boyle (2006). "*Brucella melitensis* triggers time-dependent modulation of apoptosis and down-regulation of mitochondrion-associated gene expression in mouse macrophages." *Infect Immun* **74**(9): 5035-46.
- Higgins, J., T. Stuber, C. Quance, W. H. Edwards, R. V. Tiller, T. Linfield, J. Rhyan, A. Berte and B. Harris (2012). "Molecular epidemiology of *Brucella abortus* isolates from cattle, elk, and bison in the United States, 1998 to 2011." *Appl Environ Microbiol* **78**(10): 3674-84.
- Hong, P. C., R. M. Tsolis and T. A. Ficht (2000). "Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice." *Infect Immun* **68**(7): 4102-7.
- Hort, G. M., J. Weisenburger, B. Borsdorf, C. Peters, M. Banai, H. Hahn, J. Jacob and M. E. Mielke (2003). "Delayed type hypersensitivity-associated disruption of splenic periaarteriolar lymphatic sheaths coincides with temporary loss of IFN-gamma production and impaired eradication of bacteria in *Brucella abortus*-infected mice." *Microbes Infect* **5**(2): 95-106.

- Hunter, P. R. (1990). "Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods." J Clin Microbiol **28**(9): 1903-5.
- Hunter, P. R. and M. A. Gaston (1988). "Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity." J Clin Microbiol **26**(11): 2465-6.
- Hussain, M., S. Ichihara and S. Mizushima (1982). "Mechanism of signal peptide cleavage in the biosynthesis of the major lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane." J Biol Chem **257**(9): 5177-82.
- Hutchings, M. I., T. Palmer, D. J. Harrington and I. C. Sutcliffe (2009). "Lipoprotein biogenesis in Gram-positive bacteria: knowing when to hold 'em, knowing when to fold 'em." Trends Microbiol **17**(1): 13-21.
- Ibanez, A. E., P. Smaldini, L. M. Coria, M. V. Delpino, L. G. Pacifico, S. C. Oliveira, G. S. Risso, K. A. Pasquevich, C. A. Fossati, G. H. Giambartolomei, G. H. Docena and J. Cassataro (2013). "Unlipidated outer membrane protein Omp16 (U-Omp16) from *Brucella spp.* as nasal adjuvant induces a Th1 immune response and modulates the Th2 allergic response to cow's milk proteins." PLoS One **8**(7): e69438.
- Ito, H., A. Ura, Y. Oyamada, H. Yoshida, J. Yamagishi, S. Narita, S. Matsuyama and H. Tokuda (2007). "A new screening method to identify inhibitors of the Lol (localization of lipoproteins) system, a novel antibacterial target." Microbiol Immunol **51**(3): 263-70.
- Izadjoo, M. J., A. K. Bhattacharjee, C. M. Paronavitana, T. L. Hadfield and D. L. Hoover (2004). "Oral vaccination with *Brucella melitensis* WR201 protects mice against intranasal challenge with virulent *Brucella melitensis* 16M." Infect Immun **72**(7): 4031-9.
- Jain, S., P. Afley, S. K. Dohre, N. Saxena and S. Kumar (2014). "Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a plasmid DNA vaccine encoding ribosomal protein L9 of *Brucella abortus* in BALB/c mice." Vaccine **32**(35): 4537-42.
- Jenkinson, H. F. (1994). "Cell surface protein receptors in oral streptococci." FEMS Microbiol Lett **121**(2): 133-40.
- Jenner, D. C., E. Dassa, A. M. Whatmore and H. S. Atkins (2009). "ATP-Binding Cassette Systems of *Brucella*." Comp Funct Genomics: 354649.
- Jimenez de Bagues, M. P., P. H. Elzer, J. M. Blasco, C. M. Marin, C. Gamazo and A. J. Winter (1994). "Protective immunity to *Brucella ovis* in BALB/c mice following recovery from primary infection or immunization with subcellular vaccines." Infect Immun **62**(2): 632-8.
- Jomaa, M., J. Yuste, J. C. Paton, C. Jones, G. Dougan and J. S. Brown (2005). "Antibodies to the iron uptake ABC transporter lipoproteins PiaA and PiuA promote opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*." Infect Immun **73**(10): 6852-9.
- Joris, B., S. Englebert, C. P. Chu, R. Kariyama, L. Daneo-Moore, G. D. Shockman and J. M. Ghuyssen (1992). "Modular design of the *Enterococcus hirae* muramidase-2 and *Streptococcus faecalis* autolysin." FEMS Microbiol Lett **70**(3): 257-64.
- Juncker, A. S., H. Willenbrock, G. Von Heijne, S. Brunak, H. Nielsen and A. Krogh (2003). "Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria." Protein Sci **12**(8): 1652-62.
- Kahl-McDonagh, M. M., A. M. Arenas-Gamboa and T. A. Ficht (2007). "Aerosol infection of BALB/c mice with *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* and protective efficacy against aerosol challenge." Infect Immun **75**(10): 4923-32.
- Kang, S. I., M. Her, J. W. Kim, J. Y. Kim, K. Y. Ko, Y. M. Ha and S. C. Jung (2011). "Advanced multiplex PCR assay for differentiation of *Brucella species*." Appl Environ Microbiol **77**(18): 6726-8.

- Kattar, M. M., R. F. Jaafar, G. F. Araj, P. Le Fleche, G. M. Matar, R. Abi Rached, S. Khalife and G. Vergnaud (2008). "Evaluation of a multilocus variable-number tandem-repeat analysis scheme for typing human *Brucella isolates* in a region of brucellosis endemicity." J Clin Microbiol **46**(12): 3935-40.
- Khandavilli, S., K. A. Homer, J. Yuste, S. Basavanna, T. Mitchell and J. S. Brown (2008). "Maturation of *Streptococcus pneumoniae* lipoproteins by a type II signal peptidase is required for ABC transporter function and full virulence." Mol Microbiol **67**(3): 541-57.
- Kieliszewski, M. J. and D. T. Lamport (1994). "Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny." Plant J **5**(2): 157-72.
- Kim, D. H., J. J. Lim, J. J. Lee, D. G. Kim, H. J. Lee, W. Min, K. D. Kim, H. H. Chang, M. H. Rhee, M. Watarai and S. Kim (2012). "Identification of genes contributing to the intracellular replication of *Brucella abortus* within HeLa and RAW 264.7 cells." Vet Microbiol **158**(3-4): 322-8.
- Kim, D. H., B. G. Son, J. J. Lim, J. J. Lee, D. G. Kim, H. J. Lee, W. Min, M. H. Rhee, K. D. Kim, H. H. Chang and S. Kim (2013). "The role of a *Brucella abortus* lipoprotein in intracellular replication and pathogenicity in experimentally infected mice." Microb Pathog **54**: 34-9.
- Kin, M. S., M. Fort, S. T. de Echaide and E. B. Casanave (2014). "*Brucella suis* in armadillos (*Chaetophractus villosus*) from La Pampa, Argentina." Vet Microbiol **170**(3-4): 442-5.
- Ko, J., A. Gendron-Fitzpatrick and G. A. Splitter (2002). "Susceptibility of IFN regulatory factor-1 and IFN consensus sequence binding protein-deficient mice to brucellosis." J Immunol **168**(5): 2433-40.
- Ko, J. and G. A. Splitter (2003). "Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans." Clin Microbiol Rev **16**(1): 65-78.
- Kornacki, J. A. and D. B. Oliver (1998). "Lyme disease-causing *Borrelia* species encode multiple lipoproteins homologous to peptide-binding proteins of ABC-type transporters." Infect Immun **66**(9): 4115-22.
- Kornitzer, D., D. Teff, S. Altuvia and A. B. Oppenheim (1991). "Isolation, characterization, and sequence of an *Escherichia coli* heat shock gene, htpX." J Bacteriol **173**(9): 2944-53.
- Kovacs-Simon, A., R. W. Titball and S. L. Michell "Lipoproteins of bacterial pathogens." Infect Immun **79**(2): 548-61.
- Kubler-Kielb, J. and E. Vinogradov (2013). "The study of the core part and non-repeating elements of the O-antigen of *Brucella* lipopolysaccharide." Carbohydr Res **366**: 33-7.
- Kurtz, R. S. and D. T. Berman (1986). "Influence of endotoxin-protein in immunoglobulin G isotype responses of mice to *Brucella abortus* lipopolysaccharide." Infect Immun **54**(3): 728-34.
- Kyte, J. and R. F. Doolittle (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." J Mol Biol **157**(1): 105-32.
- Lamontagne, J., H. Butler, E. Chaves-Olarte, J. Hunter, M. Schirm, C. Paquet, M. Tian, P. Kearney, L. Hamaidi, D. Chelsky, I. Moriyon, E. Moreno and E. Paramithiotis (2007). "Extensive cell envelope modulation is associated with virulence in *Brucella abortus*." J Proteome Res **6**(4): 1519-29.
- Lamontagne, J., A. Forest, E. Marazzo, F. Denis, H. Butler, J. F. Michaud, L. Boucher, I. Pedro, A. Villeneuve, D. Sitnikov, K. Trudel, N. Nassif, D. Boudjelti, F. Tomaki, E. Chaves-Olarte, C. Guzman-Verri, S. Brunet, A. Cote-Martin, J. Hunter, E. Moreno and E. Paramithiotis (2009). "Intracellular adaptation of *Brucella abortus*." J Proteome Res **8**(3): 1594-609.
- Lampen, J. O. and J. B. Nielsen (1984). "N-terminal glyceride-cysteine modification of membrane penicillinases in gram-positive bacteria." Methods Enzymol **106**: 365-8.

- Lapaque, N., A. Muller, L. Alexopoulou, J. C. Howard and J. P. Gorvel (2009). "*Brucella abortus* induces Irgm3 and Irga6 expression via type-I IFN by a MyD88-dependent pathway, without the requirement of TLR2, TLR4, TLR5 and TLR9." Microb Pathog **47**(6): 299-304.
- Laplume, H., F. Sardi, N. R. Jacob, S. Garro, N. Lucero, E. Reynes, G. López, L. Samartino, P. Amiotti, J. Hart, E. Bagnat, C. Arejula, J. Antman, C. Giovachini, N. Casas and N. Ferro (2013). Brucellosis, Guía para el Equipo de Salud. M. d. S. d. I. Nación. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Ministerio de Salud de la Nación. **12**: 1-55.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson and D. G. Higgins (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." Bioinformatics **23**(21): 2947-8.
- Laskay, T., G. van Zandbergen and W. Solbach (2003). "Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?" Trends Microbiol **11**(5): 210-4.
- Le Fleche, P., Y. Hauck, L. Onteniente, A. Prieur, F. Denoeud, V. Ramisse, P. Sylvestre, G. Benson, F. Ramisse and G. Vergnaud (2001). "A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*." BMC Microbiol **1**: 2.
- Le Fleche, P., I. Jacques, M. Grayon, S. Al Dahouk, P. Bouchon, F. Denoeud, K. Nockler, H. Neubauer, L. A. Guilloteau and G. Vergnaud (2006). "Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay." BMC Microbiol **6**: 9.
- Letesson, J. J., P. Lestrade, R. M. Delrue, I. Danese, F. Bellefontaine, D. Fretin, B. Taminiau, A. Tibor, A. Dricot, C. Deschamps, V. Haine, S. Leonard, T. Laurent, P. Mertens, J. Vandenhoute and X. De Bolle (2002). "Fun stories about *Brucella*: the "furtive nasty bug"." Vet Microbiol **90**(1-4): 317-28.
- Levinson, G. and G. A. Gutman (1987). "Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution." Mol Biol Evol **4**(3): 203-21.
- Lewenza, S., D. Vidal-Ingigliardi and A. P. Pugsley (2006). "Direct visualization of red fluorescent lipoproteins indicates conservation of the membrane sorting rules in the family *Enterobacteriaceae*." J Bacteriol **188**(10): 3516-24.
- Li, Z. J., B. Y. Cui, H. Chen, J. D. Chen, H. Y. Zhao, D. R. Piao, H. Jiang, L. Zhang, X. Tang, C. W. Ke, Z. Yao and G. Z. Tian "Molecular typing of *Brucella suis* collected from 1960s to 2010s in China by MLVA and PFGE." Biomed Environ Sci **26**(6): 504-8.
- Lin, B., S. A. Short, M. Eskildsen, M. S. Klempner and L. T. Hu (2001). "Functional testing of putative oligopeptide permease (Opp) proteins of *Borrelia burgdorferi*: a complementation model in opp(-) *Escherichia coli*." Biochim Biophys Acta **1499**(3): 222-31.
- Lopez-Goni, I., D. Garcia-Yoldi, C. M. Marin, M. J. de Miguel, P. M. Munoz, J. M. Blasco, I. Jacques, M. Grayon, A. Cloeckart, A. C. Ferreira, R. Cardoso, M. I. Correa de Sa, K. Walravens, D. Albert and B. Garin-Bastuji (2008). "Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species, including the vaccine strains." J Clin Microbiol **46**(10): 3484-7.
- López-Goñi, I. and D. O'Callaghan (2012). *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*, Caister Academic Press.
- Loschi, L., S. J. Broxk, T. L. Hills, G. Zhang, M. G. Bertero, A. L. Lovering, J. H. Weiner and N. C. Strynadka (2004). "Structural and biochemical identification of a novel bacterial oxidoreductase." J Biol Chem **279**(48): 50391-400.
- Lucero, N. E., S. M. Ayala, G. I. Escobar and N. R. Jacob (2008). "*Brucella* isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006." Epidemiol Infect **136**(4): 496-503.

- Lucero, N. E., M. Tenenbaum, N. R. Jacob, G. I. Escobar, P. Groussaud and A. M. Whatmore (2010). "Application of variable number of tandem repeats typing to describe familial outbreaks of brucellosis in Argentina." *J Med Microbiol* **59**(Pt 6): 648-52.
- Macedo, G. C., D. M. Magnani, N. B. Carvalho, O. Bruna-Romero, R. T. Gazzinelli and S. C. Oliveira (2008). "Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection." *J Immunol* **180**(2): 1080-7.
- Madan Babu, M. and K. Sankaran (2002). "DOLOP--database of bacterial lipoproteins." *Bioinformatics* **18**(4): 641-3.
- Malinverni, J. C., J. Werner, S. Kim, J. G. Sklar, D. Kahne, R. Misra and T. J. Silhavy (2006). "YfiO stabilizes the YaeT complex and is essential for outer membrane protein assembly in *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* **61**(1): 151-64.
- Manterola, L., C. Guzman-Verri, E. Chaves-Olarte, E. Barquero-Calvo, M. J. de Miguel, I. Moriyon, M. J. Grillo, I. Lopez-Goni and E. Moreno (2007). "BvrR/BvrS-controlled outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for *Brucella abortus* virulence." *Infect Immun* **75**(10): 4867-74.
- Manterola, L., I. Moriyon, E. Moreno, A. Sola-Landa, D. S. Weiss, M. H. Koch, J. Howe, K. Brandenburg and I. Lopez-Goni (2005). "The lipopolysaccharide of *Brucella abortus* BvrS/BvrR mutants contains lipid A modifications and has higher affinity for bactericidal cationic peptides." *J Bacteriol* **187**(16): 5631-9.
- Mao, F., P. Dam, J. Chou, V. Olman and Y. Xu (2009). "DOOR: a database for prokaryotic operons." *Nucleic Acids Res* **37**(Database issue): D459-63.
- Martin-Martin, A. I., P. Sancho, M. J. de Miguel, L. Fernandez-Lago and N. Vizcaino (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**(5): 1783-93.
- Martirosyan, A., E. Moreno and J. P. Gorvel (2011). "An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen." *Immunol Rev* **240**(1): 211-34.
- Mathiopoulos, C., J. P. Mueller, F. J. Slack, C. G. Murphy, S. Patankar, G. Bukusoglu and A. L. Sonenshein (1991). "A *Bacillus subtilis* dipeptide transport system expressed early during sporulation." *Mol Microbiol* **5**(8): 1903-13.
- Mazars, E., S. Lesjean, A. L. Banuls, M. Gilbert, V. Vincent, B. Gicquel, M. Tibayrenc, C. Loch and P. Supply (2001). "High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1901-6.
- McGuirl, M. A., J. A. Bollinger, N. Coper, R. A. Scott and D. M. Dooley (2001). "Expression, purification, and characterization of NosL, a novel Cu(I) protein of the nitrous oxide reductase (nos) gene cluster." *J Biol Inorg Chem* **6**(2): 189-95.
- Mears, J., I. Abubakar, T. Cohen, T. D. McHugh and P. Sonnenberg (2015). "Effect of study design and setting on tuberculosis clustering estimates using Mycobacterial Interspersed Repetitive Units-Variable Number Tandem Repeats (MIRU-VNTR): a systematic review." *BMJ Open* **5**(1): e005636.
- Meyer, M. (1990). Evolutionary development and taxonomy of the genus *Brucella*. *Advances in Brucellosis Research*. L. Adams, Texas A&M University Press: 12-35.
- Mick, V., G. Le Carrou, Y. Corde, Y. Game, M. Jay and B. Garin-Bastuji (2014). "*Brucella melitensis* in France: persistence in wildlife and probable spillover from *Alpine ibex* to domestic animals." *PLoS One* **9**(4): e94168.

- Mol, J. P., E. A. Costa, A. F. Carvalho, Y. H. Sun, R. M. Tsolis, T. A. Paixao and R. L. Santos (2004). "Early transcriptional responses of bovine chorioallantoic membrane explants to wild type, DeltavirB2 or DeltatpB *Brucella abortus* infection." PLoS One **9**(9): e108606.
- Monnet, V. (2003). "Bacterial oligopeptide-binding proteins." Cell Mol Life Sci **60**(10): 2100-14.
- Morata, P., M. I. Queipo-Ortuno, J. M. Reguera, M. A. Garcia-Ordóñez, A. Cardenas and J. D. Colmenero (2003). "Development and evaluation of a PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human brucellosis." J Clin Microbiol **41**(1): 144-8.
- Moreno, E., E. Stackebrandt, M. Dorsch, J. Wolters, M. Busch and H. Mayer (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**(7): 3569-76.
- Moriyon, I. and I. Lopez-Goni (1998). "Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*." Int Microbiol **1**(1): 19-26.
- Morozumi, T. and J. Nicolet (1986). "Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains." J Clin Microbiol **23**(1): 138-42.
- Morris, C. A. (2007). "A review of genetic resistance to disease in *Bos taurus* cattle." Vet J **174**(3): 481-91.
- Munoa, F. J., K. W. Miller, R. Beers, M. Graham and H. C. Wu (1991). "Membrane topology of *Escherichia coli* prolipoprotein signal peptidase (signal peptidase II)." J Biol Chem **266**(26): 17667-72.
- Murphy, E. A., M. Parent, J. Sathiyaseelan, X. Jiang and C. L. Baldwin (2001a). "Immune control of *Brucella abortus* 2308 infections in BALB/c mice." FEMS Immunol Med Microbiol **32**(1): 85-8.
- Murphy, E. A., J. Sathiyaseelan, M. A. Parent, B. Zou and C. L. Baldwin (2001b). "Interferon-gamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice." Immunology **103**(4): 511-8.
- Nakayama, H., K. Kurokawa and B. L. Lee (2012). "Lipoproteins in bacteria: structures and biosynthetic pathways." FEBS J **279**(23): 4247-68.
- Narita, S. "ABC transporters involved in the biogenesis of the outer membrane in Gram-negative bacteria." Biosci Biotechnol Biochem **75**(6): 1044-54.
- Narita, S. and H. Tokuda (2006). "An ABC transporter mediating the membrane detachment of bacterial lipoproteins depending on their sorting signals." FEBS Lett **580**(4): 1164-70.
- Narita, S. and H. Tokuda (2007). "Amino acids at positions 3 and 4 determine the membrane specificity of *Pseudomonas aeruginosa* lipoproteins." J Biol Chem **282**(18): 13372-8.
- Natale, P., T. Bruser and A. J. Driessen (2008). "Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms." Biochim Biophys Acta **1778**(9): 1735-56.
- Nikaido, H. and M. Vaara (1985). "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability." Microbiol Rev **49**(1): 1-32.
- Novak, R., J. S. Braun, E. Charpentier and E. Tuomanen (1998). "Penicillin tolerance genes of *Streptococcus pneumoniae*: the ABC-type manganese permease complex Psa." Mol Microbiol **29**(5): 1285-96.
- Ochsner, U. A., A. I. Vasil, Z. Johnson and M. L. Vasil (1999). "*Pseudomonas aeruginosa* fur overlaps with a gene encoding a novel outer membrane lipoprotein, OmlA." J Bacteriol **181**(4): 1099-109.
- Ogunniyi, A. D., R. L. Folland, D. E. Briles, S. K. Hollingshead and J. C. Paton (2000). "Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*." Infect Immun **68**(5): 3028-33.

- OIE (2008). *Brucellosis bovina. Manual de la OIE sobre animales terrestres*. OIE. Paris: 682-719.
- Okuda, S. and H. Tokuda (2011). "Lipoprotein sorting in bacteria." *Annu Rev Microbiol* **65**: 239-59.
- Oliaro, J., S. Dudal, J. Liautard, J. B. Andrault, J. P. Liautard and V. Lafont (2005). "Vgamma9Vdelta2 T cells use a combination of mechanisms to limit the spread of the pathogenic bacteria *Brucella*." *J Leukoc Biol* **77**(5): 652-60.
- Oliveira, S. C., J. S. Harms, M. Banai and G. A. Splitter (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**(2): 262-8.
- Oliveira, S. C. and G. A. Splitter (1995). "CD8+ type 1 CD44hi CD45 RBlo T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice." *Eur J Immunol* **25**(9): 2551-7.
- Pailler, J., W. Aucher, M. Pires and N. Buddelmeijer "Phosphatidylglycerol::prolipoprotein diacylglyceryl transferase (Lgt) of *Escherichia coli* has seven transmembrane segments, and its essential residues are embedded in the membrane." *J Bacteriol* **194**(9): 2142-51.
- Paixao, T. A., C. M. Roux, A. B. den Hartigh, S. Sankaran-Walters, S. Dandekar, R. L. Santos and R. M. Tsolis (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**(10): 4197-208.
- Pappas, G. (2010). "The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats." *Int J Antimicrob Agents* **36 Suppl 1**: S8-11.
- Paques, F., W. Y. Leung and J. E. Haber (1998). "Expansions and contractions in a tandem repeat induced by double-strand break repair." *Mol Cell Biol* **18**(4): 2045-54.
- Pasquali, P., A. M. Thornton, S. Vendetti, C. Pistoia, P. Petrucci, M. Tarantino, M. Pesciaroli, F. Ruggeri, A. Battistoni and E. M. Shevach "CD4+CD25+ T regulatory cells limit effector T cells and favor the progression of brucellosis in BALB/c mice." *Microbes Infect* **12**(1): 3-10.
- Pasquevich, K. A., S. M. Estein, C. Garcia Samartino, A. Zwerdling, L. M. Coria, P. Barrionuevo, C. A. Fossati, G. H. Giambartolomei and J. Cassataro (2009). "Immunization with recombinant *Brucella* species outer membrane protein Omp16 or Omp19 in adjuvant induces specific CD4+ and CD8+ T cells as well as systemic and oral protection against *Brucella abortus* infection." *Infect Immun* **77**(1): 436-45.
- Pasquevich, K. A., C. Garcia Samartino, L. M. Coria, S. M. Estein, A. Zwerdling, A. E. Ibanez, P. Barrionuevo, F. S. Oliveira, N. B. Carvalho, J. Borkowski, S. C. Oliveira, H. Warzecha, G. H. Giambartolomei and J. Cassataro (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-adjuncting vaccine against systemic and oral acquired brucellosis." *J Immunol* **184**(9): 5200-12.
- Pasquevich, K. A., A. E. Ibanez, L. M. Coria, C. Garcia Samartino, S. M. Estein, A. Zwerdling, P. Barrionuevo, F. S. Oliveira, C. Seither, H. Warzecha, S. C. Oliveira, G. H. Giambartolomei and J. Cassataro (2011). "An oral vaccine based on U-Omp19 induces protection against *B. abortus* mucosal challenge by inducing an adaptive IL-17 immune response in mice." *PLoS One* **6**(1): e16203.
- Pastoret, S., C. Fraipont, T. den Blaauwen, B. Wolf, M. E. Aarsman, A. Piette, A. Thomas, R. Brasseur and M. Nguyen-Disteche (2004). "Functional analysis of the cell division protein FtsW of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **186**(24): 8370-9.

- Pathania, R., S. Zlitni, C. Barker, R. Das, D. A. Gerritsma, J. Lebert, E. Awuah, G. Melacini, F. A. Capretta and E. D. Brown (2009). "Chemical genomics in *Escherichia coli* identifies an inhibitor of bacterial lipoprotein targeting." Nat Chem Biol **5**(11): 849-56.
- Payne, J. W. and M. W. Smith (1994). "Peptide transport by micro-organisms." Adv Microb Physiol **36**: 1-80.
- Perego, M., C. F. Higgins, S. R. Pearce, M. P. Gallagher and J. A. Hoch (1991). "The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation." Mol Microbiol **5**(1): 173-85.
- Perkins, S. D., S. J. Smither and H. S. Atkins (2010). "Towards a *Brucella* vaccine for humans." FEMS Microbiol Rev **34**(3): 379-94.
- Petersen, E., G. Rajashekara, N. Sanakkayala, L. Eskra, J. Harms and G. Splitter (2013). "Erythritol triggers expression of virulence traits in *Brucella melitensis*." Microbes Infect **15**(6-7): 440-9.
- Pizarro-Cerda, J., S. Meresse, R. G. Parton, G. van der Goot, A. Sola-Landa, I. Lopez-Goni, E. Moreno and J. P. Gorvel (1998a). "*Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes." Infect Immun **66**(12): 5711-24.
- Pizarro-Cerda, J., E. Moreno, V. Sanguedolce, J. L. Mege and J. P. Gorvel (1998b). "Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments." Infect Immun **66**(5): 2387-92.
- Plommet, M., G. Renoux, A. Philippon, J. Gestin and R. Fensterbank (1971). "[Congenital transmission of bovine brucellosis from one generation to another]." Bull Acad Vet Fr **44**(1): 53-9.
- Porte, F., J. P. Liautard and S. Kohler (1999). "Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages." Infect Immun **67**(8): 4041-7.
- Qi, H. Y., K. Sankaran, K. Gan and H. C. Wu (1995). "Structure-function relationship of bacterial prolipoprotein diacylglycerol transferase: functionally significant conserved regions." J Bacteriol **177**(23): 6820-4.
- Remans, K., K. Vercammen, J. Bodilis and P. Cornelis "Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in *Pseudomonas aeruginosa*." Microbiology **156**(Pt 9): 2597-607.
- Riquelme-Neira, R., A. Retamal-Diaz, F. Acuna, P. Riquelme, A. Rivera, D. Saez and A. Onate (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**(36): 3663-7.
- Robichon, C., D. Vidal-Ingigliardi and A. P. Pugsley (2005). "Depletion of apolipoprotein N-acyltransferase causes mislocalization of outer membrane lipoproteins in *Escherichia coli*." J Biol Chem **280**(2): 974-83.
- Romero-Steiner, S., T. Pilishvili, J. S. Sampson, S. E. Johnson, A. Stinson, G. M. Carlone and E. W. Ades (2003). "Inhibition of pneumococcal adherence to human nasopharyngeal epithelial cells by anti-PsaA antibodies." Clin Diagn Lab Immunol **10**(2): 246-51.
- Roop, R. M., 2nd, J. M. Gaines, E. S. Anderson, C. C. Caswell and D. W. Martin (2009). "Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host." Med Microbiol Immunol **198**(4): 221-38.
- Rose, R. W., T. Bruser, J. C. Kissinger and M. Pohlschroder (2002). "Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway." Mol Microbiol **45**(4): 943-50.

- Rosinha, G. M., D. A. Freitas, A. Miyoshi, V. Azevedo, E. Campos, S. L. Cravero, O. Rossetti, G. Splitter and S. C. Oliveira (2002). "Identification and characterization of a *Brucella abortus* ATP-binding cassette transporter homolog to *Rhizobium meliloti* ExsA and its role in virulence and protection in mice." Infect Immun **70**(9): 5036-44.
- Rossetti, C. A., K. L. Drake and L. G. Adams (2012). "Transcriptome analysis of HeLa cells response to *Brucella melitensis* infection: a molecular approach to understand the role of the mucosal epithelium in the onset of the Brucella pathogenesis." Microbes Infect **14**(9): 756-67.
- Roux, C. M., H. G. Rolan, R. L. Santos, P. D. Beremand, T. L. Thomas, L. G. Adams and R. M. Tsolis (2007). "*Brucella* requires a functional Type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice." Cell Microbiol **9**(7): 1851-69.
- Salcedo, S. P., M. I. Marchesini, H. Lelouard, E. Fugier, G. Jolly, S. Balor, A. Muller, N. Lapaque, O. Demaria, L. Alexopoulou, D. J. Comerci, R. A. Ugalde, P. Pierre and J. P. Gorvel (2008). "*Brucella* control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1." PLoS Pathog **4**(2): e21.
- Samartino, L. E. (2002). "Brucellosis in Argentina." Vet Microbiol **90**(1-4): 71-80.
- Sambrook, J. and D. W. Russell (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandalakis, V., A. Psaroulaki, P. J. De Bock, A. Christidou, K. Gevaert, G. Tsiotis and Y. Tselentis (2012). "Investigation of rifampicin resistance mechanisms in *Brucella abortus* using MS-driven comparative proteomics." J Proteome Res **11**(4): 2374-85.
- Sander, P., M. Rezwan, B. Walker, S. K. Rampini, R. M. Kroppenstedt, S. Ehlers, C. Keller, J. R. Keeble, M. Hagemeyer, M. J. Colston, B. Springer and E. C. Bottger (2004). "Lipoprotein processing is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*." Mol Microbiol **52**(6): 1543-52.
- Sangari, F. J., A. Seoane, M. C. Rodriguez, J. Aguero and J. M. Garcia Lobo (2007). "Characterization of the urease operon of *Brucella abortus* and assessment of its role in virulence of the bacterium." Infect Immun **75**(2): 774-80.
- Sankaran, K. and H. C. Wu (1994). "Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol." J Biol Chem **269**(31): 19701-6.
- Sassetti, C. M., D. H. Boyd and E. J. Rubin (2003). "Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis." Mol Microbiol **48**(1): 77-84.
- Schoenhals, G. J. and R. M. Macnab (1996). "Physiological and biochemical analyses of FlgH, a lipoprotein forming the outer membrane L ring of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol **178**(14): 4200-7.
- Schulze, R. J., S. Chen, O. S. Kumru and W. R. Zuckert (2010). "Translocation of *Borrelia burgdorferi* surface lipoprotein OspA through the outer membrane requires an unfolded conformation and can initiate at the C-terminus." Mol Microbiol **76**(5): 1266-78.
- Schulze, R. J. and W. R. Zuckert (2006). "*Borrelia burgdorferi* lipoproteins are secreted to the outer surface by default." Mol Microbiol **59**(5): 1473-84.
- Schurig, G. G., N. Sriranganathan and M. J. Corbel (2002). "Brucellosis vaccines: past, present and future." Vet Microbiol **90**(1-4): 479-96.
- Selvaraj, S. K., P. Periandythevar and N. V. Prasadarao (2007). "Outer membrane protein A of *Escherichia coli* K1 selectively enhances the expression of intercellular adhesion molecule-1 in brain microvascular endothelial cells." Microbes Infect **9**(5): 547-57.
- Setubal, J. C., M. Reis, J. Matsunaga and D. A. Haake (2006). "Lipoprotein computational prediction in spirochaetal genomes." Microbiology **152**(Pt 1): 113-21.

- Shruthi, H., M. M. Babu and K. Sankaran (2010). "TAT-pathway-dependent lipoproteins as a niche-based adaptation in prokaryotes." *J Mol Evol* **70**(4): 359-70.
- Sieira, R., D. J. Comerci, D. O. Sanchez and R. A. Ugalde (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**(17): 4849-55.
- Silva, T. M., T. A. Paixao, E. A. Costa, M. N. Xavier, J. C. Sa, V. S. Moustacas, A. B. den Hartigh, A. V. Carvalho Neta, S. C. Oliveira, R. Tsolis and R. L. Santos (2011). "Putative ATP-binding cassette transporter is essential for *Brucella ovis* pathogenesis in mice." *Infect Immun* **79**(4): 1706-17.
- Skyberg, J. A., T. Thornburg, M. Rollins, E. Huarte, M. A. Jutila and D. W. Pascual (2011). "Murine and bovine gammadelta T cells enhance innate immunity against *Brucella abortus* infections." *PLoS One* **6**(7): e21978.
- Smith, H. (1998). "What happens to bacterial pathogens in vivo?" *Trends Microbiol* **6**(6): 239-43.
- Smith, L. D. and T. A. Ficht (1990). "Pathogenesis of *Brucella*." *Crit Rev Microbiol* **17**(3): 209-30.
- Sperandeo, P., F. K. Lau, A. Carpentieri, C. De Castro, A. Molinaro, G. Deho, T. J. Silhavy and A. Polissi (2008). "Functional analysis of the protein machinery required for transport of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **190**(13): 4460-9.
- Starr, T., T. W. Ng, T. D. Wehrly, L. A. Knodler and J. Celli (2008). "*Brucella* intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment." *Traffic* **9**(5): 678-94.
- Stevens, M. G., S. C. Olsen, G. W. Pugh, Jr. and M. V. Palmer (1994). "Immune and pathologic responses in mice infected with *Brucella abortus* 19, RB51, or 2308." *Infect Immun* **62**(8): 3206-12.
- Stevenson, G., K. Andrianopoulos, M. Hobbs and P. R. Reeves (1996). "Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid." *J Bacteriol* **178**(16): 4885-93.
- Struelens, M. J. (1996). "Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems." *Clin Microbiol Infect* **2**(1): 2-11.
- Sutcliffe, I. C. and D. J. Harrington (2004). "Lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components." *FEMS Microbiol Rev* **28**(5): 645-59.
- Sutcliffe, I. C., D. J. Harrington and M. I. Hutchings (2012). "A phylum level analysis reveals lipoprotein biosynthesis to be a fundamental property of bacteria." *Protein Cell* **3**(3): 163-70.
- Taboada, B., R. Ciria, C. E. Martinez-Guerrero and E. Merino (2011). "ProOpDB: Prokaryotic Operon DataBase." *Nucleic Acids Res* **40**(Database issue): D627-31.
- Takeda, K., H. Miyatake, N. Yokota, S. Matsuyama, H. Tokuda and K. Miki (2003). "Crystal structures of bacterial lipoprotein localization factors, LolA and LolB." *EMBO J* **22**(13): 3199-209.
- Tanabe, M., H. S. Atkins, D. N. Harland, S. J. Elvin, A. J. Stagg, O. Mirza, R. W. Titball, B. Byrne and K. A. Brown (2006). "The ABC transporter protein OppA provides protection against experimental *Yersinia pestis* infection." *Infect Immun* **74**(6): 3687-91.
- Tanaka, K., S. I. Matsuyama and H. Tokuda (2001). "Deletion of lolB, encoding an outer membrane lipoprotein, is lethal for *Escherichia coli* and causes accumulation of lipoprotein localization intermediates in the periplasm." *J Bacteriol* **183**(22): 6538-42.
- Tcherneva, E., N. Rijpens, B. Jersek and L. M. Herman (2000). "Differentiation of *Brucella* species by random amplified polymorphic DNA analysis." *J Appl Microbiol* **88**(1): 69-80.

- Tcherneva, E., N. Rijpens, C. Naydensky and L. Herman (1996). "Repetitive element sequence based polymerase chain reaction for typing of *Brucella strains*." Vet Microbiol **51**(1-2): 169-78.
- Terwagne, M., A. Mirabella, J. Lemaire, C. Deschamps, X. De Bolle and J. J. Letesson (2013). "Quorum sensing and self-quorum quenching in the intracellular pathogen *Brucella melitensis*." PLoS One **8**(12): e82514.
- Tian, M., J. Qu, X. Han, M. Zhang, C. Ding, J. Ding, G. Chen and S. Yu (2013). "Microarray-based identification of differentially expressed genes in intracellular *Brucella abortus* within RAW264.7 cells." PLoS One **8**(8): e67014.
- Tibor, A., B. Decelle and J. J. Letesson (1999). "Outer membrane proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of *Brucella spp.* are lipoproteins." Infect Immun **67**(9): 4960-2.
- Tibor, A., I. Jacques, L. Guilloteau, J. M. Verger, M. Grayon, V. Wansard and J. J. Letesson (1998). "Effect of P39 gene deletion in live *Brucella* vaccine strains on residual virulence and protective activity in mice." Infect Immun **66**(11): 5561-4.
- Tibor, A., E. Saman, P. de Wergifosse, A. Cloeckert, J. N. Limet and J. J. Letesson (1996). "Molecular characterization, occurrence, and immunogenicity in infected sheep and cattle of two minor outer membrane proteins of *Brucella abortus*." Infect Immun **64**(1): 100-7.
- Tibor, A., V. Wansard, V. Bielartz, R. M. Delrue, I. Danese, P. Michel, K. Walravens, J. Godfroid and J. J. Letesson (2002). "Effect of omp10 or omp19 deletion on *Brucella abortus* outer membrane properties and virulence in mice." Infect Immun **70**(10): 5540-6.
- Tiller, R. V., B. K. De, M. Boshra, L. Y. Huynh, M. N. Van Ert, D. M. Wagner, J. Klena, T. S. Mohsen, S. S. El-Shafie, P. Keim, A. R. Hoffmaster, P. P. Wilkins and G. Pimentel (2009). "Comparison of two multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis methods for molecular strain typing of human *Brucella melitensis* isolates from the Middle East." J Clin Microbiol **47**(7): 2226-31.
- Tjalsma, H., V. P. Kontinen, Z. Pragai, H. Wu, R. Meima, G. Venema, S. Bron, M. Sarvas and J. M. van Dijk (1999). "The role of lipoprotein processing by signal peptidase II in the Gram-positive eubacterium *Bacillus subtilis*. Signal peptidase II is required for the efficient secretion of alpha-amylase, a non-lipoprotein." J Biol Chem **274**(3): 1698-707.
- Tokuda, H. (2009). "Biogenesis of outer membranes in Gram-negative bacteria." Biosci Biotechnol Biochem **73**(3): 465-73.
- Toth, T. E., J. A. Cobb, S. M. Boyle, R. M. Roop and G. G. Schurig (1995). "Selective humoral immune response of Balb/C mice to *Brucella abortus* proteins expressed by vaccinia virus recombinants." Vet Microbiol **45**(2-3): 171-83.
- Trangoni, M. D. (2013). Contribución a la virulencia en *Brucella spp.* de Proteínas Hipotéticas Consevadas y de la Síntesis del Inositol. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, UBA.
- Tschumi, A., C. Nai, Y. Auchli, P. Hunziker, P. Gehrig, P. Keller, T. Grau and P. Sander (2009). "Identification of apolipoprotein N-acyltransferase (Lnt) in mycobacteria." J Biol Chem **284**(40): 27146-56.
- Tseng, H. J., A. G. McEwan, J. C. Paton and M. P. Jennings (2002). "Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: PsaA mutants are hypersensitive to oxidative stress." Infect Immun **70**(3): 1635-9.
- Tsukahara, J., K. Mukaiyama, S. Okuda, S. Narita and H. Tokuda (2009). "Dissection of LolB function--lipoprotein binding, membrane targeting and incorporation of lipoproteins into lipid bilayers." FEBS J **276**(16): 4496-504.
- Ugalde, J. E., C. Czibener, M. F. Feldman and R. A. Ugalde (2000). "Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of

- lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication." *Infect Immun* **68**(10): 5716-23.
- Uza, F. A., L. Samartino, G. Schurig, A. Carrasco, K. Nielsen, R. F. Cabrera and H. R. Taddeo (2000). "Effect of vaccination with *Brucella abortus* strain RB51 on heifers and pregnant cattle." *Vet Res Commun* **24**(3): 143-51.
- Valdezate, S., A. Navarro, V. Rubio, B. Garin-Bastuji, D. Albert, P. Hernandez, P. M. Alonso and J. A. Saez-Nieto (2009). "Emergence of a clonal lineage of *Brucella abortus* biovar 3 in clinical cases in Spain." *J Clin Microbiol* **47**(8): 2687-8.
- Vemulapalli, R., Y. He, L. S. Buccolo, S. M. Boyle, N. Sriranganathan and G. G. Schurig (2000). "Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional wboA gene results in O-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype and attenuation." *Infect Immun* **68**(7): 3927-32.
- Verger, J. M., Grimont, F., Grimont P.A.D., Grayon, M. (1985). "*Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization." *Int J Syst Bacteriol* **35**: 292-5.
- Viadas, C., M. C. Rodriguez, J. M. Garcia-Lobo, F. J. Sangari and I. Lopez-Goni (2009). "Construction and evaluation of an ORFeome-based *Brucella* whole-genome DNA microarray." *Microb Pathog* **47**(4): 189-95.
- Viadas, C., M. C. Rodriguez, F. J. Sangari, J. P. Gorvel, J. M. Garcia-Lobo and I. Lopez-Goni (2010). "Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system." *PLoS One* **5**(4): e10216.
- Vizcaino, N., J. M. Verger, M. Grayon, M. S. Zygmunt and A. Cloeckaert (1997). "DNA polymorphism at the omp-31 locus of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers." *Microbiology* **143** (Pt 9): 2913-21.
- Whatmore, A. M. (2009). "Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens." *Infect Genet Evol* **9**(6): 1168-84.
- Whatmore, A. M., N. Davison, A. Cloeckaert, S. Al Dahouk, M. S. Zygmunt, S. D. Brew, L. L. Perrett, M. S. Koylass, G. Vergnaud, C. Quance, H. C. Scholz, E. J. Dick, Jr., G. Hubbard and N. E. Schlabritz-Loutsevitch (2014). "*Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.)." *Int J Syst Evol Microbiol* **64**(Pt 12): 4120-8.
- Whatmore, A. M., T. J. Murphy, S. Shankster, E. Young, S. J. Cutler and A. P. Macmillan (2005). "Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type *Brucella* isolates of medical and veterinary interest." *J Clin Microbiol* **43**(2): 761-9.
- Whatmore, A. M., S. J. Shankster, L. L. Perrett, T. J. Murphy, S. D. Brew, R. E. Thirlwall, S. J. Cutler and A. P. MacMillan (2006). "Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for typing of *Brucella* spp." *J Clin Microbiol* **44**(6): 1982-93.
- Wilesmith, J. W. (1978). "The persistence of *Brucella abortus* infection in calves: a retrospective study of heavily infected herds." *Vet Rec* **103**(8): 149-53.
- Winter, A. J. (1987). "Outer membrane proteins of *Brucella*." *Ann Inst Pasteur Microbiol* **138**(1): 87-9.
- Wu, S. W. and H. De Lencastre (1999). "Mrp--a new auxiliary gene essential for optimal expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*." *Microb Drug Resist* **5**(1): 9-18.
- Yang, M., A. Johnson and T. F. Murphy "Characterization and evaluation of the *Moraxella catarrhalis* oligopeptide permease A as a mucosal vaccine antigen." *Infect Immun* **79**(2): 846-57.

- Yingst, S. L., L. M. Huzella, L. Chuvala and M. Wolcott "A rhesus macaque (*Macaca mulatta*) model of aerosol-exposure brucellosis (*Brucella suis*): pathology and diagnostic implications." J Med Microbiol **59**(Pt 6): 724-30.
- Young, E. J., M. Borchert, F. L. Kretzer and D. M. Musher (1985). "Phagocytosis and killing of *Brucella* by human polymorphonuclear leukocytes." J Infect Dis **151**(4): 682-90.
- Yu, C. S., C. J. Lin and J. K. Hwang (2004). "Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions." Protein Sci **13**(5): 1402-6.
- Yumuk, Z., O. Kucukbasmaci, O. Buyukbaba Boral, M. Kucuker Ang and V. Dundar (2003). "The effects of streptozotocin-induced diabetes on brucellosis of rats." FEMS Immunol Med Microbiol **39**(3): 275-8.
- Zhang, M., X. Han, H. Liu, M. Tian, C. Ding, J. Song, X. Sun, Z. Liu and S. Yu (2003). "Inactivation of the ABC transporter ATPase gene in *Brucella abortus* strain 2308 attenuated the virulence of the bacteria." Vet Microbiol **164**(3-4): 322-9.
- Zhao, W. R., Wendoso, Hasi, Y. X. Qin, W. Weng and S. L. Lu (1989). "Selection of a *Brucella* vaccine strain of low residual virulence by chemical mutagenesis." J Med Microbiol **30**(2): 143-8.
- Zuckert, W. R. (2014). "Secretion of Bacterial Lipoproteins: Through the Cytoplasmic Membrane, the Periplasm and Beyond." Biochim Biophys Acta **1843**(8): 1509-1516.
- Zupan, J. R., D. Ward and P. Zambryski (1998). "Assembly of the VirB transport complex for DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells." Curr Opin Microbiol **1**(6): 649-55.
- Zwerdling, A., M. V. Delpino, P. Barrionuevo, J. Cassataro, K. A. Pasquevich, C. Garcia Samartino, C. A. Fossati and G. H. Giambartolomei (2008). "*Brucella* lipoproteins mimic dendritic cell maturation induced by *Brucella abortus*." Microbes Infect **10**(12-13): 1346-54.