

## Tesis de Posgrado

# Obtención de mutantes de *Brucella abortus* genéticamente definidas: su caracterización molecular y evaluación de su uso como vacunas para la brucelosis bovina

Campos, Eleonora

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Campos, Eleonora. (2003). Obtención de mutantes de *Brucella abortus* genéticamente definidas: su caracterización molecular y evaluación de su uso como vacunas para la brucelosis bovina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3609\\_Campos.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3609_Campos.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

Campos, Eleonora. "Obtención de mutantes de *Brucella abortus* genéticamente definidas: su caracterización molecular y evaluación de su uso como vacunas para la brucelosis bovina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3609\\_Campos.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3609_Campos.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Obtención de mutantes de *Brucella abortus* genéticamente  
definidas: su caracterización molecular y evaluación de su uso  
como vacunas para la brucelosis bovina

Trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

**Autor: Lic. Eleonora Campos**

**Director: Dr. Osvaldo Luis Rossetti**

**2003**

Lugar de Trabajo: Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA.  
Buenos Aires, Argentina.

University of Buenos Aires  
School of Natural and Exact Science

Obtention of *Brucella abortus* genetically defined mutants:  
molecular characterization and evaluation of their use as vaccines  
for bovine brucellosis

Thesis presented to obtain the PhD degree

**Author: Lic. Eleonora Campos**

**Director: Dr. Osvaldo Luis Rossetti**

**2003**

Institute of Biotechnology, CICVyA, INTA.  
Buenos Aires, Argentina.

## **Agradecimientos**

A Osvaldo, mi queridísimo jefe, no encuentro las palabras suficientes para agradecerte. Gracias por confiar siempre en mí, brindarme todo tu apoyo y contención, valorar mis opiniones y hacerte siempre un tiempito para escucharme.

A Silvio, porque tu aporte y experiencia son realmente invaluableles.

A Haydee y Alicia, por ser tan buenas conmigo y por todos los años compartidos. Las quiero mucho!

A Laurita, quien me marco el camino y me enseñó muchas de las cosas que se hoy. Me encantaría que estuviera acá!

A Julia y Mariela, porque es muy lindo compartir el laboratorio con ustedes.

A Lore, porque el tiempo que estuvo en el laboratorio, aportó sus ganas y entusiasmo y nos hicimos buenas amigas.

A Laura e Inés, que formaron parte del grupo y repicaron miles de colonias!

A Fabi, una genia, GRACIAS POR TODO! Por leer y corregir esta tesis con gran interés y criterio, por la buena predisposición, por no estar nunca de mal humor, porque es un placer compartir el trabajo y el día a día y por aportar simpleza a las cosas complicadas.

A Angel, porque es una fuente de consulta permanente, por interesarse por mi trabajo y mis opiniones y por su aporte al leer esta tesis.

A Ceci V., mi gran amiga y compañera de *pool*, por todas las vivencias compartidas juntas y porque nuestra amistad trasciende el laboratorio. Te quiero mucho!

A mis amigas Ceci T., Dani T., Dalia y Marisa y por supuesto, a Oski, porque disfruto muchísimo estar con ustedes.

A Paz, por compartir nuestros viajes al INTA siempre con buen humor y con tanto cariño.

A Kari y Rosalía, compañeritas de oficina y escritura, porque son muy macanudas y divertidas.

A Esteban, por estar siempre a disposición, por su ayuda con las compus y por darme la oportunidad de trabajar en docencia.

A los Dres. Eduardo Palma y Ana Sadir, por darme un lugar en el Instituto de Biotecnología.

Al Dr. Marty Roop y todo su grupo, especialmente Rose, por abrirme las puertas de su laboratorio, por interesarse en mi trabajo y porque trabajar con él cambió mi manera de ver muchas cosas.

A Isa, por tener tan buenos sentimientos y ser tan buena conmigo en todos los aspectos. Por ocuparse de mis *pottery*, *erlenmeyers* y tubos, siempre con una sonrisa.

A Berta, Vilma, Fabián y Majó por preparar el material y ayudarme siempre en todo lo que necesité.

A Jorge, porque me ha simplificado el trabajo inmensamente y nunca tuvo un no como respuesta. Gracias por cuidar a los animales, sangrar a las vacas, ir al centro y a Ezeiza mil y una vez a buscar las cosas, etc., etc., etc.

A Perla, Mónica, Marta y Any, por simplificar mi vida administrativa al extremo.

A los chicos de MEP, Guido, Ariel y Silvina, por ser tan tan macanudos.

A Lela, Analía, Gaby C, Andreita, Flavia y Dany CG, el harem de Oski, por la buena predisposición de siempre.

Al resto de los tuberculosos, Marisa R., Alicia, Martín, Laura, Andre y Silvina W. por ser tan buenos vecinos!

A los lechugones, Mariana, Norma, Ale T., Ruth, APU y todo su grupo de gente por su ayuda y su permanente aporte. A Paola, Nati, Flor del Viso y Vero Nigi que son tan buenas conmigo.

A Marisa LB, Valeria y Andrea D., por tantos almuerzos maternos compartidos.

A mis amigas de la facu Caro A., Caro T., Mele y Silvina, porque estudiando empezó una amistad que perdura a través del tiempo y las distancias y porque las quiero mucho!

A mis amigas desde que tenemos 3 años, Gaby y Myri, por estar siempre en las buenas y en las malas.

A Susana, por cuidar tan bien a mis hijos, por el cariño que nos demuestra día a día y porque gracias a que ella está, yo puedo trabajar tranquila.

A Ana María y Alberto, mis queridos suegros, por recibirme en su familia con los brazos abiertos, por ayudarme en todo y por hacerme sentir siempre tan querida.

A Luli y Anabella, por querer tanto a los chicos, por ser tan divertidas y macanudas, y por ser tan gauchas para dar una mano cuando hace falta.

A Papá, Betty, Martín (el tío "Patín"), Vale y Camilito, porque son una parte fundamental en mi vida y los adoro.

A Mamá, porque no hay palabras que resuman mis sentimientos. Por tu amor incondicional, por guiarme, cuidarme y protegerme y porque gracias a vos soy todo lo que soy hoy.

A la Baba, mi abuela, por ser mi ejemplo en la vida y porque no hay día que no tenga algo que agradecerte.

Al Colo, el amor de mi vida. Porque juntos recorremos este camino, por quererme, acompañarme, valorarme, pensar en mí. Porque te amo y te elegiría una y mil veces.

A Cata y Santi, por llenar mis días de alegría, porque los amo con toda mi alma y porque son la razón de mi vida.

<b>Indice</b>	I
<b>Abreviaturas</b>	V
<b>Resumen</b>	VI
<b><i>Abstract</i></b>	VII
<b>Introducción</b>	
Definición de brucelosis.	1
Historia del descubrimiento del agente causal de la brucelosis.	1
Descripción de la bacteria.	2
Especies de <i>Brucella</i> y su caracterización.	2
Filogenia de <i>Brucella spp.</i>	4
Genética Molecular.	5
Epidemiología de la brucelosis.	6
Situación de la brucelosis en la Argentina.	7
La enfermedad en los animales.	8
La enfermedad en el hombre.	9
Virulencia.	10
Respuesta inmune contra <i>Brucella</i>	20
Modelos para el estudio de la brucelosis	24
Vacunas y diagnóstico para brucelosis	26
Nuevas vacunas	31
Antecedentes en que se basa este trabajo	36
<b>Hipótesis</b>	38
<b>Objetivos</b>	39
<b>Materiales y Métodos</b>	
1. Medios y condiciones de cultivo	40
2. Cepas bacterianas	40

3. Secuencias de los genes <i>bp26</i> y <i>bmp18</i> de <i>B. abortus</i> S19	40
4. Oligonucléotidos	41
5. Plásmidos	42
6. Metodología de ADN recombinante	43
7. Herramientas de bioinformática	45
8. Northern Blot	45
9. Transformación de <i>B. abortus</i>	47
10. Selección de mutantes de <i>B. abortus</i> con genes de resistencia a antibióticos	47
11. Selección de mutantes de <i>B. abortus</i> sin genes de resistencia a antibióticos	48
12. Confirmación de la mutagénesis	49
13. Western Blot	52
14. Ensayos de actividad luciferasa	53
15. Tinción con cristal violeta	53
16. Sensibilidad a temperatura, SDS y Polimixina B	54
17. Ensayos de supervivencia y protección en ratones BALB/c	54
18. Respuesta humoral en ratones BALB/c	56
19. Ensayos de replicación intracelular en macrófagos peritoneales murinos	57
20. Ensayos de protección en bovinos	58
21. Respuesta humoral en bovinos	59
22. Análisis estadístico	62
23. Aprobación y control de los experimentos en animales	62
24. Financiación	62

## Resultados

### **Parte I: Mutagénesis insercional de los genes *bp26* y *bmp18* en *Brucella abortus* con marcadores de resistencia a antibióticos**

1. Caracterización transcripcional de los genes <i>bp26</i> y <i>bmp18</i> de <i>B. abortus</i>	63
2. Obtención de la cepa doble mutante <i>B. abortus</i> INTA1 (I1)	65
3. Obtención de la cepa complementante <i>B. abortus</i> I1-C	68
4. Confirmación del genotipo de las cepas obtenidas	69
5. Evaluación de las propiedades de la membrana externa de las mutantes obtenidas	71



a. Sensibilidad a temperatura	72
b. Sensibilidad a detergentes y policationes	73
6. Evaluación de <i>B. abortus</i> INTA1 en el modelo ratón	74
a. Supervivencia en ratones BALB/c	74
b. Protección frente al desafío con una cepa patógena	75
c. Evaluación de la respuesta humoral contra LPS, BP26 y BMP18	78
7. ¿La falta de expresión de BMP18 genera atenuación en una cepa virulenta?	79
a. Construcción de la mutante <i>B. abortus</i> M18v	79
b. Supervivencia intracelular en macrófagos peritoneales murinos	80
c. Supervivencia en ratones	81

**Parte II: Mutagénesis de los genes *bp26* y *bmp18* en *Brucella abortus* S19 sin marcadores de resistencia a antibióticos**

1. Expresión de <i>luc</i> y <i>mer</i> en <i>B. abortus</i>	83
a. Resistencia a mercurio	83
b. Actividad de luciferasa	85
2. Estrategia para reemplazo alélico utilizando <i>luc</i> como gen marcador	87
3. Construcción de mutantes nulas sin marcadores de resistencia a antibióticos	88
a. Obtención de la cepa mutante <i>B. abortus</i> M1luc	88
b. Obtención de la cepa doble mutante <i>B. abortus</i> INTA2 (I2)	90
4. Evaluación de <i>B. abortus</i> I2 en ratones BALB/c	91
a. Grado de atenuación	91
b. Protección frente al desafío con una cepa patógena	93

**Parte III: Valoración de las cepas *B. abortus* M1luc y *B. abortus* INTA2 (I2) en el hospedador natural.**

1. Vacunación de terneras	94
2. Respuesta humoral contra LPS	95
3. Respuesta humoral contra BP26	96
4. Respuesta humoral contra Luciferasa	97
5. Ensayos de protección en bovinos contra el desafío con una cepa patógena	99

6. Análisis de la respuesta humoral contra LPS post-desafío	100
7. Análisis de la respuesta humoral contra BP26 post-desafío	103
<b>Discusión</b>	106
<b>Conclusiones</b>	120
<b>Bibliografía</b>	122

## Abreviaturas.

[ <sup>32</sup> P]α-dCTP:	citidina trifosfato marcada radioactivamente en el átomo de fósforo α
°C:	grados Celcius
AT:	agar triptosa
<i>B. abortus</i> :	<i>Brucella abortus</i>
cat:	cloranfenicol acetil transferasa
Cm <sup>R/S</sup> :	resistencia (R) o sensibilidad (S) a cloranfenicol
DO:	Densidad óptica
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EthBr:	Bromuro de etidio
hs:	horas
INTA:	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
ip:	intra peritoneal
Kan <sup>R/S</sup> :	resistencia (R) o sensibilidad (S) a kanamicina
kb:	kilo bases
kDa:	kilo Daltons
LPS:	lipopolisacárido
MCS:	sitio múltiple de clonado (multiple cloning site)
min:	minutos
ORF:	marco de lectura abierto (open reading frame)
PBS:	<i>buffer</i> fosfato salino
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa (polimerase chain reaction)
pd:	post desafío
pi:	post infección
pv:	post vacunación
S19:	cepa vacunal de <i>Brucella abortus</i>
S2308:	cepa virulenta de <i>Brucella abortus</i>
Sac <sup>R/S</sup> :	resistencia (R) o sensibilidad (S) a sacarosa
SENASA:	Servicio Nacional de Sanidad Animal
T°:	temperatura
UFC:	unidades formadoras de colonias

## Resumen

El desarrollo de las técnicas de ADN recombinante permitió la generación de vacunas racionalmente diseñadas. Teniendo esto en cuenta, el objetivo de este trabajo es la obtención de cepas de *Brucella abortus* genéticamente modificadas que puedan ser utilizadas como vacunas contra la brucelosis.

La brucelosis es una zoonosis bacteriana causada por especies del género *Brucella*, un grupo homogéneo de patógenos intracelulares facultativos que tienen la habilidad de sobrevivir y multiplicarse en fagocitos profesionales y no profesionales. En bovinos, *Brucella abortus* produce una enfermedad crónica caracterizada por aborto, nacimiento de terneros enfermos y fertilidad reducida. La cepa vacunal para la brucelosis bovina en uso en la mayoría de los países es la cepa *B. abortus* S19, que confiere un 70 a 80% de protección contra el aborto pero genera dificultades en el serodiagnóstico y conserva considerable virulencia residual para el hombre.

Con el fin de obtener cepas de *B. abortus* que sean compatibles con un ensayo diagnóstico diferencial y que tengan menor virulencia residual que S19, se construyó la cepa doble mutante *B. abortus* INTA1 (I1) por inactivación de los genes *bp26* y *bmp18*. BP26 es una proteína periplásmica inmunodominante durante la infección con *Brucella* que no influye en la persistencia ni en la protección de la cepa en ratones BALB/c. BMP18 es una lipoproteína de membrana externa, también descrita como Omp19, cuya anulación en S19 genera menor capacidad de replicar en el bazo de los ratones aunque con igual persistencia y capacidad protectora.

La cepa INTA1 resultó más atenuada que S19, pero mantuvo su capacidad protectora en el modelo ratón. Esta cepa mostró mayor sensibilidad a temperatura, a agentes hidrofóbicos y a moléculas policatiónicas que S19 y esta sensibilidad fue revertida por una copia funcional del gen *bmp18*. Para determinar la contribución de BMP18 a la virulencia de *Brucella*, se generó la cepa M18v por inactivación de *bmp18* en la cepa patógena *B. abortus* 2308. M18v no mostró diferencias significativas respecto de S2308 en su habilidad para sobrevivir y replicarse en macrófagos, pero fue más atenuada en ratones. Por lo tanto, la falta de expresión de BMP18 generaría desorganización de la membrana externa, haciendo a la bacteria más susceptible a mecanismos bactericidas del suero pero sin afectar significativamente su supervivencia intracelular.

Para evitar el uso de genes que confieren resistencia a antibióticos en el desarrollo de cepas vacunales, se diseñó una estrategia para la generación de mutantes isogénicas utilizando el gen *sacB* como marcador de contraselección. Con esta estrategia, se obtuvo la cepa *B. abortus* M1luc por reemplazo de parte de la secuencia de *bp26* por el gen *luc* en S19 y posteriormente la cepa doble mutante INTA2 (I2) por delección del gen *bmp18* en la cepa M1luc.

Al evaluar las cepas M1luc e I2 en bovinos, la protección obtenida contra el aborto después del desafío con una cepa patógena fue equivalente para S19 y M1luc pero menor para I2. Estos resultados indican que la falta de BP26 no tiene efecto alguno sobre la capacidad de S19 de inducir una respuesta inmune protectora tanto en el modelo ratón como en el hospedador natural. Sin embargo, la falta de expresión de BMP18 en S19 genera menor capacidad protectora en bovinos. En las condiciones de desafío experimental de este ensayo, la respuesta humoral contra BP26 cuantificada por iELISA presentó gran heterogeneidad y bajos niveles de sensibilidad, para parámetros de especificidad óptima.

La estrategia desarrollada para la obtención de mutantes isogénicas en más de un gen sin marcadores de resistencia a antibióticos permitirá la posibilidad de generar cepas de *Brucella* con múltiples mutaciones definidas de manera de obtener cepas vacunales efectivas y seguras para animales y humanos que puedan ser utilizadas en el control de esta enfermedad.

**Palabras clave:** *Brucella*, BP26, BMP18, marcadores no-selectivos, mutantes.

## Abstract

Recombinant DNA technology has led to the development of rationally designed vaccines. In this context, the aim of this project was to develop genetically modified strains of *Brucella abortus* that could be used as vaccines against brucellosis.

Brucellosis is a bacterial zoonosis caused by species from the genera *Brucella*, an homogenous group of intracellular facultative pathogens that have the ability to survive and replicate in professional and non-professional phagocytes. In bovines, *Brucella abortus* produces a chronic disease characterized by abortion, birth of sick calves and reduced fertility. The vaccine strain in use for bovine brucellosis in most countries is *B. abortus* S19. This strain confers 70 to 80% protection against abortion but generates difficulties in serodiagnosis and retains considerable residual virulence for human beings.

The double mutant strain *B. abortus* INTA1 (I1) was constructed by inactivation of *bp26* and *bmp18* genes, with the objective of obtaining strains of *B. abortus* that could have an associated differential diagnostic test and that are less virulent than S19. BP26 is a periplasmic protein that is immunodominant during infection with *Brucella*. The lack of expression of this protein in S19 does not affect the strain persistence or protection capacity in the mouse model. BMP18 is an outer membrane lipoprotein, also reported as Omp19. When its expression was abrogated in S19, the resulting mutant strain showed less replication in mice spleen, suggesting attenuation, although it maintained its protection capacity.

*B. abortus* I1 resulted more attenuated than S19 and retained its protection capacity in the mouse model. This strain showed more sensitivity than S19 to temperature, hydrophobic agents and polycationic molecules, and this phenotype was reverted by a functional copy of *bmp18*. In order to establish BMP18 contribution to *Brucella* virulence, *bmp18* gene was mutated in pathogenic strain *B. abortus* 2308, generating strain M18v. This strain did not show any significant differences respect to S2308 in its ability to survive and replicate in murine macrophages, but was more attenuated in mice. Therefore, lack of expression of BMP18 would disrupt membrane integrity, probably leading to more susceptibility to sera bactericidal mechanisms but not affecting significantly intracellular survival.

In order to avoid the use of antibiotic resistance markers in the construction of vaccine strains, a mutagenesis strategy for obtaining isogenic strains using *sacB* as counterselection marker was developed. With this strategy strains *B. abortus* M11uc (S19  $\Delta bp26::luc$ ) and INTA2 (I2) (S19  $\Delta bp26::luc \Delta bmp18$ ) were obtained, replacing most of *bp26* coding region for *luc* gene in M11uc and then deleting also most of *bmp18* in the double mutant I2, without incorporating drug resistance markers.

When strains M11uc and I2 were evaluated in bovines, protection against abortion was equal for S19 and M11uc but considerably reduced for I2. These results indicate that lack of BP26 has no effect in S19 protection capacity either in mice or the natural host. However, lack of BMP18 in S19 generates less protection capacity in bovines. In the conditions of experimental challenge of this assay, the humoral response against BP26 recombinant protein measured by iELISA after challenge presented high heterogeneity and poor sensitivity respect to LPS response, considering parameters of optimal specificity.

The strategy for generation of mutant isogenic strains in more than one gene without the incorporation of antibiotic resistance markers opens the possibility of achieving strains with multiple defined mutations. This will most certainly lead to effective and safer vaccine strains against brucellosis.

**Key words:** *Brucella*, BP26, BMP18, non-selective markers, mutants.

# **Introducción**

### **Definición de brucelosis.**

La brucelosis es una zoonosis causada por bacterias del género *Brucella*. Afecta a una gran variedad de mamíferos, primariamente bovinos, ovinos, caprinos, cerdos y perros, que pueden contagiar al hombre. En los animales, la infección en las hembras lleva generalmente al aborto, mientras que en los machos genera orquitis y epididimitis, que pueden resultar en infertilidad. En los humanos, se caracteriza por ser una enfermedad febril crónica y debilitante, difícil de tratar con antimicrobianos.

### **Historia del descubrimiento del agente causal de la brucelosis.**

En el siglo XIX, las tropas británicas apostadas en la base militar de la Isla de Malta sufrieron grandes pérdidas por fiebres continuas y recurrentes. Este síndrome febril se encontraba ampliamente distribuido en los países mediterráneos y de Oriente Medio. En 1861, se había logrado diferenciar clínicamente a esta enfermedad de la fiebre tifoidea y de la malaria pero no se sabía cuál era el agente causal.

En 1887 David Bruce, un oficial del equipo médico de la Armada Británica, logró el aislamiento del microorganismo causante de la Fiebre de Malta, a partir del bazo de un soldado que murió al cursar la enfermedad al estar en servicio en dicha isla (Bruce, 1887). Bruce denominó a la bacteria “micrococci”, nombre que luego fue cambiado por *Micrococcus melitensis*, en base al nombre Romano para Malta “Melita”.

En 1904 se creó la Comisión de Fiebre Mediterránea, presidida por Bruce, que condujo una serie de trabajos de los cuales se concluyó que la enfermedad era contraída por tomar leche cruda de cabras aparentemente sanas. Así, al eliminar esta leche de la dieta de los soldados, la enfermedad desapareció de las tropas, lo que marcó el descubrimiento de un método de prevención.

Por la misma época, Bernhard Bang, un investigador danés, publicó los resultados de sus estudios en una enfermedad bovina llamada “aborto contagioso”, encontrando que la misma se debía a la infección del ganado con un agente microbiano al que denominó “Bacillus of abortion” como término general y al que luego se llamó *Bacillus abortus* (Bang, 1906).

Recién en 1917, Alice Evans, bacterióloga del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, sugirió que *M. melitensis* y el bacilo responsable de los abortos en bovinos

estaban tan relacionados que debían considerarse miembros del mismo género, solo aceptándose este hecho algunos años después (Evans, 1949). Así, el género pasó a llamarse *Brucella*, en honor a Sir David Bruce, su primer descubridor.

Más adelante, bacterias del mismo género fueron aisladas de otros animales domésticos como cerdos, ovejas y perros. También se han aislado bacterias de este género de animales salvajes como bisontes, ciervos, alces, antílopes, liebres, jabalíes, coyotes, zorros y lobos, que constituyen reservorios naturales de la enfermedad (Davis, 1990).

### **Descripción de la bacteria.**

Las bacterias del género *Brucella* son cocobacilos Gram-negativos, pequeños (0.5-0.7  $\mu\text{m}$  de diámetro por 0.5-1.5  $\mu\text{m}$  de largo), sin presencia de flagelos y no forman esporas (Metcalf *et al.*, 1994).

Si bien esta bacteria puede sobrevivir en el medio ambiente, su multiplicación se produce dentro de un animal hospedador. Posee la capacidad de invadir y replicar en células fagocíticas y no fagocíticas por lo que se la considera un parásito intracelular extracelular facultativo (Metcalf *et al.*, 1994; Moreno *et al.*, 2002; Köhler *et al.*, 2003;).

*Brucella*, al igual que otras bacterias Gram-negativas, posee una pared celular compuesta por membrana interna y externa que encierran un espacio periplásmico con una malla de péptidoglicano (PG) y componentes solubles. Sin embargo, a diferencia del común de otras bacterias Gram-negativas, esta envoltura es altamente hidrofóbica, resistente a péptidos catiónicos y a detergentes (Blasco *et al.*, 1982).

La membrana externa, por fuera de la capa de péptido glicano, está compuesta por fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS) en su superficie externa, además de proteínas características (Moriyón y Lopez-Goñi, 1998). La estructura del LPS determina si se trata de una cepa lisa (S-LPS) o una cepa rugosa (R-LPS), siendo la diferencia entre ellos el antígeno O presente en el S-LPS.

### **Especies de *Brucella* y su caracterización.**

En el género *Brucella* se reconocen actualmente 6 especies, según el hospedador del que fueron aisladas originalmente: *B. melitensis*, aislada de cabras; *B. abortus*, aislada de vacas; *B. suis*, aislada de cerdos, *B. neotomae* aislada de *Neotoma lepida* (un tipo de rata



del desierto de Utah, en Estados Unidos), *B. ovis*, aislada de ovejas y *B. canis* de perros. Para las tres primeras especies, las cepas virulentas son lisas (expresan el lipopolisacárido conteniendo la cadena O, o S-LPS), mientras que las dos últimas son especies rugosas (lipopolisacárido sin cadena O, o R-LPS), sin perder su patogenicidad para el hospedador natural (Acha y Szyfres, 1986). Se han aislado cepas de *Brucella* de mamíferos marinos (focas, delfines, morsas y ballenas) (Jahans *et al.*, 1997; Clavareau *et al.*, 1998, Bricker *et al.*, 2000) para las cuales se había propuesto inicialmente el nombre *B. maris* que luego, al analizar mayor número de aislamientos, fue cambiado por *B. pinnipediae* y *B. cetaceae* (Moreno *et al.*, 2002; Cloeckert *et al.*, 2003).

El hospedador natural se define como aquel en el que una especie determinada de *Brucella* causa aborto como efecto clínico principal. Sin embargo, las especies pueden potencialmente ser transmitidas a otra especie animal susceptible que usualmente es menos proclive al aborto por esa especie de *Brucella*. En ese sentido, *B. melitensis* es la menos especializada, pudiendo ser transmitida de cabras y ovejas al ganado y al hombre (Banai, 2002).

Las bacterias del género *Brucella* son clasificadas como microorganismos patógenos clase III y consideradas potenciales armas biológicas debido a la ausencia de vacuna para humanos y a la eficiencia de la infección con aerosoles (Boschiroli *et al.*, 2001). Sin embargo, la virulencia de las distintas especies es variable. El hombre es un hospedador accidental y se contagia mayoritariamente por *B. abortus* por ser la especie más difundida en el mundo, aunque no la más patogénica e infecciosa como lo son *B. melitensis* y *B. suis*. Se han reportado casos de brucelosis humana por *B. canis*, aunque en baja frecuencia y también se reportaron casos de brucelosis en personas que tuvieron contacto con las cepas aisladas de mamíferos marinos (Corbel, 1997). Hasta el momento, no se han comprobado casos humanos por *B. neotomae* o *B. ovis*.

Se reconocen tres biovares o biotipos para *B. melitensis* (1-3), 7 para *B. abortus* (1-6 y 9, ya que el 7 y el 8 fueron eliminados) y 5 para *B. suis* (1-5). Las otras especies no se han diferenciado en biovares aunque existen algunas variantes. Las distintas especies se distinguen por características bioquímicas como actividad ureasa, actividad oxidasa, requerimiento de CO<sub>2</sub>, producción de H<sub>2</sub>S y tinción con colorantes; por comportamiento

frente a los sueros monoespecíficos A (*abortus*) y M (*melitensis*) y por sensibilidad a fagos (Metcalf *et al.*, 1994).

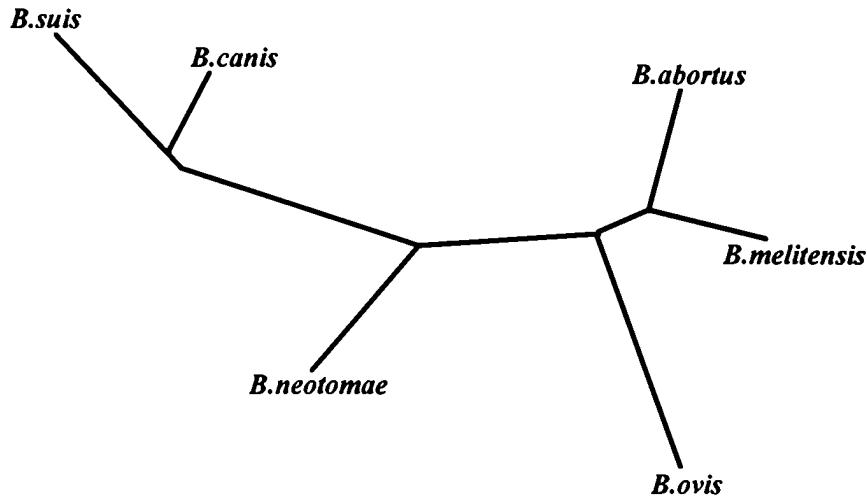
Todas las especies de *Brucella* analizadas presentan homología a nivel de ADN mayor del 90%, justificando la nominación de *Brucella* como género monoespecífico (Verger *et al.*, 1985). Sin embargo, y a pesar de que esta nueva nomenclatura fue adoptada por GenBank, la sugerencia de que todos los tipos sean vistos como biovares de *B. melitensis* ha despertado controversias y se ha encontrado con gran resistencia en el campo práctico, por varias razones. La primera es que si bien existen infecciones interespecíficas, la infección producida por una especie de *Brucella* que no sea aquella más comúnmente encontrada en un animal dado suele ser transitoria y autolimitante, lo que refleja una ancestral adaptación parásito-hospedador (Moreno *et al.*, 2002). A su vez, estudios de los proteomas de *B. abortus* y *B. melitensis* mostraron grandes diferencias a pesar de la alta homogeneidad de los genomas (DelVecchio *et al.*, 2002.b). Por otra parte, dado que no todas las especies de *Brucella* son igualmente riesgosas para la salud humana, se considera que la nueva nomenclatura podría resultar confusa. Por todo esto, ha prevalecido la nomenclatura clásica cuyo concepto es que son especies distintas.

### **Filogenia de *Brucella* spp.**

*Brucella* ha sido clasificada sobre la base de la secuencia del ARNr16S como perteneciente al grupo  $\alpha$ -2 de *Proteobacterias* y tiene una relación filogenética estrecha con *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Ochrobactrum*, *Rickettsia* y *Rhodobacter* (Jumas-Bilak *et al.*, 1998). La mayoría de las  $\alpha$ -*proteobacterias* forman asociaciones pericelulares o intracelulares con células eucariotas vegetales o son patógenos animales. Otras características que relacionan a *Brucella* spp. con estas especies bacterianas son la composición de la membrana (Moreno *et al.*, 1990) y la presencia de más de un cromosoma constituyendo el genoma (Jumas-Bilak *et al.*, 1998).

El análisis de la secuencia del ARNr16S indicaría que la diversificación de las actuales especies de *Brucella* a partir de un ancestro común se produjo aproximadamente hace 10.000 años (Michaux-Charachon *et al.*, 1997). Se han construido árboles filogenéticos para las distintas especies de *Brucella* a partir de la composición de ácidos grasos y análisis de longitud de fragmentos de restricción por electroforesis en campos

pulsados (RFLP-PFGE) (Cherwonogrodzky *et al.*, 1990, Michaux-Charachon *et al.*, 1997). Ambos árboles coinciden notablemente y ubican a *B. abortus* y *B. melitensis* en una misma rama, mientras que *B. suis* con *B. canis* componen una rama aparte. *B. neotomae* y *B. ovis* constituyen ramas independientes.



Árbol filogenético de las 6 especies de *Brucella* (Michaux-Charachon *et al.*, 1997).

### Genética Molecular.

Los estudios del genoma de *Brucella* empezaron a fines de los años '60, y tomaron auge en los '80 con el advenimiento de las técnicas de biología molecular. Recientemente, se han secuenciado los genomas completos de *B. melitensis* 16M (Gen Bank NC 003317 y NC 003318) (DelVecchio *et al.*, 2002 a) y posteriormente *B. suis* 1330 (Gen Bank NC 002969) (Paulsen *et al.*, 2002), a la vez que hay proyectos en curso para secuenciar *B. abortus* 2308 (Sánchez *et al.*, 2001).

El tamaño promedio del genoma de *B. melitensis* es de 3.29 Mb distribuidas en dos cromosomas circulares de 2.12 Mb y 1.18 Mb con 57% de contenido GC. Ambos replicones codifican para funciones metabólicas y replicativas esenciales y por lo tanto son cromosomas y no plásmidos. Hay 3198 marcos de lectura abiertos (ORF) predichos distribuidos en los dos cromosomas (2060 en el cromosoma I y 1138 en el cromosoma II). Sólo la cepa *B. suis* biovar 3 tiene un cromosoma de 3.3 Mb (Boschioli *et al.*, 2001). Se ha propuesto que los dos cromosomas de *Brucella* han evolucionado por recombinación en los loci *rrn* (correspondientes a rARN) a partir de un ancestro común con un único cromosoma circular (Michaux-Charachon *et al.*, 2002).

A pesar de ser un patógeno intracelular, no se han encontrado sistemas de secreción tipo I, II y III o islas de patogenicidad. Paradójicamente, a pesar de no ser móvil, se han encontrado marcos abiertos de lectura que codificarían para la síntesis de flagelo. A su vez, se identificó el sistema *vir* de secreción tipo IV, si bien no se ha encontrado la molécula o el tipo de molécula secretado por él (DelVecchio *et al.*, 2002.a).

Por electroforesis en campos pulsados (PFGE) se ha logrado la construcción de mapas físicos de las cepas de referencia de las distintas especies y biovars del género, mostrando cada una de ellas un patrón característico, idéntico a los aislamientos naturales (Michaux-Charachon *et al.*, 1997). Se ha sugerido que el grado de conservación observado para los aislamientos de un determinado biovar podría ser debido al aislamiento genético de las bacterias individuales, ya que en la naturaleza se multiplican principalmente dentro del hospedador preferencial, y no hay evidencias de traspaso de material genético. No se han detectado plásmidos naturales en este género, aunque en el laboratorio es posible la transformación por conjugación o electroporación con plásmidos de amplio rango de hospedador (Michaux-Charachon *et al.*, 1997).

La secuenciación y posterior análisis del genoma de *B. suis* mostró una alta similitud con el de *B. melitensis*, con un pequeño número de rearrreglos. Se encontraron “islas” únicas para ambos genomas, como una región de 19 kb presente en *B. suis* pero ausente en *B. melitensis*. Sin embargo, la misma no tiene ninguna implicancia en la preferencia de hospedador ni en la virulencia (Paulsen *et al.*, 2002).

### **Epidemiología de la brucelosis.**

La brucelosis es una enfermedad ampliamente distribuida en todo el mundo tanto en humanos como en animales domésticos (Boschiroli *et al.*, 2001). A pesar de que las incidencias y prevalencias reportadas varían de país a país, la infección con *B. abortus* es la forma más difundida.

Sin embargo, la infección por parte de *B. melitensis* a partir de cabras y ovejas infectadas, es la más importante en términos de salud pública (Corbel, 1997). La distribución geográfica de la enfermedad se encuentra circunscripta a las zonas donde hay gran cantidad de estos animales, especialmente si están asociados a prácticas nómades,

como en la mayoría de los países Medio Oriente y regiones de América Latina (Banai, 2002; Nimri, 2003).

### **Situación de la brucelosis en la Argentina.**

En Argentina el sector agropecuario cumple un rol protagónico en la economía del país, conformando el 52 % de las exportaciones. Dentro de este sector, el complejo ganadero (industrias frigorífica, láctea, veterinaria, curtiembre y peletera) es uno de los más importantes, siendo la población bovina aproximadamente 59 millones de cabeza de ganado, de las cuales el 78% se encuentra en la región pampeana (SENASA, 2000).

La brucelosis bovina por *B. abortus* tiene una prevalencia en el país de aproximadamente el 6% (Robles, 2003). En la región de la Patagonia también hay una alta incidencia de brucelosis ovina causada por *B. ovis*. La brucelosis caprina se encuentra principalmente en el norte del país, con una prevalencia de *B. melitensis* biovar 1 estimada en alrededor del 25%. También existe, con menos incidencia, brucelosis porcina por *B. suis* (SENASA, 2000).

En caso de las infecciones por *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*, el problema se agrava al transmitirse la enfermedad a humanos. Los casos de brucelosis humana más frecuentes se producen en habitantes rurales, veterinarios, personal de laboratorio, personal de mataderos y tamberos, siendo muy difícil disponer de datos epidemiológicos certeros (Franco *et al.*, 1999).

Las pérdidas económicas que provoca la brucelosis bovina fluctúan de 52 a 60 millones de dólares anuales por el impacto productivo que ocasiona en pérdida de terneros por abortos, pérdidas en la producción de leche por disminución de pariciones, pérdidas de peso al engorde y por incremento en la reposición de vaquillonas (SENASA, 2000). En cuanto al comercio internacional, son varios los países que establecen restricciones a los productos y subproductos de origen animal, principalmente los lácteos, quedando nuestro país en una situación de desventaja respecto a sus competidores (EEUU, Canadá, Australia y Nueva Zelandia) que se encuentran en situaciones sanitarias más ventajosas.

La forma de prevención y control de la enfermedad en bovinos se realiza, desde 1966, por medio de la vacunación de las terneras entre 3 y 10 meses de edad con la cepa lisa atenuada *B. abortus* 19. Desde 1994, SENASA ha implementado un plan de control y

erradicación de la brucelosis bovina que consiste, resumidamente, en vacunación sistemática y posterior seguimiento por diagnóstico serológico de los rodeos. Luego de tres muestreos negativos consecutivos a los 60, 120 y 365 días, se considera un rodeo libre de brucelosis.

En 1998 se aprobó condicionalmente el uso de la vacuna *B. abortus* RB51 en hembras mayores de 10 meses y hasta 3 meses de preñez. Esto se debe a que la vacuna RB51 no despierta anticuerpos contra LPS que puedan confundir el serodiagnóstico. En rodeos con alta incidencia de brucelosis bovina, la revacunación con RB51 contribuyó al control de la enfermedad (Samartino, 2002). La vacuna *B. melitensis* REV 1 para ovejas y cabras no está autorizada en el país, probablemente debido a la dificultad en el seguimiento y control de estos rodeos y la peligrosidad que representa esta cepa por su alta patogenicidad residual (Samartino, 2002).

Dado que la brucelosis es una zoonosis estricta, la clave para el control de la enfermedad en los humanos es el control de la enfermedad en los animales.

### **La enfermedad en los animales.**

El síntoma principal en todas las especies es el aborto o la expulsión prematura de los fetos, salvo en el caso de infecciones por *B. ovis* donde la epididimitis del carnero es la manifestación principal. En los bovinos la infección es generalmente por *B. abortus*, si bien también pueden infectarse con *B. suis* o *B. melitensis* cuando comparten el pastoreo o las instalaciones con cerdos, cabras u ovejas infectados. El período de incubación es variable, dependiendo de la virulencia de la cepa, la dosis infectiva, la vía de infección y la susceptibilidad del animal. Las hembras no preñadas no presentan síntomas clínicos, mientras que en hembras preñadas, el signo predominante es el aborto en la segunda mitad de la preñez o bien el nacimiento de terneros muertos o débiles. En los toros las bacterias pueden localizarse en los testículos y en las glándulas genitales anexas, manifestándose la enfermedad con aumento de volumen de los testículos e infertilidad.

La fuente principal de infección bovina son los fetos, las envolturas fetales y las descargas vaginales que contienen gran número de bacterias. La vía de invasión más frecuente es el tracto gastrointestinal, aunque también puede haber infección con aerosoles en ambientes cerrados e infección por el uso de semen contaminado.

Las *Brucellas* que penetran en el organismo animal, son rápidamente fagocitadas por leucocitos polimorfonucleados, en los que sobreviven. Se multiplican primero en los ganglios regionales y luego son conducidas por la linfa y la sangre a los nódulos linfáticos, bazo, hígado, médula ósea y órganos reproductivos (Smith y Ficht, 1990).

La razón por la que *Brucella* produce abortos en sus hospedadores primarios es el impacto endotóxico causado por su capacidad de replicar dentro de las células trofoblásticas placentarias (Samartino *et al.*, 1994). *Brucella* es una de las pocas bacterias capaces de metabolizar eritritol, un poliol de cuatro carbonos, el cual se halla en testículos, vesículas seminales y en los productos de la concepción en rumiantes y cerdos preñados (Sperry y Robertson, 1975, Essenberg *et al.*, 2002).

Si bien se considera que el eritritol es un potente factor de localización tisular para las especies relevantes, su rol no se encuentra completamente elucidado, ya que la cepa vacunal *B. abortus* 19 es incapaz de metabolizarlo y, en algunos casos, puede producir abortos en bovinos (Smith y Ficht, 1990). Lo mismo sucede en *B. canis* y *B. ovis*, donde abortos y placentitis son un síntoma de la enfermedad animal y sin embargo ambas especies son incapaces de utilizar este compuesto como fuente de carbono (Corbel, 1997). En cobayos, los cuales no producen eritritol, también se producen abortos ante la infección con *Brucella* de animales preñados (García-Carrillo, 1990).

### **La enfermedad en el hombre.**

La transmisión al hombre es causada por contacto con animales o productos animales infectados, por consumo de productos lácteos frescos no pasteurizados, por inhalación de aerosoles infectantes o por exposición ambiental. Los vehículos más frecuentes de infección son los quesillos frescos y la leche cruda de cabra u oveja infectada por *B. melitensis*, mientras que la leche de vaca y los productos lácteos que contienen *B. abortus* pueden dar origen a casos esporádicos (Acha y Szyfres, 1986). La prevalencia más alta se encuentra en áreas con tasas elevadas de brucelosis por *B. melitensis* en caprinos u ovinos o en ambas especies.

El período de incubación en general dura de una a tres semanas, pero a veces puede prolongarse por varios meses. La aparición de la enfermedad puede ser abrupta o paulatina, siendo frecuentes las infecciones subclínicas. Es una enfermedad septicémica, con fiebre

continua, intermitente o irregular, que puede variar de normal en la mañana a 40°C en la tarde, con sudores profusos que se caracterizan por un olor particular.

Los síntomas comunes son inespecíficos y abarcan insomnio, impotencia sexual, constipación, anorexia, cefalalgia, artralgias, dolores generalizados, irritación, nerviosismo y depresión. La enfermedad se puede presentar con ganglios periféricos aumentados de volumen, esplenomegalia y hepatomegalia, pero raramente ictericia. Muchos pacientes se recuperan espontáneamente entre los 3 y 12 meses, pero otros pueden sufrir fuertes exacerbaciones de la enfermedad que incluyen la característica fiebre ondulante, en la que la intensidad de la fiebre y los síntomas recurren y desaparecen en intervalos de 10 días. Pueden aparecer recaídas después de varios meses de un primer episodio, aún después de un tratamiento que aparentemente haya sido efectivo. Se ha descrito la aparición de complicaciones que incluyen artritis, espondilitis (en aproximadamente 10% de los casos), afección del sistema nervioso central incluyendo meningitis (en aproximadamente 5% de los casos) y ocasionalmente orquitis del epidídimo. Si bien el aborto es un signo común en la enfermedad de animales domésticos, no es un rasgo de la enfermedad en mujeres (Young, 1995).

### **Virulencia.**

Para establecerse y causar enfermedad en humanos y animales, *Brucella* spp. invade y prolifera en fagocitos profesionales y en células no fagocíticas. Los fagocitos han desarrollado varios mecanismos de defensa para eliminar patógenos. Estos son el estallido oxidativo, la acidificación de fagosomas y la fusión de fagosomas y lisosomas. A su vez, los patógenos intracelulares han desarrollado diferentes estrategias para sobrevivir y multiplicarse dentro de su hospedador.

### **Invasión celular.**

Una vez que *Brucella* invade la mucosa, los macrófagos, neutrófilos y células M residentes de la submucosa (fagocitos profesionales) ingieren la bacteria por fagocitosis. Las *Brucellas* opsonizadas son internalizadas vía complemento y receptores Fc en macrófagos y monocitos, mientras que se postula que las *Brucellas* no-opsonizadas entrarían vía receptores de fibronectina o lectina. Además de la necesidad de receptores, la



entrada de la bacteria requiere de gasto de energía por parte de la célula hospedadora (Gorvel y Moreno, 2002). El análisis del genoma ha revelado la presencia de marcos abierto de lectura con homología a adhesinas e invasinas (Del Vecchio *et al.*, 2002a), pero la funcionalidad de los mismos no ha sido evaluada hasta el momento.

### **Tráfico intracelular.**

Una vez que las cepas virulentas de *Brucella* entran a la célula, la bacteria modula su tráfico intracelular, hasta alcanzar su nicho replicativo. Sin embargo este tráfico no es homogéneo en todas las células. Se ha descrito que entre el 15 y 30% de macrófagos infectados en cultivo muestra replicación intracelular después de 48 horas, lo que indicaría que sólo una parte de las bacterias es capaz de alcanzar efectivamente su nicho replicativo intracelular (Gorvel y Moreno, 2002).

En células HeLa (modelo celular para células no fagocíticas) durante los primeros minutos posteriores a la internalización, las cepas virulentas, como *B. abortus* 2308, se localizan en endosomas tempranos. Esta asociación es transiente ya que las bacterias son luego transportadas por el sistema autofágico, formando un autofagosoma, que posteriormente adquiere marcadores de retículo endoplásmico (RE). En ningún momento, hay colocalización con catepsina D, indicando que no hay fusión de estos fagosomas con los lisosomas (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998). La morfología del compartimento final donde replican las *Brucellas* difiere de los autofagosomas en que es rodeado por una única membrana y se encuentra en el área perinuclear de las células infectadas (Gorvel y Moreno, 2002). Dadas las características particulares de las estructuras membranosas donde se replican las bacterias de este género, se ha propuesto que las mismas generan la formación de su propio compartimento intracelular, para el que se ha propuesto el término “brucelosoma” (Köhler *et al.*, 2002 y 2003).

En la línea celular de macrófagos murinos J774 (modelo celular para fagocitos profesionales), se observó que *B. abortus* 2308 altera el transporte a los compartimentos hidrolíticos y previene la fusión con los nuevos endosomas aunque no previene la acidificación del fagosoma. A diferencia de lo observado en células HeLa, un número muy reducido de bacterias fue encontrado en vesículas con marcadores de retículo endoplásmico (Arenas *et al.*, 2000). Además, en tiempos tardíos (más de 24 horas), se observó fusión de

las vesículas conteniendo *Brucella* con lisosomas ya formados. Sin embargo, las bacterias presentes en estos compartimentos lucían intactas morfológicamente (Arenas *et al.*, 2000). Esto indica que la bacteria logra demorar la fusión con el lisosoma y, cuando ésta finalmente ocurre, es resistente al medio ambiente lisosomal. Se ha reportado que la acidificación de los fagosomas induce la expresión de genes necesarios para la supervivencia intracelular (Rafie-Kolpin *et al.*, 1996) y es necesaria para la replicación intracelular de *B. suis* en macrófagos J774 (Porte *et al.*, 1999).

Esta diferencia observada en el transporte intracelular en fagocitos profesionales y no profesionales podría deberse a diferencias inherentes a ambos tipos celulares. En los macrófagos, que tienen una vía endocítica más activa que las células HeLa, el mecanismo empleado por *Brucella* no sería suficiente para prevenir permanentemente la fusión con los compartimentos tardíos, por lo que los fagosomas eventualmente madurarían a fagolisosomas (Arenas *et al.*, 2000). Sin embargo este tema permanece controversial y son necesarias nuevas evidencias para clarificarlo.

#### **Factores de virulencia y estructura antigénica.**

A diferencia de otras bacterias patógenas, en *Brucella* no se han encontrado factores de virulencia clásicos como exotoxinas, citolisinas, cápsulas, fimbria, flagelos, formas de resistencia o variación antigénica. En los últimos años se han identificado numerosos genes de *Brucella* involucrados en la virulencia de la bacteria por obtención de mutantes de fenotipo atenuado en modelos *in vitro* o *in vivo*. Los más relevantes se detallan a continuación.

**LPS.** El lipopolisacárido (LPS) es un constituyente de la membrana externa de bacterias Gram-negativas. Consiste en una región proximal, hidrofóbica compuesta por el lípido A, una región central o *core* y una cadena polisacárida externa "O". El polisacárido O es inmunodominante y se encuentra presente en las cepas lisas (S-LPS) y ausente en las cepas rugosas (R-LPS) (Nikaido y Vaara, 1987). La reactividad de los anticuerpos contra el antígeno O es la base para todas las pruebas actuales de diagnóstico.

En *Brucella*, el lípido A consiste en una estructura carbonada de glucosaminil- $\beta$ (1-6)glucosamina sustituida con ácidos grasos saturados. El *core* contiene glucosa, manosa y quinovosamina y está unido al lípido A por vía del 2-ceto-deoxioctonato (KDO).

El antígeno O es un polisacárido formado por un homopolímero de  $\alpha$ -1,2 4-formamido-4,6-dideoxi-D-manosa (N-formil-perosamina), en las cepas con epítipo A dominante, característico de *B. abortus* (serotipo A), pero  $\alpha$ -1,3 cada 5 residuos en las cepas con epítipo M dominante, característico de *B. melitensis* (serotipo M). Las uniones  $\alpha$ -1,3 hacen predecir que el serotipo M establece uniones intercatenarias más laxas en la capa externa polisacárida de la membrana externa, lo que podría explicar las diferencias físicas en la superficie de los distintos serotipos. Todas las cepas lisas de *Brucella* contienen ambos tipos de polisacáridos constituyendo su LPS, pero siempre existe uno preponderante que determina el serotipo al cual pertenecen (Moriyon y Lopez-Gofñi, 1998).

En general, las cepas rugosas son menos virulentas y menos resistentes al ataque por complemento que las cepas lisas, por lo que el LPS es considerado el factor de virulencia principal de *Brucella*. Sin embargo, las cepas virulentas de *B. ovis* y *B. canis* son rugosas, lo que indica que hay otros factores que influyen en la virulencia.

Se han identificado los genes *pgm*, *rfbE*, *pmm* y *wboA* cuyos productos están involucrados en distintas etapas de la síntesis de LPS. Al inactivar estos genes, se obtuvieron cepas rugosas con distintos grados de conservación del antígeno O. Todas ellas resultaron atenuadas en modelos animales de experimentación. Sin embargo, mutantes de *B. abortus* 2308 en los genes *pgm* y *rfbE* no presentaron deficiencias en su replicación intracelular en células HeLa y macrófagos murinos, respectivamente (Ugalde *et al.*, 2000). Estos resultados han llevado a postular que la atenuación de las cepas rugosas se debe a que el LPS tendría un rol principalmente en la supervivencia extracelular de la bacteria, controlando la lisis mediada por complemento (Ko y Splitter, 2003).

**Otros polisacáridos.** Los glucanos cíclicos  $\beta$ (1-2) son polisacáridos periplásmicos osmoregulados que, en *Agrobacterium tumefaciens* y *Sinorhizobium meliloti*, son necesarios para la inducción del tumor o la invasión del nódulo, respectivamente. En *Brucella* este azúcar es producido por una enzima codificada por el gen *cgs*. Mutantes de *B. abortus* S19 en este gen resultaron más atenuadas que la cepa parental. Cuando se mutó el

gen en *B. abortus* 2308, sin embargo, el grado de atenuación fue muy leve indicando posibles diferencias en el rol o la interacción de estos glucanos con otras moléculas en ambas cepas (Briones *et al.*, 2001).

**Proteínas de membrana externa.** Las proteínas principales de membrana externa (Omps) de *Brucella* spp. fueron inicialmente identificadas en los años '80 por extracción de la envoltura celular, y clasificadas de acuerdo a su peso molecular aparente en geles desnaturizantes de poliacrilamida como grupo 1 ( 88-94 kDa), grupo 2 (36-38 kDa) y grupo 3 (31-34 y 25-27 kDa). Las diferencias en el peso molecular observado se deben muy probablemente a asociaciones con unidades de péptido glicano (PG).

El grupo 1 es en realidad una única proteína cuya función no ha sido aún elucidada aunque ha sido identificado y clonado el gen que la codifica (Cloeckaert *et al.*, 2002).

El grupo 2 está integrado por dos proteínas clasificadas como porinas, codificadas por dos genes con homología del 85%, *omp2a* y *omp2b* (Cloeckaert *et al.*, 1996). Las diferencias entre estos genes han servido para diseñar ensayos de PCR y RFLP que diferencian cepas de *Brucella* y permiten hacer correlaciones con el desarrollo evolutivo del género (Cloeckaert *et al.*, 2002).

El grupo 3 está conformado por dos proteínas con una identidad del 40 % entre sí, de 25 y 31 kDa, codificadas por los genes *omp25* y *omp31*, respectivamente. El gen *omp25* se encuentra altamente conservado entre las especies y biovares de *Brucella*, salvo por una pequeña delección en *B. ovis*. Mutantes de *omp25* en las cepas virulentas *B. abortus* 2308, *B. melitensis* 16M y *B. ovis* 63/290 resultaron atenuadas en ratones (Edmonds *et al.*, 2001 y 2002), demostrando que esta proteína está involucrada en la virulencia de estas cepas. El gen *omp31*, por otro lado, se encuentra en todas las especies de *Brucella* salvo en *B. abortus*. Todas las cepas de referencia de *B. abortus* tienen una delección de 25 kb que comprende el gen *omp31* y un grupo de genes que estarían relacionados con la síntesis de un polisacárido que todavía no ha sido caracterizado (Vizcaino *et al.*, 1997 y 2001). La función de Omp31 aún no ha sido elucidada, si bien se especula que podría tratarse de una porina (Cloeckaert *et al.*, 2002). Además, en el genoma de *B. melitensis* se han identificado por lo menos 5 genes que codifican para proteínas con alta homología con las Omp del grupo 3 cuya función todavía no ha sido estudiada (DeVecchio *et al.*, 2002a).

**Lipoproteínas.** Se ha descrito en *Brucella* una lipoproteína similar a la lipoproteína de Braun de *E. Coli*, que se encuentra covalentemente unida al péptido glicano (PG) y se postula que es responsable de mantener la unión entre el mismo y la membrana externa (Moriyon y Lopez-Goñi, 1998).

A su vez, se identificaron tres lipoproteínas de bajo peso molecular minoritarias de la membrana externa en *B. abortus*: Omp 19, Omp 16 y Omp 10 (Tibor *et al.*, 1999). Por estudio de su secuencia de aminoácidos, Omp 16 presenta similitud con las lipoproteínas asociadas a peptidoglicano (PALs) de muchas bacterias Gram-negativas y se ha propuesto que podría estar asociada al peptidoglicano, anclada del lado periplásmico de la membrana externa por su residuo lipídico (Tibor *et al.*, 1999). Omp 10 y Omp 19 no presentan homólogos funcionales en las bases de datos. En un estudio previo con anticuerpos monoclonales y microscopía electrónica sobre células inactivadas, se demostró que la mayoría de las Omp de *Brucella* tienen epítopes en la superficie de las cepas lisas, si bien el grado de exposición sería variable (CloECKaert *et al.* 1990).

Omp 19 también ha sido clonada a partir de *B. abortus* S19 y reportada como BMP18 (Rossetti *et al.*, 1991). Mutantes de *B. abortus* S19 en *bmp18*, no presentaron la replicación característica de S19 a las 3 semanas post infección si bien persistieron por el mismo tiempo en ratones BALB/c, sugiriendo un rol para esta proteína en los estadios tempranos de infección (Cravero *et al.*, 1993). Recientemente se ha reportado que mutantes en *omp10* y en *omp19* de la cepa virulenta *B. abortus* 544, resultaron atenuadas en ratones sugiriendo que tienen un rol en la virulencia de la bacteria (Tibor *et al.*, 2002).

**Sistema de dos componentes *bvrR-bvrS*.** Estos genes codifican para un sistema de dos componentes que consiste en una proteína histidin-kinasa reguladora y una proteína sensora, altamente similar a los sistemas ChvG-ChvI de *Agrobacterium tumefaciens*, ExoS-ChvI de *Sinorhizobium meliloti* y equivalentes a los sistemas PhoP-PhoQ de *Salmonella* y BvgA-BvgS de *Bordetella bronchiseptica* (Solá-Landa *et al.*, 1998). En *Brucella*, se ha demostrado que este sistema regula la expresión de Omp 25 y otras Omps del grupo 3, y es necesario para mantener la homeostasis de la membrana externa. Las mutantes en este sistema presentan problemas en la invasión y supervivencia en fagocitos profesionales y no

profesionales, y esta deficiencia no se debería únicamente a la falta de Omp 25, sino a un grupo de factores controlados por BvrS-BvrR (Guzmán-Verri *et al.*, 2002).

**Sistema de secreción Tipo IV.** Se ha encontrado casi simultáneamente un sistema de secreción tipo IV homólogo al sistema *virB* de *Agrobacterium tumefaciens* y a los genes *ptI* de *Bordetella pertussis*, en *B. suis* (O'Callaghan *et al.*, 1999) y *B. abortus* (Sieira *et al.*, 2000), y ha sido denominado operón *vir*. En *Agrobacterium* estos genes codifican para una estructura necesaria para la transferencia del ADN a la célula eucarionte. En *Bordetella* este sistema codifica para la maquinaria necesaria para secreción de la toxina pertúsica. El análisis de la secuencia de ADN del operón *vir* de *B. suis* reveló la presencia de 12 marcos abiertos de lectura (ORFs) que codifican para 11 homólogos a las proteínas codificadas por el plásmido Ti de *Agrobacterium* y un ORF 12 que codifica para una posible lipoproteína (O'Callaghan *et al.*, 1999).

El operón se induce después de la entrada al macrófago, y la acidificación del fagosoma es esencial para que esta activación ocurra (Boschioli *et al.*, 2002a). Toda la región *vir* es necesaria para la supervivencia y la multiplicación intracelular de *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus* (Boschioli *et al.*, 2002b). La función del operón *vir* estaría relacionada con la inyección de moléculas efectoras en la célula huésped, para redireccionar el tráfico intracelular y permitir a la bacteria alcanzar su nicho replicativo (Comerci *et al.*, 2001; Delrue *et al.*, 2001), si bien aún no se ha podido identificar la molécula secretada (Sexton y Vogel, 2002).

**Sistema de Quorum Sensing (QS).** El sistema de *quorum sensing* es un sistema que controla la expresión de genes en respuesta a un aumento en la densidad celular y ha sido descrito para numerosas bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Esta regulación se logra por la producción y posterior liberación de una molécula pequeña o feromona que, cuando su acumulación alcanza cierto nivel, es sensada por una proteína sensora (codificada por genes con similitud al gen *luxS* de *Vibrio fischeri*) y activa a un regulador transcripcional (codificado por un gen con similitud a *luxR*) llevando a la activación o represión de los genes blanco. En la mayoría de las bacterias Gram-negativas la molécula señal es una N-acyl homoserin lactona (HSL). Se han identificado dos moléculas de estas

características en el sobrenadante de *Brucella melitensis* 16M: una HSL de 12 carbonos (C12-HSL) y una molécula más pequeña (3-oxo-C12-HSL) (Taminiau *et al.*, 2002). A su vez, también se ha encontrado un homólogo al gen *luxR*. Sin embargo, no se ha encontrado ningún gen con similitud a *luxI*, que es el responsable de la síntesis de la HSL (Letesson *et al.*, 2002).

Dado que las mutantes en *luxR* daban el mismo patrón de comportamiento intracelular que las mutantes en *vir*, se buscó una relación entre ambos sistemas. Se encontró que al aumentar la concentración de C12-HSL, disminuye la transcripción del operón *vir* (Taminiau *et al.*, 2002). La hipótesis planteada es que por medio de su sistema de *quorum sensing*, las bacterias “sensan” que han alcanzado su nicho replicativo, no siendo ya necesaria la expresión de los genes *vir*.

**Genes flagelares.** Si bien las *brucellas* están descritas como no móviles, se han encontrado en *B. abortus* marcos abiertos de lectura con alta similitud a genes que codifican para las proteínas flagelares FliF, FlgE y FliC (Halling *et al.*, 1998). Más recientemente, con la disponibilidad de la secuencia del genoma de *B. melitensis*, se encontraron además 28 genes flagelares, distribuidos en tres grupos en el cromosoma pequeño. Están todos los genes estructurales para la construcción del flagelo pero no se encontraron los receptores quimiotácticos o transductores de señal. La organización de estos tres grupos de genes es altamente similar a la organización en *Mesorhizobium loti*. Además se encontraron homólogos a los genes *motC* y *motD*, involucrados en movilidad en *Sinorhizobium meliloti* (Letesson *et al.*, 2002). Por análisis con mutantes por transposición de promotores que se inducen *in vivo* en el ratón, se descubrió que el promotor *fliF* se induce intracelularmente (Lestrade *et al.*, 2000), lo que sugiere que los genes flagelares no son remanentes evolutivos sino que tendrían una función en la supervivencia intracelular de la bacteria. Se ha demostrado en *B. abortus* la expresión de los genes flagelares putativos (*fliQ*, *fliL*) es controlada por el regulador transcripcional CtrA (Letesson *et al.*, 2002).

**Transportadores de membrana.** El gen *exsA* de *Sinrhixobium meliloti* codifica para un transportador ABC (ATP- Binding Cassete) del exopolisacárido succinilglicano

(EPS I), siendo EPS I esencial para la invasión de nódulos de alfalfa. Se identificó, clonó y mutó el gen *exsA* de *B. abortus*, obteniéndose una mutante atenuada en ratones BALB/c (Rosinha *et al.*, 2002). Aún resta evaluar si la atenuación se debe únicamente a la falta del exopolisacárido o si este transportador cumple alguna otra función biológica en *Brucella*.

Por otro lado, el gen *bacA* codifica para una proteína de membrana interna con alta homología con la proteína BacA de *Sinorhizobium meliloti*, necesaria para el establecimiento de la simbiosis intracelular de esta bacteria con las raíces de alfalfa. BacA es un transportador de moléculas similares a bleomicina y tiene un rol en la estructura y composición del LPS. Mutantes de *B. abortus* 2308 en este gen presentaron marcada atenuación tanto en macrófagos como en ratones, sugiriendo un rol conservado en la relación bacteria- célula huésped (Le Vier *et al.*, 2000).

**Proteínas de respuesta al estrés.** Los patógenos que permanecen en el macrófago, probablemente expresen una variedad de genes que los ayudan a adaptarse al ambiente adverso que encuentran en cuanto a pH, intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno (ROIs y RNIs) y falta de nutrientes. Así, las primeras proteínas que se expresan son aquellas involucradas en la respuesta al estrés e involucran chaperonas y proteasas necesarias para degradar las proteínas dañadas. No todas las proteínas de respuesta a estrés encontradas en *Brucella* resultaron necesarias para la supervivencia intracelular. Así, mientras que mutantes que no expresan Hsp70 (*dnaK*) o proteasa Lon (*lon*) resultaron atenuadas (Elzer *et al.*, 1996; Robertson *et al.*, 2000 b), no lo fueron las mutantes en la serin proteasa A (*htrA*), sugiriendo probable redundancia en su función (Philips y Roop, 2001).

**Cu-Zn SOD y Catalasa.** Las proteínas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa son parte de un sistema de defensa que protege a las bacterias de los efectos tóxicos de los intermediarios reactivos del oxígeno, convirtiendo los radicales superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno. En *Brucella* se han encontrado Mn-SOD, que se expresa en el citoplasma y Cu-Zn SOD, que se expresa en periplasma, mientras que la única actividad catalasa conocida se encuentra en el periplasma. La ubicación periplásmica sería importante en la protección de las bacterias a compuestos oxidativos externos. Sin embargo, mutantes en Cu-Zn SOD tanto de *B. abortus* S19 como de 2308 no presentaron atenuación



incrementada en modelos celulares y solo fueron moderadamente atenuadas en ratones (Latimer *et al.*, 1992; Roop *et al.*, 2003). Mutantes en el gen *kat* que codifica para catalasa, resultaron más susceptibles a la muerte por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero aún no se realizaron ensayos en modelos celulares o animales (Kim *et al.*, 2000). Por lo tanto, el rol de estos sistemas para la supervivencia intracelular de *Brucella* es aún confuso.

**Proteínas necesarias para el mantenimiento de la fase estacionaria.** La chaperona de ARN HF-1, codificada por el gen *hfq1*, es una proteína abundante que participa en numerosos caminos regulatorios en *E. coli*. Actúa post-transcripcionalmente para regular la expresión del factor sigma alternativo, RpoS, necesario para el mantenimiento de la fase estacionaria. Mutantes de *B. abortus* en el gen *hfq1*, mostraron un defecto generalizado en la fisiología de fase estacionaria y resultaron atenuadas tanto en macrófagos como en ratones (Robertson *et al.*, 1999). Por comparación de electroforesis en dos dimensiones de la cepa salvaje *B. abortus* 2308 y de la correspondiente mutante en *hfq1*, se identificaron numerosas proteínas cuya expresión depende de HF-1 en fase estacionaria (por una revisión bibliográfica ver Roop *et al.*, 2003). Sin embargo, no se han encontrado genes inequívocamente homólogos a *rpoS* en el genoma de *B. melitensis* o *B. suis*, o en ningún género perteneciente a las  $\alpha$ -proteobacterias, lo que implica que el mecanismo de acción de HF-1 en este grupo es todavía incierto.

**Proteínas involucradas en la utilización del hierro.** El hierro es el ion metálico más abundante de los sistemas biológicos y está involucrado en numerosos procesos metabólicos. La concentración de hierro dentro del macrófago es baja, limitando la replicación de las bacterias intracelulares que han debido desarrollar sistemas muy eficientes para adquirir hierro. Se ha identificado el operón *ent* como necesario para la síntesis de sideróforos en *B. abortus*, si bien su rol en la virulencia no está claro (Gonzalez Carreró *et al.*, 2002).

Por otro lado, la enzima ferroquelatasa (HemH) cataliza la incorporación de un ion ferroso en la protoporfirina IX, en el último paso del camino biosintético del grupo hemo. Este grupo participa como cofactor de enzimas involucradas en el transporte de oxígeno,

reacciones oxidativas y transducción de señales. En *B. abortus*, mutantes *hemH* resultaron en auxotrofia para hemina y atenuación en modelos celulares (Almirón *et al.*, 2001).

### **Respuesta inmune contra *Brucella*.**

La respuesta del hospedador a la infección con *Brucella* es tanto humoral como celular y es básicamente similar en todas las especies animales susceptibles. Durante el curso de la infección, *Brucella* se mantiene principalmente asociada a la célula hospedadora, por lo tanto se necesita matar a la bacteria intracelularmente o que la célula hospedadora muera para que otros mecanismos, como los mediados por anticuerpos intervengan (Golding *et al.*, 2001). En la infección con *Brucella*, como en la mayoría de las infecciones, los diferentes componentes del sistema inmune actúan juntos para proveer una respuesta coordinada.

### **Inmunidad Innata.**

La inmunidad innata es la respuesta inmune no específica en la etapa temprana de la infección, antes de que se establezca la inmunidad adaptativa mediada por selección clonal de linfocitos específicos. La patogenicidad de las bacterias está relacionada con su habilidad para resistir a los mecanismos de la inmunidad innata: lisis por complemento, muerte por células NK y fagocitosis por macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. El papel de los diferentes componentes que median esta respuesta en un hospedador infectado con *Brucella* se analiza a continuación.

**i. Complemento.** El complemento es un sistema de proteínas plasmáticas que interacciona con la superficie bacteriana para opsonizar o matar a los patógenos formando un complejo de ataque en la membrana de las bacterias Gram-negativas. Hasta el momento se han elucidado 3 mecanismos de activación: i) el mecanismo clásico, mediado por el complejo antígeno-anticuerpo; ii) el camino alternativo, inducido por estructuras de la superficie del microorganismo, independiente de anticuerpos; y iii) el camino de lectinas, activado por la unión de lectina a los carbohidratos de la superficie bacteriana. Recientemente se ha sugerido que en el caso de infecciones con *Brucella*, tanto el camino clásico como el mediado por lectinas son los responsables de la muerte extracelular mediada por complemento (Fernández-Prada *et al.*, 2001). El antígeno humoral dominante

en *Brucella* es el S-LPS (Cherwonogrodzky *et al.*, 1990). Sin embargo, las cepas lisas de *B. abortus* pueden resistir a la muerte mediada por complemento bovino (incluso en presencia de anticuerpos específicos) mientras que las cepas rugosas mueren rápidamente por acción del complemento sérico (Corbeil *et al.*, 1988).

**ii. Células NK.** Las células NK son linfocitos grandes que no expresan marcadores T o B y que contienen numerosos gránulos citoplasmáticos que son capaces de lisar células infectadas o tumorales (Abbas *et al.*, 1997). En ratones, estas células no cumplen una función importante en el control de la infección con *Brucella*. Se ha descrito que el IFN $\gamma$  en la fase inicial de la infección con *Brucella* proviene de los linfocitos T y no de las células NK (Baldwin y Roop, 1999). Ratones deficientes en células NK (como resultado de depleción con anticuerpos anti-NK), no mostraron diferencias en el número de bacterias en hígado y bazo respecto de ratones normales, cuando fueron infectados con una cepa virulenta de *Brucella* (Ko y Splitter, 2003). Esto no significa necesariamente que las células NK no tengan un rol en la protección contra *Brucella*, pero sugiere que otros componentes de la respuesta inmune son suficientes para el control de la infección en ausencia de una respuesta NK funcional.

**iii. Fagocitos polimorfonucleados (PMN) o neutrófilos.** Los PMN o neutrófilos son células de ciclo celular corto, abundantes en sangre, cuya función principal es la fagocitosis. Dado que *Brucella* sobrevive en los PMN, se ha sugerido que podrían actuar como vehículo para transportar las bacterias hasta tejidos linfáticos (Ko y Splitter, 2003).

**iv. Macrófagos y Células Dendríticas (CD): Células Presentadoras de Antígeno (CPA).** Las CPA se encuentran estratégicamente bajo la piel y en las mucosas y fagocitan inicialmente de manera no específica a los microorganismos en el caso de infección. Las bacterias internalizadas mueren y son procesadas resultando en la expresión de péptidos bacterianos en la superficie de las CPAs en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Las células T reconocen a los complejos péptido-MHC. Las células T activadas, activan a su vez a las CPAs por producción de citoquinas específicas. Esto da origen a la respuesta inmune adquirida o adaptativa.

### **Inmunidad adaptativa o adquirida.**

La inmunidad adaptativa se desarrolla en respuesta a la infección y es crucial para proveer función de memoria, que es el componente clave de la vacunación. Esta respuesta se clasifica en inmunidad humoral e inmunidad mediada por células.

La respuesta protectora contra bacterias intracelulares es la inmunidad celular o CMI (Abbas *et al.*, 1997). Consiste en dos tipos de reacciones: la muerte de las bacterias fagocitadas como resultado de la activación del macrófago por los linfocitos T, principalmente por la acción de INF- $\gamma$ , y la lisis de células infectadas por linfocitos CD8+ citotóxicos.

**i. Macrófagos.** La capacidad de *Brucella* de sobrevivir a la muerte intracelular en macrófagos activados es la clave para su patogénesis. Las funciones bactericidas contenidas en los macrófagos son los intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno (ROIs y RNIs), que se inducen por IFN- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ). Por experimentos con inhibidores de los ROIs y RNIs, se concluyó que son los primeros los que juegan un papel preponderante en la muerte intracelular de *Brucella* (Ko y Splitter, 2003).

**ii. Células T.** El rol principal de las células T en la inmunidad contra *Brucella* es la secreción de IFN $\gamma$  para la activación de la función bactericida de los macrófagos y linfocitos T citotóxicos, así como el cambio a anticuerpos isotipo IgG2a e IgG3. Los linfocitos T reconocen al antígeno específico por un receptor heterodímero compuesto por cadenas  $\alpha/\beta$  o  $\gamma/\delta$ . Los receptores T $\alpha/\beta$  se asocian a una molécula co-receptora, CD4 o CD8. El subgrupo  $\alpha/\beta$  es el que sufre expansión clonal en respuesta a la vacunación o a una infección y manifiesta la inmunidad específica.

**Linfocitos T $\alpha/\beta$  CD4+ o CD8+.** Las células T CD4+ o CD8+ reconocen antígenos procesados por las células presentadoras de antígenos (CPA), generalmente fagocitos mononucleares, que expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II o clase I, respectivamente dependiendo de la localización intracelular del procesamiento. Las células CD4+ reconocen antígenos procesados por las CPA que expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II y las células CD8+ reconocen antígenos que son procesados y presentados por células que expresan moléculas MHC clase I.

Dado que *Brucella* entra a la célula por fagocitosis y luego un porcentaje de las células que fueron internalizadas son capaces de redireccionar el tráfico intracelular y replicar en compartimentos derivados del retículo endoplásmico (RE), los antígenos son presentados por las dos vías (Wyckoff, 2002) y por lo tanto estimulan tanto a los linfocitos CD4+ como a los CD8+.

Al reconocer el antígeno asociado a la molécula MHCII, la célula CD4<sup>+</sup> se activa y puede diferenciarse a subgrupos funcionales Th1 o Th2, dependiendo de las citoquinas que producen en respuesta a la estimulación antigénica. Los linfocitos Th1 secretan IFN $\gamma$ , IL2, TNF $\beta$ , pero no IL4. En contraste, los linfocitos Th2 secretan IL4, IL5, IL6 e IL10, pero no IFN $\gamma$ . La expansión clonal de los linfocitos Th1 y Th2 es recíprocamente regulada por IFN $\gamma$  (que suprime a los Th2), IL4 (que estimula a los Th2), IL10 (que suprime a los Th1) e IL12 (producida por macrófagos y linfocitos B que estimula la respuesta Th1) (Scott *et al.*, 1993). Por lo tanto, el balance de citoquinas determina si la respuesta es predominantemente mediada por anticuerpos (Th2) o mediada por células (Th1). Se ha demostrado que en *Brucella* la respuesta predominante es Th1 (Baldwin y Roop, 1999).

Por otro lado, después de reconocer al antígeno, las células CD8+ producen IFN $\gamma$  y factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) y, a su vez, también hacen citólisis directa de la célula infectada (Seder y Hill, 2000). La subpoblación de linfocitos citotóxicos T CD8+ es imprescindible para la protección contra la infección con *Brucella* (Oliveira *et al.*, 2002).

**Linfocitos T $\gamma/\delta$ .** El mecanismo de acción de los linfocitos  $\gamma/\delta$  aún no está esclarecido. Estas células, al estar activadas, secretan IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , que a su vez activa las funciones bactericidas del macrófago. Además tienen función citotóxica y son capaces, *in vitro*, de lisar las células infectadas con *Brucella* (Ko y Splitter, 2003). Hasta el momento solo se han identificado como antígenos específicos que estimulan a los linfocitos T $\gamma/\delta$  a proteínas de respuesta al estrés (HSP) (Wyckoff, 2002). Es interesante destacar que los bovinos y la mayoría de los rumiantes inmaduros, tienen una alta proporción de linfocitos T $\gamma/\delta$  circulantes (aproximadamente 50%), a diferencia de otras especies como humano y ratón, lo cual podría explicar la resistencia natural de los bovinos inmaduros a la infección con *Brucella* (Wyckoff, 2002).

### **Citoquinas.**

Las citoquinas median la respuesta innata y adaptativa en el hospedador infectado. Las citoquinas claves en la infección con *Brucella* son IL12, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ . IL-12 es producida por células B y macrófagos y dirige la respuesta inmune hacia el tipo Th1. Así, las células T producen IFN $\gamma$  que, junto con el TNF $\alpha$ , activan la capacidad bactericida de los macrófagos. Caron y colaboradores, postularon que una de las estrategias de *Brucella* es secretar inhibidores de la producción de TNF $\alpha$  (Caron *et al.*, 1996). Más tarde se demostró que macrófagos infectados con *B. suis* no son capaces de producir TNF $\alpha$  y que esta inhibición es mediada por la proteína Omp 25, por un mecanismo aún no elucidado (Dornand *et al.*, 2002).

### **Modelos para el estudio de la Brucelosis**

#### **Modelos *in vitro*.**

Los mecanismos que llevan a *Brucella* a sobrevivir dentro de macrófagos constituyen los blancos más estudiados para determinar posibles factores de virulencia. Los modelos *in vitro* permiten estudiar cuáles son los factores específicos producidos por la bacteria que interfieren con la fisiología del macrófago, y también cuáles son las señales específicas que activan el macrófago para matar la bacteria.

Las células más utilizadas son monocitos purificados de la sangre humana o bovina, que pueden ser diferenciados a macrófagos en cultivo (Smith y Ficht, 1990). También se utilizan macrófagos peritoneales de ratón y la línea murina J774 (Alton *et al.*, 1988). En estos modelos celulares se puede evaluar la capacidad de las distintas cepas de sobrevivir a la muerte intracelular y replicarse, dando un claro indicio de su grado de atenuación.

Un modelo celular muy atractivo para evaluar cepas de *Brucella* es el de infección de células trofoblásticas en cultivo (Samartino *et al.*, 1994). Las células trofoblásticas placentarias son el nicho replicativo preferencial de *Brucella* en los rumiantes preñados infectados. Teniendo esto en cuenta, se desarrolló un modelo de infección de células obtenidas a partir de membranas corialantoideas del útero de vacas preñadas en distintos estadios de gestación (temprano, 60 a 120 días; tardío, 180-240 días) (Samartino y Enright, 1996). Lamentablemente la obtención y mantenimiento de estas células es muy difícil, lo que ha hecho que este modelo no pueda ser utilizado rutinariamente.

### **Modelos *in vivo*.**

Para el estudio de la patogénesis de *Brucella* se han utilizado modelos en grandes y pequeños animales. Si bien el mejor modelo animal es el hospedador primario del microorganismo, esto no siempre es posible debido a la dificultad y el costo que representan trabajar con grandes animales. Los cobayos y ratones son los animales principalmente utilizados en experimentos de laboratorio (Nicoletti, 1990).

Los cobayos son susceptibles a la infección con todas las especies de *Brucella*, salvo *B. ovis*. Después de la infección se observan lesiones en el hígado, bazo, pulmones y en los nódulos linfáticos. Si se infectan cobayos hembra preñadas, se observarán abortos en una proporción dependiente de la dosis de infección (Nicoletti, 1990). Este modelo se utiliza generalmente para la evaluación de lotes de vacunas establecidas.

Por otro lado la infección en ratón es el primer modelo donde se analiza la virulencia residual de una cepa determinada y la capacidad protectora de una nueva vacuna, dado que el número de bacterias recuperadas de las cepas virulentas de *Brucella* en bazo después del desafío es inversamente proporcional a la inmunogenicidad despertada por la vacuna (García-Carrillo, 1990). Está documentado que las cepas de *Brucella* que son atenuadas y eficaces en el modelo murino, generalmente son seguras y protectoras en el rumiante (Schurig *et al.*, 1991).

Recientemente se describió el uso de ratones knock-out para factores regulatorios de interferón (IRF-17) como modelo para evaluar distintos grados de virulencia de cepas de *Brucella*. Estos ratones mueren dos semanas después de ser inoculados con la cepa patógena *B. abortus* 2308 mientras que sobreviven a la infección con igual dosis de la cepa atenuada RB51 (Ko *et al.*, 2002).

El abordaje experimental más ampliamente usado para el análisis de la respuesta inmune consiste en la infección intraperitoneal de una cepa susceptible de ratones (por ejemplo, BALB/c) con la cepa a estudiar de *B. abortus*, *B. melitensis* o *B. suis* y luego el recuento de bacterias viables en el bazo y/o en el hígado (Baldwin, 2002) y la cuantificación de la respuesta por técnicas inmunológicas. Se distinguen cuatro fases de infección: (1) temprana, de crecimiento bacteriano activo; (2) etapa bactericida, de 7 a 21 días post-infección; (3) fase de *plateau* cuya duración depende de la virulencia de la cepa y

(4) fase de recuperación. Los niveles de agentes quimiotácticos se incrementan notablemente con un máximo alcanzado a los 5 a 7 días post infección (Smith y Ficht, 1990). Durante este tiempo se observa el inicio de la esplenomegalia, ya que grandes cantidades de fagocitos, especialmente monocitos, se infiltran en el bazo respondiendo a los agentes quimiotácticos.

Para la evaluación de nuevas vacunas, se desafían los ratones con una cepa patógena, luego de que las cepas vacunales fueron eliminadas del organismo (generalmente entre 40 y 70 días post vacunación). Posteriormente se evalúa el control de la infección por recuento de bacterias de la cepa de desafío en bazo o hígado.

Sin embargo, para considerar a una cepa como candidato vacunal es imprescindible la evaluación de la misma en el hospedador natural. El modelo clásico para evaluar vacunas en ganado bovino es la vacunación de grupos al azar y su posterior desafío por vía conjuntival en el segundo trimestre de preñez con una única dosis de bacterias patógenas. La dosis de desafío debe infectar aproximadamente al 95% de los controles, e inducir abortos en aproximadamente el 50%. Como regla, el 70-80% de los animales vacunados debe resistir el aborto. El criterio para infección varía, pero se basa en signos clínicos, resultados bacteriológicos de tejidos y fluidos y ensayos serológicos. Las cepas de desafío generalmente utilizadas son las cepas *B. abortus* 544 y 2308 (Nicoletti, 1990).

Para la evaluación de nuevas cepas mutantes de *B. melitensis* con potencial como vacunas para pequeños rumiantes (cabras y ovejas), se ha descrito un modelo de infección de cabras para medir la colonización de tejidos maternos y fetales, como indicador de atenuación, y la eficacia de la vacuna comparada con *B. melitensis* Rev. 1 en la protección contra el desafío con la cepa patógena de referencia *B. melitensis* 16M (Elzer *et al.*, 2002).

### **Vacunas y diagnóstico para brucelosis.**

La vacuna ideal contra la brucelosis no debe producir enfermedad en el animal vacunado, debe conferir protección duradera con una sola dosis, no debe estimular la producción de anticuerpos que interfieran con los ensayos de diagnóstico, no debe transmitirse a otros animales, debe ser biológicamente estable, debe ser inocua para humanos y debe poder cultivarse en fermentadores para su producción. Además es deseable



que posea marcadores genotípicos o fenotípicos que la hagan fácilmente distinguible de las cepas de campo (WHO, 1997).

### **Vacunas actuales.**

i. *B. abortus* S19. La cepa *B. abortus* S19 es la cepa de uso universal como vacuna viva contra la brucelosis bovina y, en ensayos de infección experimental, confiere entre 70-80% de protección contra el aborto y 50-60% de protección contra la infección frente al desafío con cepas patógenas (García-Carrillo, 1980). Fue aislada en 1923 por Buck a partir de un cultivo virulento de leche de una vaca Jersey infectada, y resultó atenuada después de un año en medio sólido a temperatura ambiente (Buck, 1930).

Es una cepa lisa que se diferencia de las cepas de campo principalmente porque su crecimiento es inhibido por eritritol, un hidrato de carbono presente en abundancia en los tejidos placentarios de rumiantes, el cual es utilizado por *Brucella* en preferencia a la glucosa. *B. abortus* S19 carece de la enzima D-eritruosa-1-fosfato deshidrogenasa, debido a una deleción en el locus *ery* (Sangari *et al.*, 1994), lo cual lleva a la acumulación del intermediario tóxico D-eritruosa-1-fosfato y a la depleción de los niveles de ATP en presencia de eritritol, resultando en inhibición del crecimiento bacteriano (Sperry y Robertson, 1975; Sangari *et al.*, 2000). Sin embargo, se ha demostrado que este defecto no está relacionado con la atenuación de esta cepa, al menos en el modelo ratón (Sangari *et al.*, 1998).

A pesar de que las bases moleculares de la atenuación de S19 no se conocen, esta cepa mantuvo sus propiedades inmunogénicas y ha probado ser estable después de décadas de pasajes en animales. Sin embargo, tiene la desventaja que la vacunación del ganado con S19 causa un aumento en el título serológico indistinguible de las bacterias patógenas, lo que dificulta el diagnóstico en las primeras etapas post-vacunación y no permite la re-vacunación de animales adultos. También existen, aunque en baja proporción, animales que quedan permanentemente infectados con la cepa vacunal y, si es administrada en animales preñados, puede inducir abortos (Muzny *et al.*, 1989). Además, mantiene virulencia residual para el hombre por lo que la vacuna requiere precauciones para su producción, distribución y administración.

ii. ***B. melitensis* Rev.1.** *B. melitensis* Rev.1 es la vacuna de uso en cabras y ovejas. Es una cepa lisa, obtenida a partir de un aislamiento virulento de *B. melitensis* resistente a estreptomocina que resultó atenuada después de numerosos subcultivos. Si bien es atenuada comparada con las cepas de campo, mantiene considerable virulencia residual por lo que provoca abortos con frecuencia variable al ser administrada en cabras u ovejas preñadas (Schurig *et al.*, 2002), y se excreta en leche (Banai, 2002). Su uso para ovinos está prohibido en áreas libres de *B. melitensis*, lo cual genera un problema para el control de *B. ovis* (Edmonds *et al.*, 2002). Además esta cepa es patógena para humanos, pudiendo resultar en fiebre ondulante (Blasco y Diaz, 1993 a).

iii. ***B. abortus* RB51.** Se han desarrollado cepas rugosas para sobrepasar la dificultad serológica que implica el uso de S19 y Rev.1. El fundamento de la utilización de cepas rugosas es que los animales vacunados no desarrollan una respuesta humoral contra el antígeno O del LPS por lo que pueden ser distinguidos de los animales infectados, por las pruebas serológicas clásicas. Sin embargo, esto no evita los falsos positivos debido a reacciones cruzadas con otras bacterias.

En 1922, se ensayó la cepa rugosa *B. abortus* 45/20 obtenida después de 20 pasajes en cobayos a partir de una cepa lisa virulenta aislada de una vaca infectada. Si bien esta cepa confirió protección al ser ensayada en bovinos, no resultó estable en el hospedador natural revirtiendo a la forma lisa virulenta, por lo que no pudo ser utilizada. Sin embargo, estos experimentos llevaron a la conclusión que las cepas rugosas podían despertar respuesta protectora.

Así, décadas más tarde, se obtuvo la cepa *B. abortus* RB51 a partir de sucesivos pasajes en rifampicina de la cepa lisa patógena *B. abortus* 2308 (Schurig *et al.*, 1991). Esta cepa ha resultado estable tras numerosos pasajes *in vitro* e *in vivo* por varias especies animales (por una revisión bibliográfica ver Schurig *et al.*, 2002). Si bien no se conocen por completo las bases de su atenuación, esta cepa posee una deleción en el gen *wboA* que codifica para la enzima glucosiltransferasa, responsable de la síntesis de la cadena O (Vemulapalli *et al.*, 2000).

RB51 ha sido aprobada como vacuna oficial para bovinos en los Estado Unidos y su uso está siendo actualmente evaluado en otros países, especialmente Chile y México

(Schurig *et al.*, 2002). Sin embargo, la eficacia de RB51 respecto de S19 en la protección del ganado es todavía controversial (Samartino, 2002). Es necesaria mayor experiencia en el campo para determinar si esta cepa podría reemplazar a la cepa S19 en la vacunación del ganado bovino. A su vez, su infectividad para humanos permanece en estudio, principalmente por su resistencia a rifampicina, que es un antibiótico de uso en ciertos casos de infecciones humanas por *Brucella*.

### **Diagnóstico en los animales.**

Hasta el momento no existe un método certero e inequívoco de diagnóstico para la brucelosis. El diagnóstico de la enfermedad se basa en la detección de anticuerpos anti-LPS, si bien la confirmación proviene del aislamiento y caracterización de la cepa infectante de *Brucella* (Sutherland y Searson, 1990).

En el caso de la brucelosis bovina, para el diagnóstico serológico se utilizan las pruebas clásicas de aglutinación estándar en placa (BPA), en tubo (SAT) y aglutinación en tubo en presencia de 2-mercaptoetanol (2-Me) (Alton *et al.*, 1988). Estas pruebas se basan en la aglutinación por anticuerpos anti-LPS, de distintos antígenos preparados con cepas de *Brucella* inactivadas. La prueba de BPA es una prueba tamiz, que suele arrojar un alto número de falsos positivos. Las pruebas de SAT y 2-Me son lentas y consumen mucho tiempo, a la vez que están sujetas a errores de subjetividad por parte del operador (Metcalf *et al.*, 1994). La prueba de fijación de complemento es considerablemente más trabajosa que las anteriores pero es más específica. Se basa en la detección de anticuerpos anti-LPS, por la fijación de complemento de cobayo sobre un antígeno preparado con *Brucella* inactivada (Metcalf *et al.*, 1994).

En los bovinos que se vacunan con la cepa S19, estos ensayos deben hacerse a partir de los 6-8 meses post vacunación, ya que en ese período los animales vacunados también dan positivo debido a que S19 es una cepa lisa. Hay animales vacunados que siguen dando positivo pasada esa fecha y se confunden con los animales infectados, con la subsecuente pérdida para el productor.

Otra fuente de error en el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina es la reacción cruzada con anticuerpos anti LPS de *Yersinia enterocolitica* O:9, una bacteria que

produce una infección frecuente en el ganado bovino (Corbel *et al.*, 1984). Los títulos heterólogos son habitualmente iguales a los homólogos.

Se han propuesto varias estrategias para lograr la diferenciación serológica entre los mismos. Estas involucran el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico utilizando proteínas de *Brucella* en vez de LPS y la aplicación de vacunas alternativas que faciliten el serodiagnóstico, como cepas rugosas o cepas con determinados genes inactivados que permitan utilizar las proteínas por ellos sintetizadas en un ensayo diagnóstico.

### **Diagnóstico en los humanos.**

El diagnóstico no es difícil si el nivel de sospecha es alto y la enfermedad se manifiesta en su forma típica, pero las manifestaciones variadas de la enfermedad subaguda, localizada o crónica, llevan muchas veces a errores. El diagnóstico es serológico y la confirmación se da por el aislamiento e identificación del microorganismo.

Los métodos serológicos empleados son el test de Huddleson y de Rosa Bengala, que se basan en la aglutinación y utilizan como antígeno la bacteria entera o extractos antigénicos de cepas lisas, por lo cual se detectan anticuerpos contra el S-LPS, que pueden dar falsos positivos en casos de infecciones con bacterias que dan reactividad cruzada, como *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio cholerae* O1, *Salmonella landau* grupoN, y *Pseudomonas maltophilia* (Corbel *et al.*, 1984). Por otra parte, el título de anticuerpos anti LPS permanece alto, aun en pacientes que se han recuperado de la enfermedad (Young, 1995).

Para la confirmación bacteriológica, el hemocultivo en 10% de CO<sub>2</sub> es el procedimiento más utilizado. Sin embargo, la proporción relativa de los cultivos positivos varía entre el 17 y el 85% dependiendo de la especie infectiva (Elberg, 1986).

### **Nuevos métodos de diagnóstico: PCR**

La amplificación de secuencias específicas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha probado ser una herramienta de gran utilidad en la confirmación del diagnóstico de la especie y cepa infectante de *Brucella*, especialmente en los casos dudosos. En la década pasada se han desarrollado numerosos ensayos basados en PCR, que han demostrado ser más rápidos y sensibles que los ensayos tradicionales, aunque su costo es

todavía alto, lo que ha limitado su implementación como herramienta de rutina (por un review ver Bricker, 2002 a y b).

### **Control y tratamiento en los humanos.**

No se ha logrado hasta el momento una vacuna segura y efectiva para humanos, pero existe un gran esfuerzo en laboratorios de todo el mundo para el desarrollo de la misma, especialmente por el peligro de la utilización de *Brucella* como arma bacteriológica.

Los pacientes se tratan con una combinación de tetraciclinas (doxiciclina y minociclina), estreptomina y ocasionalmente rifampicina; con regímenes de tratamiento de dos semanas con descansos de otras dos semanas. Los pacientes con brucelosis crónica necesitan tratamiento sintomático junto al de antibióticos y la respuesta a agentes antimicrobianos es frecuentemente ineficaz (Metcalf *et al.*, 1994).

### **Nuevas vacunas.**

#### **Vacunas no- vivas.**

Para la vacunación en humanos es deseable que la vacuna no produzca enfermedad y provea inmunidad duradera. Las vacunas no-vivas poseen grandes ventajas en cuanto a seguridad pero su principal dificultad es la ineficacia para despertar una respuesta inmune mediada por células (CMI), lo que limita su aplicación.

**i. Cepas inactivadas.** Lamentablemente se sabe desde hace ya mucho tiempo que las vacunas muertas no tienen la capacidad de despertar niveles aceptables de protección frente a patógenos intracelulares debido a la falta de procesamiento y presentación de antígenos por la vía endógena, necesario para la inducción de respuesta Th1 y células CD8+. En el caso de *Brucella*, las formulaciones ensayadas con cepas muertas tampoco arrojaron resultados satisfactorios de protección (Nicoletti, 1990).

**ii. Vacunas a subunidades.** El concepto de vacuna a subunidades en brucelosis se basa en la generación de células CD4+ Th1 y CD8+ citotóxicas por inmunización con antígenos T, por lo que el requerimiento primordial es la identificación de estos antígenos.

Se han evaluado numerosas fracciones antigénicas como membranas celulares, LPS liso y rugoso y extractos salinos solubles e insolubles sin lograr protección duradera en los modelos animales utilizados (Blasco *et al.*, 1993).

En cuanto al uso de antígenos purificados, hasta el momento se han identificado, purificado y probado como vacunas tan solo diez antígenos: la proteína ribosomal L7/L12, la proteína periplásmica P39, bacterioferritina, Cu-Zn superóxido dismutasa (SOD), UvrA, la proteína de membrana YajC, la deshidrogenasa GAPDH y proteínas de función desconocida de 14 kDa, 22.9 kDa y 32.2 kDa (Oliveira *et al.*, 2002). Sin embargo, solo L7/L12, Cu-Zn SOD, la proteína de 22.9 kDa y P39, confirieron distintos grados de protección en ratones de experimentación. Hasta el momento, con los esquemas ensayados, la protección lograda no alcanzó los niveles o la duración despertados por las vacunas actuales (Oliveira *et al.*, 1996; Oñate *et al.*, 1999; Céspedes *et al.*, 2000 y Al-Mariri *et al.*, 2001). Es de esperar futuros experimentos utilizando combinaciones de estos antígenos.

**iii. Vacunas a ADN.** La premisa básica de las vacunas a ADN es la introducción de uno o más genes que codifican para antígenos capaces de estimular una respuesta inmune protectora, en un plásmido que tenga la habilidad de expresar el o los antígenos protectivos en el animal inmunizado. En el campo de la brucelosis, las vacunas a ADN se han probado en ratones utilizando distintos vectores y vías de inoculación. Si bien algunas de las vacunas ensayadas han demostrado poder inducir la respuesta inmune apropiada, no se han logrado niveles de protección significativos comparados con las vacunas vivas atenuadas (Shurig *et al.*, 2002).

Se ensayaron vacunas a ADN con el gen codificante para la proteína ribosomal L7/L12, logrando respuesta inmune mediada por células (CMI) y cierto grado de protección (Kurar y Splitter, 1997). También se indujo una respuesta adecuada pero un nivel de protección moderado al utilizar el gen que codifica para bacterioferritina o P39 (Al-Mariri *et al.*, 2001). Otros antígenos evaluados, como SOD, GroES (Cravero, comunicación personal) y GroEL (Leclercq *et al.*, 2003), no confirieron protección aunque si fueron expresados en la célula huésped y despertaron CMI. Los resultados más alentadores en cuanto a protección se obtuvieron con inmunizaciones reiteradas con el gen que codifica para la lumazina-sintetasa de *B. abortus* (Velikovsky *et al.*, 2002).

Estos datos indican que las vacunas a ADN, a pesar de inducir respuesta Th1, no pueden proteger al organismo contra la infección por *Brucella*. No se puede descartar que los niveles de expresión sean menores a lo esperado por silenciamiento de genes expresados bajo promotores virales, como ya fue descrito en la literatura (Schurig *et al.*, 2002).

## **Vacunas vivas**

### **i. Mutantes atenuadas a partir de cepas virulentas.**

Una estrategia en el desarrollo de nuevas vacunas implica la obtención de mutantes atenuadas a partir de mutaciones en factores de virulencia o en genes de metabolismo o en cepas virulentas como *B. abortus* 2308 o *B. melitensis* 16M. En estas mutantes es primordial evaluar la virulencia residual y luego ensayar la protección en comparación con las vacunas comerciales establecidas.

Dado que los fagosomas del macrófago contienen nutrición limitada para las bacterias intracelulares, las mutantes auxotróficas en caminos metabólicos esenciales, generan cepas con virulencia disminuida. En este contexto, se generaron cepas de *B. melitensis* y *B. suis* mutantes auxotróficas en los genes *purE* y *aroC*, respectivamente (Crawford *et al.*, 1996). El gen *purE* está involucrado en la biosíntesis de novo de inosina y *aroC* está involucrado en la biosíntesis de compuestos aromáticos. En ambos casos, las mutantes resultaron atenuadas tanto *in vitro* como *in vivo*. Actualmente estas mutantes auxotróficas están siendo ensayadas como vacunas para grandes animales y primates no humanos (Hoover *et al.*, 1999).

En cuanto a las mutantes en genes que codifican para factores de virulencia, solo un pequeño número de las mutantes obtenidas ha sido ensayado para su capacidad protectora en ratones, y de estas son menos aún las que han sido evaluadas en el hospedador natural (por una revisión bibliográfica ver Ko y Splitter, 2003).

Una mutante de *B. abortus* 2308 para el gen *exsA* mostró menor supervivencia que la cepa parental y confirió mejor capacidad protectora que S19 y RB51 en ratones BALB/c, aunque su patogenicidad residual en el hospedador natural aún no fue evaluada (Rosinha *et al.*, 2002). Mutantes en el gen *omp25* de *B. abortus* (BA25), de *B. melitensis* (BM25), y de *B. ovis* (BO25) resultaron más atenuadas en ratones BALB/c. La protección alcanzada con

BM25 fue igual a la de *B. melitensis* Rev. 1 en ratones frente al desafío con una cepa patógena de *B. melitensis* y mayor al de Rev. 1 frente al desafío con una cepa patógena de *B. ovis*, indicando que esta cepa podría ser un candidato interesante para la vacunación de ovinos (Edmonds *et al.*, 2002).

Por otro lado, mutantes de la cepa vacunal *B. abortus* S19 en los genes *cgs* (Briones *et al.*, 2001) y *bmp18* (Cravero *et al.*, 1993; Campos *et al.*, 2002) resultaron más atenuadas que S19 pero confirieron iguales niveles de protección frente al desafío con una cepa patógena de *B. abortus* en ratones BALB/c.

## ii. Mutantes en antígenos inmunodominantes a partir de cepas vacunales.

Otra estrategia consiste en la identificación de antígenos de diagnóstico y la delección del gen correspondiente en la cepa lisa atenuada utilizada como vacuna (S19 o Rev.1). Esta estrategia posee la ventaja de que se dispone de años de experiencia en el campo sobre la estabilidad y el manejo de la cepa que da origen a la vacuna.

Idealmente dichas mutantes no deben inducir respuesta de anticuerpos contra una proteína blanco, que será utilizada en nuevas pruebas de diagnóstico. Esta proteína debe ser inmunodominante durante la infección y permitir la identificación de animales infectados de manera por lo menos similar a los reactivos de diagnóstico en uso.

Con este objetivo se han identificado antígenos inmunodominantes durante la infección con *Brucella* (Rossetti *et al.*, 1991 y 1996; Cheville *et al.*, 1992; Baldi *et al.*, 1997; Tibor *et al.*, 1998), de los cuales los más relevantes se discuten a continuación:

**Bcsp31 y SOD.** Se había descrito que los bovinos infectados con cepas virulentas de *Brucella* tenían anticuerpos contra las proteínas Bcsp31 y superóxido dismutasa (SOD) (Tabatabai y Deyoe, 1984; Halling *et al.*, 1991). Mutantes de S19 en los genes *bcsp31* o *sod* fueron hasta el momento las únicas evaluadas en ratones y bovinos. Estas mutantes confirieron iguales niveles de protección que S19 en bovinos vacunados y desafiados con una cepa patógena y presentaron la misma virulencia residual que S19, pero las proteínas elegidas no resultaron inmunodominantes durante la infección con *B. abortus* S2308 por lo que su uso no prosperó (Cheville *et al.*, 1992, 1993).



**CP24.** El antígeno CP24 de *B. melitensis* es un factor de reciclado de ribosomas inmunogénico en ovejas infectadas con *B. melitensis* pero no reconocido por sueros de ovejas vacunadas con Rev-1 (Vizcaíno *et al.*, 1996). Sin embargo, al ser ensayado en un ELISA para diagnóstico con sueros de perros y humanos, la sensibilidad fue muy baja, resultando por debajo de las pruebas de diagnóstico convencionales (Cassataro *et al.*, 2002). Se obtuvieron mejores resultados al utilizar una combinación de este antígeno con la proteína lumazin-sintetasa (BSL) de *Brucella abortus*, que es inmunodominante en infecciones con *Brucella* en humanos y perros (Baldi *et al.*, 1997). Todavía no se ha reportado la obtención de mutantes en estos genes.

**P15, P17 y P39.** Estos antígenos corresponden a proteínas citoplasmáticas que fueron identificadas por Western Blot con sueros de ovejas infectadas. Se clonaron los genes correspondientes y se produjeron las proteínas recombinantes, que luego fueron evaluadas con sueros de ovinos, bovinos y caprinos para su utilidad diagnóstica en forma individual y conjunta (Letesson *et al.*, 1997). La combinación de P15 y P39 arrojó excelentes resultados en la detección de ovinos y caprinos infectados (sensibilidad entre el 86 y 97%), mientras que P17 resultó el mejor antígeno para detectar bovinos infectados. La sensibilidad fue de alrededor del 80% en los animales naturalmente infectados aunque mucho menor en los animales experimentalmente infectados (Letesson *et al.*, 1997). Se obtuvieron mutantes de *B. abortus* S19 y *B. melitensis* Rev-1 con el gen que codifica para P39 inactivado, resultando en cepas con similar virulencia residual y capacidad protectora que las parentales, al ser evaluadas en ratones (Tibor *et al.*, 1998).

**BP26.** La proteína periplásmica BP26 fue descrita por nuestro grupo y por otros grupos de investigación como inmunodominante en infecciones con *B. abortus* y *B. melitensis* en distintas especies animales (Cloeckert *et al.*, 1996 y 2001; Linder *et al.*, 1996; Rossetti *et al.*, 1996; Arese *et al.*, 1999). La mutante de este gen en *B. abortus* S19, resultó tener igual virulencia residual y capacidad protectora que S19 al ser evaluada en ratones (Boschiroli *et al.*, 1995, 1997) y es objeto de estudio en este trabajo.

### **Antecedentes en que se basa este trabajo.**

La cepa de *B. abortus* S19 es la cepa vacunal actual en uso contra la brucelosis bovina. Esta cepa protege un 70 a 80% de los animales contra el aborto pero posee serias desventajas que hacen necesario el desarrollo de nuevas vacunas. Las desventajas más serias que presenta son que interfiere con el serodiagnóstico, que posee virulencia residual por lo que algunos animales permanecen persistentemente infectados y que es patógena para el hombre, creando un gran riesgo para los trabajadores rurales, veterinarios y de laboratorio.

Las estrategias para lograr la diferenciación serológica de animales vacunados e infectados involucran la utilización de nuevas pruebas de diagnóstico y/o la aplicación de vacunas alternativas asociadas a un diagnóstico diferencial, ya sea por la utilización de una cepa rugosa (*B. abortus* RB51) o por delección en S19 de genes que codifican para proteínas inmunodominantes durante la infección sin alterar la capacidad protectora. A su vez, la identificación de factores de virulencia ha permitido la generación de mutantes atenuadas que podrían potencialmente ser evaluadas como nuevas cepas vacunales. Sin embargo, hasta el momento, en todas las mutantes genéticamente definidas propuestas como vacunas alternativas, los genes fueron interrumpidos o reemplazados por marcadores de resistencia a antibióticos, lo cual dificulta el uso en el campo ya que no es posible liberar microorganismos con resistencias a antibióticos.

Nuestro grupo ha descrito la identificación y el clonado de dos genes de *B. abortus* S19: i) *bp26* (n° de acceso GenBank Z54148), que codifica para la proteína periplásmica BP26, de 26 kDa (Rossetti *et al.*, 1996) y ii) *bmp18* (n° de acceso GenBank U29211), que codifica para BMP18, una lipoproteína de 18 kDa asociada a membrana (Rossetti *et al.*, 1991).

La proteína **BP26** es una proteína periplásmica que se encuentra en todas las especies descritas de *Brucella* (Rossetti *et al.*, 1996). Pertenece a un grupo ortólogo de proteínas de membrana o periplásmicas aún no caracterizadas, con dominios conservados tanto en especies altamente relacionadas, como *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti* y *Agrobacterium tumefaciens*, como en especies más distantes filogenéticamente. BP26 ha sido reportada como inmunodominante en infecciones con *Brucella abortus* (Rossetti *et al.*, 1996; Arese *et al.*, 1999) y con *Brucella melitensis* (Cloeckaert *et al.*, 1996 y 2001) de

bovinos, ovinos, cabras, perros y humanos. Debido a su alta inmunogenicidad se propuso que esta proteína podría ser utilizada para el serodiagnóstico de brucelosis, como método alternativo a la detección de anticuerpos anti- LPS.

Se obtuvo una cepa de *B. abortus* S19 mutante que no expresa la proteína BP26. Esta cepa, llamada M1 (Boschioli *et al.*, 1995), resultó tener igual virulencia residual y capacidad protectora que S19 en ratones (Boschioli *et al.*, 1997). Por estas razones, es válido postular que una cepa vacunal mutante en BP26 tendría las mismas propiedades que la cepa parental de la que se origina y permitiría el diagnóstico utilizando BP26 como antígeno ya que los animales vacunados con la mutante no tendrían anticuerpos contra BP26 pero los animales infectados con cepas de campo sí.

La proteína **BMP18** de *B. abortus* S19 (Rossetti *et al.*, 1991) fue descrita también como Omp19 en *B. abortus* 544 (Tibor *et al.*, 1996). Es una lipoproteína asociada a membrana externa que se encuentra presente en todas las cepas de *Brucella* y en la mayoría de las  $\alpha$ -proteobacterias. Sin embargo, su función no ha sido elucidada en ningún género bacteriano. Una cepa mutante de *bmp18* en *B. abortus* S19 (cepa SC1) obtenida en nuestro laboratorio presentó menor replicación que S19 en la fase temprana de infección en ratones BALB/c a la vez que no despertó la esplenomegalia característica, sugiriendo que esta proteína estaría involucrada en la virulencia de la bacteria. Sin embargo, a pesar de la mayor atenuación observada, la mutante protegió en igual medida que S19 al ser ensayada en ratones BALB/c, por lo que al menos en el modelo ratón, esta proteína no sería necesaria para el desarrollo de una respuesta inmune protectora (Cravero *et al.*, 1993).

# **Hipótesis**

## Hipótesis:

En base a los antecedentes mencionados planteamos las siguientes hipótesis

- La mutación simultánea de los genes *bp26* y *bmp18* en *B. abortus* S19 no tiene efecto de sinergismo ni anulación de las mutaciones individuales.
- Una cepa doble mutante de S19 en los genes *bp26* y *bmp18* es más atenuada que S19 sin perder capacidad protectora en el modelo ratón y en el hospedador natural.
- Los bovinos vacunados con cepas mutantes de *B. abortus* que no expresan BP26 pueden ser diferenciados de los animales infectados utilizando el antígeno BP26 como reactivo de diagnóstico serológico.
- El desarrollo de una estrategia de mutagénesis que no incorpore marcadores de resistencia a antibióticos permite la obtención de cepas mutantes nulas en más de un gen en *B. abortus*.

La confirmación de estas hipótesis permitiría concluir que la mutación simultánea de los genes *bp26* y *bmp18* en *B. abortus* S19 tendrá el efecto aditivo de ambas mutaciones. Por lo tanto, una cepa doble mutante S19 *bp26 bmp18* será más atenuada que S19 (por efecto de la mutación en *bmp18*), sin perder capacidad protectora. El uso de esta cepa en la vacunación de bovinos permitirá, además, la utilización del antígeno BP26 como reactivo de diagnóstico para diferenciar serológicamente animales vacunados de infectados con cepas virulentas de *Brucella*. El desarrollo de una estrategia de mutagénesis que no incorpore marcadores de resistencia a antibióticos facilitará la generación de vacunas más seguras.

# **Objetivos**

**Objetivo general:**

**Generar mutantes por inactivación de genes involucrados en la inmunogenicidad y virulencia de *Brucella abortus* para el desarrollo de cepas vacunales.**

**Objetivos particulares:**

- Construir una cepa de *Brucella abortus* doble mutante para los genes *bp26* y *bmp18*.
- Analizar la interacción de ambas mutaciones, el fenotipo de las mutantes obtenidas y los parámetros de infectividad y protección contra el desafío con una cepa patógena en el modelo ratón para brucelosis.
- Determinar la importancia de BMP18 en la virulencia de *B. abortus*.
- Estudiar genes marcadores y estrategias de mutagénesis que no impliquen el uso de resistencia a antibióticos para obtener mutantes por reemplazo alélico en *Brucella*.
- Si los resultados con la doble mutante son satisfactorios, construir la cepa doble mutante *B. abortus* S19 *bp26 bmp18* sin marcadores de resistencia a antibióticos.
- Estudiar la capacidad de la cepa obtenida de generar una respuesta inmune protectora contra el aborto y la infección en el hospedador natural (bovino).
- Determinar la utilidad de la proteína BP26 en la discriminación entre bovinos vacunados con esta cepa y bovinos infectados con cepas virulentas de *Brucella abortus*.

# **Materiales y Métodos**



### 1. Medios y condiciones de cultivo.

Las *Escherichia coli* fueron crecidas en medio Luria Bertani (LB) a 37°C y con agitación constante o en LB solidificado con 1,5% de agar (DIFCO).

Las cepas de *Brucella* fueron crecidas en Tryptic Soy Broth (TSB) (DIFCO) a 37°C y con agitación constante. Como medio sólido se utilizó agar triptosa (AT) de DIFCO.

Los antibióticos y las concentraciones utilizadas en este trabajo fueron:

Antibiótico o droga	Proveedor	Concentración	
		<i>E. coli</i>	<i>B. abortus</i>
Kanamicina (Kan)	Sigma	50 µg/ml	25 µg/ml
Ampicilina (Ap)	USB	100 µg/ml	15 µg/ml
Cloranfenicol (Cn)	Sigma	20 µg/ml	6 µg/ml
Mercurio (HgCl <sub>2</sub> )	Química Galeno	12 µg/ml	15 µg/ml

### 2. Cepas Bacterianas.

Las cepas de *E. coli* y *B. abortus* utilizadas en este trabajo se detallan a continuación:

Cepa	Procedencia
<i>E. coli</i> DH5α	Gibco
<i>E. coli</i> BL21plys	Invitrogen
<i>B. abortus</i> S19	Stock del laboratorio
<i>B. abortus</i> 2308	Stock del laboratorio
<i>B. abortus</i> M1 (S19 <i>bp26::kan</i> )	Boschiroli <i>et al.</i> , 1995.
<i>B. abortus</i> INTA1 (I1) (S19 <i>bp26::kan bmp18::cat</i> )	Este trabajo
<i>B. abortus</i> M18 (S19 <i>bmp18::cat</i> )	Este trabajo
<i>B. abortus</i> I1-C (S19 <i>bp26::kan bmp18::cat pBS18</i> )	Este trabajo
<i>B. abortus</i> M1luc (S19 $\Delta$ <i>bp26::luc</i> )	Este trabajo
<i>B. abortus</i> INTA2 (I2) (S19 $\Delta$ <i>bp26::luc \Delta</i> <i>bmp18</i> )	Este trabajo
<i>B. abortus</i> Mv18 (2308 <i>bmp18::cat</i> )	Este trabajo

### 3. Secuencias de los genes *bp26* y *bmp18* de *B. abortus* S19.

Las secuencias sobre las que se diseñaron los oligonucleótidos específicos se encuentran depositadas en el banco de datos GenBank del sitio NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), con los números de acceso Z54148 para *bp26* y U29211 para *bmp18*. A continuación se transcriben las secuencias nucleotídicas para simplificar el análisis de los resultados. En rojo se señalan las secuencias correspondientes a los péptidos señal, en azul el resto de la secuencia codificante y en negro las regiones adyacentes secuenciadas a partir de los insertos de los fagos recombinantes de la biblioteca genómica de *B. abortus* S19. Se encuentran señalados, por subrayado, los sitios de restricción que luego serán utilizados para la obtención de las cepas mutantes y, por subrayado doble, los sitios de pegado de los oligonucleótidos (*primers*) utilizados para confirmar la mutagénesis.

En la secuencia de *bmp18*, se encuentra entre paréntesis el sitio EcoRI correspondiente al adaptador utilizado para la construcción de la biblioteca genómica (Rossetti *et al.*, 1991). En negrita se resalta la secuencia codificante correspondiente al consenso de precursores de lipoproteínas bacterianos.

#### Secuencia de *bp26*

```

1   atctcaaatc aacaactcct tgcataaaag gagacttaag aacacaatga tttcaagaca
61  aagcccttga cataaccgcg tttgtccaaa tttttcaact tttcctgtag gagattttat
121 gaacactcgt gctagcaatt ttctcgagc ctcattttcc acaatcatgc tcgtcggcgc
181 tttcagcctg cccgctttcg cacaggagaa tcagatgacg acgcagcccg cgcgcatcgc
                                     p26f                               BssHII
241 cgtcaccggg gaaggcatga tgacccccctc gcccgatatg gccattctca atctctcggt
301 gctacgccag gcaaagaccg cgcgcggaagc catgaccgcg aataataatg aagccatgac
361 cgcgataaat gaagccatga gaaaagtgtc cgatgccatg aagaaggccg gcatcgaaga
421 tcgcatcttc cagacaggcg gcatcgatat ccagccgatt tatgtctatc ctgacgacaa
481 gaacaacctg aaagagccta ccatcaccgg ctattctgta tccaccagtc tcacggttcg
541 cgtgcgcgaa ctggccaatg ttggaaaaat tttgcatgaa tccgtcacgc tcggtgtaa
601 tcagggcggt gatttcaacc tggtaaatga taatccctcc gccgtgatca cgaggggcaa
661 gcgcgcagtg gccaatgcca ttgccaagcc gaagacgctt gccgacgctg caggcgtggg
                                     PetI
721 gcttggccgt gtggtggaaa tcagtgaact gagccgcccg cccatgccga tgccgatgcc
781 aattcgcgcg ggacagttca gaacctgct agcagccgca cgggacaatt ccgtgccgat
                                     BssHII
841 ccgcaggc gaaaacagct ataacgtatc ggtcaatgtc gttttgaaa tcaagtaaat
                                     p26r1
901 agccggggta tgacgccctt tgccacctga taaaaacgc cggcctggtt tcacagggcg
961 gtttttttga ttagagcgt ttcgatctga ttgaatccga tcggcgctct aatcctttgt
                                     p26r2
1021 tttgacgcgc atcttttcg aaaaccgttt cacacttttc ggatgcggtc tagcggatga
1081 tcggaaaccg cgcgcaaatg tcacgctcgt cggacgacat ggcggaacct acgcacggta

```

#### Secuencia de *bmp18*:

```

1   (gaattc) cgac ccgcgcgca ttgcgaaaact tgcagtgcag tcatgcgccc agaacaacg
                                     p18f
61  ccaatatcgg gaaactgtg gccttctgtg gccagtttca gaattatcag gtggtttcaa
121 gcattcttga agggctttgg aggcagaaat gaaagggtgt ggtggtgctt ttttaacct
181 atagccattt tctcggtcca atatatcata ttgcatggct tcggcatgct gcccgggccc
241 cgccccacc cctgatgaga aatgcgcaa tggagaacct gatgggaatt tcaaaagcaa
301 gtctgctcag cctcgcggcg gctggcattg tcttggccgg gtgccagagc tcccggctg
                                     BlpI                               SacI
361 gtaatctcga taatgtttcg cctccgccgc cgctgcacc ggtcaatgct gttccggcag
421 gcacggtgca gaaaggcaat cttgattctc ccacacaatt cccaatgcg cctccacgg
481 atatgagcgc gcaatccggc acacaggtcg caagcctgcc gcctgcatcc gcaccggacc
541 tgacgcccgg cgccgtggct ggcgtctgga acgcctcgtc tgggtggtcag agctgcaaga
601 tcgcgcagcc gcagacaaa tatggccagg gctatcgcgc aggccgctg cgctgcccc
                                     NruI
661 gtgaactggc taatcttgc tcttgggccc tcaatggcaa gcaactcgtc ctttacgatg
721 cgaacggcgg tacggttgc tcgctctatt cttcaggaca gggccgctc gatggccaga
781 ccaccggcgg gcaggcgtg acgctgtcgc gctgatctga cccggaacg atgaacagg
841 cggagcttct tcgggcagct ccgccgaatt ttaaggcgca ccgcaatga tttcggcaga
901 tgcgcatcag tccaaggtt cactggaacc tctcatgtct tttgatgga atctgaaagc
961 cttcccttcc gtcccgcaac qttatgaagc catgg
                                     p18r                               NcoI

```

#### 4. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos o *primers* utilizados en las reacciones de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) fueron encargados a la firma Fagos (Buenos Aires, Argentina) o a Universal DNA (USA) y se detallan a continuación:

Primer	Secuencia (orientación 5'-3')
p26f	<u>ggtacc</u> CAGAGGAGAATCAGATGACGACG
p26r1	<u>ggtacc</u> <b>TTACTT</b> GATTTCAAAAACGACATT
p26r2	<u>ggtacc</u> <b>ta</b> CAGATCGAAACGCCTCTAATC
p18f	<u>aagaa</u> TCCGACCCGCGCGGATT
p18r	<u>agaattc</u> TCATAAGCTTCGGGGACGGAAGGG
patpf	ATCTGAAAGCCTTCCCTTCC
patpr	GTAAAGCACGTCGATCAGCA
plucf	<u>ttggcggc</u> ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG
plucr	<u>ttggcggc</u> CTAGAATTACACGGCGATCTTT

Se encuentran subrayados los sitios de restricción incorporados a los oligonucleótidos que fueron utilizados en este trabajo; en mayúsculas las secuencias complementarias al gen a amplificar; en negrita se señalan los codones de iniciación (ATG) y el triplete complementario a los codones de terminación (TTA).

## 5. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo se detallan a continuación.

Plásmido	Resistencia/ Origen de replicación	Descripción	Procedencia/ Referencia
pBluescriptII-KS(+)	Ap <sup>r</sup> ColE1	Vector comercial de clonado.	Stratagene
pBS18	Ap <sup>r</sup> ColE1	Fragmento de 1 kb EcoRI/NcoI que contiene el gen <i>bmp18</i> de <i>B. abortus</i> S19 clonado en el vector pBluescriptII-KS(+) en los sitios EcoRI-ClaI, al cual se le anuló el sitio SacI por corte y tratamiento con T4 ADN polimerasa. Los sitios NcoI y ClaI se pierden por tratamiento con el fragmenteo Klenow de la ADN polimerasa y ligación de extremos romos.	Cravero <i>et al.</i> , 1993.
pUC1318cat	Ap <sup>r</sup> , Cn <sup>r</sup> ColE1	Gen <i>cat</i> clonado en el plásmido pUC1318 (Kay y McPherson, 1987).	Cravero, sin publicar.
pUC1318kan	Ap <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> ColE1	Gen <i>kan</i> clonado en el plásmido pUC1318 (Kay y McPherson, 1987).	Boschiroli <i>et al.</i> , 1995.
pBS18cat	Ap <sup>r</sup> , Cn <sup>r</sup> ColE1	Gen <i>cat</i> proveniente de pUC1318cat clonado en el sitio SacI del gen <i>bmp18</i> en el plásmido pBS18.	Cravero, sin publicar.
pSD18	Ap <sup>r</sup> ColE1	Delección BlnI/NruI del gen <i>bmp18</i> clonado en el plásmido pBS18	Campos <i>et al.</i> , 2002 .
pSacB	Ap <sup>r</sup> ColE1	Fragmento de 2,5 kb conteniendo el gen <i>sacB</i> de <i>Bacillus subtilis</i> proveniente del cassette SacB-npt1-SacR (Ried y Collmer, 1987) clonado en el sitio PstI del plásmido Sac-Kiss-Lambda (Tsang <i>et al.</i> , 1996).	Cravero, sin publicar.
pBK	Kan <sup>r</sup> ColE1	Vector comercial de clonado.	Stratagene
pGemT	Ap <sup>r</sup> ColE1	Vector comercial para clonado de productos de amplificación por <i>Taq</i> .	Promega

pRSET B	Ap <sup>r</sup> ColE1	Vector comercial para expresión en bacterias de proteínas recombinantes como fusión a 6 residuos Histidina en el extremo amino terminal, bajo la regulación del promotor del fago T7.	Invitrogen
pBBR1MCS	Cn <sup>r</sup> Amplio rango	Vector replicativo para <i>Brucella</i> ssp.	Kovach <i>et al.</i> , 1994.
pBBR1MCS-2	Kan <sup>r</sup> Amplio rango	Vector replicativo para <i>Brucella</i> ssp.	Kovach <i>et al.</i> , 1994.
pSP-Luc+	Ap <sup>r</sup> ColE1	Vector comercial que lleva el gen <i>luc</i> sin promotor flanqueado por sitios de restricción.	Promega
pHP45Ω	Ap <sup>r</sup> , Hg <sup>r</sup> ColE1	Operón <i>mer</i> de Tn501 ( <i>P. aeruginosa</i> ) flanqueado por sitios BamHI.	Baulard <i>et al.</i> , 1995
pBa26	Ap <sup>r</sup> ColE1	Inserto de 3,5 kb clonado en el sitio EcoRI del plásmido pPO6 (derivado de pBR322).	Rossetti <i>et al.</i> , 1996.
pBB1luc	Cn <sup>r</sup> Amplio rango	Gen <i>luc</i> proveniente del plásmido pSPluc+ clonado en los sitios HindIII/XbaI del plásmido pBBR1MCS, bajo el promotor del gen <i>lacZ</i> .	Este trabajo
pBB2mer	Kan <sup>r</sup> , Hg <sup>r</sup> Amplio rango	Operón <i>mer</i> del plásmido pHP45Ω clonado en el sitio BamHI del plásmido pBBR1MCS-2	Este trabajo
p18mer	Ap <sup>r</sup> ColE1	Gen <i>bmp18</i> clonado en el plásmido pBS18 interrumpido en el sitio SacI con el operón <i>mer</i>	Este trabajo
p26d	Ap <sup>r</sup> ColE1	Delección BssHII del gen <i>bp26</i> clonado en pBa26	Este trabajo
pGEMT-luc	Ap <sup>r</sup> ColE1	Fragmento de 1,7 kb conteniendo el gen <i>luc</i> amplificado con los primers plucf /plucr a partir de pSPluc+.	Este trabajo
p26DL	Ap <sup>r</sup> ColE1	Fragmento de 1,7 kb BssHII conteniendo gen <i>luc</i> proveniente de pGEMTluc y clonado como fusión en el sitio BssHII del plásmido p26D	Este trabajo
pK26L	Kan <sup>r</sup> ColE1	Fragmento de 4,7 kb EcoRI del plásmido p26DL clonado en el plásmido pBK	Este trabajo
pK26SL	Kan <sup>r</sup> ColE1	Fragmento de 2,5 kb conteniendo el gen <i>sacB</i> proveniente del plásmido pSacB clonado en el sitio PstI del plásmido pK26L	Campos <i>et al.</i> , 2002.
pRSETB-Luc	Ap <sup>r</sup> ColE1	Fragmento de 1,7 kb BglII-EcoRI de pSP-Luc+ clonado en vector pRSETB.	Este trabajo

## 6. Metodología de ADN recombinante.

La construcción y análisis de los plásmidos recombinantes se realizó por técnicas clásicas de biología molecular (Ausubel *et al.*, 1996; Sambrook *et al.*, 1989).

### 6. 1. Aislamiento de plásmidos

Los plásmidos fueron aislados utilizando el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989), columnas de intercambio aniónico de Qiagen y también con el *kit* de Wizard para mini y midipreps (Promega).

### 6. 2. Utilización de enzimas de restricción y modificantes.

Las digestiones con enzimas de restricción (simples o dobles) así como la utilización de enzimas modificantes se realizaron de acuerdo con los *buffers*, las temperaturas, las

duraciones de la incubación y las condiciones de inactivación recomendadas por los respectivos proveedores (Promega y NEB).

### **6. 3. Electroforesis en geles de agarosa**

Las concentraciones de los geles de agarosa fueron 0,7-1,5 % según los tamaños de los fragmentos de restricción a analizar (Ausubel *et al.*, 1996). La agarosa fue disuelta en TAE (10 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8), a la que se le adicionó bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Las muestras de ADN fueron sembradas en el gel previo agregado de 1/10 del volumen del sembrado de *buffer* de siembra (0,5% azul de bromofenol, 25% glicerol). Los geles se corrieron en TAE a 5-10 V/cm a temperatura ambiente. Las bandas de ADN fueron visualizadas por fluorescencia al UV. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron ladder de 100 pb (Promega) y ladder de una 1 kb (Gibco y Promega). Los geles se documentaron utilizando un equipo Fotodyne y el programa Cricket Graph.

### **6. 4. Aislamiento de los fragmentos de interés de geles de agarosa**

Se utilizaron los métodos de GeneClean (Bio101) y Prep-A-Gene (Bio-Rad), siguiendo las indicaciones del proveedor.

### **6. 5. Ligación**

Las reacciones de ligación de fragmentos de ADN fueron efectuados con la enzima T4 ADN ligasa (NEB y Promega), con el *buffer* suministrado por el proveedor. Se agregó 1 unidad de T4 ADN ligasa a una mezcla que contenía por lo menos 50 ng de plásmido vector y 1 a 5 veces más (en molaridad) de fragmentos de ADN inserto. Para la ligación de extremos cohesivos, la incubación se realizó durante 16 horas a 4°C en un volumen final de 10 a 15 µl. Para la ligación de extremos romos, la incubación se realizó durante 16 horas a 18°C en igual volumen final.

### **6. 6. Transformación de *E. coli* y selección de los vectores recombinantes**

Con 1 a 5 µl del producto de ligación se transformaron 50 µl de *E. coli* competentes obtenidas por el método de incubación en cloruro de calcio y congeladas a -70°C hasta su uso (Sambrook *et al.*, 1989). En cada caso, luego de la introducción del ADN plasmídico por choque térmico a 42°C, se recuperaron las bacterias y se plaquearon en medio de cultivo sólido suplementado con los correspondientes a antibióticos y 40 µl de

2% X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido), 40  $\mu$ l de 100 mM IPTG (Isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactósido) en el caso de selección por  $\alpha$ -complementación. Se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico de las colonias resistentes a antibióticos y se confirmó por digestión con enzimas de restricción y análisis de los fragmentos generados en geles de agarosa, si se estaba en presencia del plásmido recombinante deseado.

## **7. Herramientas de bioinformática.**

El acceso a las secuencias y las comparaciones se realizaron a través de los programas del sitio NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

El análisis de los sitios de restricción y el diseño de oligonucleótidos para las reacciones de amplificación se hizo a través de las herramientas del sitio JustBio.com de acceso libre a través de internet ([www.justbio.com](http://www.justbio.com)).

El análisis de promotores se realizó por algoritmos de redes neuronales que permiten la predicción de que una secuencia dada sea un promotor procariota, desarrollado en la Universidad de Berkley, USA y que tiene libre acceso a través de internet en el sitio [www.fruitfly.org](http://www.fruitfly.org).

## **8. Northern Blot.**

### **8. 1. Extracción de ARN de *B. abortus* S19.**

Para la extracción de ARN de *Brucella* se utilizó una modificación del método de extracción con fenol caliente (Coligan *et al.*, 1997). A partir de un cultivo de S19 en un medio de baja concentración salina (0.8% Nutrient Broth, 0.75% extracto de levadura), se cosecharon 5 ml en fase exponencial (24 horas). Todas las soluciones de la extracción fueron realizadas con agua tratada con DEPC (dietil pirocarbonato). Al cultivo se le agregó 10% SDS (dodecil sulfato de sodio) y 25  $\mu$ l de Proteínasa K (10 mg/ml). Se incubó 20 min a 60°C y se agregó 1/20 volumen de 3 M acetato de sodio, pH=7 y 1 volumen de fenol equilibrado en agua. Luego de una incubación a 60°C durante 20 min, se enfrió rápidamente en baño de hielo, 10 min. El lisado se centrifugó 15 min a 15.000 rpm y el sobrenadante se pasó a un tubo de vidrio, para la precipitación con 0,8 volúmenes de isopropanol (16 horas a -20°C). El precipitado se lavó con 0,5 ml de etanol 75% y luego se secó en vacío y se resuspendió en 200  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de

ARNasas, obteniéndose una concentración de ARN total de 1µg/µl. Se guardaron en alícuotas a -70°C.

### **8. 2. Electroforesis del ARN bacteriano.**

El gel de agarosa utilizado fue 1,5% en *buffer* ME 1X (solución stock 10X: 400 mM MOPS, 100 mM acetato de Sodio, 10 mM EDTA pH=8, ajustado a pH=7 con 10 N NaOH y llevado a volumen con H<sub>2</sub>O-DEPC). Se agregó al gel 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. Se utilizó aproximadamente 5 µg de ARN bacteriano por calle. El estándar utilizado fue ARN-ladder (Promega). Las muestras se trataron previamente a la electroforesis de la siguiente manera: a 4,5 µl de solución de ARN se le agregó 1 µl de bromuro de etidio (EthBr) (4 mg/ml), 30 µl de *buffer* desnaturizante (13% MOPS 1X, 66% formamida deionizada, 21% formaldehído) y 1 µl de *buffer* de siembra (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilenexianol, 50% glicerol). Se calentaron las muestras 15 min a 60°C y luego se las dejó enfriar en hielo. La corrida electroforética se realizó a 5 Volts/cm a temperatura ambiente

### **8. 3. Transferencia e hibridación.**

La transferencia a membrana de nylon se realizó por capilaridad en SSC 10X (1,5 M NaCl, 0,15 M Na<sub>3</sub>citrato, pH=7). La membrana se sometió a horneado 2 hs a 80°C con vacío para fijar el ARN. La prehibridación, hibridación, lavados y exposiciones se realizaron con solución UltraHyb (Ambion), siguiendo las recomendaciones del proveedor.

### **8. 4. Detección de mARN de *bp26*, *bmp18*, *atpasa*.**

Las sondas utilizadas fueron productos de amplificación de los genes *bp26*, *bmp18* y *atpasa* amplificados a partir de ADN cromosomal de *B. abortus* S19 con los pares de oligonucleótidos p26f/p26r, p18f/p18r y patpf/patpr. Los ciclos de amplificación fueron: 94°C, 2 min; 30x(94°C, 1 min; 58°C, 1 min; 72°C, 1,5 min); 72°C, 10 min. Los amplicones correspondientes a los genes *bp26*, *bmp18* y *atpasa* (de tamaño aproximado 700, 500 y 1000 pb, respectivamente) fueron purificados de gel de agarosa después de la electroforesis y marcados con [<sup>32</sup>P]α-dCTP, por el método de polimerización con oligonucleótidos al azar (Prime-a-Gene de Promega). La detección se hizo por exposición a -70°C e impresión en placa radiográfica (placas Kodak X-Omat).

## **9. Transformación de *B. abortus*.**

La transformación de *B. abortus* se realizó en todos los casos por electroporación.

### **9.1. Preparación de *B. abortus* electrocompetentes.**

Se inocularon 100 ml de TSB con un volumen de 1ml de un cultivo saturado de *B. abortus* S19, M1, I1 o S2308, según corresponda. Se cultivaron a 37°C con agitación hasta  $DO_{600\text{ nm}} = 0,5$ . Se enfrió el recipiente conteniendo las bacterias por 15 min en hielo y se centrifugó el cultivo a 7.000 rpm, 4°C, 15 min. El sobrenadante se descartó en un recipiente adecuado y se resuspendieron las bacterias en 50 ml de H<sub>2</sub>O apirogénica o miliQ estéril (ddH<sub>2</sub>O). Los lavados se repitieron 3 veces y en el último, las bacterias se resuspendieron en ~300 µl de ddH<sub>2</sub>O estéril de manera de tener una densidad de  $1-6 \times 10^9$  células/ml. Esta suspensión fue fraccionada en volúmenes de 50 µl y guardada hasta el momento de ser utilizada a -70°C.

### **9. 2. Electroporación.**

En todos los casos, las bacterias se descongelaron en baño de hielo. Se puso 0,5 a 1 µg de ADN (~1µg/µl) en contacto con 50 µl de bacterias *B. abortus* competentes. Se dejó 5 min en hielo y luego se lo colocó en cubetas de electroporación de 0,2 cm frías y estériles. Se aplicó un pulso eléctrico fijando al aparato (Gene Pulser / Pulse controller, BioRad Ca, USA) en 25 µF, 2,5 kV (12,5 kV/cm) y 400Ω. Inmediatamente luego de electroporar, se agregó 1ml de medio SOC (BRL-Bethesda) y se cultivaron las células a 37°C con agitación constante de 300 rpm durante 6 a 16 horas. Posteriormente se sembraron en placas de AT suplementadas con el correcto agente de selección y se aislaron las bacterias transformadas.

La eficiencia de transformación descrita con este método para plásmidos replicativos en *B. abortus* S19 es de  $1 \times 10^4$  UFC/µg de ADN recombinante (McQuiston *et al.*, 1995) y fue lo que se obtuvo en este trabajo.

## **10. Selección de mutantes de *B. abortus* con genes de resistencia a antibióticos.**

Para la obtención de mutantes isogénicas se utilizó el protocolo de intercambio alélico (Halling *et al.*, 1991; Boschiroli *et al.*, 1995).

***B. abortus* M18.** Se electroporaron bacterias *B. abortus* S19 competentes con el plásmido pBS18cat. Después de la electroporación y recuperación, las bacterias



transformantes fueron seleccionadas en placas de TA cloranfenicol (antibiótico que interrumpe el gen *bmp18*). Las colonias que crecieron en la placa original (que corresponden a recombinantes simples o dobles) se repicaron, en réplica, a placas de TA ampicilina (antibiótico cuya resistencia porta el plásmido) y a placas de TA cloranfenicol. Las bacterias que crecieron en ambos antibióticos corresponden a simples recombinantes y aquellas que no crecieron en ampicilina a dobles recombinantes.

***B. abortus* INTA1 (I1).** Se transformaron bacterias M1 (S19 *bp26::kan*) competentes con el plásmido pBS18cat. Las bacterias transformantes fueron seleccionadas en TA cloranfenicol y luego replicadas en réplica a TA ampicilina/kanamicina, TA cloranfenicol/kanamicina, para discriminar entre simples y dobles recombinantes.

***B. abortus* I1-C.** Se transformaron bacterias I1 competentes con el plásmido pBS18, como fue detallado previamente. Se seleccionaron las bacterias simple recombinantes en placas de AT suplementadas con ampicilina, kanamicina y cloranfenicol.

***B. abortus* M18v.** Se transformaron bacterias S2308 competentes con el plásmido pBS18 y se siguió el mismo procedimiento que para la obtención de M18.

## **11. Selección de mutantes de *B. abortus* sin genes de resistencia a antibióticos.**

### **11. 1. Sin utilizar marcadores de contraselección.**

Se transformaron bacterias *B. abortus* S19 por electroporación con los plásmidos p18mer y p26DL.

En el caso de p18mer, las bacterias transformadas se plaquearon a TA suplementado con mercurio (15 µg/ml) y luego se repicaron a placas de TA mercurio y TA ampicilina para identificar aquellas en que ocurrió el reemplazo alélico.

En el caso de p26DL, se seleccionaron las que integraron el plásmido al cromosoma por plaqueo del producto de electroporación en placas con ampicilina. Se seleccionó una colonia Ap<sup>R</sup> y se creció en 2 ml de TSB, 16 hs a 37°C en ausencia de presión de selección para promover la ocurrencia de un segundo evento de recombinación entre las regiones homólogas de *bp26*. Alícuotas del cultivo fueron guardadas a -70°C. Para identificar aquellas colonias donde ocurrió el segundo evento de recombinación, las alícuotas fueron tituladas y se sembraron en placas de AT de manera de tener 10<sup>2</sup> UFC/placa. Las colonias fueron repicadas a medio con y sin ampicilina para identificar

aquellas en que ocurrió un segundo evento de recombinación homóloga y perdieron la secuencia del plásmido.

### **11. 2 Utilizando *sacB*.**

Se transformaron bacterias *B. abortus* S19 por electroporación con el plásmido pKS26L, como fue descrito anteriormente. Se seleccionaron las que integraron el plásmido al cromosoma por plaqueo del producto de electroporación en kanamicina. De las colonias 50 fueron repicadas a placas de AT kanamicina con 5% sacarosa, para confirmar la sensibilidad a sacarosa. Se seleccionó una colonia Kan<sup>R</sup> Sac<sup>S</sup> y se creció en un cultivo de 2 ml de TSB, 16 hs a 37°C en ausencia de presión de selección para promover la ocurrencia de un segundo evento de recombinación entre las regiones homólogas de *bp26*. Alicuotas del cultivo fueron guardadas a -70°C.

Como anteriormente, para identificar aquellas colonias donde ocurrió el segundo evento de recombinación, las alicuotas fueron tituladas y diluidas de manera de tener 10<sup>2</sup> UFC/100 µl. En este caso, se sembraron 100 µl de la dilución en placas de AT con 5% sacarosa. Las colonias sacarosa resistentes fueron repicadas a placas de AT con 5% sacarosa con y sin kanamicina (para descartar que la resistencia a sacarosa se deba a mutaciones en el gen *sacB*). Las Sac<sup>R</sup> Kan<sup>S</sup> fueron sometidas a hibridación en colonia.

Para obtener la doble mutante *B. abortus* I2, se transformaron bacterias *B. abortus* M11uc electrocompetentes con el plásmido pSD18. Se seleccionaron las que integraron el plásmido al cromosoma plaqueando el producto de electroporación en AT suplementado con ampicilina. Como previamente, 50 colonias fueron repicadas a placas de AT ampicilina con 5% sacarosa y a AT ampicilina para confirmar sensibilidad a sacarosa. Una colonia fue seleccionada al azar, crecida sin presión de selección y alicuotada a -70°C, como en el caso anterior. Se tituló el cultivo y se plaquearon en AT con 5% sacarosa de manera de tener 100 colonias sacarosa resistentes por placa. De las colonias obtenidas, 200 se repicaron a placas AT ampicilina con 5% sacarosa y a AT con 5% sacarosa, de manera de seleccionar las que perdieron el plásmido.

## **12. Confirmación de la mutagénesis**

### **12.1. Extracción de ADN cromosomal de *Brucella*.**

Se utilizó una modificación del protocolo de extracción de ADN cromosomal bacteriano con proteinasa K (PK) y CTAB (Ausubel *et al.*, 1996). Básicamente, se inoculó una colonia en 2 ml de TSB y se creció a 37°C, 48 hs. Se centrifugó el cultivo y se

resuspende el precipitado en 1.5 ml de TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8). Luego se agregaron 90 µl de SDS 10% y 15 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Se incubó 16 hs a 37°C, se agregaron 300 µl de 5 M NaCl y 240 µl de CTAB/NaCl y se incubó 10min a 65°C. Al cabo de ese tiempo, se hicieron extracciones sucesivas con cloroformo, fenol y fenol-cloroformo. Se precipitó el ADN con 0,6 volúmenes de isopropanol, seguido por lavado con etanol al 70%. El ADN cromosomal se resuspendió en TE 0,1X y se guardó a 4°C hasta su uso.

## **12.2. Southern blot.**

### **12.2.a. Tratamiento del ADN genómico con enzimas de restricción y electroforesis.**

Para la evaluación de la mutagénesis, el ADN genómico de S19, I1 e I1-C fue digerido durante 6 horas con EcoRI. Posteriormente las muestras fueron corridas en un gel de agarosa 0,7%. en *buffer* TAE con 0,5 µg/ml de EthBr durante 16 horas a 1V/cm. Como marcador de peso molecular se incluyó Ladder de 1 kb (Gibco). Al terminar la electroforesis se tomó una fotografía del gel colocando una regla como referencia para comparar las distancias de migración de los fragmentos de ADN genómico con respecto a los marcadores de peso molecular. Esta referencia se usó para determinar los pesos moleculares relativos de las bandas en las posteriores autorradiografías.

### **12.2.b. Transferencia e hibridación de la membrana de nylon.**

La transferencia se llevó a cabo por los protocolos clásicos (Ausbel *et al.*, 1996). El gel se trató por incubaciones sucesivas con agitación suave de 2 x 15 min en 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH, seguido de 1 x 1,5 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5. La transferencia se realizó por vacío utilizando un aparato de transferencia semiseco de Millipore a una membrana de nylon (Nytran) en SSC 10X, 1 hora. Luego se fijó el ADN a la membrana exponiéndola a 0.15 J/cm<sup>2</sup> de luz ultravioleta.

Las condiciones de hibridación fueron de alta astringencia. La prehibridación fue 1 hora a 65°C con una solución de PAES 0,1%, SDS 1%. La hibridación se realizó agregando las diferentes sondas marcadas con [<sup>32</sup>P]α-dCTP e incubando durante toda la noche a 65°C. Luego se descartaron las sondas y se lavó dos veces durante 15 min a temperatura ambiente con SSC 1X, 0,1% de SDS, y por último dos veces con SSC 0,1X, 0,1% SDS a 65°C. Una vez que se secaron las membranas, se realizaron exposiciones con película

radiográfica X-Omat (KODAK) a -70°C durante períodos variables y se obtuvieron autorradiografías.

### **12.2.c. Preparación de sondas .**

Para la evaluación de las cepas mutantes se utilizaron como sondas: a) un fragmento del gen *bmp18* obtenido por digestión con SacI/XhoI de pBS18 (0,6 kb), b) el gen *cat* obtenido por digestión de pUC1318cat con SacI (1 kb), c) el plásmido pBluescript linealizado por digestión con EcoRI (2.9 kb) y d) el gen *kan* obtenido por digestión de pUC1318-kan con PstI (1,5 kb) (Boschiroli *et al.*, 1995) Los fragmentos fueron purificados después de electroforesis en geles de agarosa y aproximadamente 50 ng de los mismos fueron marcados con [<sup>32</sup>P]α-dCTP por el método polimerización a partir de oligonucleótidos al azar (Prime-a-Gene, Promega).

### **12.3. Confirmación de la mutagénesis de *B. abortus* M18v y M11uc por PCR.**

Para la confirmación de la mutagénesis de M18v y de M11uc se realizó una amplificación con oligonucleótidos específicos a partir de ADN cromosomal obtenido como fue especificado más arriba. Para confirmar la mutagénesis de *bp26* con el gen de luciferasa se utilizaron los pares de oligonucleótidos p26f/p26r2 y para confirmar la inserción del gen *cat* en *bmp18* (en la cepa M18v) se utilizaron los oligonucleótidos p18f/ p18r. Los ciclos de amplificación utilizados para ambas reacciones fueron 94°C, 2min; 30 x (94°C, 1 min; 58°C, 1 min; 72°C, 2 min); 72°C, 10 min.

### **12.4. Identificación de las mutantes *B. abortus* Δ*bmp18* por PCR en colonia**

Para la identificación de las colonias que reemplazaron el alelo salvaje de *bmp18* por el alelo que lleva la delección, en la obtención de I2, se realizó una amplificación a partir de ADN aislado de colonia. Para ello, se picaron al azar 10 colonias Ap<sup>S</sup> Sac<sup>R</sup> aisladas y se formó una suspensión celular con cada una de ellas en 100 μl de <sub>d</sub>H<sub>2</sub>O estéril. Estas suspensiones fueron sometidas a 3 ciclos de calentamiento a 100°C y congelado a -70°C. Se centrifugaron a 10.000 rpm 5 min y 5 μl del sobrenadante se utilizaron como fuente de ADN en reacciones de amplificación de volumen final 50 μl. Se utilizaron los oligonucleótidos p18f/p18r con ciclos de amplificación de 94°C, 2min; 30 x (94°C, 1 min; 58°C, 1 min; 72°C, 1 min); 72°C, 10 min.

### 12.5. Hibridación en colonia de *B. abortus*.

La hibridación en colonia se realizó por una modificación del método clásico (Ausubel *et al.*, 1996). Las colonias Sac<sup>R</sup> Ap<sup>S</sup> de *B. abortus* S19 transformadas con el plásmido pK26SL fueron transferidas a membranas de 82 mm de nitrocelulosa (MCI) y las membranas fueron incubadas secuencialmente sobre un papel Whatmann embebido con 0,5 M NaOH, por 5 min; 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris pH=4; otros 5 min y finalmente con 1,5 M MnCl/ 2X SSC, 5 min. Se dejaron secar las membranas 1 hr a temperatura ambiente y luego fueron horneadas 2 hs a 80°C. Estos filtros fueron utilizados para las reacciones de hibridación.

Como sonda se utilizó el gen *luc* marcado con [<sup>32</sup>P]α-dCTP. El gen se obtuvo por amplificación con los oligonucleótidos *plucf/plucr*. Los ciclos de amplificación fueron 94°C, 2min; 35 x (94°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C, 2 min); 72°C, 10 min.

## 13. Western Blot.

### 13.1. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.

Se utilizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida de concentración 12,5% (para la detección de BP26) o 15% (para la detección de BMP18). La relación de acrilamida: bisacrilamida fue 30:0,8. En general se utilizaron minigeles (8 x 8 cm) que se corrieron a 100V (aproximadamente 40 mA iniciales), 2 horas o a 40V (10 mA iniciales), 16 horas en *buffer* Laemmli (25 mM TrisHCl, 250 mM Glicina, 0,1% SDS).

Una vez finalizada la corrida electroforética se desmontaron los geles y las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando *buffer* Laemmli suplementado con 20% de metanol, durante dos horas a 200 mA. La efectividad de la transferencia se confirmó en todos los casos por tinción de la membrana con una solución de 0,1% Rojo *Ponceau* (SIGMA) en 5% ácido acético glacial.

Los extractos bacterianos utilizados corresponden al precipitado de 0,5ml de cultivo saturado resuspendido en 100 µl de agua y 100 µl de *buffer* de muestra (2% β-mercaptoetanol, 100 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% glicerol, 4% SDS, 0,2% azul de bromofenol). Se calentaron a 100°C durante 5 min y se sembraron en el gel o se congelaron a -20°C hasta su uso. En el caso de cepas de *Brucella*, el cultivo fue inactivado previamente por calentamiento 1 hr a 60°C.

### **13.2. Inmunodetección.**

Para los ensayos de Western Blot las membranas fueron bloqueadas por incubación a temperatura ambiente en una solución 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl (TBS), 0,05% Tween 20 y 5% de leche en polvo descremada, durante una hora. La incubación con el primer anticuerpo se realizó a temperatura ambiente agitando suavemente durante dos horas, con los anticuerpos y las diluciones especificadas en cada caso. Se lavó tres veces con TBS-0,05% Tween 20 durante 10 min a temperatura ambiente cada una. Luego se agregó el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón, anti-IgG de conejo o anti IgG bovino (Accurate), según corresponda, en todos los casos conjugado con peroxidasa de rabanito. Se incubó una hora a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados y se reveló con una solución que contiene 1vol. de 4-cloro naftol (3 mg/ml en metanol), 5vol. de H<sub>2</sub>O y 1:1000 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%.

Los antisueros primarios de conejo contra BP26 y BMP18 fueron obtenidos en nuestro laboratorio (Boschiroli *et al.*, 1995; Rossetti *et al.*, 1991).

### **14. Ensayos de actividad luciferasa.**

Las colonias luminiscentes de *E. coli* y *B. abortus* se detectaron por una adaptación del método descrito por Wood y De Luca (1987) y Palomares *et al.* (1989).

Se transfirieron las colonias aisladas a filtros de nitrocelulosa de 82mm. Una vez transferidas, se colocaron los filtros con las bacterias en la cara superior sobre una solución 1mM luciferina (LH<sub>2</sub>) (Promega o SIGMA), 100 mM citrato de sodio pH 5, en una placa de petri limpia. Una vez que el filtro estuvo humedecido (aproximadamente 1 minuto), se envolvió en papel plástico transparente (Saran-wrap o Rolopac), y se colocó sobre una película autorradiográfica (AGFA STG2), con la cara del filtro conteniendo las bacterias hacia la película. El tiempo de exposición es de 30 a 60 min para *E. coli* y varía de 6 a 16 horas para *B. abortus* (según el gen *luc* esté en una única copia o en plásmido multicopia y según el promotor bajo el cual esté clonado).

### **15. Tinción con cristal violeta.**

La tinción por cristal violeta se realizó según el protocolo de Alton *et al.*, 1988. Las placas de AT con colonias aisladas de *Brucella* se inundaron con 10 ml de una dilución 1/40 en agua de solución de cristal violeta preparada como 20% cristal violeta (10% p/v cristal violeta en etanol absoluto), 80 % oxalato de amonio (1% p/v C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> en agua). Después de 20 segundos, se retiró el exceso de colorante y se examinaron las colonias.

Las colonias lisas no toman el colorante (colonias blancas) mientras que las colonias rugosas sí (colonias violetas). Las drogas utilizadas fueron de Sigma.

#### **16. Sensibilidad a temperatura, a SDS y Polimixina B.**

Para los ensayos de sensibilidad a la temperatura, se obtuvieron dos suspensiones celulares para cada una de las cepas de *Brucella* a partir de colonias crecidas 48 hs. a 30°C, disueltas en 0,5 ml de TSB. Esta suspensión se llevó a  $OD_{600nm}=0,1$ . Se realizaron diluciones seriadas y se sembraron alícuotas de las diluciones en placas de AT para S19 y AT suplementadas con los correspondientes antibióticos en los casos de I1 e I1-C por triplicado, siendo que cada réplica se incubó a distinta temperatura: 30, 37 y 40°C. Se incubaron las placas 48 hs para las temperaturas de 37 y 40°C y 72 hs para las de 30°C. Se contaron las bacterias y se determinó el número de bacterias viables que se expresó como UFC/ml.

La sensibilidad a SDS y Polimixina B (PmB) se ensayó por inhibición de crecimiento en placa. Cultivos saturados de las cepas mutantes y parentales se ajustaron a una  $DO_{600\text{ nm}}=0,2$ . De esa dilución, 100  $\mu\text{l}$  fueron sembrados en placas de AT (5 placas por cepa, por tratamiento) y se colocaron sobre las bacterias sembradas discos de papel de filtro (10 mm de diámetro) con 10  $\mu\text{l}$  de SDS 10% o Pm B (100  $\mu\text{g/ml}$ ) según corresponda. Luego de incubar 72 hs a 30°C, se midieron las zonas de inhibición del crecimiento, tomando los dos diámetros del halo de inhibición y calculando el promedio.

#### **17. Ensayos de supervivencia y protección en ratones BALB/c.**

##### **17.1. Animales de laboratorio.**

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, provistos por el bioterio del CICVyA-Castelar en el caso de las mutantes de S19 o por la Universidad de East Carolina en el caso de las mutantes en 2308 y los experimentos en macrófagos peritoneales.

##### **17.2. Estimación de la virulencia residual de las mutantes de S19.**

Se inocularon intraperitonealmente grupos de ratones hembra BALB/c de 6 a 8 semanas con  $1 \times 10^5$  UFC de las distintas cepas de *Brucella* en 200  $\mu\text{l}$  de PBS. A las distintas fechas post inoculación, 5 animales por grupo fueron sacrificados por sobredosis de éter

etélico y se obtuvieron muestras de sangre del seno retroorbital en los casos en que se analizaron los sueros. Se realizó un pool con la sangre extraída de los ratones de cada grupo y se obtuvo el suero por incubación de 2 horas a 37°C y posterior centrifugación a 2.000g por 15 min. El suero de los animales fue fraccionado y guardado a -20°C para su posterior análisis.

Los bazos fueron extraídos, pesados y luego homogeneizados en 5 ml de solución salina (PBS). El número de bacterias por bazo se determinó por diluciones seriadas de los homogenatos y plaqueo en AT suplementado o no con los antibióticos correspondientes. Las placas fueron incubadas a 30°C por 72 hs, luego de lo cual se contaron las colonias y se determinaron unidades formadoras de colonia (UFC) por bazo.

### **17.3. Protección contra el desafío con una cepa patógena.**

Para las experiencias de protección de ratones BALB/c, se utilizaron los esquemas clásicos (Boschiroli *et al.*, 1997). En el caso de *B. abortus* I1, se inocularon intraperitonealmente tres grupos de ratones, cada uno con  $1 \times 10^5$  UFC de *B. abortus* S19 o I1, en 200 µl de PBS y con PBS como control negativo. En la experiencia con *B. abortus* I2, se inocularon tres grupos de ratones con  $1 \times 10^5$  UFC de S19 o I2 en 200 µl de PBS y PBS sólo como control negativo. A distintos tiempos post inoculación, grupos de 5 ratones de cada grupo fueron sacrificados y se determinó el número de UFC en el bazo por homogenización y diluciones seriadas, así como la presencia de esplenomegalia por peso de bazo.

Entre 7 y 10 semanas post-infección, los ratones fueron desafiados con  $5 \times 10^4$  *Brucella abortus* 2308 (cepa virulenta). A las distintas fechas post desafío, 5 ratones de cada grupo en el caso de I1 o 10 ratones de cada grupo, en el caso de I2, fueron sacrificados y sus bazos procesados como fue descrito anteriormente. Para diferenciación de *B. abortus* 2308 de S19 o las mutantes, la suspensión esplénica fue plaqueada en AT y en AT suplementado con 0,1% eritritol (que permite el crecimiento de S2308 pero no de S19) (Sangari *et al.*, 1998). Después de 48 hs a 37°C, se visualizaron las colonias y se determinó el número de UFC de S2308 por bazo.

### **17.4. Estimación de la atenuación *in vivo* de M18v.**

Ratones BALB/c de 8 semanas fueron inoculados intraperitonealmente con  $5 \times 10^4$  UFC de S2308 o M18v. A los distintos tiempos post inoculación 5 ratones de cada grupo



fueron sacrificados y el número de UFC en el bazo determinado como anteriormente. Diluciones de los homogenatos en PBS correspondientes a S2308, fueron plaqueadas en AT, mientras que diluciones de los homogenatos correspondientes a M18v fueron plaqueados por duplicado en AT y AT suplementado con cloranfenicol. Las placas fueron incubadas a 37°C por 48 hs. Se contaron las colonias y se determinaron unidades formadoras de colonia (UFC) por bazo.

## **18. Respuesta humoral en ratones BALB/c.**

### **18.1. Detección de anticuerpos anti-LPS por pruebas de BPA y 2-Me.**

La prueba de BPA (aglutinación en placa) se realizó según el protocolo oficial del SENASA (Nicola *et al.*, 1999) utilizando el antígeno BPA (suspensión inactivada de *B. abortus* cepa lisa 1119-3 al 11%, pH= 3,7) producido por SENASA (gentilmente cedido por la Dra. Ana Nicola). Se mezclaron 80 µl del suero de los ratones con 30 µl de antígeno BPA. Se mezclaron sobre el aglutinoscopio, abarcando una superficie circular de 3 cm de diámetro hasta homogeneizar la mezcla. Después de incubar con rotación, se procedió a la lectura. Las reacciones se consideran positivas cuando se forman grumos, aún siendo finos o negativas cuando la mezcla suero-antígeno es de turbidez homogénea y sin grumos.

La prueba de 2-Me se realizó también según los procedimientos del SENASA. Brevemente, distintas diluciones de suero fueron incubadas con una solución de 2-mercaptoetanol e incubadas 1 hora a temperatura ambiente, luego de lo cual se agregó el antígeno BPA al 2% (pH=6,5) y se incubó 48 hs a 37°C. Los resultados se leyeron como aglutinación presente en el tubo. El título de aglutinación del suero está dado por la dilución del último tubo en el que se presentó una disminución de la turbidez evidente, manteniéndose los grumos firmes a pesar de una agitación leve. Se ensayaron diluciones seriadas hasta 1/200.

### **18.2. Determinación de anticuerpos anti-BP26 y anti-BMP18 por Western Blot.**

Se corrieron en geles preparativos extractos de *E. coli* DH5α-pBa26 y DH5α-pBS18. Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa. Se hizo un análisis de multitira, con fracciones de las membranas de 0,5 mm de ancho. Los pools de sueros fueron utilizados en una dilución 1/100 en TBS con 5% de leche descremada. Como segundo anticuerpo se utilizó un anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa en una dilución 1:500.

## **19. Ensayos de replicación intracelular en macrófagos peritoneales murinos.**

### **19. 1. Preparación de las dosis infectivas.**

Las bacterias fueron crecidas en medio sólido 48 hs a 37°C. El día de la infección, se tomó una colonia y se obtuvo una suspensión celular que se llevó a  $OD_{600nm}=0,1$ . Se tituló la suspensión utilizada para confirmar la dosis infectiva por diluciones seriadas y plaqueo en medio sólido. En el momento de la infección, las bacterias fueron opsonizadas por incubación de 2 horas con 10% de suero de ratones BALB/c de 8 semanas post-infección con S2308 (concentración sub-aglutinante) a 37°C.

### **19. 2. Infección de macrófagos y ensayo de proliferación intracelular.**

Se utilizó el método descrito por Robertson *et al.* (1998). Ratones BALB/c de 8 semanas fueron sacrificados por sobredosis de Isoflurano (se utilizaron 3 ratones por cepa). Los macrófagos residentes se cosecharon por lavaje de la cavidad peritoneal con medio de cultivo DMEM (GIBCO). Los macrófagos obtenidos se centrifugaron y resuspendieron en el volumen adecuado de DMEM con 5% SFB (suero fetal bovino) (GIBCO), de manera de tener  $2 \times 10^5$  células por pocillo de placa de 96 pocillos, considerando 3 pocillos por cepa y una placa por tiempo de ensayo (en este caso tres: 0, 24 y 48 horas). Se incubaron a 37°C con atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, toda la noche. Los cultivos celulares se enriquecieron en macrófagos por lavado posterior a la incubación. Se agregaron las bacterias, en una relación de aproximadamente 100 bacterias por macrófago. Se permitió la fagocitosis por 2 horas a 37°C, con 5% CO<sub>2</sub>. En este punto el medio de cultivo se reemplazó con DMEM + 5%SFB conteniendo 50 µg/ml de gentamicina (GIBCO) para matar las bacterias extracelulares. Después de una hora, el medio se reemplazó con DMEM + 5% SFB con 12.5 µg/ml de gentamicina. A los tiempos 0, 24 y 48 horas después de la adición de DMEM con bajas dosis de gentamicina, las monocapas se lavaron y se lisaron con 0,1% de deoxicolato. El número de bacterias intracelulares sobrevivientes se determinó por diluciones seriadas y plaqueo en AT (para 2308 y M18v) y AT con cloranfenicol (en el caso de M18v). En todos los tiempos se comprobó que no hubiera bacterias extracelulares plaqueando tres gotas de 10 µl del medio previo a la lisis con deoxicolato.

## **20. Ensayos de protección en bovinos.**

### **20.1. Selección y mantenimiento de los bovinos.**

La experiencia en bovinos se realizó íntegramente en colaboración con el grupo del Dr. Carlos Campero en la EEA-Balcarce de INTA, con autorización de la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA) y supervisión del SENASA.

Se seleccionaron 64 terneras de cuatro meses de edad Hereford y Aberdeen Angus de rodeos libres de brucelosis de la zona de Balcarce y se mantuvieron en pasturas artificiales en las instalaciones de la EEA-Balcarce a lo largo de la experiencia, previo al desafío, en reservas aisladas. Luego de ser seleccionados los animales permanecieron un mes, periodo en el cual se confirmó por dos extracciones de suero que los animales eran BPA negativos. Al mes, los animales fueron vacunados.

### **20.2. Vacunación de bovinos con cepas de *B. abortus*.**

Las cepas vacunales mutantes se prepararon por plaqueo hasta césped confluyente en AT. El césped de bacterias fue resuspendido y lavado con PBS estéril, fraccionado y guardado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Una alícuota de cada cultivo fue titulada por diluciones seriadas y plaqueo para determinar las diluciones necesarias para la obtención de la dosis de vacunación. Los stocks tenían  $1-2 \times 10^{10}$  UFC/ml. La concentración de la dosis de vacunación se determinó en base a las recomendaciones para S19 y fue de  $2-3 \times 10^{10}$  UFC/ml. Para el grupo S19 se utilizó una vacuna comercial ( $2 \times 10^{10}$  UFC/ml). Los animales se vacunaron por vía subcutánea con 2 ml de la cepa correspondiente (N=15 animales por grupo). Un grupo de 15 animales no fue vacunado (grupo control).

### **20.3. Desafío de los bovinos con una cepa patógena de *B. abortus*.**

A los 10 meses post vacunación, los animales que llegaron a la madurez sexual fueron sincronizados en su etapa de celo por tratamiento con progesterona? y preñados por monta con toros controlados de la EEA-Balcarce. En el segundo trimestre de preñez, los animales fueron trasladados a los campos del SENASA en Azul, para la experiencia de desafío.

Las dosis de desafío se prepararon a partir de la cepa de 2308 aislada de los ratones del grupo control de la experiencia de I2 en ratones BALB/c, de la misma manera que las cepas vacunales. Las bacterias fueron evaluadas por tinción con cristal violeta y

crecimiento en eritritol para confirmar la estabilidad de la cepa, se encontró que la disociación fue menor del 0.6%.

Las vacas fueron desafiadas con 50 µl por vía conjuntival, en cada ojo de una suspensión de  $3 \times 10^8$  UFC/ml de S2308.

#### **20.4. Evaluación de los aislamientos a partir de tejidos y fluidos.**

Los aislamientos fueron realizados por la Med. Veterinaria Andrea Fiorentino de la EEA-Balcarce por procedimientos tradicionales de aislamiento de *Brucella* a partir de distintos tejidos y fluidos (Alton *et al.*, 1988). Las bacterias aisladas fueron liofilizadas y remitidas al Inst. de Biotecnología para posterior caracterización.

Las bacterias fueron resuspendidas en TSB y diluciones seriadas fueron plaqueadas en placas con y sin eritritol para diferenciar S2308 de S19 y las mutantes M11uc e I2.

### **21. Respuesta humoral en bovinos.**

#### **21.1. Respuesta humoral anti-LPS por BPA y 2-Me.**

Las pruebas de BPA y 2-Me fueron realizadas en la EEA-Balcarce por procedimientos oficiales del SENASA (Nicola *et al.*, 1999). El título de cada suero se determinó como la dilución más alta que causa aglutinación y se expresó en unidades que corresponden al recíproco de esa dilución.

#### **21.2. Respuesta humoral anti-LPS por cELISA**

El ELISA competitivo o cELISA se realizó siguiendo el protocolo desarrollado por Nielsen *et al.*, 1996, siguiendo las especificaciones del SENASA. La técnica consiste en la adsorción del S-LPS a una placa de 96 pocillos y luego se adicionan los sueros bovinos (dilución 1/10) y un anticuerpo monoclonal de ratón específico para un epitope de la cadena O del S-LPS. Cada suero fue evaluado por duplicado. Después de la incubación y lavados, se añadió un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa. El resultado se expresó como porcentaje de inhibición y corresponde a

$$\% \text{inhibición} = 100 \left[ \frac{\text{valor promedio de DO de dos repeticiones de una determinada}}{\text{valor promedio de DO del control de conjugado, sin primer}} \times 100 \right]$$

#### **21.3. Respuesta humoral anti-BP26 por BP26-iELISA.**

Se utilizó como antígeno extractos periplásmicos de las bacterias *E. coli* pBa26 (vector con inserto que expresa BP26) y *E. coli* pPO6 (vector sin inserto) (Arese *et al.* 1999).

La concentración de proteínas totales en ambos extractos fue determinada por el método de Biuret, utilizando el *kit* comercial *Micro BSA Protein Assay Reagent Kit* (Pierce). Se sensibilizaron placas de poliestireno con 60 ng de cada antígeno en *buffer* bicarbonato 60 mM, pH 9.6 (100  $\mu$ l por pocillo), mitad de la placa con el antígeno BP26 y la otra mitad con el antígeno pPO6. La sensibilización se hizo 16 hs a 22-25°C. Después de la sensibilización, se descartó el líquido y las placas se congelaron a -20°C hasta su uso. En el momento de usar, se descongelaron a temperatura ambiente. Una vez descongeladas, se lavaron una vez con PBST (PBS 1X, 0,05% de Tween 20, pH 7,2) y se bloquearon 1 hora a 37°C con 100  $\mu$ l/pocillo de solución de bloqueo (3% leche descremada en PBST). Se lavó con PBST y se agregaron 100  $\mu$ l de una dilución 1/200 del suero problema en solución de bloqueo, por duplicado y en ambas partes de la placa. En todos los casos se incluyó control positivo, control negativo y blanco (solo leche), también por duplicado y en ambas parte de la placa. Se incubó 1 hr a 37°C y después de lavar exhaustivamente (6 veces) con PBST, se agregaron en cada pocillo 100  $\mu$ l del conjugado anti-IgG bovino-peroxidasa 1/1500. Se incubó 1 hr a 37°C y luego se lavó 6 veces con PBST. Para revelar, se agregó en cada pocillo 100  $\mu$ l de solución de revelado (0,04M ABTS en *buffer* citrato pH 5 y 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100Volts). Se tomaron lecturas a los 30, a los 40 y a los 50 min, en lector de ELISA a 405 nm. Se toma aquella lectura de cada placa donde el control positivo fuerte da  $DO_{405\text{ nm}} \sim 1$ .

Para cada suero se promediaron las lecturas con el antígeno BP26 y se le restó el promedio del blanco (a). Para el mismo suero, se promediaron las lecturas contra el antígeno pPO6 y se le resta el blanco de este antígeno (b). Se restaron después los resultados a-b y ese es el valor de DO que se tomó.

#### **21.4. Respuesta humoral anti-Luciferasa por Western Blot.**

##### **21.4.a. Clonado, expresión y purificación de Luciferasa recombinante.**

El plásmido pSP-luc+ (Promega) fue cortado con las enzimas de restricción BglII y EcoRI, liberando un fragmento de 1,7 kb que contiene el gen *luc*. Este fragmento fue purificado por electroforesis en gel de agarosa y clonado en el plásmido pRSET B en los sitios BglII/EcoRI. El plásmido resultante, pRSETB-luc, deja al gen *luc* bajo control del promotor T7 y en el 5min del gen está la región que codifica para los 6 residuos de Histidina. Una vez identificado el plásmido con la construcción correcta por análisis con las enzimas de restricción BamHI (corta en pRSET y no en *luc*) y NarI (corta en *luc* y no en pRSET), se transformaron bacterias *E. coli* BL21plys competentes. Se confirmó

la expresión de luciferasa por inducción con 3 mM IPTG y posterior análisis por SDS-PAGE, siguiendo el protocolo descrito para expresión utilizando los vectores pRSET (Invitrogen).

La purificación se realizó por afinidad utilizando una resina de agarosa cargada con Níquel (ProBond de Invitrogen). Se realizó una prueba de solubilidad de la proteína recombinante y se determinó que se encuentra en la fracción insoluble por lo que se utilizaron condiciones de purificación desnaturalizantes. Para la purificación se utilizó una modificación del protocolo sugerido por el proveedor de la resina (Invitrogen). Brevemente, un cultivo de 100 ml de *E. coli* BL21plys-pRSETBluc de  $DO_{600nm}=0,5$  fue inducido con 3mM de IPTG para lograr la expresión de la proteína. Después de 2 hs, el cultivo fue centrifugado y el precipitado resuspendido en 10 ml de solución de lisis (100 mM  $NaH_2PO_4$ , 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH=8). Luego de agitación suave 60 min a T° ambiente, el lisado se centrifugó para separar los restos celulares. El sobrenadante (10 ml) se mezcló con 2 ml de resina y se mezclaron suavemente 30 min a T° ambiente. Se cargó la resina en una columna y se dejó pasar el eluido. Se lavó con 4 ml de solución de lavado (100 mM  $NaH_2PO_4$ , 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH=6,3) y luego se eluyeron fracciones de 0,5 ml con las soluciones de elución de 100 mM  $NaH_2PO_4$ , 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH=5,9 y pH=4.5. Aliquotas de las diferentes fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie.

#### **21.4.b. Análisis por tinción con azul de Coomassie.**

Se incubaron los geles en una solución de Coomassie 0,05% (Coomassie Brilliant Blue R 250 0,05%, metanol 50%, ácido acético 10%) por 1 a 2 hs con agitación suave. Se retiró la solución de tinción y se decoloró el exceso de colorante mediante la incubación con agitación suave con solución decolorante (metanol 50%, ácido acético 10%), que se reemplazó periódicamente hasta que las bandas proteicas se visualizaran con nitidez.

#### **21.4.c. Western Blot contra Luciferasa con los sueros bovinos.**

Una alícuota de la fracción de elución del experimento de purificación correspondiente al mayor grado de purificación de luciferasa alcanzado fue sometida a electroforesis en SDS-PAGE y transferida a membrana de nitrocelulosa. La membrana fue fraccionada y se realizó un WesternBlot con grupos de sueros bovinos de las fechas post vacunación indicadas. Los anticuerpos anti-luciferasa fueron identificados por incubación con un

segundo anticuerpo anti-IgG bovina conjugado con peroxidasa utilizado en una dilución 1/500.

## **22. Análisis estadístico.**

Los análisis por prueba *t* de Student se realizaron con el programa Microsoft Excell y con el programa Sigma Plot (SPSSInc).

Los datos de protección obtenidos en el ensayo con la cepa mutante INTA1 (I1) fueron comparados por análisis de varianza a dos criterios (ANOVA) y comparación de Tukey, en colaboración con la Dra. Laura Marangunich.

Los datos de protección de la experiencia con la cepa INTA2 (I2) fueron analizados por la prueba no paramétrica de Kruskal y Wallis seguida del ensayo de comparaciones múltiples, utilizando el programa SAS (Version 8) para Microsoft Windows, SAS Institute Inc., 1999, con colaboración de la Ing. Nancy Kahn del IMYZA de INTA.

## **23. Aprobación y control de los experimentos en animales.**

Los estudios de persistencia y protección en ratones con las cepas *B. abortus* I1 e I2 fueron aprobados por la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA).

Los estudios en bovinos fueron aprobados y monitoreados por CONABIA y SENASA. Los experimentos de M18v se realizaron en el laboratorio del Dr. Martin Roop II de la Universidad de East Carolina, Greenville, Estados Unidos, siguiendo los lineamientos de ética para el uso de animales con fines científicos de dicha universidad.

## **24. Financiación.**

El presente trabajo contó con la financiación de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica a través del subsidio BID 802 OC/AR-PID 616 y del INTA a través de la financiación de proyectos nacionales.

Los estudios y ensayos realizados en el país y en el exterior fueron posibles gracias a beca interna de CONICET, beca de investigación de INTA y beca externa de la Comisión Fulbright.

# **Resultados**



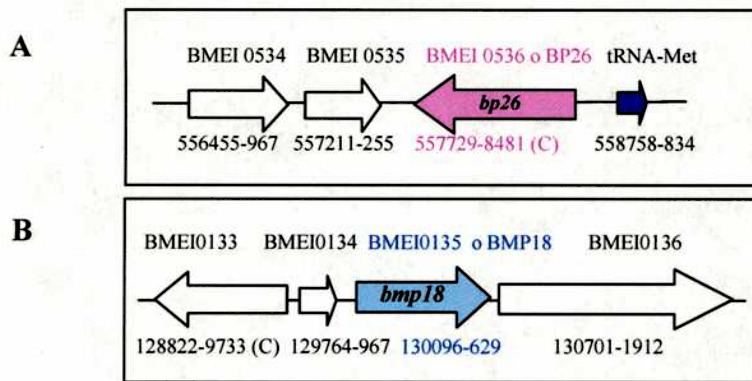
## **Parte I: Mutagénesis insercional de los genes *bp26* y *bmp18* en *Brucella abortus* con marcadores de resistencia a antibióticos.**

### **1. Caracterización transcripcional de los genes *bp26* y *bmp18* de *B. abortus*.**

Las proteínas BP26 y BMP18 fueron identificadas en trabajos previos a partir de una biblioteca genómica de *B. abortus* S19 en el fago  $\lambda$ gt11 por reactividad frente a sueros de bovinos inoculados reiteradamente con S19 (Rossetti *et al.*, 1991). Se aislaron y secuenciaron los fagos recombinantes y los insertos fueron subclonados en vectores plasmídicos. La secuenciación de los insertos permitió la identificación de los genes *bp26* y *bmp18* (Rossetti *et al.*, 1996; Cravero *et al.*, 1993). Si bien se habían obtenido por mutagénesis insercional las mutantes simples M1 (*B. abortus* S19 *bp26::kan*) (Boschioli *et al.*, 1995) y SC1 (*B. abortus* S19 *bmp18::kan*) (Cravero *et al.*, 1993), no se habían caracterizado transcripcionalmente los genes en estudio.

El análisis de la secuencia nucleotídica de los insertos correspondientes a los fagos recombinantes, reveló que los marcos abiertos de lectura (ORF) río abajo del gen *bp26* se encontraban codificados en la otra hebra, mientras que río abajo del gen *bmp18* se encontraba un marco abierto de lectura que, por similitud de secuencia, podría corresponder a una ATPasa.

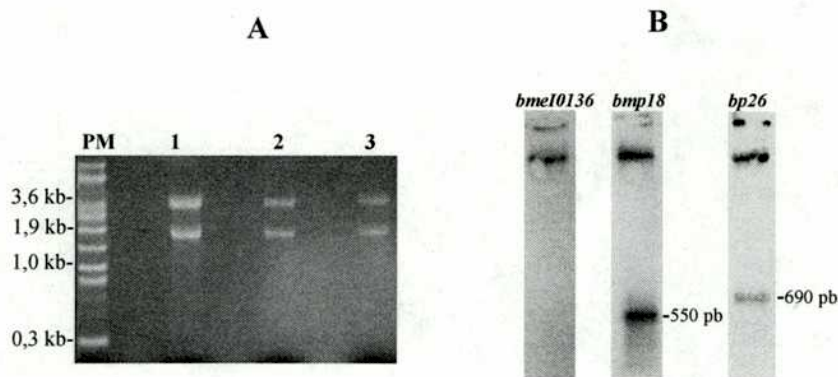
Esta organización fue después confirmada por comparación con el genoma de *B. melitensis* 16M (Del Vecchio *et al.*, 2002 a) (GenBank NC 003317). Tanto en *B. melitensis* como en *B. abortus* los marcos abiertos de lectura río abajo del gen *bp26* se transcribirían en el sentido contrario al gen *bp26* y río arriba se encuentra el gen para el tARN de metionina, también en sentido de transcripción contrario a *bp26* (Figura 1 A). Por otra parte, río abajo del gen *bmp18* se encuentra un marco abierto de lectura que podría corresponder a una hipotética ATPasa (BME10136) (Figura 1 B).



**Figura 1. Esquema de las regiones genómicas de *B. melitensis* que comprenden a los genes *bp26* y *bmp18* (GenBank NC\_003317).** Se indican las coordenadas (expresadas en pares de bases) en que se encuentran los distintos marcos abiertos de lectura anotados en el genoma de *B. melitensis* 16M y si se encuentran codificados en la hebra positiva o en la complementante (c). El esquema no se encuentra a escala. **A. *bp26*.** BMEI0534 y BMEI 0535 son proteínas hipotéticas. BMEI0536 es la proteína BP26 y río arriba del gen que la codifica se encuentra el gen para el tARN para Metionina. **B. *bmp18*.** BMEI0133 presenta similitud con epimerasas; BMEI0134, corresponde a una proteína hipotética; BMEI0135 es la proteína BMP18 y BMEI0136 presenta similitud con ATPasas.

El clon proveniente de la biblioteca genómica original de S19 en  $\lambda$ gt11 expresa la proteína BMP18 a partir de su propio promotor, y este clon no incluye al marco abierto de lectura *bmeI0134*, lo que sugiere que hay un promotor entre *bmeI0134* y *bmp18*. Por análisis de esta región intergénica con algoritmos que estiman la probabilidad de que una secuencia dada sea un promotor ([www.fruitfly.org](http://www.fruitfly.org)), se encontró una secuencia con alta probabilidad (0.98/1) río arriba de *bmp18* (bases -117 a -69). Sin embargo, aplicando dicho algoritmo no se identificaron promotores entre *bmp18* y *bmeI0136*. De este análisis se desprende que *bmp18* podría formar parte de un operón.

Se realizó un Northern Blot utilizando como molde ARN total extraído de *B. abortus* S19 y como sondas los productos de amplificación correspondientes a los genes *bmeI0136*, *bmp18* y *bp26* (Figura 2).



**Figura 2. Análisis transcripcional de los genes *bp26*, *bmp18* y *bmeI0136*.** **A. Electroforesis en gel de agarosa de ARN total de *B. abortus* S19.** Calle PM: marcador de peso molecular de ARN de 0.28 a 6.58 kb (Promega); calles 1, 2 y 3: ARN total de S19. Las bandas que se observan corresponden a los ARN ribosomales 23S y 16S. **B. Northern Blot.** Las tres calles corresponden a hibridaciones independientes del ARN bacteriano total transferido a membrana de Nylon. Las sondas utilizadas fueron fragmentos de amplificación de los genes *bmeI0136*, *bmp18* y *bp26*, marcados con [ $^{32}$ P] $\alpha$ -dCTP. Las dos bandas en el extremo superior corresponden a los ARN ribosomales (hibridación inespecífica) y se incluyen como referencia de tamaño.

Tanto *bp26* como *bmp18* revelan transcritos del tamaño correspondiente a los genes monocistrónicos (690 y 550 pb, respectivamente). La secuencia del ORF *bmeI0136* correspondería a un transcritto de 1,2 Kb, pero la sonda *bmeI0136* no hibridó con ningún transcritto. Estos resultados demuestran que *bp26* y *bmp18* se transcriben como genes únicos y que el transcritto de *bmeI0136* o bien no corresponde a un gen funcional, o el transcritto no se detecta bajo las condiciones de este ensayo.

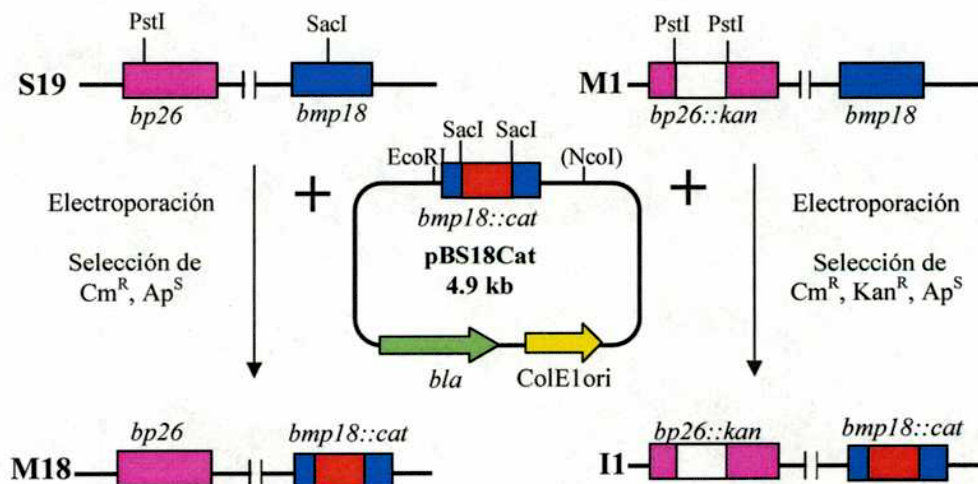
Por ensayos previos se sabe que la mutación de *bmp18* en S19 genera una cepa con menor replicación en los estadios iniciales de infección en el bazo de ratones BALB/c, y que este fenotipo es revertido por una copia funcional del gen *bmp18* en un plásmido replicativo para *Brucella* (Cravero *et al.*, 1993). Estos antecedentes junto con los resultados obtenidos en el Northern Blot sugieren fuertemente que *bmp18* es un gen monocistrónico en *B. abortus*.

## 2. Obtención de la cepa doble mutante genes *B. abortus* INTA1 (II).

Con el objetivo de obtener una cepa doble mutante para los genes *bp26* y *bmp18* en *B. abortus* S19, se diseñó una estrategia de mutagénesis insercional por reemplazo alélico utilizando genes que confieran resistencia a diferentes antibióticos.

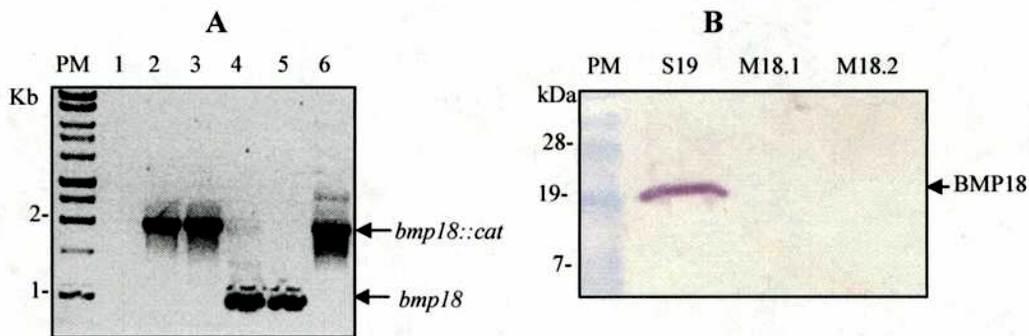
Se interrumpió la secuencia codificante de *bmp18* con un gen que confiere resistencia a cloranfenicol (*cat*), en un vector no replicativo para *Brucella*, generando el plásmido pBS18cat. Los vectores con origen de replicación ColE1 tiene un rango de hospedador restringido y no pueden replicar en *Brucella*, por lo que si el plásmido no se integra al cromosoma, se pierde en las sucesivas divisiones celulares. Con el vector pBS18cat se transformaron por electroporación bacterias competentes de las cepas *B. abortus* S19 y *B. abortus* M1.

Las bacterias transformadas fueron seleccionadas por plaqueo en medio sólido suplementado con cloranfenicol (resistencia portada por el gen *cat* que interrumpe la secuencia de *bmp18*). Como se trata de un plásmido suicida para *Brucella*, las colonias obtenidas corresponden tanto a bacterias en las que el plásmido se integró al cromosoma por un único evento de recombinación, como a bacterias en las que el alelo mutado reemplazó al alelo salvaje por dos eventos de recombinación homóloga. Para discriminar entre ambos casos, se hace un ensayo de plaqueo en réplica de las colonias transformadas obtenidas, seleccionando en ampicilina (Figura 3).



**Figura 3. Estrategia de mutagénesis insercional para la obtención de cepas mutantes de *B. abortus* S19 por reemplazo alélico.** Se indican las cepas parentales, S19 y M1 (Boschiroli *et al.*, 1995); las cepas obtenidas M18 e INTA1 (I1); los genes blanco de la mutagénesis, *bp26* y *bmp18*; los genes maracadores, *cat* (resistencia a cloranfenicol) y *kan* (resistencia a kanamicina); el plásmido utilizado para transformar, pBS18cat y los sitios de restricción utilizados. Los paréntesis indican que el sitio se perdió en el proceso de clonado.  $Kan^R$  y  $Cm^R$ , indican resistencia a kanamicina y cloranfenicol, respectivamente.  $Ap^S$ , indica sensibilidad a ampicilina. El esquema es ilustrativo y no se encuentra a escala.

De 50 colonias de S19 transformadas resistentes a cloranfenicol, 48 crecieron tanto en cloranfenicol como en ampicilina, indicando que se trataba de simples recombinantes (SR) mientras que 2 (M18.1 y M18.2) crecieron sólo en cloranfenicol, reemplazando el gen *bmp18* salvaje por la construcción *bmp18::cat*. Se confirmó por amplificación con oligonucleótidos específicos que las dos colonias tenían el gen *bmp18* interrumpido (Figura 4 A) y por Western Blot que no expresaron la proteína BMP18 (Figura 4 B). De estas se tomó una y se la llamó M18.



**Figura 4. Confirmación de la mutagénesis en *bmp18*.** **A. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación obtenidos por PCR de colonia con los oligonucleótidos p18f y p18r.** Calle PM: marcador de peso molecular 1 kb (Promega), calles 1: control sin ADN, 2: M18.1, 3: M18.2, 4: SR (se tomó al azar una colonia simple recombinante como control), 5: S19, 6: *E. coli* DH5 $\alpha$ -pBS18cat. Se indican los amplicones correspondientes a los distintos alelos. **B. Inmunodetección de BMP18.** Western blot con suero policlonal de conejo anti-BMP18, sobre membrana con extractos proteicos totales de las distintas cepas de *B. abortus* separados por electroforesis en SDS-PAGE. El marcador de peso molecular utilizado es preteñido de amplio rango (Broad Range, BioRAD).

Por otro lado, de 22 colonias M1 transformadas, 2 (M2618.1 y M2618.2) crecieron en cloranfenicol y kanamicina y no crecieron en ampicilina, mientras que las demás crecieron en los tres antibióticos. Ninguna de las colonias seleccionada expresaba las proteínas BMP18 y BP26, pero la interrupción de ambos genes por amplificación con oligonucleótidos específicos sólo se confirmó en una de ellas (M2618.1), ya que a partir del ADN de la otra colonia no hubo amplificación (Figura 5). Por lo tanto, se eligió M2618.1 para continuar trabajando y se la llamó *B. abortus* INTA1 (I1).

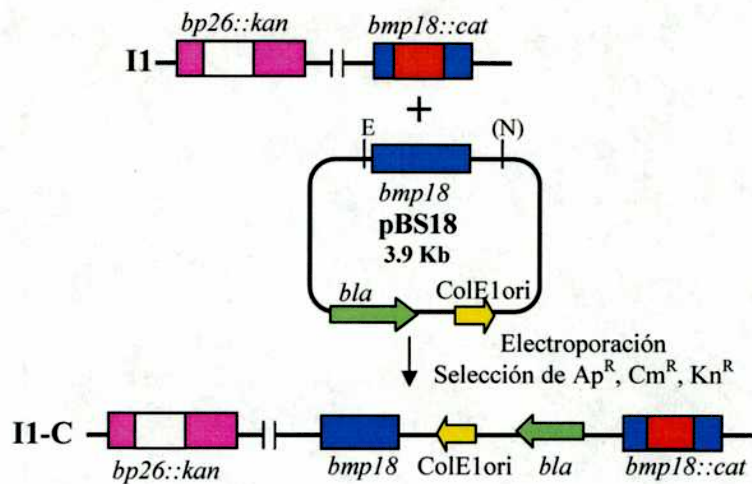


**Figura 5. Confirmación de la mutagénesis en *bp26* y *bmp18*.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación obtenidos por PCR de colonia con los oligonucleótidos p26f y p26r o p18f y p18r. Calle PM: marcador de peso molecular 1 kb (Promega), calles 1 y 6: M2618.1; calles 2 y 7: M2618.2, calle 3: control sin ADN con ambos pares de *primers*, calles 4 y 5: S19. Se indican los amplicones correspondientes a los distintos alelos.

### 3. Obtención de la cepa complementante *B. abortus* I1-C.

Dado que la mutación de BP26 en S19 no genera ningún tipo de alteración en el comportamiento de la cepa en ratones respecto de la cepa parental (Boschiroli *et al.*, 1995) y la mutación en BMP18 genera menor replicación en el bazo, se complementó la mutante I1 con una copia funcional del gen *bmp18* con el objetivo de determinar si en la doble mutantes se mantenían las características de las mutaciones individuales.

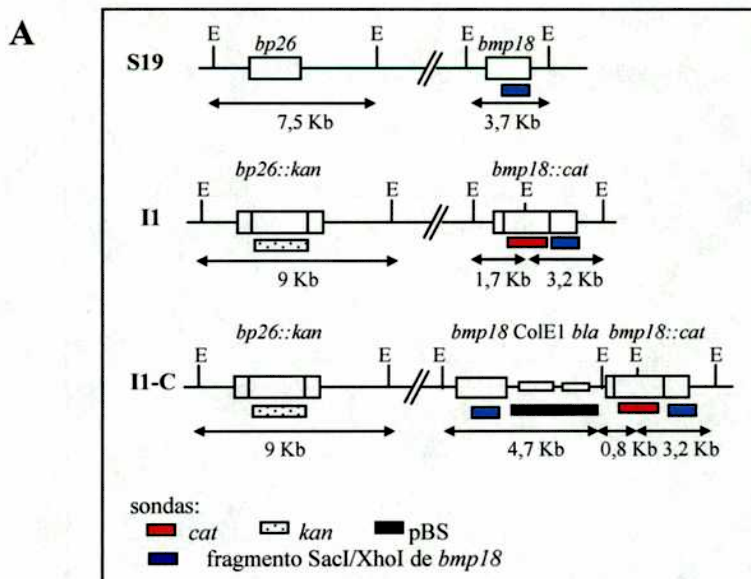
Las estrategias para complementar cepas mutantes genéticamente definidas son la introducción en la cepa mutante de un plásmido replicativo que lleva una copia funcional del gen mutado o la integración de un plásmido suicida con la copia funcional del gen, en el cromosoma de la bacteria. De esta última manera se tiene el gen en una única copia en vez de en varias copias como en el caso del plásmido replicativo. En este caso, para obtener la cepa complementada se transformaron bacterias competentes I1 con un plásmido suicida que lleva una copia del gen *bmp18*. Se seleccionaron aquellas bacterias en que ocurrió un único evento de recombinación (integración del plásmido al cromosoma bacteriano), por la resistencia portada por el vector (en esta caso, ampicilina). Se generó así la cepa I1-C, que tiene dos copias de *bmp18*, de las cuales una es funcional y la otra está interrumpida con el gen *cat*, ambos alelos separados por la secuencia del plásmido (Figura 6).

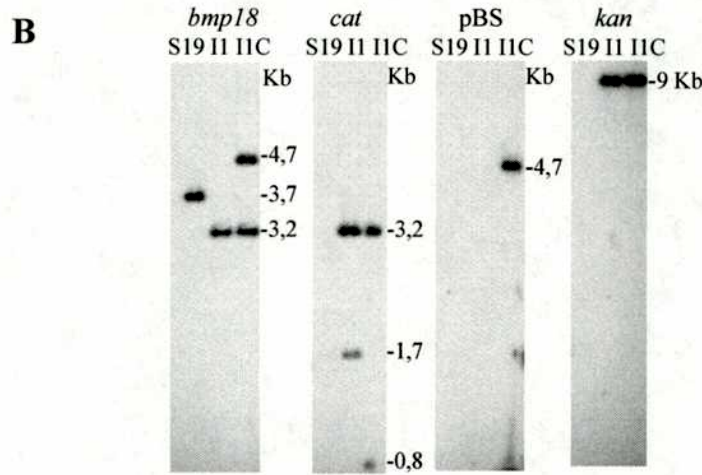


**Figura 6. Esquema de obtención de la cepa complementante *B. abortus* II-C.** Se indican las cepas doble mutante (II) y complementante (II-C), el plásmido utilizado para complementar (pBS18) y los genes involucrados. Se señalan los sitios de restricción utilizados para clonar el fragmento de 1.8 Kb que contiene al gen *bmp18*, E: Eco RI, (N): es el sitio NcoI que se pierde en el clonado.  $Ap^R$ ,  $Kn^R$  y  $Cm^R$ , indican resistencia a ampicilina, kanamicina y cloranfenicol, respectivamente.

#### 4. Confirmación del genotipo de las mutantes obtenidas.

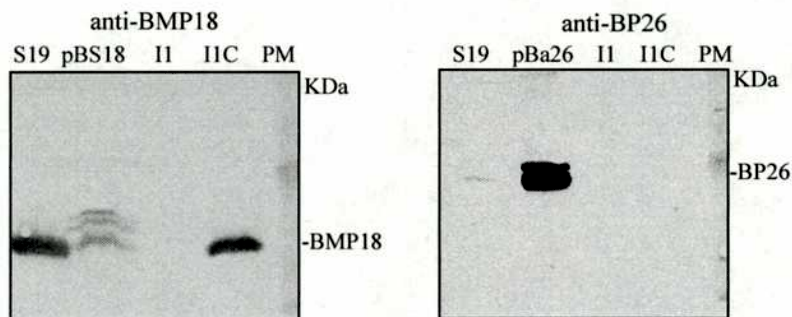
La mutagénesis fue confirmada por Southern Blot con ADN total de las cepas parentales y mutantes (Figura 7).





**Figura 7. Confirmación de la mutagénesis de *bp26* y *bmp18*.** A. Esquema de las regiones de ADN genómico que comprenden a los genes *bp26* y *bmp18* en las distintas cepas de *B. abortus*. Se indican las cepas (S19, II e II-C), los genes involucrados en la mutagénesis y los sitios de corte para EcoRI (E) en el ADN genómico de las cepas de *B. abortus*, las sondas utilizadas y los tamaños de bandas esperados por hibridación con las distintas sondas. El esquema es demostrativo y no está a escala. B. **Southern Blot.** ADN genómico total de *B. abortus* S19, II e IIC fue digerido con EcoRI (condiciones de digestión total), sometido a electroforesis en gel de agarosa 0.8%, transferido a una membrana de nylon e hibridado en condiciones de alta astringencia con las sondas. *bmp18*; *cat*, pBluescript (pBS) y *kan*, marcadas con [<sup>32</sup>P]α-dCTP. Los pesos moleculares indicados se establecieron en base un estándar de peso molecular (1 Kb ladder, GIBCO) incluido en el gel de agarosa.

Se evaluó la expresión de las proteínas BMP18 y BP26 en la cepa doble mutante y complementante por Western Blot con antisueros policlonales específicos contra BMP18 y BP26 (Figura 8).



**Figura 8. Western Blot realizado en membranas con extractos proteicos totales sometidos a SDS-PAGE, revelado con suero policlonal de conejo anti-BMP18 o anti-BP26.** Las calles corresponden a extractos proteicos totales de las cepas de *Brucella* indicadas: S19, II, eII-C y a las



cepas *E. coli* DH5 $\alpha$  con los plásmidos pBS18 o pBa26 según se indica. PM es el estándar de peso molecular Kaleidoscope (BioRad).

Estos resultados confirman que la cepa I1 tiene los genes *bp26* y *bmp18* interrumpidos tal como se había diseñado y que no expresa las proteínas correspondientes. Por lo tanto, la suma de ambas mutaciones introducidas en S19 no es deletérea para la bacteria. La introducción de una copia funcional del gen *bmp18* en el cromosoma de la bacteria restaura la expresión de la proteína BMP18.

##### **5. Evaluación de las propiedades de la membrana externa de las mutantes obtenidas.**

Las mutaciones introducidas en la cepa I1 afectan a dos proteínas de las cuales se desconoce su función biológica. Sin embargo, ambas forman parte de la envoltura celular: BP26 en el periplasma y BMP18 asociada a la membrana externa por su residuo lipídico. Las funciones descritas para otras proteínas de igual localización están relacionadas, entre otros aspectos, con el mantenimiento de la estructura de la membrana externa (CloECKaert *et al.*, 2002). Se ha descrito que la membrana externa de *Brucella* es más resistente a policiones bactericidas, péptidos catiónicos y detergentes comparada con otras bacterias Gram-negativas y que estas características están fuertemente relacionadas con la integridad de la envoltura celular (Lopez-Goñi y Moriyon, 1998). Para evaluar el efecto de la pérdida de BMP18 y BP26 sobre las propiedades de la membrana externa respecto de S19, se evaluaron parámetros clásicos de sensibilidad a temperatura, a SDS y al antibiótico Polimixina B (modelo para policiones).

Para evaluar si la mutación de ambas proteínas afecta la capacidad de la bacteria de formar el S-LPS, se investigó si las cepas mutantes mantenían el fenotipo liso por análisis con tinción de cristal violeta. Todas las cepas mutantes obtenidas (I1, I1C, M18 y M1), mantenían la resistencia a la tinción con el colorante, característica de las cepas lisas, al igual que la cepa parental S19 (datos no mostrados). Por lo tanto, la presencia del antígeno O del S-LPS en estas cepas no se vio afectada por las mutaciones introducidas ni por el proceso en sí.

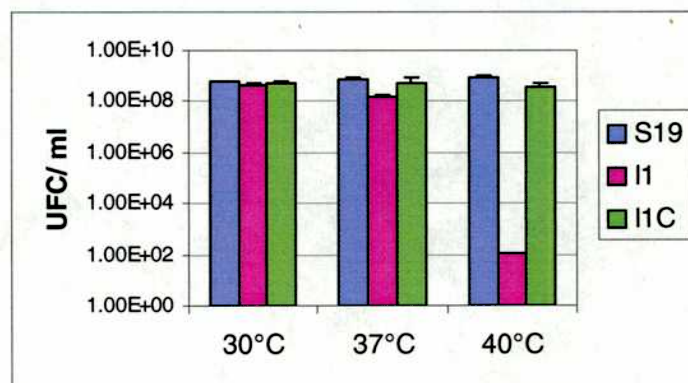
### 5.a. Sensibilidad a temperatura.

Al estudiar el crecimiento en medio líquido rico, a 37°C, no se observaron diferencias en la cinética de replicación ni en la supervivencia de I1 respecto de S19 (Figura 9)



**Figura 9. Cinética de crecimiento de las cepas S19 e I1 en medio rico.** Estos resultados corresponden a una de dos repeticiones con resultados equivalentes. Los cultivos fueron titulados a distintos tiempos, existiendo en todos los casos una correlación entre la densidad óptica (DO) medida y el número de UFC en el cultivo.

Sin embargo, al realizar un ensayo de sensibilidad a temperatura en medio sólido a 30°C, 37°C y 40°C, se observó que la mutante I1 presenta crecimiento restringido a 40°C, a diferencia de S19. Este fenotipo de sensibilidad a la temperatura, se revierte al complementar la cepa I1 con una copia del gen *bmp18* (Figura 10).

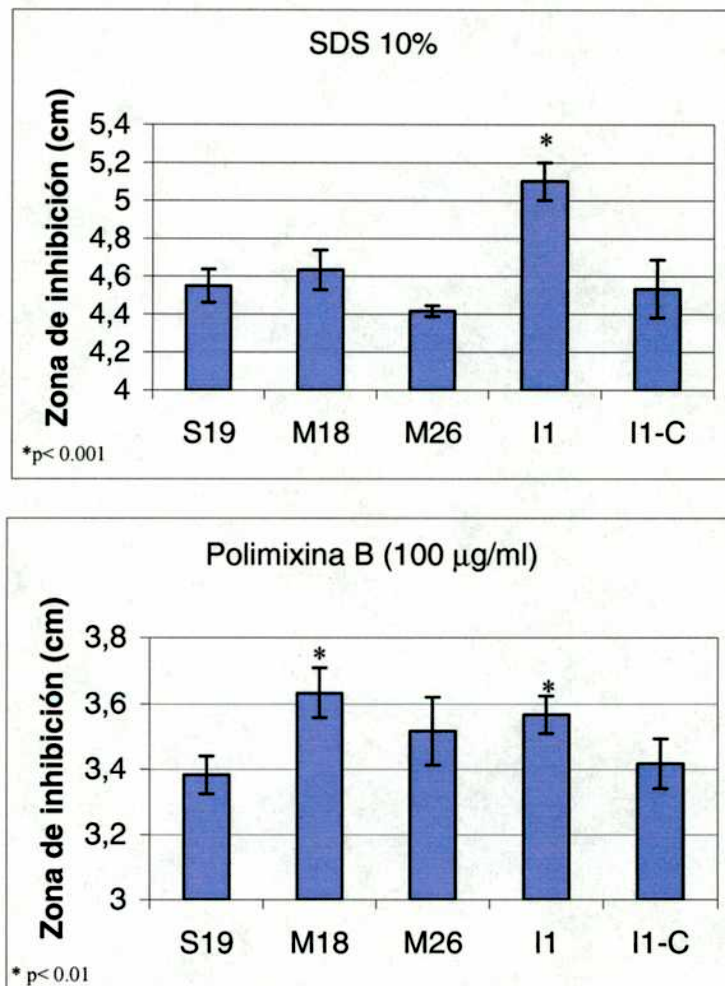


**Figura 10. Sensibilidad a temperatura en medio sólido.** Cada barra corresponde al promedio de titulación de dos suspensiones celulares independientes a  $DO_{600nm}=0,1$ , con su correspondiente desvío estándar.

Estos resultados indican que la falta de BMP18 afecta la capacidad de la bacteria de sobrevivir a temperaturas elevadas.

### 5.b. Sensibilidad a detergentes y policationes.

Se determinó la sensibilidad al dodecil-sulfato de sodio (SDS) y a la polimixinaB (PmB) como modelos para detergentes y péptidos catiónicos, respectivamente. El ensayo se realizó por halo de inhibición del crecimiento en placa (Figura 11).



**Figura 11: Análisis de inhibición del crecimiento por SDS 10% o PmB (100 µg/ml).** Los resultados son expresados como la media y desvío estándar de tres repeticiones y corresponden a uno de dos experimentos independientes con resultados equivalentes. Los grupos con asterisco son significativamente distintos de S19 por análisis *t*-student con la significancia expresada en cada caso.

La mutante I1 presentó un incremento significativo de la sensibilidad al SDS y a PmB respecto de S19, sugiriendo que la falta de estas proteínas afecta las propiedades de la membrana externa de la bacteria. En ambos casos, la mutante simple M26 no presentó diferencias significativas respecto a S19 y el aumento en la sensibilidad observado para I1 fue revertido con una copia funcional del gen *bmp18* (cepa I1-C).

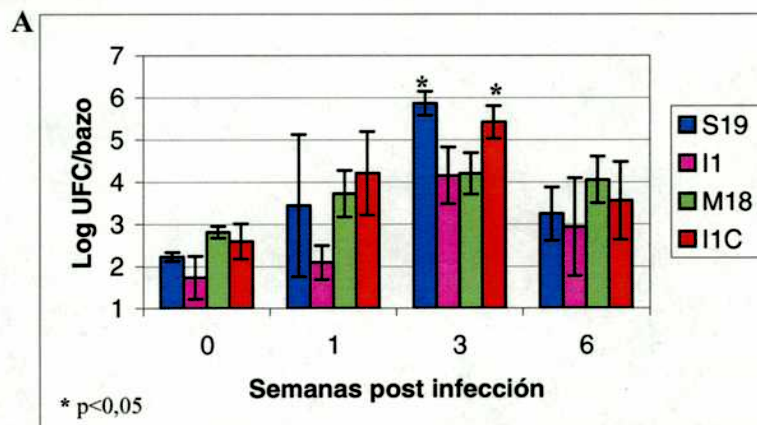
Estos resultados indicarían que la falta de BMP18 es responsable de la alteración en la integridad de la membrana externa. Teniendo esto en cuenta, resultó llamativo que la mutante simple M18 no presentara mayor sensibilidad que S19 a SDS.

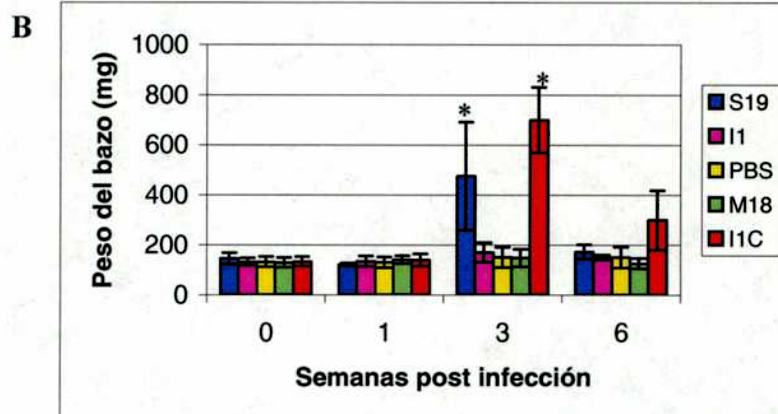
## 6. Evaluación de *B.abortus* INTA1 (I1) en el modelo ratón.

El modelo animal utilizado para evaluar cepas de *Brucella* es el ratón. La virulencia de una cepa se relaciona con su capacidad de invadir y replicarse en bazo, provocando esplenomegalia (WHO, 1997). Si bien S19 es una cepa atenuada, mantiene cierta virulencia residual que determina un comportamiento en ratones BALB/c caracterizado por un período inicial de infección, seguido por un pico replicativo en bazo, acompañado de esplenomegalia a los 15-21 días post infección, para luego disminuir las unidades formadoras de colonia (UFC) hasta la clarificación casi completa a las 7 semanas post infección (Baldwin, 2002).

### 6.a. Supervivencia en ratones BALB/c

En esta experiencia se inocularon ratones hembra BALB/c con  $1 \times 10^5$  UFC/ ratón de las cepas S19, I1, M18 e I1-C. Se midió la cinética de la replicación en bazo así como la esplenomegalia inducida por el microorganismo (figura 12).





**Figura 12. A. Replicación de cepas de *Brucella* en el bazo de ratones BALB/c.** Cada barra representa el promedio del Log de las UFC/bazo de 5 ratones y el correspondiente desvío estándar. **B. Esplenomegalia inducida por la infección con cepas de *Brucella*.** Cada barra representa el promedio del peso del bazo de 5 ratones y el correspondiente desvío estándar. Los grupos con \* son significativamente distintos de los demás y no diferentes entre sí por prueba *t* Student con  $p < 0,05$ .

La titulación de las bacterias recuperadas del bazo se realizó por duplicado en medio sólido suplementado y sin suplementar con los correspondientes antibióticos. Se obtuvieron recuentos del mismo orden en todos los casos, lo que indica que, en el ratón, las cepas no sufrieron rearrreglos que eliminaran la mutación introducida.

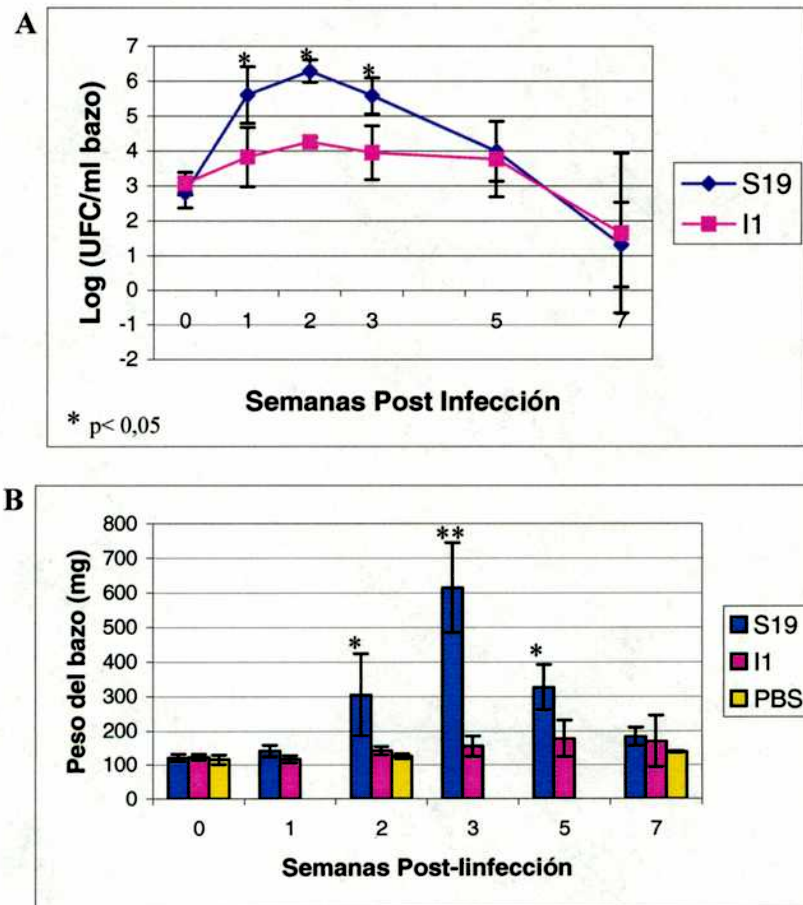
Los resultados obtenidos muestran que la cepa I1 es más atenuada que la cepa vacunal S19, no presentando el pico replicativo ni la esplenomegalia característicos a las 3 semanas post infección. Sin embargo, la cepa I1 permanece en el organismo por tiempos similares a S19. Este comportamiento se debe a la falta de expresión de BMP18 ya que es equivalente al observado para la mutante M18, no siendo afectado por la presencia de la mutación en *bp26*. A su vez, el fenotipo de atenuación es revertido al complementar la mutante I1 con una copia del gen *bmp18* (cepa I1-C).

#### 6.b. Protección frente al desafío con una cepa patógena.

Con el objetivo de estudiar si la mayor atenuación observada afecta la capacidad de la mutante I1 de generar una respuesta inmune protectora respecto de la cepa parental S19, se analizó la protección frente a la infección con una cepa patógena en el modelo de ratones BALB/c.

El criterio utilizado para medir protección en ratones inmunizados es la reducción en el número de UFC de *Brucella* recuperadas del bazo, del hígado o de ambos después del desafío con una cepa virulenta (WHO report, 1997; Hoover et al, 1999).

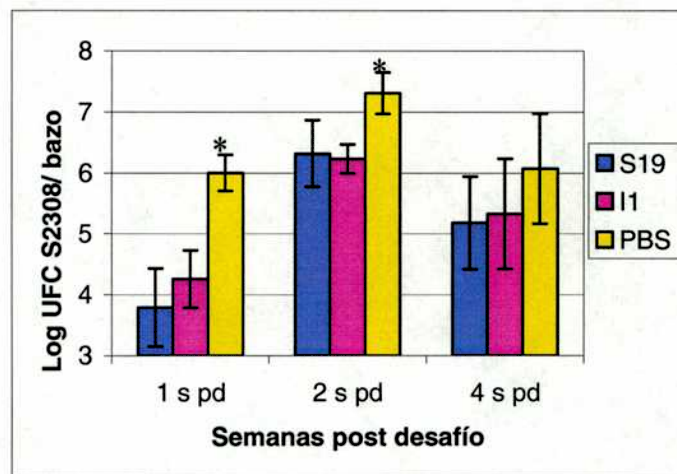
Se tomaron tres grupos de animales, uno sin inmunizar (control) y los otros inmunizados con  $1 \times 10^5$  UFC de S19 o I1. Se monitoreó el comportamiento de las cepas vacunales tomando muestras a distintos tiempos post-vacunación, obteniéndose resultados equivalentes a los observados en la primera experiencia (Figura 13).



**Figura 13. A. Persistencia de las cepas vacunales de *B. abortus* en el bazo de ratones BALB/c.** Cada punto representa el promedio del Log de las UFC/bazo de 5 ratones y el correspondiente desvío estándar. \* representa grupos significativamente distintos por prueba *t* Student, con  $p < 0,05$ . **B. Esplenomegalia inducida por las cepas de *Brucella*.** Cada barra representa el promedio del peso del bazo de 5 ratones y el correspondiente desvío estándar. \* representa grupo significativamente distinto por prueba *t* Student, con  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,001$ .

A las 8 semanas post-vacunación los ratones fueron desafiados con  $5 \times 10^4$  UFC de la cepa virulenta *B. abortus* 2308. A las 1, 2 y 4 semanas post-desafío se evaluó la capacidad

de controlar la infección de la cepa patógena por recuento de unidades formadoras de colonia de S2308 en el bazo de los ratones desafiados (Figura 14). Con el objetivo de descartar que las bacterias presentes en el bazo sean producto de reactivación de las cepas vacunales, el recuento de las bacterias obtenidas después del desafío se realizó por duplicado en placas suplementadas y no suplementadas con eritritol. El eritritol es un hidrato de carbono que puede ser utilizado como fuente de carbono por las cepas salvajes de *Brucella* pero que resulta tóxico para S19 (Sangari *et al.*, 1994). Se obtuvieron recuentos del mismo orden en ambos casos, demostrando que las bacterias contadas son efectivamente S2308.



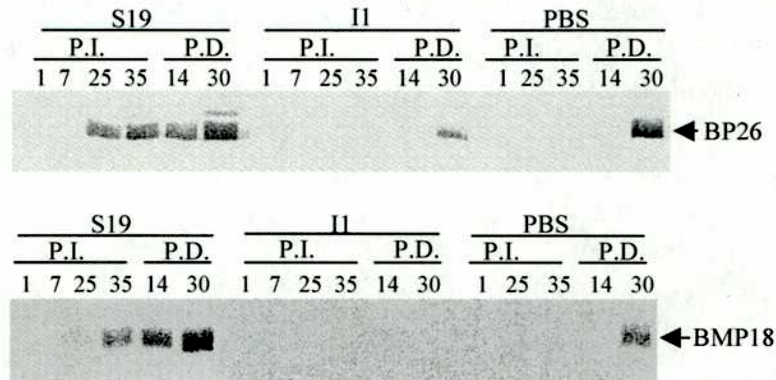
**Figura 14. Protección de ratones vacunados con las distintas cepas de *Brucella* contra el desafío con la cepa patógena S2308.** Las barras corresponden al promedio de 5 ratones y su desvío estándar. \* grupo significativamente distinto de los demás por prueba de ANOVA seguido de comparaciones múltiples. Estos datos corresponden a una de dos repeticiones, con resultados equivalentes.

Se observó que los niveles de protección contra el desafío con la cepa patógena inducidos por la cepa I1 son similares a los obtenidos con la cepa vacunal actual S19, a igual dosis de vacunación y de desafío, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Los resultados observados indican que la mutante I1 es capaz de generar una respuesta inmune protectora, a pesar de su atenuación, lo que coincide con los resultados reportados para al mutante SC1 (Cravero *et al.*, 1993). Por ende, la falta simultánea de BMP18 y BP26 no tiene efecto sinérgico ni de anulación de las mutaciones individuales.

### 6.c. Evaluación de la respuesta inmune humoral contra LPS, BP26 y BMP18.

Para confirmar que en ratones inmunizados con la mutante I1 no hay producción de anticuerpos contra las proteínas BP26 y BMP18, se ensayaron los sueros de los ratones en un Western blot contra extractos proteicos de *E. coli* que expresan las proteínas BMP18 y BP26 (Figura 15).



**Figura 15: Western Blot con sueros de ratones inmunizados con las cepas S19 e I1 de *Brucella* y controles inoculados con solución salina (PBS) y desafiados a los 64 días p.i. con la cepa *B. abortus* 2308. A. Extracto proteico total de *E. Coli* DH5 $\alpha$ -pBa26. B. Extracto proteico total de *E. coli* DH5 $\alpha$ -pBS18. Cada calle corresponde a la inmunodetección de las proteínas correspondientes con una dilución 1/200 del grupo de sueros de ratones inmunizados con las diferentes cepas (o sin inmunizar inoculados con PBS), extraído a los tiempos indicados en días. P.I. : post-inmunización. P.D.: post- desafío.**

Los ratones inmunizados con S19 desarrollaron anticuerpos contra BP26 a los 25 días post infección, y esta respuesta se incrementó después del desafío. En cambio, los anticuerpos contra BMP18 pudieron ser visualizados por esta técnica en la muestra correspondiente a los 35 días post-vacunación. Los ratones inmunizados con la mutante I1 no desarrollaron anticuerpos contra estas proteínas en ningún momento post-vacunación, al igual que los ratones inoculados con PBS. Después del desafío, los ratones que habían sido inoculados con I1, desarrollaron una respuesta contra BP26 de muy baja intensidad que solo pudo ser detectada a los 30 días post-desafío, mientras que la respuesta contra Bmp18 no pudo ser detectada por este método en los tiempos evaluados. A su vez, en los ratones inoculados con PBS, la respuesta humoral contra estas proteínas recién pudo ser detectada a los 30 días post- desafío.

Con el objetivo de confirmar que la falta de anticuerpos contra BMP18 y BP26 es específica y no se debe a una disminución general de la respuesta humoral por el menor



número de bacterias en el bazo de los ratones inmunizados con I1, se analizó la producción de anticuerpos contra S-LPS por aglutinación en placa (BPA) y por aglutinación en tubo con 2-mercaptoetanol (2-Me). La aglutinación fue positiva, y de igual intensidad (título de 1/200), a partir de las tres semanas post infección tanto con los sueros provenientes de los ratones vacunados con S19 como con los vacunados con I1, mientras que fue negativa para los sueros provenientes de ratones inoculados con solución salina (datos no mostrados).

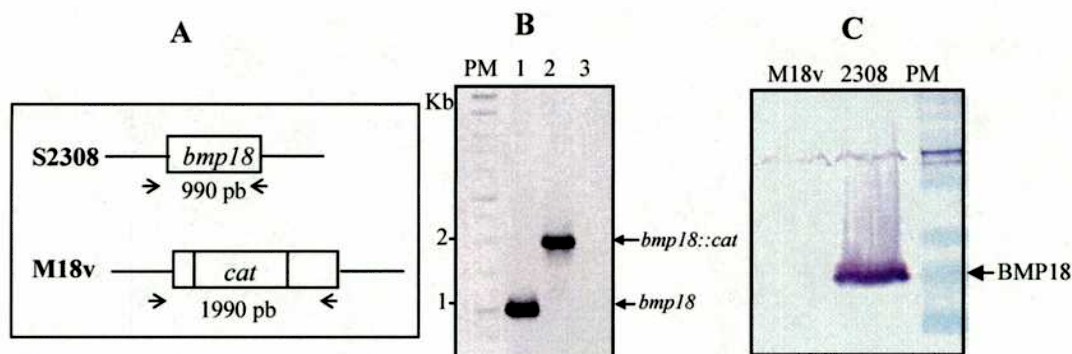
### **7. ¿La falta de BMP18 genera atenuación en una cepa virulenta?**

La virulencia de *Brucella* está relacionada con la capacidad de la bacteria de resistir a elementos del suero y de sobrevivir y replicarse en fagocitos, lo que lleva a distribución sistémica y a persistencia en los órganos blanco del hospedador (Baldwin y Roop, 1999). Por ende, la multiplicación intracelular está directamente relacionada con la capacidad de establecer la infección crónica.

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que la falta de expresión de BMP18 en *B. abortus* S19 genera alteración de la estructura de la membrana externa y menor replicación en el bazo en los estadios iniciales de infección en ratones BALB/c. Sin embargo, *B. abortus* S19 es una cepa atenuada, obtenida a partir de la misma cepa de la cual deriva S2308, y de la cual no se conocen todas las mutaciones que llevan a esa atenuación. La cepa S19 sobrevive pobremente a la muerte intracelular en fagocitos debido que no puede evitar la degradación lisosomal como S2308 (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998), por lo que no es un modelo adecuado para estudiar virulencia.

#### **7.a. Construcción de la mutante *B. abortus* M18v.**

Con el objetivo de determinar la contribución de BMP18 a la virulencia de *B. abortus*, se construyó una mutante de la cepa patógena S2308 que no expresa BMP18. Se utilizó la estrategia de intercambio alélico y la construcción plasmídica utilizada para la mutagénesis en S19 (pBS18cat), generando la cepa mutante M18v (*B. abortus* 2308 *bmp18::cat*). La inserción del marcador génico fue confirmada por amplificación con oligonucleótidos específicos y también se confirmó la falta de expresión de la proteína BMP18 por Western Blot (Figura 16).

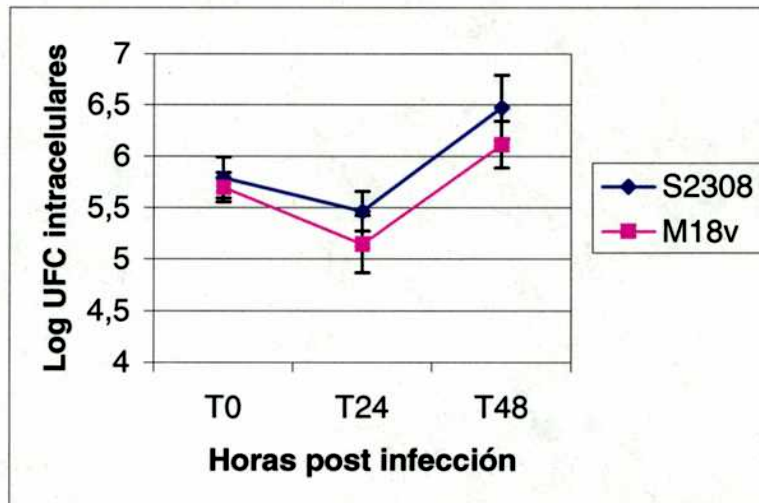


**Figura 16: Construcción de mutante M18v (*B. abortus* 2308 *bmp18*).** A. Esquema de los productos de amplificación esperados a partir de ADN genómico de las cepas de *Brucella*. Se indican las cepas estudiadas (S2308 y M18v), los genes *bmp18* y *cat* y el tamaño de los amplicones esperados con los oligonucleótidos p18f y p18r. B. PCR. PM: marcador de peso molecular 1 Kb (Promega); 1: S2308; 2: M18v y 3: control sin ADN. C. Western Blot sobre membrana con extractos proteicos totales. Los extractos proteicos se corrieron en un gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y la inmunodetección de BMP18 se realizó con un suero policlonal de conejo anti-BMP18, con un segundo anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa, revelado por reacción con 4-cloronaftol y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 7. b. Supervivencia intracelular en macrófagos peritoneales murinos.

Dado que existe una correlación entre la virulencia de las cepas de *B. abortus in vivo* y su habilidad para sobrevivir en macrófagos *in vitro* (Baldwin y Roop, 1999), se evaluó la capacidad de la mutante M18v de infectar y sobrevivir a la muerte intracelular en macrófagos peritoneales de ratones BALB/c.

En un ensayo clásico de supervivencia intracelular (Elzer *et al.*, 1996; Robertson y Roop, 1999; Robertson *et al.*, 2000; Phillips y Roop, 2001), los macrófagos residentes del peritoneo fueron cosechados y luego infectados con la cepa salvaje S2308 y la cepa mutante M18v, determinándose el número de bacterias intracelulares a distintos tiempos post infección, después de tratamiento con gentamicina para matar a las bacterias extracelulares (Figura 17).



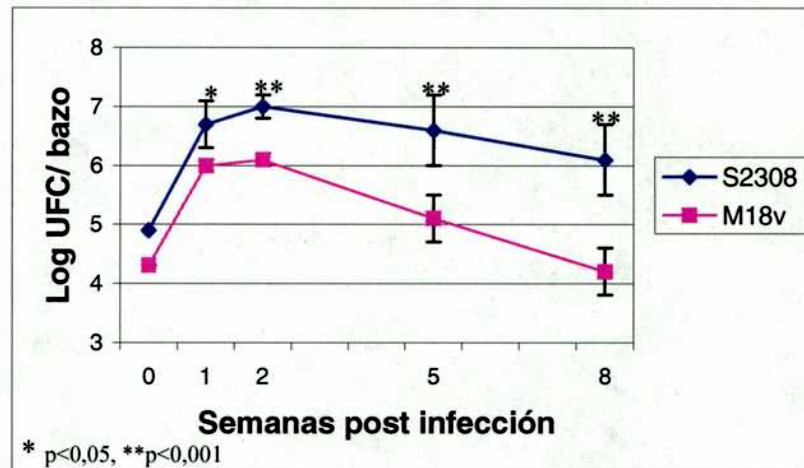
**Figura 17. Supervivencia intracelular de las cepas S2308 y M18v en macrófagos peritoneales murinos.** Los macrófagos fueron infectados en una proporción aprox. de 100 bacterias por macrófago. T0, T24 y T48 corresponden a los tiempos 0, 24 y 48 horas después que se permitió la fagocitosis durante 2 horas y se eliminaron las bacterias extracelulares por tratamiento con gentamicina. Cada punto corresponde a la media del número de bacterias intracelulares de tres repeticiones con su correspondiente desvío estándar. Los resultados no presentaron diferencias significativas por análisis *t* Student.

En forma típica, el número de bacterias intracelulares de S2308 decayó a las 24 hs de infección, luego de lo cual hubo replicación intracelular (Robertson y Roop, 1999). La mutante M18v no presentó diferencias estadísticamente significativas en el número de bacterias intracelulares en ninguno de los tiempos evaluados respecto de S2308, lo que indica que la falta de BMP18 no afecta la capacidad de la bacteria de sobrevivir a la etapa inicial de muerte intracelular (T24 hs) o replicarse (T48 hs) en los macrófagos.

Estos datos sugieren que BMP18 no es esencial para la supervivencia y replicación en macrófagos murinos.

### 7.c. Supervivencia en ratones.

Para establecer una correlación entre el comportamiento intracelular observado en los macrófagos y el comportamiento *in vivo*, se infectaron ratones BALB/c de 4 semanas con la cepa mutante M18v y la cepa parental S2308 (Figura 18).



**Figura 18: Persistencia de las cepas de *Brucella* en el bazo de ratones BALB/c.** Cada punto representa la media de 5 ratones, con el correspondiente desvío estándar. Los asteriscos marcan diferencias estadísticamente significativas por análisis *t*-Student con \*  $p<0,05$  y \*\* $p<0,001$ .

El número de bacterias en el bazo de los ratones infectados con la cepa mutante M18v fue significativamente menor que la cepa salvaje en todos los tiempos evaluados, salvo en 1 día post infección (tiempo 0). La diferencia se acrecentó con el tiempo hasta ser de prácticamente 2 logaritmos a las 8 semanas post infección.

Estos resultados sugieren que la proteína BMP18 es necesaria en cierta medida para la virulencia *in vivo* pero la atenuación observada en la mutante no se debería a deficiencias en la replicación intracelular en los macrófagos. Probablemente la cepa mutante sea más sensible a otros mecanismos de control de la infección, como muerte extracelular.

## **Parte II: Mutagénesis de los genes *bp26* y *bmp18* en *Brucella abortus* S19 sin marcadores de resistencia a antibióticos.**

El criterio actual para liberar microorganismos genéticamente modificados (GMOs) al medio ambiente, es que, en lo posible, estos no lleven genes de resistencia a antibióticos, tradicionalmente utilizados para la selección de bacterias recombinantes. Para ello se deben utilizar genes marcadores que confieran al microorganismo alguna característica fenotípica que permita identificarlo, sin que esto represente un riesgo ambiental (de Lorenzo, 1992). Se han descrito los marcadores selectivos *arsAB* de *E.coli* R773, que confiere resistencia a arsenito (Herrero *et al.*, 1990) y el operón *mer*, que codifica para un grupo de genes que confieren resistencia a mercurio (Baulard *et al.*, 1995). También se han estudiado los marcadores no selectivos *lacZY* de *E.coli*, que codifica para las enzimas  $\beta$ -galactosidasa y permeasa que, en presencia de X-gal, dan color azul (Prosser, 1994) y los genes *luc* y *lux* que codifican para la enzima luciferasa eucariota y procariota, respectivamente (Cebolla *et al.*, 1993). La luciferasa eucariota es codificada por único gen, *luc*, y tiene una mayor eficiencia en la emisión de luz que la contraparte procariota. Puede ser utilizada en sistemas bacterianos ya que no necesita de modificaciones postranscripcionales (Coronado, 1994).

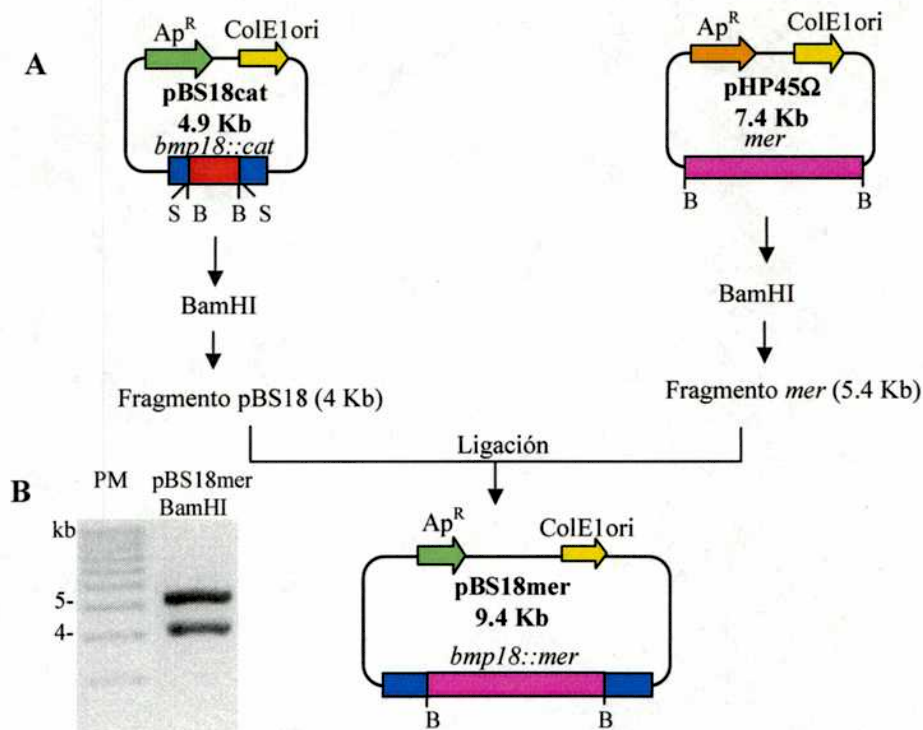
Dado que existen antecedentes de uso de luciferasa en bacterias Gram negativas, entre ellas *Rhizobium* y *Agrobacterium* (Boivin *et al.*, 1988), se estudió la utilidad del gen *luc*, como marcador no selectivo, y del operón *mer*, como marcador selectivo, para la construcción de mutantes nulas por intercambio alélico en *Brucella abortus* S19.

### **1. Expresión de *luc* y *mer* en *Brucella abortus*.**

#### **1. a. Resistencia a mercurio.**

Se clonó el operón mercurio (*mer*) proveniente del plásmido pHP45 $\Omega$  (Baulard *et al.*, 1995) en el vector replicativo para *Brucella* pBBR1MCS-2 generando el plásmido pBB2mer. Con este vector se transformaron por electroporación bacterias *B. abortus* S19 competentes y por selección en placas con kanamicina y plaqueo en réplica a distintas concentraciones de mercurio se estableció la concentración óptima de trabajo para *Brucella* en 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de  $\text{HgCl}_2$ .

Para evaluar la utilidad de la resistencia a mercurio como agente selectivo en la obtención de mutantes, se interrumpió la secuencia de *bmp18* con el operón de resistencia a mercurio en un plásmido suicida para *Brucella*, generando el plásmido pBS18mer (Figura 19).



**Figura 19. Construcción del plásmido pBS18mer. A. Esquema de obtención del plásmido. B:** BamHI, S: SacI, K: KpnI. El esquema es demostrativo y no se encuentra a escala. **B. Confirmación de la estructura del plásmido.** Electroforesis en gel de agarosa del producto de digestión del plásmido pBS18mer con BamHI. PM es el marcador de peso molecular 1 Kb (GIBCO).

Con el plásmido pBS18mer se transformaron *B. abortus* S19 electrocompetentes, buscando que ocurra el reemplazo alélico del gen *bmp18* salvaje por la copia interrumpida por el operón *mer*, portada por el plásmido. De las 500 bacterias resistentes a mercurio ensayadas (producto de 3 electroporaciones independientes), todas resultaron también resistentes a ampicilina. Es decir que sólo se obtuvieron bacterias que incorporaron el plásmido al cromosoma bacteriano por un único evento de recombinación (simples recombinantes). Una explicación posible es que el tamaño del operón de resistencia a mercurio (5 kb) dificulte la ocurrencia de dos eventos de recombinación, con el subsiguiente reemplazo alélico, entre las regiones flanqueantes homólogas del gen *bmp18*. Por esta razón, no se utilizó este operón en la construcción de las mutantes.

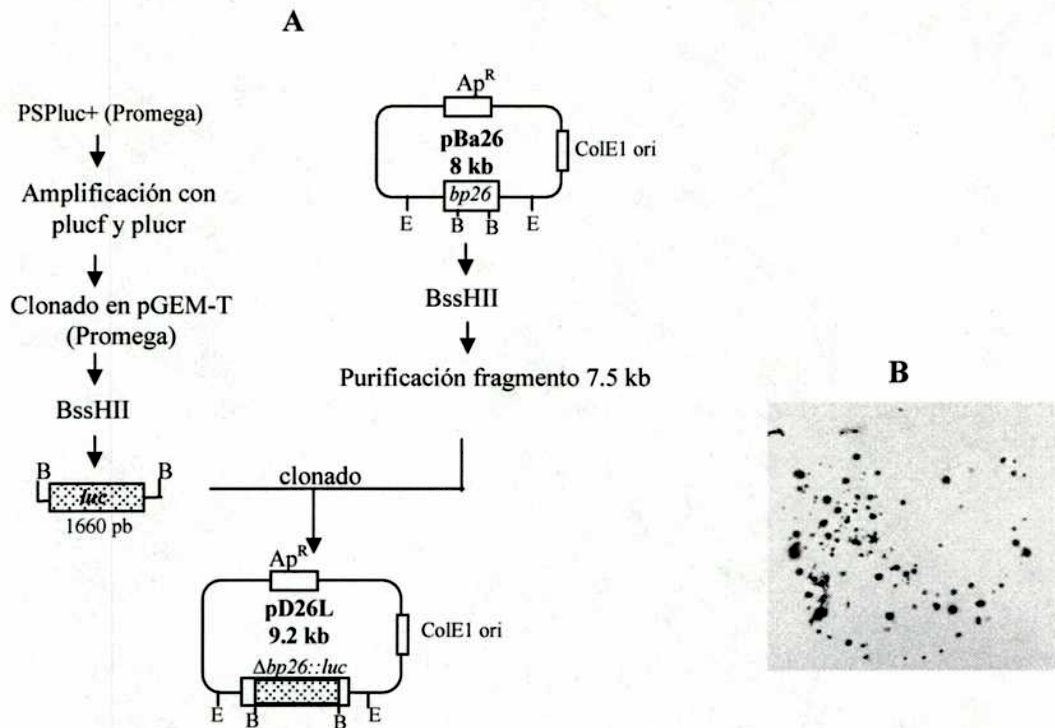
### 1. b. Actividad de Luciferasa.

La enzima luciferasa proveniente de la luciérnaga americana *Photinus pyralis* cataliza la decarboxilación oxidativa dependiente de ATP de la luciferina (LH<sub>2</sub>), que resulta en la producción de luz (Palomares *et al.*, 1989). La reacción es básicamente la siguiente:



En primera instancia, se evaluó la viabilidad y funcionalidad de esta enzima en *Brucella* clonando el gen *luc* de *P. pyralis* proveniente del plásmido pSP-luc+ (Promega) bajo el promotor del gen *lacZ* (*plac*) de pBBR1MCS (Kovach *et al.*, 1994). Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  y *B. abortus* S19 con esta construcción y se determinaron las condiciones óptimas para la detección de actividad luciferasa por impresión en placa radiográfica de la luz emitida (datos no mostrados).

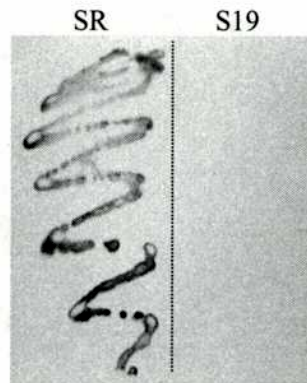
Posteriormente, para determinar si con una única copia del gen *luc* se podría detectar la actividad de luciferasa, se construyó un plásmido no replicativo para *Brucella* (con origen de replicación ColE1) que lleva el gen *luc* reemplazando parte de la secuencia codificante del gen *bp26*. Se realizó una deleción de 500 bases de la secuencia codificante de una copia del gen *bp26* clonada en el plásmido pBa26, utilizando dos sitios de restricción BssHIII internos, en los cuales se clonó el gen *luc* sin promotor, de manera que la enzima luciferasa quede como proteína de fusión a la secuencia señal y primeros aminoácidos de Bp26 (plásmido pD26L) (Figura 20 A). Las colonias que llevan el inserto *luc* en la orientación correcta fueron identificadas por actividad luciferasa en placa (Figura 20 B). De las colonias identificadas, 6 fueron repicadas y sometidas nuevamente al ensayo de luciferasa para confirmar la actividad Luc observada. Se extrajeron los plásmidos correspondientes y la construcción fue confirmada por análisis con enzimas de restricción. Una de las construcciones fue elegida para seguir trabajando.



**Figura 20: Construcción del plásmido pD26L. A. Esquema demostrativo de la obtención del plásmido pD26L.** Se indican los plásmidos utilizados, los genes involucrados y los sitios de restricción. B: BssHIII, E: EcoRI. **B. Detección de luminiscencia en placa.** Las bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con el plásmido pD26L fueron sembradas en placas con ampicilina y se obtuvo una réplica en membrana de nitrocelulosa que fue sometida a ensayo de actividad luciferasa. El resultado se obtiene como impresión en placa radiográfica de la luz emitida ( $\lambda=560$  nm).

Con este plásmido se transformaron bacterias S19 electrocompetentes y se seleccionaron aquellas que incorporaron el plásmido al cromosoma por resistencia a ampicilina. Se confirmó la expresión de luciferasa en una de las colonias simples recombinantes (SR) obtenidas, demostrando que la presencia del gen *luc* en una única copia bajo el promotor de *bp26* puede ser detectada por el ensayo en placa (Figura 21).





**Figura 21. Detección de actividad luciferasa en placa.** Una colonia simple recombinante (SR) y la cepa parental S19 fueron estriadas en una placa de TA y transferidas a membrana de nitrocelulosa. La actividad luciferasa fue revelada como emisión de luz ( $\lambda=560$  nm) e impresión en placa radiográfica, después de 16 hs de exposición a temperatura ambiente.

## 2. Estrategia para reemplazo alélico utilizando *luc* como gen marcador.

Con el objetivo de reemplazar el gen *bp26* salvaje con la copia del gen interrumpida por el gen *luc*, se intentó una estrategia de selección en dos etapas. Una de las colonias simples recombinantes seleccionadas se creció sin presión de selección en medio líquido toda la noche. Se fraccionó el cultivo y se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Alícuotas del cultivo fueron sembradas en placas sin antibiótico de manera de tener aproximadamente 100 UFC/ placa. Estas colonias se repicaron luego a placas con y sin ampicilina de manera de encontrar aquellas que perdieran el plásmido por un segundo evento de recombinación entre las regiones homólogas de *bp26*. De 10.000 bacterias evaluadas, todas crecieron en el antibiótico, indicando que en ninguna de ellas había ocurrido el segundo evento de recombinación y seguían siendo simple recombinantes.

El hecho de no encontrar colonias dobles recombinantes en la obtención de mutantes por reemplazo alélico, en general, puede deberse a que la mutación sea letal o a dificultades en la identificación del segundo evento de recombinación. Por los resultados previos sabemos que la mutación en *bp26* no es letal, por lo tanto, se decidió utilizar una estrategia de contraselección para favorecer la identificación del segundo evento de recombinación homóloga. El gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, codifica para una enzima levanosucrasa que hidroliza sacarosa generando levanos que resultan tóxicos para la bacteria, confiriendo sensibilidad a sacarosa (Pelicic *et al.*, 1996). Este marcador ha sido utilizado en la construcción de mutantes no marcadas en otras bacterias como *Erwinia chrysanthemi* (Ried

y Collmer, 1987) y distintas cepas de *Mycobacterium* spp. (Pelicic *et al.*, 1996; Pavelka y Jacobs, 1999). Recientemente, ha sido utilizado en *Brucella* para facilitar la identificación de dobles recombinantes respecto de las simples recombinantes en la obtención de mutantes por reemplazo alélico utilizando genes de resistencia a antibióticos como marcador (Robertson *et al.*, 2000).

### **3. Construcción de mutantes nulas sin marcadores de resistencia a antibióticos.**

Teniendo en cuenta estos resultados se decidió utilizar como estrategia para la obtención de mutantes nulas sin marcadores de resistencia a antibióticos, el reemplazo alélico en dos etapas asistido por contraselección utilizando el gen *sacB*.

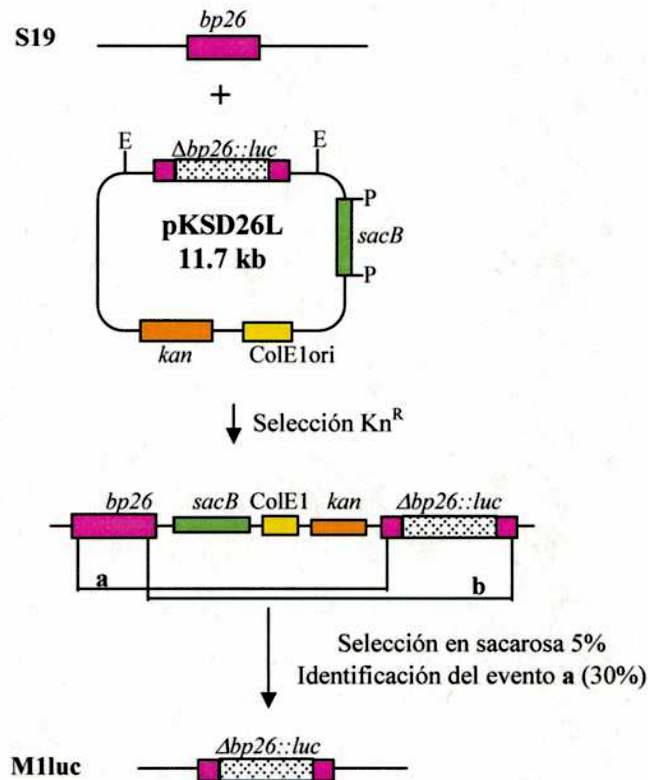
#### **3.a. Obtención de la cepa mutante *B. abortus* M1luc.**

El fragmento  $\Delta bp26::luc$  del plásmido pD26L se movilizó al plásmido pBK, por sus sitios EcoRI flanqueantes (fragmento de 4.6 kb) y se insertó en este vector el gen *sacB* del plásmido pSac, resultando en el plásmido pKSD26L. Con este plásmido se transformaron *B. abortus* S19, y las bacterias transformantes fueron seleccionadas en medio sólido con kanamicina (resistencia portada por el plásmido). De esta manera se obtuvieron aquellas bacterias que incorporaron el plásmido al locus *bp26* por un único evento de recombinación, resultando en la separación de la copia salvaje del gen y la copia interrumpida de *bp26* por la secuencia plasmídica que contiene el gen *sacB* y *kan*. Las colonias resultantes se repicaron a medio sólido con y sin sacarosa 5%. De 50 colonias repicadas, el 95% resultaron resistentes a kanamicina y sensibles a sacarosa. El 5% restante corresponde a bacterias resistentes a sacarosa a pesar de la presencia del gen *sacB*, fenómeno que fue descripto para micobacterias y que se debería a mutaciones puntuales en el gen *sacB* (Pelicic *et al.*, 1996).

Para lograr un segundo evento de recombinación entre las regiones homólogas de las dos copias de *bp26* que implique la escisión del gen *sacB* y el resto del vector, se eligió una colonia al azar y se creció 24 horas sin presión de selección en medio líquido. Luego se sembraron diluciones del cultivo en placas suplementadas con sacarosa 5% para obtener aproximadamente  $10^2$  UFC Sac<sup>R</sup> por placa. Las colonias obtenidas fueron repicadas a medio con y sin kanamicina, de manera de confirmar que hubieran perdido el plásmido. De

las colonias  $\text{Kn}^S$ , 200 fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa para detectar la presencia del gen *luc* por hibridación en colonia.

De las colonias  $\text{Suc}^R \text{Kn}^S$  sólo aproximadamente el 30% (57 colonias) fueron *luc*<sup>+</sup>, lo que sugiere que fue más frecuente el retorno a la condición salvaje que la incorporación de la mutación. Una colonia  $\text{Suc}^R, \text{Kn}^S, \text{luc}^+$  fue seleccionada al azar y se la llamó M1luc.



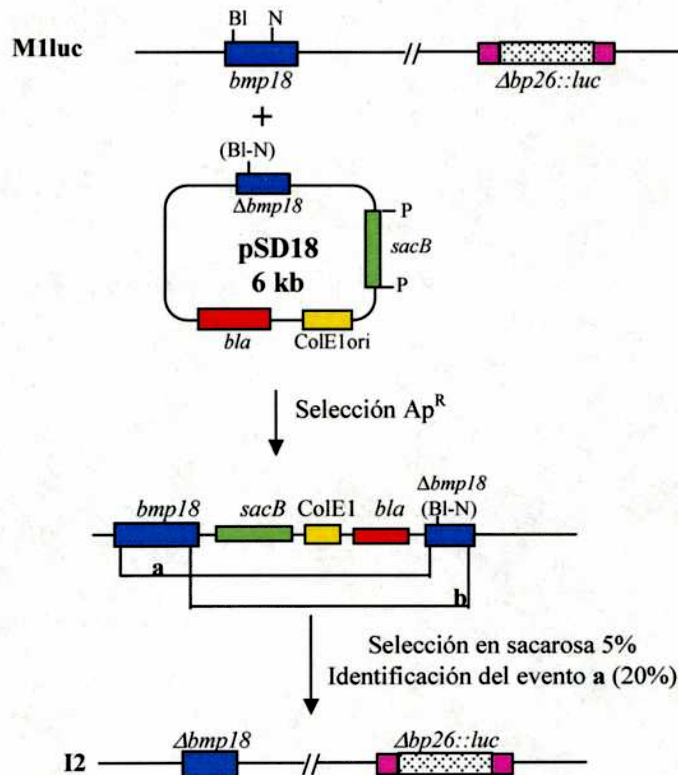
**Figura 22. Esquema de la obtención de *B. abortus* M1luc.** Se señalan las cepas, el plásmido utilizado y los eventos de recombinación homóloga posibles (a y b). Las enzimas de restricción utilizadas para la construcción del plásmido de mutagénesis son: PstI (P) para clonar el gen *sacB* y EcoRI (E) para clonar el fragmento de 4.6 kb que comprende a la construcción *bp26::luc*.

Se confirmó que la cepa M1luc no expresa la proteína Bp26 por Western blot, que tiene actividad luciferasa (por ensayo en placa) y se confirmó la mutagénesis por amplificación del alelo *bp26* por PCR con oligonucleótidos específicos (ver más adelante Figura 24).

### 3.b. Obtención de la doble mutante *B. abortus* INTA2 (I2).

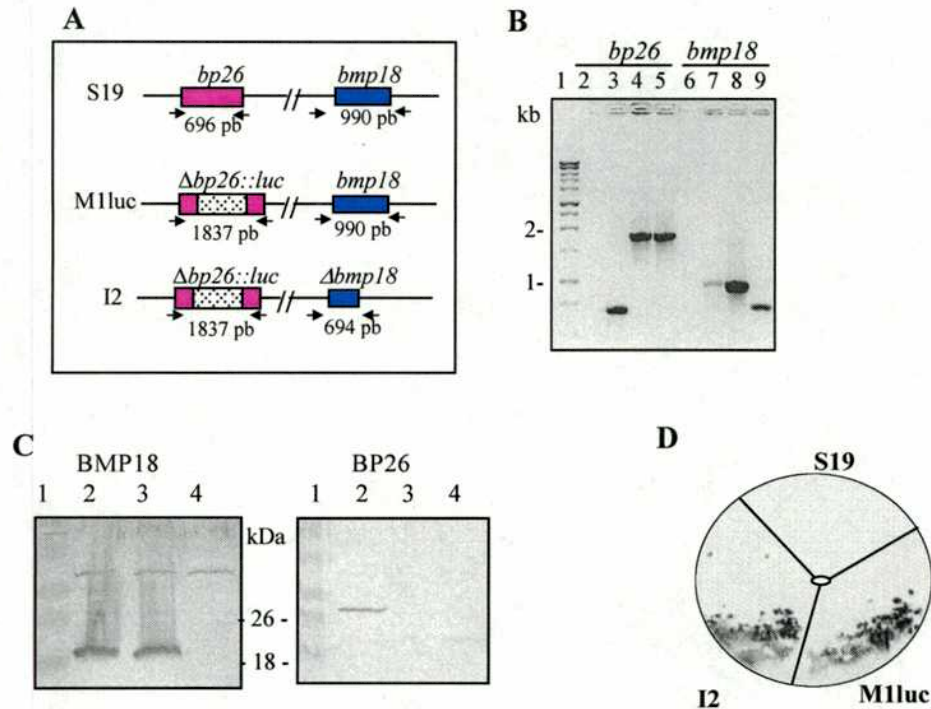
Para lograr la mutagénesis de *bmp18*, se delecionaron 296 pb (B<sub>l</sub>pI-NruI) de la secuencia codificante de una copia del gen *bmp18* en el plásmido pBS. Como en el caso anterior, se clonó el gen *sacB* en el mismo plásmido resultando en pSD18. Este plásmido se introdujo por electroporación en M11uc y se seleccionó la integración del mismo en el locus *bmp18* por la resistencia a ampicilina portada por el vector.

Como anteriormente, el crecimiento de esta cepa en sacarosa 5% seleccionó la escisión del gen *sacB* con el segundo evento de recombinación. De 200 colonias Suc<sup>R</sup>, aproximadamente el 95% resultaron Ap<sup>S</sup>, y de estas, 10 fueron analizadas por PCR de colonia para distinguir las mutantes de las que retuvieron el fenotipo salvaje, siendo el 20%  $\Delta$ *bmp18* y el 80% salvaje. Una colonia S19  $\Delta$ *bp26::luc*  $\Delta$ *bmp18*, fue seleccionada y se la llamó *B. abortus* INTA2 (I2) (Figura 23).



**Figura 23: Esquema de la obtención de la mutante *B. abortus* I2.** Se señalan las cepas, el plásmido utilizado y los eventos de recombinación posibles (a y b). Las enzimas de restricción utilizadas para la mutagénesis son: Bl: B<sub>l</sub>pI, N: NruI. Se indica el sitio de la delección en el gen *bmp18* como (Bl-N).

La mutagénesis fue confirmada por amplificación con oligonucleótidos específicos para *bmp18* y *bp26* (Figura 24 A y B), por Western Blot con antisueros anti-BP26 y anti-BMP18 (Figura 24 C) y por ensayo en placa de luciferasa (Figura 24 D). Ambas cepas M1luc e I2 resultaron lisas por tinción con cristal violeta.



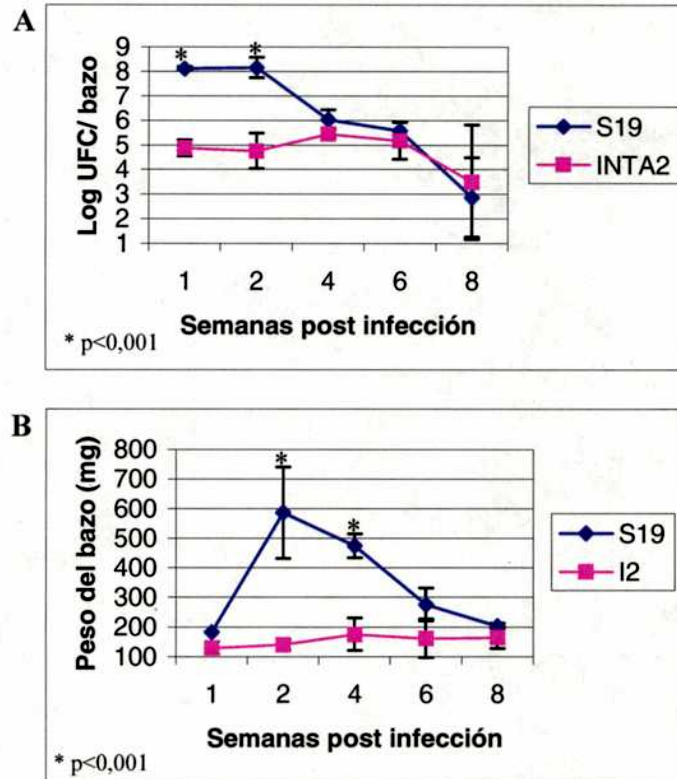
**Figura 24. Confirmación del genotipo y fenotipo de las mutantes obtenidas. A. Esquema de los amplicones esperados.** Se indican los productos de amplificación esperados para las distintas cepas con los pares de oligonucleótidos p26f-p26r1, para *bp26*, y p18f-p18r, para *bmp18*. **B. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de los locus *bp26* y *bmp18*.** Calle 1: marcador de peso molecular 1 kb (Promega) Calles 2 y 6: control sin ADN. Calles 3 y 7: S19, calles 4 y 8: M1luc, calles 5 y 9: I2. **C. Western Blot de extractos proteicos totales de las distintas cepas de *Brucella* revelado con suero policlonal de conejo anti-BP26 o anti-BMP18 según se indica.** Calle 1: marcador de peso molecular preteñido (Broad Range, BioRad); calle 2, S19; calle 3: M1luc; calle 4: I2. **D. Ensayo de luminiscencia en placa.** Una colonia de las cepas S19, I2 y M1luc fue estríada en una placa de AT. Las colonias fueron transferidas a un filtro de nitrocelulosa que luego fue embebido en una solución de luciferina en buffer citrato y revelado por impresión en placa radiográfica.

#### 4. Evaluación de *B. abortus* INTA2 (I2) en ratones BALB/c.

##### 4.a. Grado de atenuación.

Con el objetivo de evaluar si la cepa I2 mantenía la disminución de la virulencia residual observada para I1, se determinó la persistencia y la proliferación de la cepa

mutante en ratones en comparación con la cepa parental S19. Se infectaron ratones BALB/c con  $2 \times 10^5$  UFC de I2 o S19, y a distintos tiempos post infección se comparó el número de bacterias recuperadas del bazo y la respuesta inflamatoria (esplenomegalia) (Figura 25).



**Figura 25: Virulencia residual de la mutante *B.abortus* I2 en ratones Balb/c. A. Replicación de las cepas de *Brucella* en el bazo.** Cada punto representa la media del Log de las UFC totales del bazo con el correspondiente desvío estándar. **B. Esplenomegalia inducida por las distintas cepas de *Brucella*.** Cada punto representa la media de 5 ratones con el correspondiente desvío estándar. El asterisco representa diferencias significativas por análisis *t* de Student ( $p < 0.001$ ).

Los niveles de S19 recuperados del bazo presentaron más de 2 logaritmos que los de I2 a las semanas 1 y 2 post-infección. A las 4 semanas post-infección, los niveles esplénicos de S19 e I2 no presentaban diferencias y ambos grupos habían prácticamente clarificado la infección a las 6 semanas post-infección (4 de 5 ratones en el grupo vacunado con S19 y 3 de 5 en el grupo vacunado con I2).

En cuanto a la esplenomegalia, a las 2 y 4 semanas post-infección, los ratones infectados con la mutante presentaban bazos de menor tamaño que aquellos infectados con la cepa salvaje S19, hasta las 6 semanas post-infección en la cual no se observó diferencia.

En todos los tiempos, dos ratones del grupo control (vacunado con solución salina) fueron sacrificados y se confirmó que no había infección ni esplenomegalia. Estas observaciones indican que la cepa I2 ha perdido parte de la virulencia residual de S19, al igual que había sido descrito para I1.

#### 4.b. Capacidad protectora frente al desafío con una cepa patógena.

Con el objetivo de determinar la capacidad protectora de *B. abortus* I2, se analizó la misma respecto de S19. Tres grupos de 10 ratones fueron inoculados i.p. con 0.2 ml de solución salina (PBS) (grupo control) o con 0.2 ml de PBS conteniendo  $10^5$  UFC de S19 o I2. Todos los grupos fueron desafiados a las 10 semanas post inoculación con  $5 \times 10^4$  UFC de *B. abortus* S2308 por ratón. En este caso, se tomó sólo una fecha post desafío a los 15 días. Los ratones fueron sacrificados, se les extrajo el bazo y se examinó la proliferación de *Brucella*.

La tabla 1 muestra que los ratones vacunados con S19 o I2 presentaron menor número de S2308 esplénicas que los ratones control no vacunados, siendo las diferencias entre los grupos S19 e I2 no significativas estadísticamente.

		Cepa Vacunal		
		S19	I2	PBS
CFU 2308/	Mediana	$2.9 \times 10^5$ *	$1.4 \times 10^6$ *	$1.3 \times 10^7$
bazo	Rango	$2.4 \times 10^4$ - $3.7 \times 10^6$	$8.8 \times 10^4$ - $7.7 \times 10^6$	$4.1 \times 10^6$ - $2.6 \times 10^7$

**Tabla1. Resistencia a la infección de ratones vacunados con I2 después del desafío con S2308.** Los ratones (n=10/ grupo) fueron inoculados con S19, I2 ( $10^5$  UFC/ ratón, en ambos casos) o solución salina (PBS) y desafiados 10 semanas después con  $5 \times 10^4$  UFC de S2308. Se determinó el número de S2308 por bazo dos semanas después del desafío. Los resultados se expresan como la mediana y el rango de dispersión. Los grupos con asterisco son significativamente distintos del control y no diferentes entre sí por la evaluación no-paramétrica de Kruskal-Wallis seguido por análisis de comparaciones múltiples.

Estos resultados indican que I2 es capaz de despertar una respuesta antibacteriana equivalente a la generada por S19, al igual que habíamos descrito para I1.

### **Parte III: Valoración de las cepas *B. abortus* M11uc y *B. abortus* INTA2 (I2) en el hospedador natural.**

Las mutantes M11uc e I2 fueron evaluadas como cepas vacunales para la brucelosis bovina. Las ventajas de estas nuevas cepas respecto de S19 son que son cepas marcadas genéticamente con un marcador cromosomal (*luc*) y que permitirían el diagnóstico diferencial de animales vacunados e infectados utilizando BP26 como reactivo de diagnóstico. El hecho de poder utilizar una herramienta de diagnóstico distinta de la identificación de anticuerpos anti-LPS, podría permitir la revacunación, que hoy es un problema serio en la campaña de erradicación de la brucelosis. Por otro lado, la cepa I2, posee otra potencial ventaja adicional ya que al ser más atenuada que S19, se podrían vacunar animales adultos o preñados sin riesgo de abortos. A su vez, podría presentar menor virulencia residual que S19 para el hombre.

#### **1. Vacunación de terneras.**

Para esta experiencia, se seleccionaron 60 terneras Aberdeen Angus y Hereford de aproximadamente 5 meses de edad de rodeos libres de brucelosis. La experiencia fue desarrollada en el INTA de Balcarce y en el campo experimental del SENASA en Azul, en colaboración con el grupo del Dr. Campero. Al mes de haber sido seleccionados, los animales se dividieron en cuatro grupos de 15 terneras cada uno que se denominaron a los grupos C, grupo control no vacunado y los grupos correspondientes a las vacunas S19, M11uc e I2.

Los animales fueron vacunados por vía subcutánea con la dosis habitual de vacunación que corresponde a  $2-4 \times 10^{10}$  UFC de S19 (vacuna comercial, San Jorge Bagó) y a una dosis igual de M11uc o I2 formuladas en el laboratorio. Para preparar las cepas vacunales M11uc e I2, se produjo y fraccionó un *stock* que fue mantenido a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Un vial de cada cepa fue descongelado y titulado por plaqueo en medio sólido. Así se establecieron las diluciones necesarias. El día de la vacunación, otro vial fue diluido a la concentración necesaria en solución salina estéril (PBS) y titulado después de vacunar para confirmar la dosis utilizada. Las dosis de vacunación fueron  $2 \times 10^{10}$  UFC/ml de S19,  $1.6 \times 10^{10}$  UFC/ml de M11uc,  $3 \times 10^{10}$  UFC/ml de I2.



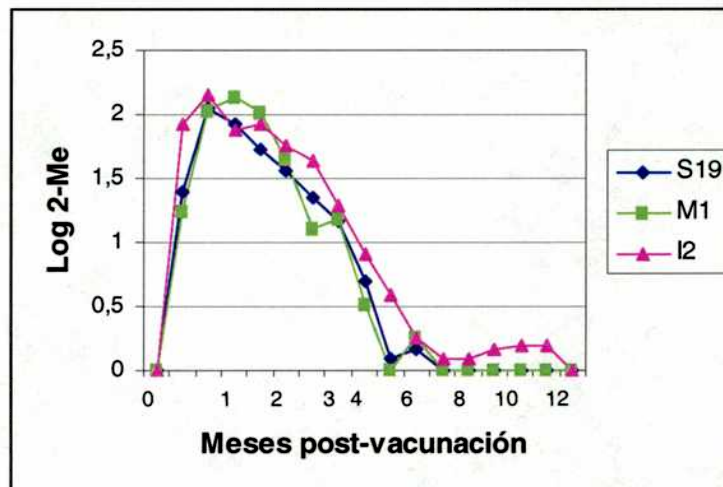
Se confirmó el genotipo y fenotipo de las cepas inoculadas por PCR en colonia de los genes mutados, Western Blot de las proteínas BP26 y BMP18, resistencia a la tinción con cristal violeta y sensibilidad a eritritol (datos no mostrados).

## 2. Respuesta humoral contra LPS.

Las cepas I2 y M1 luc mantienen el fenotipo liso de S19 (antígeno O formando el LPS), por lo tanto es esperable que los animales vacunados generen una respuesta humoral contra este antígeno equivalente a la generada por S19.

Para evaluar este aspecto, a distintos tiempos post-vacunación los animales fueron sangrados y la respuesta humoral contra LPS despertada por las vacunas fue evaluada por ensayos estándar de aglutinación en placa (BPA) y de seroaglutinación en presencia de 2-Mercaptoetanol (2-Me). Estos ensayos fueron realizados por el grupo del Dr. Carlos Campero en la EEA INTA Balcarce.

La respuesta inmune humoral contra el LPS fue equivalente en los animales vacunados con I2, M1 luc y S19. El pico de IgG fue entre una y dos semanas después de la vacunación, luego de lo cual decayó hasta hacerse nulo en prácticamente todos los animales a los 6 meses post-vacunación (Figura 26). Todos los animales no-vacunados (grupo control) fueron BPA negativos en todos los tiempos pre- y post-vacunación evaluados.



**Figura 26:** Respuesta inmune humoral contra S-LPS en los bovinos vacunados con las distintas cepas de *Brucella*. Cada punto representa el promedio del log de la dilución mayor a la cual el suero dió aglutinación positiva, de todos los animales de los respectivos grupos.

Estos resultados muestran que la inmunización con todas las cepas fue efectiva y similar a la descripta para la vacunación con S19 en el campo (Nicola *et al.*, 1999).

### **3. Respuesta humoral contra BP26.**

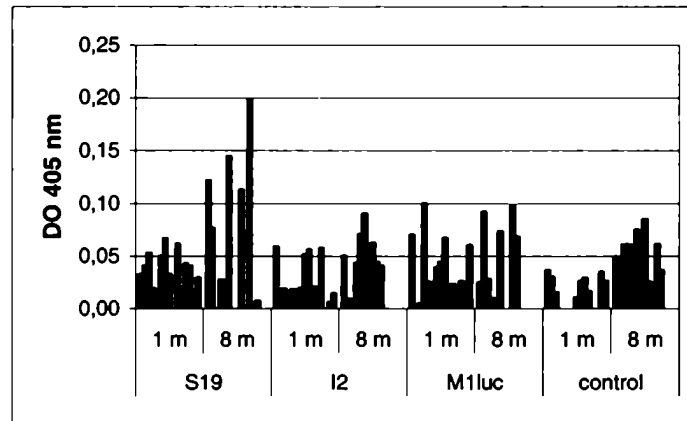
Sabiendo que la inmunización fue efectiva por la respuesta contra LPS despertada por todas las cepas, se analizó la respuesta humoral contra la proteína BP26 en los distintos grupos. Los sueros de los animales vacunados fueron analizados por una modificación de un inmunoensayo indirecto (iELISA) utilizando como antígeno BP26 recombinante previamente desarrollado (Arese *et al.*, 1999). Se utilizó un extracto periplásmico de *E. coli* DH5 $\alpha$  que expresa BP26 de *B. abortus*. Para evitar detectar el título de anticuerpos contra *E. coli*, se tomó un extracto periplásmico de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada únicamente con el vector (sin el gen *bp26*) y a las determinaciones de cada suero se le sustrajo la lectura obtenida de enfrentar a los sueros con este extracto.

Para analizar la validez del método, se ensayaron sueros de animales naturalmente infectados y sueros negativos provenientes de establecimientos libres de brucelosis, (cedidos gentilmente por la Dra. Susana Echaide de la EEA INTA-Rafaela). Al analizar 40 sueros negativos y 36 sueros positivos el método arrojó una especificidad 95% y una sensibilidad del 78%, con un punto de corte de  $DO_{405nm}=0,13$ , establecido como la media de los sueros negativos más tres desvíos estándar.

Una vez establecida la validez del ensayo con los sueros de campo, se analizaron los sueros de los bovinos vacunados con las distintas cepas. Se estableció en primera instancia el punto de corte como el promedio de la  $DO_{405 nm}$  de los 64 sueros pre-inmunes más tres desvíos estándar, lo que arrojó un resultado de  $DO_{405nm}=0,1$ . Este será el punto de corte utilizado para evaluar los sueros de esta experiencia.

Se determinó el título de anticuerpos contra BP26 en los animales vacunados con las distintas cepas (Figura 27). Los grupos control (no vacunados) y vacunados con las cepas M11uc e I2 presentaron valores de DO por debajo o cercanos al punto de corte tanto al mes como a los 8 meses post vacunación (N=15, 14 y 14, respectivamente). Los sueros provenientes del grupo vacunado con S19 presentaron lecturas negativas al mes post-vacunación pero, a los 8 meses post-vacunación, 4 de 14 animales presentaron lecturas

positivas (Figura 27). A los 14 meses post vacunación, ninguna lectura fue mayor a 0.06 en ningún grupo.



**Figura 27: BP26-iELISA en animales vacunados.** Cada barra representa el promedio de las lecturas correspondientes a dos repeticiones del inmunoensayo con suero de un mismo animal.

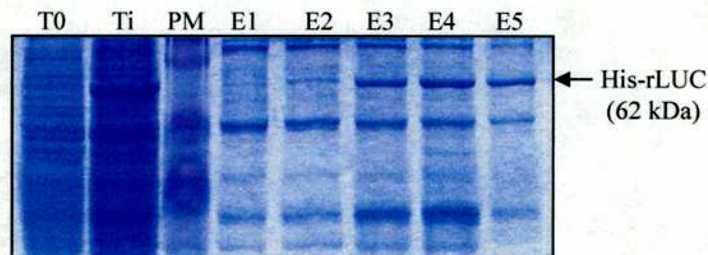
Estos resultados confirman la predicción de que las cepas mutantes que no expresan BP26 no inducen anticuerpos contra esta proteína al ser inoculadas en los bovinos. En cambio, si bien los animales vacunados con la cepa S19 no presentaron título de anticuerpos contra BP26 al mes post vacunación, a los 8 meses hay animales que dan positivo. Analizando la respuesta contra LPS y BP26, en el momento que la respuesta contra LPS es máxima, no habría anticuerpos contra BP26 en los animales vacunados con S19, lo que sugiere que la aparición de anticuerpos anti BP26 está demorada en el tiempo, respecto de la aparición de anticuerpos anti-LPS. Estos datos concuerdan con observaciones previas que sueros de animales vacunados con S19 y positivos para la prueba de BPA no presentaban reactividad contra BP26 (Rossetti *et al.*, 1996).

#### 4. Respuesta humoral contra Luciferasa.

Con el objetivo de determinar si el marcador genético introducido despierta respuesta humoral en los bovinos vacunados, se analizó la presencia de anticuerpos anti-luciferasa en los bovinos inmunizados.

Para ello, se clonó el gen *luc* proveniente del plásmido pSP-LUC+ (promega) en el vector de expresión pRSETB (Invitrogen) de manera de obtener la proteína luciferasa (LUC) recombinante fusionada en su extremo amino terminal a 6 residuos de histidina

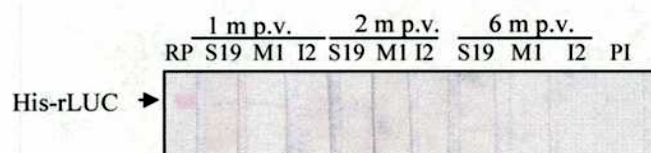
(His). La proteína HisLUC recombinante fue expresada en la cepa *E. coli* BL21plys (Invitrogen) y luego purificada por una columna de intercambio basada en la afinidad de los residuos His al Níquel (Figura 28).



**Figura 28. Purificación de His-rLUC.** Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), teñido con Coomassie Blue. To: extracto proteico total BI21plys-pRSETB-Luc+, sin inducir; Ti: extracto inducido (2 horas); PM: marcador de peso molecular (Kaleidoscope de BioRAD); E1 y E2 corresponden a fracciones de elución con buffer pH: 5.9; E3, E4 y E5: fracciones de elución con buffer pH: 4.5. Se indica la proteína His-rLUC y la referencia de peso molecular.

La proteína purificada (fracción E4) fue utilizada para determinar si los sueros de animales vacunados con las mutantes I2 y M1 luc (que expresan luciferasa a partir del promotor de BP26) presentaban anticuerpos diferenciales contra luciferasa respecto de los animales vacunados con S19 o sin vacunar, por Western Blot con los sueros de los grupos de bovinos a diferentes tiempos post vacunación (Figura 29).

No se observaron diferencias en el reconocimiento de la proteína recombinante en los distintos grupos a los diferentes tiempos evaluados, indicando una baja inmunogenicidad específica de esta proteína en los bovinos, al menos en las condiciones de este ensayo. El ensayo se reiteró utilizando el extracto Ti con idénticos resultados (datos no mostrados).



**Figura 29: Western Blot anti His-rLuc con sueros bovinos.** La fracción E4 de la purificación de la proteína His-rLUC se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida preparativo y transferido a membrana de nitrocelulosa. La membrana fue cortada y cada porción fue incubada con *pooles* de sueros bovinos según se indica: m p.v corresponde a meses post vacunación. RP, tinción con Rojo Ponzó; PI, pool de 64 sueros pre-inmune. Todos los sueros fueron utilizados en una dilución 1/100.

## **5. Ensayos de protección en bovinos contra el desafío con una cepa patógena.**

Para evaluar si las mutantes estudiadas eran capaces de generar una respuesta inmune protectora en el hospedador natural, se realizó un ensayo de protección comparativa entre los animales vacunados con las cepas mutantes M11uc e I2 respecto de S19 y de los animales sin vacunar.

A los 10 meses post vacunación aquellas vacas que llegaron a la madurez sexual fueron inseminadas. Del total de vacas inseminadas, aproximadamente el 85% resultaron preñadas y fueron trasladadas al campo experimental del SENASA en la localidad de Azul, Pcia. de Buenos Aires para el desafío con una cepa de *B. abortus* virulenta.

En el mes 5-6 de preñez (segundo trimestre), se instiló en el saco conjuntival  $3 \times 10^7$  UFC de la cepa patógena de referencia S2308 a cada animal.

El objetivo de las vacunas contra la brucelosis bovina es generar una respuesta inmune protectora que controle la proliferación de las cepas patógenas de manera de prevenir el aborto. Se toma entonces como índice de protección el número de animales que no abortan frente al total de animales desafiados. Sin embargo, también es importante conocer el número de vacas que, aunque no abortan, excretan *Brucella* en los fluidos vaginales o con los tejidos placentarios ya que estos tejidos sirven en el campo como fuente de contagio para otros animales.

Se ha reportado en este tipo de experiencia que el uso de la cepa virulenta S2308 como cepa de desafío induce aproximadamente 75% de abortos en animales sin vacunar (Schurig *et al.*, 1991; Cheville *et al.*, 1993).

En este caso, de los 12 animales del grupo control (no vacunados, desafiados) 9 abortaron y 2 dieron a luz terneros vivos pero con aislamiento de los fluidos vaginales y tejidos placentarios. Un animal (número 29), no presentó aislamiento en ningún tejido analizado y dió a luz a un ternero vivo y sano, lo cual sugiere que no se infectó y concuerda con los datos de eficiencia de desafío descriptos para este tipo de experiencia (Cheville *et al.*, 1993). Los animales vacunados con la cepa S19 resultaron protegidos contra el aborto en un 78.6%, dato que coincide con la literatura en donde se reporta que el nivel de protección alcanzado con la vacunación con S19 es de entre 70 y 80% (WHO, 1997). En cuanto a las cepas mutantes evaluadas, de los 11 animales preñados vacunados con M11uc, abortaron dos y otros dos dieron a luz terneros vivos, pero con aislamiento de la cepa de

desafío de los fluidos vaginales y tejidos placentarios. Esto indica que M11uc protegió en igual grado que S19 contra el aborto y la infección, ya que las diferencias no son significativas. De los animales 11 vacunados con I2, en cambio, 6 resultaron protegidos contra el aborto, mientras que de todos se aisló la cepa de desafío con los fluidos vaginales o tejidos placentarios (Tabla 2).

	N abortos/ N total	Protección (%)	N aislamientos/ N total	Prevención Infección (%)
Control	9/ 12	25	11/12	8*
S19	3/ 14	78.6	7/ 14	50
M11uc	2/ 11	81.8	4/ 11	63.6
I2	6/ 11	45.5	11/ 11	-

**Tabla 2. Índices de protección contra el aborto y la infección obtenidos por la vacunación las distintas cepas de *Brucella abortus* y posterior desafío con S2308.** Abortos se refiere a los animales que nacieron muertos o murieron en las 48 hs posteriores al nacimiento. \* corresponde al animal n° 29 que no se infectó.

En todos los casos de aborto o nacimiento del ternero muerto hubo aislamiento de *Brucella abortus* de los tejidos fetales. De los animales que no abortaron se intentó aislamiento de *Brucella* del mucus cérvico-vaginal y de la placenta. Con el objetivo de conocer a que cepas corresponden las bacterias aisladas , se crecieron los aislamientos en medio con y sin eritritol. En todos los casos la muestra creció en eritritol, demostrando que se trata de la cepa de desafío.

#### **6. Análisis de la respuesta humoral contra LPS post-desafío.**

Con el objetivo de estudiar la respuesta anti-LPS en los bovinos desafiados, se midieron los anticuerpos anti-LPS en 10 sueros elegidos al azar de los distintos grupos a las fechas 1 y 10 meses post-vacunación y 1 y 4 meses post-desafío, por un inmunoensayo de competición (cELISA) (Figura 30).

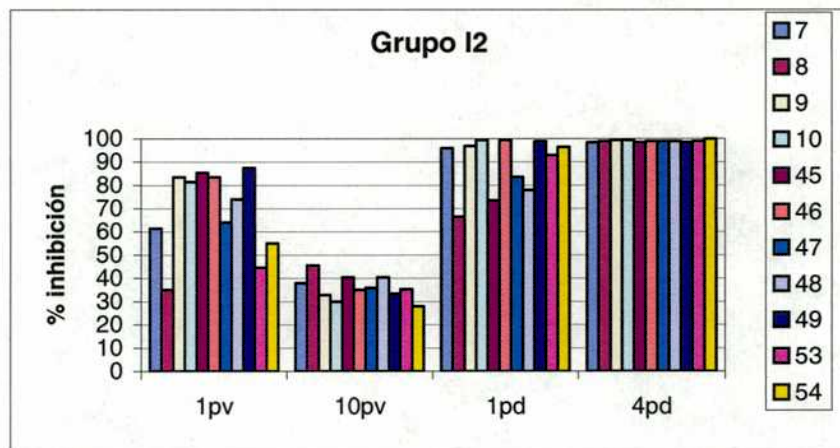
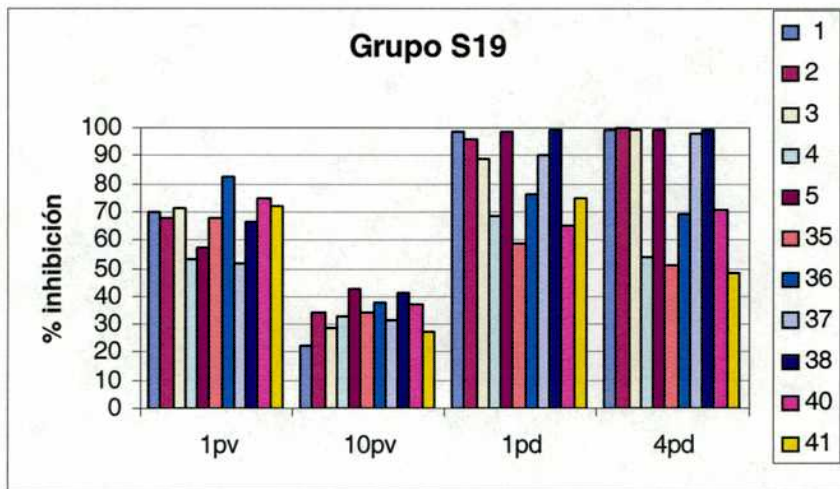
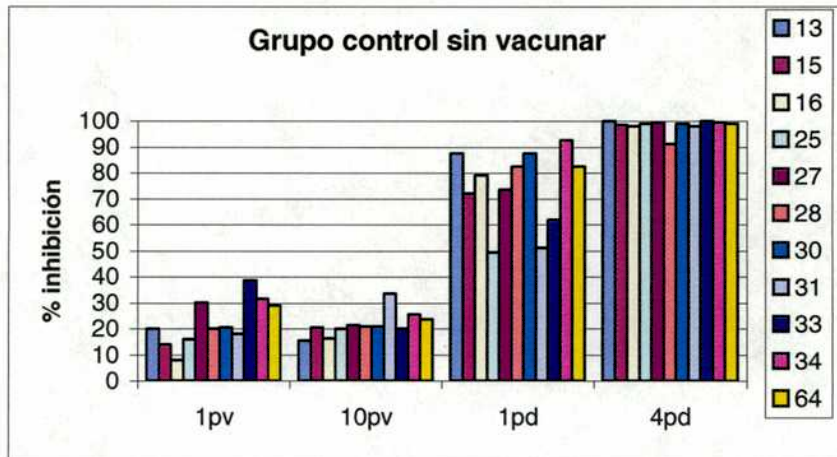
El cELISA se basa en el desplazamiento de los anticuerpos presentes en el suero por una concentración fija de un anticuerpo monoclonal de ratón contra un epítipo dominante del polisacárido O de *B. abortus* y *B. melitensis* (Marín *et al.*, 1999). Se refieren entonces

los resultados de OD obtenidos al valor del control de conjugado sin primer anticuerpo, siendo en este caso 0% de inhibición ya que no hay desplazamiento. Se consideran positivos, los sueros de los animales que presentan una inhibición de unión del monoclonal mayor al 40% (Nicola *et al.*, 1999). Se ha reportado que los animales vacunados con S19 dan reacción positiva hasta los tres meses post-vacunación, luego de lo cual dan negativo, con pocas excepciones (Nicola *et al.*, 1999).

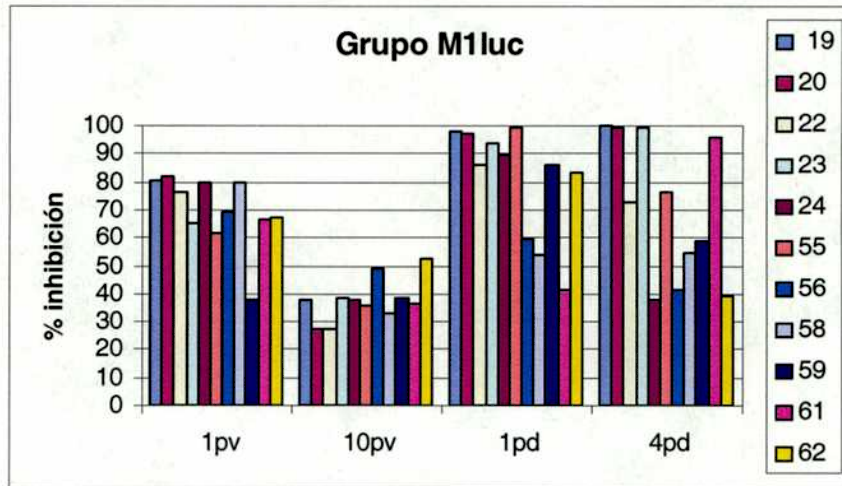
En esta experiencia, los animales vacunados con las cepas M11uc, I1 y S19 presentaron anticuerpos anti-LPS al mes post vacunación. A los 10 meses post vacunación, los animales de estos grupos presentaron en su mayoría títulos negativos, como era esperado. Ningún animal del grupo control (sin vacunar) presentó títulos positivos en las fechas evaluadas previas al desafío.

En los tiempos post desafío evaluados (1 y 4 meses), todos los sueros analizados de los animales del grupo control (no vacunados, desafiados) presentaron título contra LPS, indicando que se infectaron (el suero del animal n°29 no fue incluido). La respuesta se incrementó en el tiempo, siendo de mayor intensidad a los 4 meses post desafío que al mes post desafío. Los animales vacunados con I2 presentaron una respuesta contra LPS similar, lo que coincide con el hecho de que se aisló *B. abortus* S2308 de todos los animales de este grupo. En cambio, los animales vacunados con S19 y M11uc presentaron una respuesta más variable, siendo que en algunos animales la respuesta contra LPS aumentó con el transcurso del tiempo y en otros disminuyó.

Es atractivo especular que en aquellos animales que controlaron la infección, la respuesta contra LPS debería tender a disminuir y en aquellos que no fueron protegidos contra la infección, no. Sin embargo, si bien el aislamiento es considerado prueba definitiva de infección, el hecho de no haber podido aislar la bacteria no implica que el animal necesariamente no se haya infectado, ya que ningún método de aislamiento tiene 100% de eficiencia. La correlación, entonces, puede hacerse únicamente con los animales positivos. En este contexto, la correlación entre infección y respuesta contra LPS fue del 100% con este método.







**Figura 30. cELISA.** Se consideran positivos los sueros que arrojan un porcentaje de inhibición mayor al 40%. Las fechas de muestreo evaluadas fueron 1 y 10 meses post vacunación (1pv y 10pv, respectivamente) y 1 y 4 meses post desafío (1pd y 4pd, respectivamente). La leyenda indica el número del animal correspondiente.

### 7. Análisis de la respuesta humoral contra BP26 post-desafío.

La aparición de anticuerpos anti-BP26 en las distintas fechas post-desafío fue analizada por BP26-iELISA (Tabla 3). Se calculó la sensibilidad del método teniendo en cuenta como positivos sólo los animales que abortaron o de los cuales se aisló *Brucella*.

Vaca #	Ternero/a	Aislamiento	BP26 i-ELISA		
			Punto de corte: $DO_{405nm}=0,1$		
			1 m pd	3 m pd	4 m pd
C13	P	+	0.02	0.00	0.01
C15	M	+	0.21	0.02	0.33
C16	M	+	0.19	0.07	0.19
C25	M	+	0.05	0.06	0.02
C27	M	+	0.01	0.04	0.09
C28	P	+	0.09	0.16	0.07
C29	AT	-	NR	0.12	NR
C30	M	+	0.01	NR	0.19
C31	M	+	0.11	NR	0.14
C33	M	+	0.27	0.43	0.01
C34	M	+	0.09	0.05	0.13
C64	M	+	0.21	0.00	0.03
<b>Sensibilidad*</b>			<b>45.5%</b>	<b>22.2%</b>	<b>45.5%</b>
S1	M	+	0.01	0.57	0.6
S2	AT	+	0.07	0.09	0.1
S3	AT	-	0.09	0.07	0.05
S4	AT	-	0.00	0.09	0.04
S5	AT	+	0.14	0.25	0.13
S35	AT	-	0.18	0.05	0.06
S36	AT	-	0.11	0.11	NR

S37	AT	+	NR	NR	0.08
S38	M	+	0.05	NR	0.1
S40	AT	-	NR	NR	0.05
S41	M	+	0.12	0.05	0.02
S42	AT	-	0.05	NR	NR
S43	AT	-	NR	0.05	NR
S44	P	+	NR	0.15	NR
<b>Sensibilidad*</b>			<b>40%</b>	<b>68%</b>	<b>78%</b>
M19	M	+	0.17	0.22	0.22
M20	P	+	0.00	0.24	0.03
M22	AT	-	0.00	0.06	0
M23	P	+	0.00	0.00	0.06
M24	AT	-	0.10	0.05	0.02
M55	M	+	0.24	0.08	0.01
M56	AT	-	0.34	0.09	0
M58	AT	-	0.28	0.12	0
M59	AT	-	0.00	NR	0
M61	AT	-	0.00	NR	0
M62	AT	-	0.00	NR	0
<b>Sensibilidad*</b>			<b>50%</b>	<b>50%</b>	<b>25%</b>
I7	M	+	0.12	0.26	0.16
I8	AT	+	0.33	0.03	0.00
I9	AT	+	0.33	0.00	0.00
I10	M	+	0.00	1.66	0.69
I45	M	+	0.00	0.01	0.02
I46	P	+	0.00	0.08	0.07
I47	AT	+	0.00	0.00	0.02
I48	P	+	0.13	NR	0.04
I49	M	+	0.10	NR	0.21
I53	M	+	0.26	0.04	NR
I54	M	+	0.21	0.18	0.07
<b>Sensibilidad*</b>			<b>63.6%</b>	<b>33.3%</b>	<b>30%</b>

**Tabla 3. Correlación entre animales que abortaron o fueron protegidos por las distintas cepas de *Brucella* frente al desafío con la cepa patógena S2308 y el BP26-iELISA.** Grupo C: control, grupo S, S19, grupo M, M1luc, grupo I, I2. Nr= no realizado. P: prematuro, M: aborto o muerto en las primeras 48 hs de vida, AT: a término, vivo. Los datos del BP26-iELISA corresponden al promedio de dos repeticiones independientes de cada suero leídas a DO<sub>405nm</sub>. \*Para calcular la sensibilidad se tomaron como positivos aquellos animales que abortaron o presentaron aislamiento de *Brucella*.

Los resultados demuestran que la aparición de anticuerpos anti-BP26 a las fechas post desafío evaluadas y en las condiciones de infección controlada de este ensayo, presenta grandes variaciones individuales. No hubo una correlación entre infección en un animal y el título contra BP26. A su vez, la sensibilidad del BP26-iELISA para los distintos grupos y en las distintas fechas evaluadas fue muy variable, y menor a la obtenida con los sueros de animales naturalmente infectados. Es para destacar que el grupo vacunado con S19 fue el

**que presentó mejores niveles de sensibilidad, aproximándose a los resultados obtenidos con los sueros de animales naturalmente infectados previamente analizados.**

# **Discusión**

*Brucella abortus*, el agente etiológico de la brucelosis bovina, es una bacteria intracelular facultativa que replica en células fagocíticas y que también infecta a humanos, por lo que la enfermedad es considerada una zoonosis. Esta enfermedad produce grandes pérdidas en el sector pecuario y de salud pública del país y del mundo.

La vacuna de uso actual para el ganado bovino en la mayoría de los países es la cepa *B. abortus* S19. Esta cepa confiere protección a un 70-80% de los animales vacunados pero tiene importantes desventajas: induce anticuerpos en el animal vacunado que no pueden ser distinguidos del animal infectado lo cual interfiere con el serodiagnóstico, puede causar abortos al vacunar animales adultos y es infectiva para humanos (Nicoletti, 1990). Uno de los objetivos principales en la investigación en brucelosis bovina es el desarrollo de una cepa vacunal que induzca protección contra el aborto y la infección, que provea un serodiagnóstico certero y que sea segura para los humanos.

Una estrategia en el desarrollo de vacunas alternativas es la identificación de factores de virulencia y la delección de los genes correspondientes en cepas virulentas o vacunales, lo que ha llevado a la generación de cepas atenuadas (por una revisión sobre el tema ver Ko y Splitter, 2003). Sin embargo hasta el momento de este trabajo, en el caso de la brucelosis bovina, en muy pocos casos se han reportado ensayos de capacidad protectora de las mutantes en ratones (Briones *et al.*, 2001; Edmonds *et al.*, 2002; Rosinha *et al.*, 2002) y no se han informado resultados de protección en bovinos con ninguna de las cepas obtenidas.

Otra estrategia implica la identificación de proteínas antigénicas que sean inmunodominantes durante la infección con *Brucella* y la delección de los genes correspondientes en las cepas lisas vacunales (WHO, 1997). La anulación de la expresión de dichas proteínas no debe tener efecto sobre la capacidad protectora de la cepa.

Siguiendo esta última estrategia, se obtuvieron mutantes de *B. abortus* S19 en los genes *bscp31* y *sod* (Cheville *et al.*, 1992). Hasta el momento, en el área de brucelosis bovina, estas mutantes fueron las únicas cuya evaluación en el hospedador natural fue reportada. Ambas cepas confirieron iguales niveles de protección que S19 en bovinos vacunados y desafiados con la cepa patógena S2308, pero presentaron la misma virulencia residual que S19 y las proteínas elegidas no resultaron inmunodominantes durante la infección por lo que no presentaban ventajas respecto de S19 (Cheville *et al.*, 1993).

En trabajos previos de nuestro grupo se habían identificado y mutagenizado por interrupción con un gen que confiere resistencia a kanamicina y posterior reemplazo alélico, los genes *bp26* y *bmp18* de *B. abortus* S19 (Boschioli *et al.*, 1995; Cravero *et al.*, 1993).

BP26 es una proteína periplásmica de 26 kDa que ha sido descrita como inmunogénica durante la infección de distintas especies animales con *B. abortus* y *B. melitensis* (Linder *et al.*, 1996; Rossetti *et al.*, 1996; Arese *et al.*, 1999; Cloeckert *et al.*, 2001). La mutante de *bp26* en *B. abortus* S19 no presentó diferencias de comportamiento respecto de S19 en ratones BALB/c, ya sea en términos de virulencia residual como en términos de protección (Boschioli *et al.*, 1997).

BMP18 es una lipoproteína de membrana externa, que también ha sido descrita en *B. abortus* 544 como Omp19 (Tibor *et al.*, 1996) y como Ba18 en *B. abortus* 2308 (Kovach *et al.*, 1997). La mutante del gen *bmp18* en S19 presentó mayor atenuación pero igual capacidad protectora frente al desafío con una cepa patógena en ratones BALB/c (Cravero *et al.*, 1993).

En base a estos antecedentes nos planteamos la hipótesis que una cepa doble mutante de S19 para los genes *bp26* y *bmp18* debería ser más atenuada que S19 (por la mutación en *bmp18*) sin alterar su capacidad protectora. A su vez, esta mutante, al ser utilizada como cepa vacunal en bovinos debería proveer un método alternativo de diagnóstico utilizando la proteína BP26 como antígeno. Es decir que los animales vacunados con la mutante no generarían anticuerpos contra BP26 y los animales infectados con cepas de campo tendrían anticuerpos contra esta proteína. Para que esto ocurra, ambas mutaciones deben ser independientes y su efecto debe ser aditivo.

Para probar esta hipótesis, los genes *bp26* y *bmp18* fueron interrumpidos con genes que confieren resistencia a antibióticos en la cepa S19 por reemplazo alélico, generando la cepa *B. abortus* INTA1 (I1) (*B. abortus* S19 *bp26::kan bmp18::cat*). La obtención de la cepa I1 probó que la ocurrencia simultánea de ambas mutaciones no es letal para la bacteria. Con el objetivo de determinar si ambas mutaciones generaban sinergismo o anulación de las mutaciones individuales, se analizaron parámetros de comportamiento *in vitro* e *in vivo*.

Hace ya tiempo que se conoce que *B. abortus* es más resistente que otras bacterias patógenas intracelulares, entre ellas *Salmonella typhimurium*, a los mecanismos independientes del oxígeno de las células polimorfonucleadas (Riley y Robertson, 1984). Los mecanismos independientes de oxígeno involucran la acción sinérgica de proteínas y péptidos catiónicos que se unen a sitios aniónicos de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, volviéndolas permeables y susceptibles a la acción de enzimas líticas, bloqueando así las funciones celulares que dependen de la integridad de membrana (Groisman, 1994). Por otro lado, la membrana externa de las bacterias Gram-negativas presenta cierta resistencia a los agentes hidrofóbicos (como el detergente) por la baja permeabilidad del LPS presente en la cara externa de la misma, dado que este contiene cadenas de ácidos grasos saturados que provocan menor fluidez en el interior de la monocapa (Nikaido y Vaara, 1987).

En *E. coli*, hay más de 90 lipoproteínas que se encuentran ancladas a la membrana externa por su residuo lipídico. Estas sufren la modificación y procesamiento a lipoproteínas maduras en la cara periplásmica de la membrana interna, por el sistema Lol que libera las proteínas que poseen residuos distintos de Asp en la posición 2, llevando a la formación de un complejo lipoproteína-proteína periplásmica, que transfiere después la lipoproteína al receptor específico y determina el anclaje en la membrana externa (Miyamoto *et al.*, 2002). Las proteínas del sistema Lol se encuentran conservadas en las bacterias Gram-negativas, incluido el género *Brucella*.

Está bien documentado que la membrana externa de *Brucella* es más resistente a policationes, iones divalentes y agentes hidrofóbicos que otras bacterias Gram-negativas (Martínez de Tejada y Moriyón, 1993; Martínez de Tejada *et al.*, 1995) y que esta resistencia se debe a la estabilidad de la estructura de su membrana externa (Moriyon y Lopez Goñi, 1998). Las proteínas de membrana externa (Omps) y el sistema de dos componentes *bvrR/bvrS*, que regula la expresión de algunas de ellas, están íntimamente relacionados con dicha estabilidad (Solá-Landa *et al.*, 1998).

Es racional entonces pensar que, dado que BMP18 es una lipoproteína de membrana externa podría estar involucrada en el mantenimiento de la integridad de la envoltura celular de *B. abortus*. A su vez, BP26 es una proteína periplásmica de función no caracterizada que podría de alguna manera interactuar con BMP18 o con otros

componentes del espacio periplásmico que a su vez interactúen con BMP18. Para evaluar si la mutación en *bmp18*, en *bp26* o en ambos genes altera la estructura de la membrana externa se analizaron parámetros de sensibilidad a temperatura, a agentes policatiónicos (como polimixina B) y a agentes hidrofóbicos (como SDS).

La PolimixinaB (PmB) es un antibiótico lipodecapéptido con 5 grupos cargados positivamente y sin cargas negativas. Se une a la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y la desorganiza, siendo el prototipo de acción de agentes policatiónicos (Nikaido y Vaara, 1987). El LPS es el principal blanco de las moléculas policatiónicas, a nivel de sustituciones fosfato y del 3-deoxy-D-manno-2-octulosonato (KDO) de la región *core*-lípidos A. El antígeno O enmascara las cargas aniónicas y es por ello que las cepas lisas son más resistentes que las cepas rugosas a los péptidos cationicos (Martinez de Tejada *et al.*, 1995). Se ha postulado que, en *Brucella*, la resistencia aumentada a policationes se debe a enmascaramiento de cargas negativas por presencia de ornitina entre los lípidos (que tiene carga positiva) y a que el *core* contiene cantidades reducidas de KDO y ausencia de fosfatos (Moriyon y Lopez Goñi, 1998).

La cepa mutante I1 presentó mayor sensibilidad que S19 a la temperatura, a PmB y al SDS y esta sensibilidad se revirtió en todos los casos a los niveles observados para S19, con una copia funcional de *bmp18*, indicando que la falta de expresión de la proteína BMP18 es la responsable de la alteración de las propiedades de la membrana externa. Coincidentemente, la mutante simple M1 (S19 *bp26::kan*) no presentó diferencias con S19 respecto de estas características, sugiriendo que BP26 no está relacionada con la integridad de la membrana externa.

Si bien la mutante simple M18 (S19 *bmp18::cat*) presentó sensibilidad aumentada a PmB, llamativamente no resultó más sensible a SDS. Esto podría sugerir que el efecto de la mutación en *bmp18* sobre la permeabilidad a agentes hidrofóbicos se ve enmascarado en la mutante simple y solo resulta evidente en la mutante doble, tal vez por interacción de ambas proteínas con otros componentes del espacio periplásmico.

Resultados recientes obtenidos con una mutante de *omp19* (nombre con el que fue reportado el gen *bmp18* en *B. abortus* 544 por otros investigadores) en la cepa virulenta *B. abortus* 544 mostraron que la mutante es más sensible a PmB pero no más sensible a SDS (Tibor *et al.*, 2002), corroborando nuestros resultados obtenidos en S19.



La mayor permeabilidad de la membrana externa de la cepa mutante I1 no involucra la estructura del antígeno O del LPS, ya que tanto la cepa doble mutante I1 como las cepas mutantes individuales M1 y M18 y la cepa complementante I1-C siguen siendo resistentes a la tinción con cristal violeta, al igual que S19, lo que indica que son lisas. Postulamos entonces que BMP18 tendría una función estructural en la membrana externa de *B. abortus*, por lo que la falta de esta proteína llevaría a una desorganización de la membrana, probablemente resultando en exposición de cargas aniónicas, blanco para los policationes.

Al evaluar la infectividad de la mutante I1 en ratones BALB/c encontramos que no presenta el incremento característico de S19 en las UFC esplénicas a las 2-3 semanas post-infección, ni la correspondiente esplenomegalia. A su vez, este comportamiento es idéntico al de los ratones inoculados con la mutante M18 y al obtenido para la mutante SC1 (*S19 bmp18::kan*) (Cravero *et al.*, 1993). El fenotipo observado para I1 revierte al fenotipo de S19 con una copia funcional del gen *bmp18* (cepa I1-C), indicando que se debe exclusivamente a la mutación en este gen y no es influenciado por la mutación en *bp26*.

Los mecanismos por los cuales se produce la replicación en bazo y la esplenomegalia son la migración de las bacterias por la linfa a los ganglios linfáticos y de ahí a los principales órganos blanco: bazo e hígado (Ko y Splitter, 2003). En el bazo, las bacterias invaden y/o son fagocitadas por los macrófagos esplénicos, en los cuales alteran el tráfico intracelular hasta que alcanzan su nicho replicativo en compartimentos rodeados de membrana para los que se propuso el nombre de brucelosoma (Arenas *et al.*, 2000; Köhler *et al.*, 2003). En este compartimento, las bacterias replican y luego lisan la célula por abundancia en carga bacteriana para invadir nuevas células (Köhler *et al.*, 2002).

Con el objetivo de determinar en que etapa de la virulencia está implicada la proteína BMP18, se construyó la mutante M18v (S2308 *bmp18::cat*) con el gen *bmp18* inactivado en la cepa virulenta S2308. Se comparó la capacidad de esta cepa, respecto de la cepa salvaje S2308, de sobrevivir y replicar en macrófagos peritoneales murinos y de colonizar el bazo de ratones BALB/c. La cepa mutante no presentó diferencias respecto de la cepa salvaje en la supervivencia y replicación en los macrófagos aunque sí resultó más atenuada en los ratones. Estos resultados sugieren que la atenuación no se debería a defectos en la supervivencia intracelular en fagocitos profesionales sino más bien a mayor sensibilidad a otros mecanismos bactericidas *in vivo*.

Es posible que la alteración en la membrana externa genere mayor susceptibilidad a los componentes del suero, que limitan el número de bacterias que colonizan las células blanco del hospedador, en este caso los macrófagos esplénicos. Sin embargo, una vez que las bacterias alcanzan el microambiente intracelular, pueden replicar y establecer la infección. A favor de esta hipótesis, la mutante *B. abortus* 544 *omp19* presentó mayor sensibilidad a la lisis mediada por complemento sérico bovino. Esta mutante exhibió atenuación en ratones BALB/c y no presentó diferencias en la replicación en macrófagos bovinos (Tibor *et al.*, 2002), coincidiendo con nuestros resultados con la mutante M18v en macrófagos murinos y ratones BALB/c. Sin embargo, la cepa *B. abortus* 544 *omp19* presentó menor tasa de replicación en células HeLa (Tibor *et al.*, 2002). Las diferencias observadas en el comportamiento en macrófagos y células HeLa probablemente se deban a que ambos tipos celulares presentan diferencias en el tráfico intracelular y por ende en sus mecanismos bactericidas (Arenas *et al.*, 2000).

Por otra parte, se ha descrito que en ratones inmunizados con la cepa rugosa *B. abortus* RB51, hay respuesta celular contra BMP18 (Vemulapalli *et al.*, 2000). Por lo tanto, BMP18 podría ser un antígeno necesario para la generación de inmunidad celular. Si así fuera, se podría postular que las cepas mutantes que no expresan la proteína BMP18 desarrollarían menor CMI en el hospedador, lo que podría resultar en menor infiltrado de macrófagos en el bazo de los ratones inoculados con estas mutantes. Esto sería otra explicación posible a la falta de esplenomegalia en ratones inmunizados con las mutantes M18, I1 e I2, respecto de los inoculados con S19.

Dado que la respuesta celular es la respuesta imprescindible para la protección contra la infección con cepas patógenas de *Brucella*, si BMP18 tiene una función importante en la generación de CMI, cepas que no expresan esta proteína deberían tener menor capacidad protectora. Sin embargo, cepas de *B. abortus* RB51 y S19 mutantes para *bmp18*, no presentaron diferencias significativas en su capacidad protectora en ratones BALB/c (Vemulapalli *et al.*, 2000; Cravero *et al.*, 1993). Además, la inmunización con un virus vaccinia recombinante expresando el antígeno BMP18 no confirió ningún grado de protección contra el desafío con la cepa patógena S2308 y la sobre expresión de BMP18 en la cepa rugosa *B. abortus* RB51 no mejoró la capacidad protectora de la cepa en ratones, mientras que la sobre expresión de otros antígenos protectivos sí lo hicieron (Vemullapali

*et al.*, 2000). Estas evidencias sugieren que la contribución de BMP18 en el desarrollo de inmunidad protectora es muy limitado, al menos en el ratón.

El hecho que en ratones de experimentación la doble mutante I1 sea más atenuada que la cepa S19, pero con igual tiempo de permanencia en el hospedador, es alentador al considerar a esta cepa como candidata a cepa vacunal para la brucelosis. La persistencia es una característica favorable ya que se sabe que si la bacteria es eliminada rápidamente del organismo hospedador, probablemente no llegue a inducir una respuesta inmune protectora satisfactoria (Elzer *et al.*, 2002). Al ensayar la capacidad protectora de la cepa doble mutante I1 contra el desafío con una cepa patógena en ratones BALB/c, no se encontraron diferencias significativas respecto de S19, a igual dosis de vacunación y a pesar de la menor virulencia observada.

Por estas razones, y por los resultados obtenidos previamente con la mutante M1 (S19 *bp26::kan*), se generaron las mutantes nulas *B. abortus* M1luc (S19  $\Delta$ *bp26::luc*) e I2 (S19  $\Delta$ *bp26::luc*  $\Delta$ *bmp18*), con marcadores que no confieren resistencia a antibióticos (Campos *et al.*, 2002) con el objetivo de obtener cepas de *Brucella* que puedan ser utilizadas como cepas vacunales en bovinos. La estrategia de obtención de las mutantes requirió el uso de *sacB* como marcador de contraselección por la dificultad de identificar las colonias mutantes debido a la baja frecuencia del segundo evento de recombinación homóloga.

Los resultados obtenidos en ratones BALB/c luego de la inoculación con la mutante *B. abortus* I2 fueron similares a los obtenidos con *B. abortus* I1. La falta de BMP18 por delección de la mayor parte del gen sin introducir genes de resistencia a antibióticos y el reemplazo de gran parte del gen *bp26* por el gen *luc*, generó una cepa con mayor atenuación e igual capacidad de despertar una respuesta inmune protectora que S19. Sin embargo, hay que destacar que en algunos de los tiempos post desafío evaluados para I1 (1 y 4 semanas), así como en los 15 días post desafío de los ratones vacunados con I2, el número de bacterias de la cepa de desafío en el bazo de los ratones vacunados con I1 o I2 fue levemente mayor que el de los vacunados con S19. Esta diferencia en ningún caso fue estadísticamente significativa, pero podría mostrar una tendencia a menor protección.

La capacidad de las mutantes M1luc e I2 de despertar una respuesta inmune protectora fue ensayada en el hospedador natural (bovinos).

Los niveles de protección contra el desafío experimental con S2308 alcanzados en los bovinos vacunados con la mutante M1luc fueron equivalentes a los obtenidos con S19, tanto para la protección contra el aborto como en la protección contra la infección (81.8% y 63.6% respectivamente para M1luc y 78.6% y 50% respectivamente para S19). Esto demuestra que la falta de expresión de BP26 no afecta la capacidad protectora de S19 en los bovinos, coincidiendo con los resultados obtenidos en trabajos previos con la mutante M1 (S19 *bp26::kan*) en ratones BALB/c (Boschiroli *et al.*, 1997).

Sin embargo, la falta de expresión de la proteína BMP18 en la cepa I2 provocó una disminución en la capacidad de generar una respuesta inmune protectora en los bovinos, siendo el índice de protección contra el aborto de 78,6% en los animales vacunados con S19 pero sólo 45,5% en los vacunados con I2. En el caso de protección contra la infección, en el grupo vacunado con I2, en todos los animales hubo aislamiento de la cepa de desafío de tejidos placentarios o fluidos vaginales, indicando que no hubo protección contra la infección (contra el 50% observado en los animales vacunados con S19).

La diferencia observada en la magnitud de la protección alcanzada en ratones y bovinos vacunados con I2 podría estar relacionada con diferencias en el sistema inmune de ambas especies animales.

Por un lado, los ratones BALB/c son una cepa endocriada para la cual se describió una inhabilidad de mantener la producción de IFN- $\gamma$  constante (Baldwin, 2002). Se postula que en el período en que IFN- $\gamma$  no contribuye a la resistencia, la respuesta de los linfocitos CD8+ y la producción de TNF $\alpha$  son los responsables del control de la replicación de las bacterias (Murphy *et al.*, 2001). En el sistema inmune de los bovinos, los linfocitos T son el componente principal de la defensa del hospedador contra *Brucella* que se basa en la activación de los macrófagos por IFN- $\gamma$  así como en la muerte de células infectadas por los linfocitos CD8+ (Smith y Ficht, 1990). Si bien, las evidencias experimentales señalan que el modelo ratón para el rol de los linfocitos CD8+ se reproduce en los bovinos (Wyckoff III, 2002), la contribución diferencial de IFN- $\gamma$  en el control de la infección podría explicar las diferencias observadas en los índices protectivos.

Por otro lado, BMP18 podría tener una contribución más importante en la generación de CMI en bovinos que en ratones por lo que la mutante tendría menor capacidad de generar una respuesta inmune protectora. En este aspecto, se podría medir la

respuesta de citoquinas inducida en bovinos por las distintas cepas respecto de S19, para esclarecer la contribución de las proteínas individuales a la generación de respuesta celular.

Desde el punto de vista de la vacunación, sería interesante investigar si mayores dosis de I2 logran despertar mejores niveles de protección. En este sentido, la dosis de vacunación de RB51 (cepa vacunal de *B. abortus* rugosa en uso en los Estados Unidos, Chile y México), que es más atenuada que S19, posee un logaritmo más de bacterias que la dosis de S19, para conferir niveles similares de protección. Igualmente se ha demostrado que con una única dosis de vacunación con RB51, la protección de bovinos no llega a los niveles alcanzados con S19. Sin embargo, la revacunación sistemática del ganado permite disminuir drásticamente la incidencia de la enfermedad (Samartino, 2002).

Hay que destacar que por lo menos el 50% de los bovinos vacunados con S19 excretaron *Brucella* en los tejidos placentarios, leche o fluidos vaginales, lo que sirve como fuente de reinfección para los otros animales. Esto indica la ineficacia de S19 para el control de la enfermedad en las áreas de alta prevalencia y ratifica la necesidad del desarrollo de nuevas vacunas o de nuevos esquemas de vacunación que permitan alcanzar mejores niveles de protección.

Al evaluar la respuesta humoral en los bovinos, el título y la cinética de evolución de los anticuerpos contra LPS resultó idéntico en los grupos de bovinos vacunados con I1, M11uc y S19, lo que confirma que la estructura del antígeno O no se vio afectado en las mutantes.

En cuanto al uso de BP26 como antígeno de diagnóstico, se analizaron los sueros de esta experiencia por un inmunoensayo (BP26-iELISA) previamente desarrollado (Arese *et al.*, 1999). La especificidad se tomó como el número de animales negativos para infección por *Brucella*, que dan negativos en este ensayo. La sensibilidad es el número de animales que se sabe certeramente que son positivos (por aislamiento de la cepa virulenta) y que dan positivo en este ensayo. En general, el punto de corte del ensayo se determina de manera de optimizar sensibilidad y especificidad.

Se había descrito en trabajos previos que si bien el gen *bp26* está presente en todas las cepas de *Brucella*, los sueros de bovinos vacunados con S19 con serología positiva para LPS no presentaban anticuerpos contra esta proteína mientras que los sueros de animales infectados con cepas de campo sí (Rossetti *et al.*, 1996).

En este trabajo comprobamos que en los bovinos hay respuesta humoral contra BP26 después de la vacunación con S19, pero esta respuesta está demorada en el tiempo respecto de la aparición de anticuerpos anti-LPS y es de baja intensidad. Coincidentemente, se ha descrito que en ovejas naturalmente infectadas con *B. ovis*, la respuesta contra BP26 se encuentra demorada respecto de la aparición de anticuerpos anti LPS (Zygmunt, *et al.*, 2002). Las terneras vacunadas con S19 presentaron niveles de anticuerpos contra BP26 muy bajos a lo largo de todas las fechas post vacunación evaluadas, detectándose algunos animales positivos al BP26-iELISA a los 8 meses post vacunación. Los animales no vacunados o vacunados con las mutantes, no presentaron título contra BP26 en ningún tiempo ensayado, bajo las condiciones de este ensayo.

A su vez, resultados del Servicio de Investigación Agraria de Zaragoza, España, utilizando el antígeno BP26 obtenido y cedido por nuestro laboratorio, indican que la especificidad con sueros de animales infectados con *Yersinia enterocolitica* (bacteria que infecta frecuentemente el ganado y que genera reacción cruzada en el serodiagnóstico tradicional) fue del 100% (Blasco, comunicación personal). Esto indica que no hay reacción cruzada al utilizar este antígeno, coincidiendo con el hecho que *Y. enterocolitica* no expresa la proteína BP26 (Rossetti *et al.*, 1996). Por lo tanto, BP26 sería un antígeno de diagnóstico atractivo como prueba complementaria para animales recientemente vacunados con S19 (o eventualmente con mutantes en el gen *bp26*), ya que en el período en que la respuesta contra LPS es indistinguible entre animales vacunados e infectados, los primeros no presentan anticuerpos contra BP26. Además esta proteína sería útil para distinguir serológicamente infecciones por *Brucella* o *Yersinia*.

Resulta evidente que, para que BP26 sea útil en el serodiagnóstico, los animales infectados con cepas virulentas de *Brucella* deben presentar título de anticuerpos contra esta proteína. Sin embargo, al analizar los sueros correspondientes a esta experiencia observamos que el diagnóstico de bovinos infectados utilizando BP26 como antígeno presentó menor sensibilidad que la esperada por resultados previos obtenidos con sueros de animales naturalmente infectados. Aquellos animales que fueron inmunizados con las mutantes M11uc o I2 (que no expresan BP26) o que no fueron vacunados (grupo control), presentaron después del desafío una respuesta de anticuerpos anti-BP26 de baja intensidad y con pobres índices de correlación con el grado de infección. Los animales vacunados con

S19 a los tres meses post desafío, presentaron mejores niveles de sensibilidad, acercándose a los observados para los sueros de campo. Esto tiene lógica ya que los sueros de campo corresponden a animales que fueron vacunados con S19 (la vacunación es obligatoria para terneras de 3-6 meses), y posteriormente se infectaron, situación equivalente a la del grupo S19.

La sensibilidad de la prueba podría aumentar mejorando la calidad del antígeno utilizado para el diagnóstico. En este trabajo se utilizó un extracto periplásmico de *E. coli* recombinante que expresa el antígeno BP26 y luego se sustrajo la señal correspondiente a los anticuerpos contra *E. coli*. Esta metodología arrojó resultados más reproducibles que la adsorción de los sueros con extracto de *E. coli* previo al inmunoensayo y a la utilización de un antígeno recombinante His-BP26 (resultados no mostrados). Sin embargo, los niveles de sensibilidad no presentaron variaciones significativas y resultaron equivalentes a los encontrados con un antígeno recombinante His-BP26 de *B. melitensis* (que es idéntica a la BP26 de *B. abortus*) desarrollado por otro grupo de investigación (Blasco, comunicación personal).

Recientemente se reportó la identificación de epitopes inmunodominantes de BP26 de *B. melitensis* (Seco-Mediavilla *et al.*, 2003). Se determinó por Western Blot que utilizando un fragmento correspondiente a los aminoácidos 55 a 152 de BP26 de *B. melitensis*, no hay reactividad con sueros negativos de ovejas y se mantienen los niveles de reactividad contra los sueros positivos (de ovejas infectadas con *B. melitensis*), mientras que con la proteína entera se observa cierta reactividad con algunos de los sueros negativos (Seco-Mediavilla *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren que el uso de epitopes ubicados en esta zona podría arrojar mejores resultados de sensibilidad ya que disminuiría la reactividad de los sueros negativos, permitiendo bajar el punto de corte de la prueba sin disminuir la especificidad. Sería interesante volver a ensayar los sueros bovinos obtenidos en este trabajo con un antígeno que abarque sólo esta región y comparar los resultados de sensibilidad.

Por otro lado, no se puede descartar que la diferencia de sensibilidad observada en este trabajo respecto de la obtenida para sueros de animales naturalmente infectados, se deba a diferencias entre las cepas de campo y la cepa de referencia S2308 utilizada para el desafío. Tampoco a la vía de infección ya que en las infecciones naturales el contagio es

principalmente gastrointestinal, con sucesivas reinfecciones y en el caso del desafío experimental se hace en una única dosis intraconjuntival. De todas maneras, la respuesta contra BP26 fue altamente variable entre animales individuales y en el tiempo para un mismo animal.

Resultados obtenidos analizando otras proteínas recombinantes para el diagnóstico de brucelosis en distintas especies animales también revelaron que en cabras experimentalmente infectadas la respuesta humoral contra las proteínas individuales fue altamente variable y de menor intensidad que la de cabras naturalmente infectadas (Letteson *et al.*, 1997). Por lo tanto, la heterogeneidad observada en la respuesta contra BP26 podría ser un indicador de la generalidad de la respuesta humoral contra antígenos proteicos de *Brucella*.

A su vez, las distintas especies de animales estudiados (cabras, ovejas y vacas) presentaron reactividad distinta para las proteínas ensayadas (Omp10, Omp16, Omp19 ó BMP18, Omp25, Omp36, p15, p17 y p39), resultando algunas mejores que otras en términos de sensibilidad para la detección de animales infectados, dependiendo de la especie animal en estudio (Letteson *et al.*, 1997). Se podrían evaluar distintas combinaciones de todas las proteínas descritas hasta el momento como útiles para el diagnóstico, para sobrellevar las variabilidades individuales.

En este trabajo no se ensayó la utilidad de BMP18 como antígeno de diagnóstico ya que está bien documentado que no despierta respuesta humoral en bovinos infectados (Letteson *et al.*, 1997), si bien es inmunoreactiva en otras especies animales como humanos, cabras, perros (Kovach *et al.*, 1997) y ovejas infectadas (Tibor *et al.*, 1996;).

Es interesante especular que pasaría con una doble mutante en *bp26* y *bmp18* para *B. melitensis* Rev.1 (cepa lisa vacunal actual para cabras y ovejas), ya que ambas proteínas son inmunogénicas en cabras y ovejas lo que podría aumentar la sensibilidad del diagnóstico al utilizar ambas proteínas en un inmunoensayo. Se ha reportado que la sensibilidad con el antígeno BP26 recombinante para infecciones con *B. melitensis* es del 90% con un 95% de especificidad (Blasco, comunicación personal). A su vez, se sabe que Rev.1 además de proteger a cabras y ovejas contra cepas virulentas de *B. melitensis*, puede proteger a los bovinos contra cepas patógenas de *B. abortus* (Banai, 2002). Sin embargo, la cepa Rev.1 tiene una alta virulencia residual para los animales y es patógena para el



hombre, por lo que su uso en bovinos no está aprobado. Dado que la mutación en *bmp18* genera atenuación en *B. abortus*, sería interesante evaluar como afecta la falta de BMP18 a la virulencia y, eventualmente, a la capacidad protectora de Rev.1.

La generación de cepas vacunales atenuadas de *Brucella* más seguras para los animales y para el hombre es necesaria para el control de la enfermedad y el diseño racional de dichas cepas a partir de los conocimientos básicos en cuanto a proteínas inmunogénicas y factores de virulencia es un camino promisorio para lograrlo. El análisis de la información que surge a partir de la secuenciación de los genomas de *B. abortus* (Sanchez *et al.*, 2001), *B. melitensis* (Del Vecchio *et al.*, 2002 a) y *B. suis* (Paulsen *et al.*, 2002) facilitará la identificación y clonado de potenciales genes blanco para ser mutados.

En este contexto, la estrategia de mutagénesis desarrollada para obtener mutantes sin marcadores de resistencia a antibióticos cobra particular relevancia. Hasta el momento todas las mutantes genéticamente definidas reportadas en *Brucella* se obtuvieron por inserción o reemplazo de la secuencia codificante del gen blanco con genes marcadores que confieren resistencia a antibióticos (ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, gentamicina). Por lo tanto, el número de mutaciones que se podrían introducir en una cepa por reemplazo alélico clásico estaría limitado al número de genes marcadores. A su vez, las mutantes así generadas serían cepas con resistencias múltiples.

Con la metodología desarrollada en este trabajo, se pueden mutar numerosos genes blanco por delección de la secuencia codificante sin marcadores (como se hizo para *bmp18* en la mutante I2), utilizando siempre el mismo sistema de plásmido suicida y contraselección por *sacB*. De esta manera, las cepas obtenidas, además de no poseer resistencia a antibióticos, podrían tener tantas mutaciones genéticamente definidas como la cepa permita.

Así, si se identifica un grupo de proteínas que permite la identificación de los animales infectados, se podría obtener una cepa derivada de las cepas vacunales con esas proteínas inactivadas, o inactivar varios genes en las cepas virulentas de manera de tener cepas con diferentes grados de atenuación. Por otro lado este sistema permitiría la expresión de antígenos heterólogos bajo promotores de genes no esenciales de *Brucella* (como *bp26*), ya sea para el marcado molecular de las cepas vacunales (como en este caso

se utilizó el gen *luc*) o para la generación de vacunas multivalentes por expresión de antígenos heterólogos inmunoprotectivos.

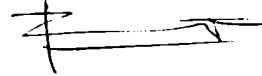
# **Conclusiones**

## Conclusiones

1. La anulaci3n simult3nea de la expresi3n de las prote3nas BMP18 y BP26 en *B. abortus* S19 no es letal para la bacteria.
2. La falta de expresi3n de la prote3na BMP18 en la cepa S19 altera la integridad de la membrana externa haci3ndola m3s susceptible al efecto de mol3culas cati3nicas, mientras que la falta de expresi3n de BP26 no tiene ning3n efecto sobre los par3metros de estabilidad evaluados.
3. La mutaci3n simult3nea de *bmp18* y *bp26* en S19 no tiene efecto de anulaci3n o sinergia en el comportamiento de la bacteria en ratones BALB/c. La doble mutante *B. abortus* INTA1 (I1) (S19 *bp26::kan bmp18::cat*) es m3s atenuada que la cepa parental S19, y esto se debe a la falta de BMP18.
4. La mayor atenuaci3n de la cepa I1 no influy3 significativamente en su capacidad para generar una respuesta inmune protectora en ratones BALB/c.
5. La prote3na BMP18 no es necesaria para la supervivencia intracelular en macr3fagos murinos aunque s3 para la virulencia de S2308 en ratones BALB/c.
6. La construcci3n de mutantes de *B. abortus* sin resistencia a antibi3ticos es posible utilizando la estrategia de reemplazo al3lico en dos etapas asistido por el marcador de contraselecci3n *sacB*.
7. Luciferasa es un gen marcador no selectivo funcional en *Brucella* que permite la identificaci3n de las cepas mutantes. Sin embargo, esta prote3na no result3 inmunog3nica en los bovinos por lo que no permitir3a un ensayo serol3gico que permita identificar a los bovinos vacunados.
8. La cepa *B. abortus* INTA2 (I2) (S19  $\Delta bp26::luc \Delta bmp18$ ) present3 un comportamiento similar a la mutante I1 en ratones BALB/c.
9. La interrupci3n del gen *bp26* por delecci3n e inserci3n del gen heter3logo *luc* no afect3 la capacidad protectora de S19 en el hospedador natural (bovinos), como fue demostrado con la cepa M1luc.
10. La falta de expresi3n de la prote3na BMP18 disminuy3 la capacidad de S19 de generar una respuesta inmune protectora en los bovinos.



11. La utilización de BP26 como antígeno de diagnóstico arrojó muy buenos resultados de especificidad pero bajos niveles de sensibilidad en las condiciones de infección experimental controlada de este ensayo.
12. La aparición de anticuerpos anti-BP26 en bovinos se encuentra demorada en el tiempo respecto de la aparición de anticuerpos anti-LPS y presenta gran heterogeneidad individual.

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the bottom.A handwritten signature in black ink, featuring a vertical stroke on the left and a horizontal stroke on the right.

# **Bibliografía**

## **Bibliografía**

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. S.** (1997). Cellular and molecular Immunology. 3<sup>rd</sup> ed. W. B. Saunders.
- Acha, P. N. y Szyfres B.** (1986). Brucelosis. *En Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales.* Organización Panamericana de la Salud. pp; 14-46.
- Al-Mariri A., Tibor A., Mertens P., De Bolle X., Michel P., Godefroid J., Walravens K., Letesson J.J.** (2001). Protection of BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 challenge by vaccination with bacterioferritin or P39 recombinant proteins with CpG oligodeoxynucleotides as adjuvant. *Infect Immun.* 69: 4816-22.
- Almirón M., Martínez M., Sanjuan N., Ugalde R.A.** (2001). Ferrochelatase is present in *Brucella abortus* and is critical for its intracellular survival and virulence. *Infect. Immun.* 69: 6225-6230.
- Alton G.G., Jones L.M. Angus R.D., Verger J.M.** (1988). Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris.
- Arenas G., Staskevich A., Aballay A., Mayorga L.** (2000). Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 Macrophages. *Infect. Immun.* 68: 4255-4263.
- Arese A.I., Cravero S.L., Boschioli M.L., Campos E., Samartino L., Rossetti O.L.** (1999). Use of a recombinant protein from *Brucella abortus* for the diagnosis of brucellosis in different animal species. *Rev. Argent. Microbiol.* 31: 36-39.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. (ed.)** (1996). Current protocols in Molecular Biology. J. Wiley & Sons, Inc., N.Y.
- Baldi P.C., Wanke M. M., Loza M.E., Monachesi N., Fossati C.A.** (1997) Diagnosis of canine brucellosis by detection of serum antibodies against an 18 kDa cytoplasmic protein of *Brucella* spp. *Vet Microbiol.* 57: 273-81.
- Baldwin, C.** (2002). Immune response overview. *Vet. Microbiol.* 90: 365- 366.
- Baldwin C., Roop II R.M.** (1999). *Brucella* Infections and Immunity, p. 266-271. *In* L. J. Paradise (ed.), Opportunistic intracellular bacteria and immunity. Plenum Press, N.Y.
- Banai, M.** (2002) Control of small ruminant brucellosis by use of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine: laboratory aspects and field observations. *Vet Microbiol.* 90: 497-519.
- Bang, B.** (1906). Infectious abortion in cattle. *J. Comp. Pathol.* 19: 191-202.
- Baulard A., Escuyer V., Haddad N., Kremer L., Loch C., Berche P.** (1995). Mercury resistance as a selective marker for recombinant mycobacteria. *Microbiology.* 141: 1045-50.

**Blasco J.M., Moriyón I., Berman D.T.** (1982). Effects of nonionic, ionic, and dipolar ionic detergents and EDTA on the *Brucella* cell envelope. *J Bacteriol.* 152(2): 822-828.

**Blasco J.M., Díaz, R.** (1993 a). *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine as a cause of human brucellosis. *Lancet* 342: 805.

**Blasco J.M., Gamazo C., Winter A.J., Jimenez de Bagues M.P., Marin C., Barberan M., Moriyón I., Alonso-Urmeneta B., Diaz R.** (1993 b). Evaluation of whole cell and subcellular vaccines against *Brucella ovis* in rams. *Vet Immunol Immunopathol.* 37: 257-70.

**Boivin R., Chalifour F.P., Dion P.** (1988). Construction of a Tn5 derivative encoding bioluminescence and its introduction in *Pseudomonas*, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Mol Gen Genet.* 1988 213: 50-5.

**Boschioli M.L., Cravero S.L., Arese A.I., Rossetti O.L.** (1995). Construcción y caracterización de una mutante de *Brucella abortus* por inactivación de un gen que codifica una proteína de 26 kDa. *Arch. Med. Vet.* 26:103-111.

**Boschioli M.L., Cravero S.L., Arese A.I., Campos E., Rossetti O L.** (1997). Protection against infection in mice vaccinated with a *Brucella abortus* mutant. *Infect. Immun.* 65:798-800.

**Boschioli M.L., Foulongne V., O'Callaghan D.** (2001). Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr. Opin. Microbiol.* 4:58-64.

**Boschioli M.L., Ouahrani-Bettache S., Foulongne V., Michaux-Charachon S., Bourg G., Allardet-Servent A., Cazevieille C., Liautard J.P., Ramuz M., O'Callaghan D.** (2002a). The *Brucella suis virB* operon is induced intracellularly in macrophages. *PNAS* 99: 1544-9.

**Boschioli M.L., Ouahrani-Bettache S., Foulongne V., Michaux-Charachon S., Bourg G., Allardet-Servent A., Cazevieille C., Lavigne J.P., Liautard J.P., Ramuz M., O'Callaghan D.** (2002b). Type IV secretion and *Brucella* virulence. *Vet. Microbiol.* 90: 341-348.

**Bricker B.J., Ewalt D.R., Mac Millan A.P., Foster G., Brew S.** (2000). Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *J Clin Microbiol* 38:1258-1262.

**Bricker, B.J.** (2002a) Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. *Vet Microbiol.* 90: 433-4.

**Bricker, B.J.** (2002b) PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol.* 90: 435-46.



- Briones G., N. Iñón de Iannino, M. Roset, A. Vigliocco, P. Silva Paulo, R. A. Ugalde.** (2001). *Brucella abortus* cyclic  $\beta$  1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect. Immun.* 69:4528-35.
- Bruce, D.** (1887). Note on the discovery of a microorganism in Malta Fever. *The Practitioner* 39: 161-170.
- Buck, J.M.** (1930). Studies of vaccination during calthood to prevent bovine infectious abortion. *J of Agric. Reasearch.* 41: 667-689.
- Campos E., Cravero S.L., Delgui L., Mora I., Kahn N., Arese A.I., Rossetti O.L.** (2002). *Brucella abortus* INTA2, a novel strain 19 ( $\Delta$ )*bp26::luc* ( $\Delta$ )*bmp18* double mutant lacking drug resistance markers. *Vet Microbiol.* 87: 1-13.
- Caron E., Gross A., Liutard J.P., Dornand J.** (1996). *Brucella* species release a specific, protease-sensitive, inhibitor of TNF $\alpha$  expression, active on human macrophage-like cells. *J. Immunol.* 156: 2885- 2893.
- Cassataro J., Delpino M.V., Velikovsky C.A., Bruno L., Fossati C.A., Baldi P.C.** (2002). Diagnostic usefulness of antibodies against ribosome recycling factor from *Brucella melitensis* in human or canine brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9: 366-9.
- Cebolla A., Vazquez M.E., Palomares A.J.** (1995). Expression vectors for the use of eukaryotic luciferases as bacterial markers with different colors of luminescence. *Appl Environ Microbiol.* 61: 660-8.
- Céspedes S, Andrews E, Folch H, Oñate A.** (2000). Identification and partial characterisation of a new protective antigen of *Brucella abortus* *J. Med. Microbiol.* 49: 165-70
- Cherwonogrodzky J.W., Dubray G., Moreno E., Mayer H.** (1990). Antigens of *Brucella*, pp. 19-64. *En: Animal Brucellosis.* K. Nielsen y J.R. Duncan, ed. CRC Press.
- Cheville N.F., Jensen A.E., Halling S.M., Tatum F.M., Mortiff D.C., Hennager S.G., Frerichs W.M., Schurig G.G.** (1992). Bacterial survival, lymph node changes, and immunologic responses of cattle vaccinated with standard and mutant strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 53:1881-1888.
- Cheville N.F., Stevens M.G., Jensen A.E., Tatum F.M., Halling S.M.** (1993). Immune responses and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.* 54:1591-1597.
- Clavareau C., Wellemans V., Walravens K., Tryland M., Verger J.M., Grayon M., Cloeckaert A., Letesson J.J., Godfroid J.** (1998). Phenotypic and Molecular characterization of a *Brucella* strain isolated from a mink whale (*Balaenoptera acutorostrata*). *Microbiology.* 144:3267-3273

- Cloekaert A., de Wergifosse P., Dubray G., Limet J.N.** (1990) Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect Immun.* 58: 3980-7.
- Cloekaert A., Debbarh H.S., Vizcaino N., Saman E., Dubray G., Zygmunt M.S.** (1996) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* bp26 gene coding for a protein immunogenic in infected sheep. *FEMS Microbiol. Lett.* 140: 139-144
- Cloekaert A., Baucheron S., Vizcaino N., Zygmunt M.S.** (2001) Use of recombinant BP26 in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8: 772-775.
- Cloekaert A., Vizcaino N., Paquet J.I., Bowden R., Elzer P.** (2002) Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet. Microbiol.* 90:229-247.
- Cloekaert A., Grayon M., Grepinet O., Boumedine K.S.** (2003) Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. *Microbes Infect.* 2003 5: 593-602.
- Coligan J. E., Kruisbeek A. M., Margulies D. H., Shevach E. M., Strober W. (editors).** (1997). *Current Protocols in Immunology.* John Wiley & Sons.
- Comerci D.J., Martinez-Lorenzo M.J., Sieira R., Gorvel J.P., Ugalde R.A.** (2001). Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. *Cell Microbiol.* Mar;3(3):159-68.
- Corbeil L.B., Blau K., Inzana T.J., Nielsen K., Jacobson R., Corbeil R., Winter A.J.** (1988). Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. *Infect and Immunity* 56: 3251- 3261.
- Corbel M.J , Stuart F.A , Brewer R.A.** (1984). Observations on serological cross-reactions between smooth *Brucella* species and organisms of other genera. *Dev Biol Stand.* 56: 341-8.
- Corbel M.J.** (1997). Recent advances in Brucellosis. *The Pathological Society of Great Britain and Ireland* pp: 101-103
- Coronado C., Vazquez M.E., Cebolla A., Palomares A.J.** (1994). Use of firefly luciferase gene for plasmid copy number determination. *Plasmid.* 32: 336-41.
- Cravero S., Boschioli L., Rossetti O.** (1993). Inactivation and growth behavior in mice of a *Brucella abortus* *bmp18* insertion mutant. 46th Annual Brucellosis Research Conference. Chicago, USA.
- Crawford R.M., Van De Verg L., Yuan L., Hadfield T.L., Warren R.L., Drazek E.S., Houg H.H., Hammack C., Sasala K., Posinelli T., Thompson J., Hoover D.L.** (1996).

Deletion of *purE* attenuates *Brucella melitensis* infection in mice. *Infect. Immun.* 64:2188-2192.

**Davis D.S.** (1990). Brucellosis in the wildlife, pp. 283-300. *En: Animal Brucellosis.* K. Nielsen y J.R. Duncan, ed. CRC Press.

**De Lorenzo V.** (1992). Genetic engineering strategies for environmental applications. *Curr Opin Biotechnol.* 3: 227-31.

**Delrue R.M., Martinez-Lorenzo M., Lestrade P., Danese I., Bielarz V., Mertens P., De Bolle X., Tibor A., Gorvel J.P., Letesson J.J.** (2001). Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol.* 3: 487-97.

**DelVecchio V.G., Kapatral V., Redkar R.J., Patra G., Mujer C., Los T., Ivanova N., Anderson I., Bhattacharyya A., Lykidis A., Reznik G., Jablonski L., Larsen N., D'Souza M., Bernal A., Mazur M., Goltsman E., Selkov E., Elzer P.H., Hagijs S., O'Callaghan D., Letesson J.J., Haselkorn R., Kyrpides N., Overbeek R.** (2002.a). The Genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *PNAS* 99: 443-448.

**DelVecchio V.G., Wagner M.A., Eschenbrenner M., Horn T., Kraycer J.A., Estock F, Elzer P., Mujer C.H.** (2002.b). *Brucella* proteomes- a review. *Vet. Microbiol.* 90: 593-603.

**Dornand J., Gross A., Lafont V., Liautard J., Oliaro J., Liautard J-P.** (2002). The innate immune response against *Brucella* in humans. *Vet. Microbiol.* 90: 383-394.

**Edmonds, M. D.,A. Cloeckert, N. J. Booth, S. D. Hagijs, J. V. Walker and P. H. Elzer.** 2001. Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking major 25 kDa outer membrane protein in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 62: 1461-6.

**Edmonds, M. D.,A. Cloeckert, N. J. Booth, P. H. Elzer.** 2002. *Brucella* species lacking major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*. *Vet. Microbiol.* 88: 205-221.

**Elberg S.S.** (1986). A guide to the diagnosis, treatment and prevention of human brucellosis, WHO document. World Health Organization. Geneva

**Elzer PH, Hagijs SD, Davis VG, DelVecchio VG, Enright FM.** (2002). Characterization of the caprine model for ruminant brucellosis. *Vet Microbiol* 90: 425-431.

**Elzer, P. H., R. H. Jacobson, S. M. Jones, K. H. Nielsen, J. T. Douglas, A. J. Winter.** 1994. Antibody-mediated protection against *Brucella abortus* in BALB/c mice at successive periods after vaccination: variation between virulent strain 2308 and attenuated vaccine strain 19. *Immunology* 82: 651-658.

**Elzer, P. H., R. W. Philips, G. T. Robertson, R. M. Roop II.** 1996. The HtrA stress response protease contributes to resistance of *Brucella abortus* to killing by murine phagocytes. *Infect and Immun* 64: 4838-4841.

**Essenberg, R., R. Seshadri, K. Nelson, I. Paulsen.** 2002. Sugar metabolism by *Brucellae*. *Vet. Microbiol.* 90: 249-261.

**Evans, A. C.** (1949). Comments on the early history of human brucellosis. *En Brucellosis, a symposium.* AAAS, Waverly Press, Inc. Baltimore, Maryland. pp.:1-8.

**Fernandez-Prada CM, Nikolich M, Vemulapalli R, Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig GG, Hadfield TL, Hoover DL.** (2001). Deletion of *wboA* enhances activation of the lectin pathway of complement in *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Infect Immun* 69: 4407-16.

**Franco, A.J., Maurel, D., Cotella, A., Urrusuno, J. L.** (1999). Estadística sobre brucelosis humana en la República Argentina. *Rev Arg de Microbiol.* 31: 52-55.

**Gracia- Carrillo C.** (1980). Comparison of *B. melitensis* Rev.1 and *B. abortus* strain 19 as a vaccine against brucellosis in cattle. *Zbl Vet Med* 27: 131- 138.

**García-Carrillo C.** (1990). Laboratory animal models for brucellosis studies, pp. 423-442. *En: Animal Brucellosis.* K. Nielsen y J.R. Duncan, ed. CRC Press.

**Golding B, Scott DE, Scharf O, Huang LY, Zaitseva M, Lapham C, Eller N, Golding H.** (2001). Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect.* 3: 43-8.

**Gonzalez Carreró MI, Sangari FJ, Aguero J, Garcia Lobo JM.** (2002). *Brucella abortus* strain 2308 produces brucebactin, a highly efficient catecholic siderophore. *Microbiology.* 148: 353-60.

**Gorvel, J.P., E. Moreno.** (2002) *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet. Microbiol.* 90: 281-297.

**Groisman E.A.** (1994). How bacteria resist killing by host-defense peptides. *Trends Microbiol.* 2: 444-9.

**Guzmán-Verri ,C., L. Man-Landa, A. Parra, A. Cloeckaert, J. garin, J. P. Gorvel, I. Moriyon, E. Moreno, I. Lopez-Goñi.** (2002). The two component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the *Rhizobiaceae*. *PNAS* 99: 12375-12380.

**Halling S.M., Detilleux P.G., Tatum F.M., Judge B.A y J.E. Mayfield.** (1991). Deletion of the BCSP31 gene of *Brucella abortus* by replacement. *Infect. Immun.* 59(11): 3863-3868.

**Halling, S. M.** (1998). On the presence and organization of open reading frames of the nonmotile pathogen *Brucella abortus* similar to class II, III, and IV flagellar genes and to LcrD virulence superfamily. *Microb Comp Genomics*3: 21-9.

**Herrero M., de Lorenzo V., Timmis K.N.** (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol.* 172: 6557-67.

**Hoover, D. L., R. M. Crawford, L. L. Van der Verg, M. J. Izadjoo, A. K. Bhattacharjee, C. M. Paronavitana, R. L. Warren, M. P. Nikolich and T. L. Hadfield.** (1999). Protection of mice against Brucellosis by vaccination with *Brucella melitensis* WR201 (16M  $\Delta$ purEK). *Infect. Immun.* 67:5877-5884.

**Jahans, K. L., Foster, G. y E. S. Broughton.** (1997). The characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Vet Microbiol* 16:373-382.

**Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, Ramuz M, Allardet-Servent A.** (1998). Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the Proteobacteria. *J Bacteriol.* 180: 2749-55.

**Kim, J., Z. Sha., JE Mayfield.** (2000). Regulation of *Brucella abortus* catalase. *Infect Immun.* 68: 3861-6.

**Ko J., Gendron-Fitzpatrick A., Ficht T.A., Splitter G.A.** (2002). Virulence criteria for *Brucella abortus* strains as determined by interferon regulatory factor 1-deficient mice. *Infect Immun.* 70: 7004-12.

**Ko, J., G. Splitter.** (2003). Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 65- 78.

**Köhler S, Foulongne V, Ouahrani-Bettache S, Bourg G, Teyssier J, Ramuz M, Liautard JP.** (2002). The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc Natl Acad Sci.* 99: 15711-6.

**Kohler S, Michaux-Charachon S, Porte F, Ramuz M, Liautard JP.** (2003). What is the nature of the replicative niche of a stealthy bug named *Brucella*? *Trends Microbiol.* 11: 215-9.

**Kovach, M. E., R. W. Philips, P. H. Elzer, R. M. Roop II and K. M. Peterson.** (1994). PBRR1MCS: a broad host range cloning vector. *BioTechniques* 16: 800-802.

**Kovach M.E., Elzer P.H., Robertson G.T., Chirhart-Gilleland R.L., Christensen M.A., Peterson K.M., Roop R.M. 2nd.** (1997). Cloning and nucleotide sequence analysis of a *Brucella abortus* gene encoding an 18 kDa immunoreactive protein. *Microb Pathog.* 22: 241-6.

**Kurar E., Splitter G.** (1997). Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicits immune response. *Vaccine* 15: 1851-7.

**Latimer E., Simmers J., Srirangatan N., Roop M., Schurig G.G., Boyle S.M.** (1992). *Brucella abortus* deficient in copper/zinc superoxide dismutase is virulent in BALB/c mice. *Microb. Path.* 7: 367-370.

**Leclercq S., Harms J.S., Oliveira S.C.** (2003) Enhanced efficacy of DNA vaccines against an intracellular bacterial pathogen by genetic adjuvants. *Curr Pharm Biotechnol.* 4: 99-107

**Lestrade P., Delrue R.M., Danese I., Didembourg C., Taminiau B., Mertens P., De Bolle X., Tibor A., Tang C.M., Letesson J.J.** (2000). Identification and characterization of in vivo attenuated mutants of *Brucella melitensis*. *Mol Microbiol* 38: 543-51.

**Letesson J.J., Tibor A., Van Eynde G., Wansard V., Weynants V., Denoel P., Saman E.** (1997) Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* 4: 556-64.

**Letesson J.J., Lestrade P., Delrue RM, Danese I, Bellefontaine F, Fretin D, Taminiau B, Tibor A, Dricot A, Deschamps C, Haine V, Leonard S, Laurent T, Mertens P, Vandenhoute J, De Bolle X.** (2002). Fun stories about *Brucella*: the "furtive nasty bug". *Vet. Microbiol.* 90: 317-28.

**Le Vier, K., Philips R.W., Gripe V.K., Roop II R.M., Walker G.C.** (2000). Similar requirements of a plant symbiont and a mammalian pathogen for prolonged intracellular survival. *Science* 287:2492-3.

**Linder L.E., Hadfield T.L., Tall B.D., Snellings N.J., Rubin F.A., Van De Verg L.L., Hoover D., Warren R.L.** (1996). Cloning of a *Brucella melitensis* group 3 antigen gene encoding Omp28, a protein recognized by the humoral immune response during human brucellosis. *Infect. Immun.* 64: 2490-2499.

**Marin C.M., Moreno E., Moriyon I., Diaz R., Blasco J.M.** (1999). Performance of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays, gel immunoprecipitation with native hapten polysaccharide, and standard serological tests in diagnosis of sheep brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 6: 269-72.

**Martinez de Tejada G., Moriyon I.** (1993). The outer membranes of *Brucella* spp. are not barriers to hydrophobic permeants. *J Bacteriol.* 175: 5273-5.

**Martinez de Tejada G, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Moriyon I.** (1995). The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect Immun.* 63: 3054-61.

- McQuiston J.R., Schurig G.G., Siranganathan N., Boyle S.M.** (1995). Transformation of *Brucella* species with suicide and broad host range plasmids. *En Methods in Molecular Biology*. Vol 47: Electroporations protocols for microorganisms. Ed. J. A. Nickoloff. Humana Press Inc. pp: 143-148.
- Metcalf H.E., Luchsinger D.W., Ray W.C.** (1994). Brucellosis, *en Handbook of zoonoses: bacterial, rickettsial, chlamydial and mycotic*. G.W. Beram and J. H. Steele (ed). 2<sup>nd</sup> ed. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. pp. 9-39.
- Michaux-Charachon S., Bourg G., Jumas-Bilak E., Guigue-Talet P., Allardet-Servent A., O'Callaghan D., Ramuz M.** (1997). Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *J. Bacteriol.* 179: 3244-3249.
- Michaux-Charachon S., Jumas-Bilak E., Allardet-Servent A., Bourg G., Boschioli M., Ramuz M., O'Callaghan D.** (2002). The *Brucella* genome at the beginning of the post genomic era. *Vet. Microbiol.* 90: 581-585.
- Miyamoto A., Matsuyama S., Tokuda H.** (2002). Dominant negative mutant of a lipoprotein-specific molecular chaperone, LolA, tightly associates with LolCDE. *FEBS Lett.* 528:193-6.
- Moreno E., Stackebrandt E., Dorsch M., Wolters J., Busch M. y H. Ma yer.** (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): 3569-3576.
- Moreno E., Cloeckert A., Moriyon I.** (2002). *Brucella* evolution and Taxonomy. *Veterinary Microbiology* 90: 209-227.
- Moriyón I., Lopez- Goñi I.** (1998). Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *Internatl Microbiol* 1: 19-26.
- Murphy E.A., Parent M., Sathiyaseelan J., Jiang X., Baldwin C.L.** (2001). Immune control of *Brucella abortus* 2308 infections in BALB/c mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 32: 85-8.
- Muzny D.M., Ficht T.A, Templeton J., Adams L.G.** (1989). DNA homology of *Brucella abortus* strains 19 and 32308. *Am.J.Vet.Res.*50:655-661.
- Nicola A., Alonso B., Bagnat E., Manetti J.C., Bernardelli, A., Mussini, J.C.** (1999). Manual de procedimientos para el diagnóstico de brucelosis. SENASA- DILAB.
- Nicoletti P.** (1990). Vaccination against *Brucella*. *Adv Biotechnol Processes* 13: 147-68.
- Nikaido H., Vaara M.** (1987) Outer Membrane. *En: Escherichia coli and Salmonella typhimurium-Cellular and Molecular Biology*. American Society for Microbiology, Washington D.C. pp: 7-22.

**Nimri L.F.** (2003). Diagnosis of recent and relapsed cases of human brucellosis by PCR assay. *BMC infectious diseases* 3:5. <http://www.biomedcentral.com>

**O'Callaghan D., Cazeville C., Allardet-Servent A., Boschioli M.L., Bourg G., Foulongne V., Frutos P., Kulakov Y., Ramuz M.** (1999). A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol Microbiol* 33: 1210-20.

**Oliveira S., Splitter G.** (1996). Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. *Vaccine*. 14: 959-62.

**Oliveira S., Soeurt N., Splitter G.** (2002). Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet. Microbiol.* 90: 417-24.

**Oñate A.A., Vemulapalli R., Andrews E., Schurig G.G., Boyle S., Folch H.** 1999. Vaccination with live *Escherichia coli* expressing *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent *B. abortus*. *Infect Immun.* 67: 986-8.

**Palomares A.J., DeLuca M.A., Helinski D.R.** (1989). Firefly luciferase as a reporter enzyme for measuring gene expression in vegetative and symbiotic *Rhizobium meliloti* and other gram-negative bacteria. *Gene* 81:55-64.

**Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac LM, Beanan MJ, Daugherty SC, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Nelson WC, Ayodeji B, Kraul M, Shetty J, Malek J, Van Aken SE, Riedmuller S, Tettelin H, Gill SR, White O, Salzberg SL, Hoover DL, Lindler LE, Halling SM, Boyle SM, Fraser CM.** (2002). The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *PNAS* 99: 13148-53.

**Pavelka M.S., Jacobs W.R.** (1999). Comparison of the construction of unmarked deletion mutations in *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin, and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv by allelic exchange. *J Bacteriol.* 181: 4780-9.

**Pellicic V., Reytrat J.M., Gicquel B.** (1996). Generation of unmarked directed mutations in mycobacteria, using sucrose counter-selectable suicide vectors. *Mol. Microbiol.* 20:919-925.

**Phillips R., Roop II R. M.** (2001). *Brucella abortus* HtrA functions as an authentic stress response protease but is not required for wild-type virulence in BALB/c mice. *Infect. Immune.* 69: 5911-5913.

**Pizarro-Cerdá J., Moreno E., Sanguedolce V., Mege J.L., Gorvel J.P.** (1998). Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect. Immun.* 66:2387-2392.



**Porte F., Liautard J. P., Köhler S.** (1999). Early acidification of phagosomes containing *Brucella suis* is essential for intracellular survival in murine macrophages. *Infect. Immun.* 67: 4041-4047.

**Prosser J.I.** (1994) Molecular marker systems for detection of genetically engineered micro-organisms in the environment. *Microbiology.* 140: 5-17.

**Rafie-Kolpin M., Essenberg R.C., Wyckoff III J.H.** (1996). Identification and comparison of macrophage-induced proteins induced proteins and proteins induced under various stress conditions in *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 64(12): 5274-5283.

**Ried J.L., Collmer A.** (1987). An nptI-sacB-sacR cartridge for constructing directed, unmarked mutations in gram-negative bacteria by marker exchange- eviction mutagenesis. *Gene* 57: 239-46.

**Riley L.K., Robertson D.C.** (1984) Ingestion and intracellular survival of *Brucella abortus* in human and bovine polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.* 46: 224-30.

**Robertson G., Roop II R.M.** (1999). The *Brucella abortus* host factor I (HF-I) protein contributes to stress resistance during stationary phase and is a major determinant of virulence in mice. *Mol. Micro.* 34: 690- 700.

**Robertson G., Kovach M.E., Allen C.A., Fitch T.A., Roop II R.M.** (2000 a). The *Brucella abortus* Lon functions as a generalized stress response protease and is required for wild- type virulence in BALB/c mice. *Mol. Micro.* 35: 577- 588.

**Robertson G.T., Reisenauer A., Wright R., Jensen R.B., Jensen A., Shapiro L., Roop R.M.** 2nd. (2000 b). The *Brucella abortus* CcrM DNA methyltransferase is essential for viability, and its overexpression attenuates intracellular replication in murine macrophages. *J Bacteriol.* 182: 3482-9.

**Robles, C.** (2003). Antecedentes de la brucelosis bovina en la Patagonia. Reporte de la Comisión técnica de sanidad animal y análisis de riesgo epidemiológico de la región protegida. INTA Bariloche.

**Roop II R.M., Gee J.M., Robertson G.T., Richardson J.M., Ng W.L., Winkler M.E.** (2003). *Brucella* Stationary Phase Gene Expression and Virulence. *Annu Rev Microbiol.* Epub.

**Rosinha GM, Freitas DA, Miyoshi A, Azevedo V, Campos E, Cravero SL, Rossetti O, Splitter G, Oliveira SC.** (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.* 70:5036-44.

**Rossetti O.L., Rossi S.G., Oszlak P.A., Rosenblit N., Cravero S.L.** (1991). Cloning of *Brucella abortus* genes coding for proteins immunologically active in cows. *En Networking in brucellosis research*. J. F. Frank ed. UNU. pp: 191:204.

**Rossetti O.L., Boschioli M.L., Arese A.I., Cravero S.L.** (1996). Cloning of *Brucella abortus* gene and characterization of expressed 26-kilodalton periplasmic protein: potential use for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 34:165-169.

**Seco-Mediavilla P., Verger J.M., Grayon M., Cloeckert A., Marin C.M., Zygmunt M.S., Fernandez-Lago L., Vizcaino N.** (2003). Epitope mapping of the *Brucella melitensis* BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol.*10: 647-51.

**Samartino L.E., Truax R.E., Enright F.M.** (1994). Invasion and replication of *Brucella abortus* in three trophoblastic cell lines. *J. Vet. Med.* 41: 229-231.

**Samartino LE, Enright FM.** (1996). *Brucella abortus* differs in the multiplication within bovine chorioallantoic membrane explants from early and late gestation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 19: 55-63.

**Samartino, L.E.** (2002). Brucellosis in Argentina. *Vet. Microbiol.* 90: 71- 80.

**Sambrook, J., Fritsch E.F., Maniatis T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

**Sanchez D., Zandomeni R., Cravero S., Verdún R., Pierrou E., Faccio P., Diaz G., Lanzavecchia S., Agüero F., Frasch A., Anderson S., Rossetti O., Grau O., Ugalde R.** (2001). Gene discovery through genomic sequencing of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 69: 865-868.

**Sangari F.J., García Lobo J.M., Blasco J.M., Agüero J.** (1994). The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiol. Letters* 121: 337-342.

**Sangari, F. J., M. J. Grilló, M. P. Jiménez de Bagüés, M. I. González- Carreró, J. M. García Lobo, J. M. Blasco and J. Agüero.** (1998). The defect in the metabolism of the *Brucella abortus* B19 vaccine strain is unrelated with its attenuated virulence in mice. *Vaccine* 16:1640-1645.

**Sangari F.J., Agüero, J., García Lobo, J.M.** (2000). The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*. *Microbiology* 146: 487- 495.

**Schurig G.G., Roop R.M., Bagchi T., Boyle S., Sriranganathan N.** (1991). Biological properties of RB51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* 28:171-188.

**Schurig G.G., Sriranganathan N., Corbel M.J.** (2002). Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol.* 90: 479-96.

- Scott, P.** (1993). IL12: initiation cytoquine for cell-mediated immunity. *Science* 260: 496-497.
- Seder, R., Hill A.** (2000). Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature* 406: 793-798.
- Sexton, J.A., Vogel J.P.** (2002) Type IVB secretion by intracellular pathogens. *Traffic* 3: 178-85.
- Sieira R., Comerci D.J., Sanchez D.O., Ugalde R.A.** (2000). A homologue of an operon required for DNA transfer in *Agrobacterium* is required in *Brucella abortus* for virulence and intracellular multiplication. *J Bacteriol.* 182: 4849-55.
- SENASA.** (2000). Plan Nacional de control y erradicación de la brucelosis y tuberculosis bovina. SAGyP.
- Smith, L.D., Ficht T.A.** (1990). Pathogenesis of *Brucella*. *Critical Reviews in Microbiology.* 17(3): 209-230.
- Sola-Landa A., Pizarro-Cerda J., Grillo M.J., Moreno E., Moriyon I., Blasco J.M., Gorvel J.P., Lopez-Goni I.** (1998). A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol.* 29: 125-38.
- Sperry J.F., Robertson D.C.** (1975). Erythritol catabolism by *Brucella abortus*. *J Bacteriol* 121(2): 619-630.
- Sutherland S.S., Searson J.** (1990). The immune response to *Brucella abortus*: the humoral response, pp. 65-82. *En: Animal Brucellosis.* K. Nielsen y J.R. Duncan, ed. CRC Press.
- Tabatabai L.M., Deyoe, B.L.** (1984). Specific enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine antibody to *Brucella abortus*. *J Clin Microbiol* 20: 209-213.
- Taminiau B., Daykin M., Swift S., Boschioli M.L., Tibor A., Lestrade P., De Bolle X., O'Callaghan D., Williams P., Letesson J.J.** (2002). Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.* 70: 3004-11.
- Tibor A., Saman E., de Wergifosse P., Cloeckert A., Limet J.N., Letteson J.J.** (1996). Molecular characterization, occurrence, and immunogenicity in infected sheep and cattle of two minor outer membrane proteins of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 64:100-107.
- Tibor, A. I. Jaques, L. Guilloteau, JM. Verger, M. Grayon, V. Wansard and J. J. Letteson.** (1998). Effect of P39 gene deletion in live *Brucella* vaccine strains on residual virulence and protective activity in mice. *Infect. Immun.* 66:5561-5564.

**Tibor A., Decelle B., Letteson J. J.** (1999). Outer membrane proteins Omp10, Omp16 and Omp19 of *Brucella* spp. are lipoproteins. *Infect. Immun.* 67:4960-4962.

**Tibor A., Wansard V., Bielartz V., Delrue R.M., Danese I., Michel P., Walravens K., Godfroid J., Letesson J.J.** (2002). Effect of *omp10* or *omp19* deletion on *Brucella abortus* outer membrane properties and virulence in mice. *Infect Immun.* Oct;70(10):5540-6.

**Ugalde J.E., Czibener C., Feldman M.F., Ugalde R.A.** (2000) Identification and characterization of the *Brucella abortus* phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. *Infect Immun.* 68: 5716-23.

**Velikovskiy C.A., Cassataro J., Giambartolomei G.H., Goldbaum F.A., Estein S., Bowden R.A., Bruno L., Fossati C.A., Spitz M.** (2002). A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun.*70: 2507-11.

**Vemulapalli R., Cravero S., Calvert C.L., Toth T.E., Sriranganathan N., Boyle S.M. Rossetti O.L. and Schurig G.G.** (2000). Characterization of specific immune responses of mice inoculated with recombinant vaccinia virus expressing an 18-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7:114-118.

**Verger J.M., Grimont F., Grimont P.A., Grayon M.** (1985). *Brucella*: a monoespecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int J Syst Bacteriol* 35: 292-295.

**Vizcaino N., Cloeckeaert A., Dubray G., Zygmunt M.S.** (1996). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene coding for a ribosome releasing factor-homologous protein of *Brucella melitensis*. *Infect Immun.* 64: 4834-7.

**Vizcaino N., Verger J. M., Grayon M., Zygmunt M. S., Cloeckeaert A.** (1997). DNA polymorphism at the omp-31 locus of *Brucella* ssp.: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species specific markers. *Microbiology* 143:2913-2921.

**Vizcaino N., Cloeckeaert A., Zygmunt M.S., Fernández Lago L.** (2001). Characterization of a *Brucella* species 25 kb DNA fragment deleted from *Brucella abortus* reveals a large cluster related to the synthesis of a polysaccharide. *Infect Immun* 69: 6738-6748.

**Young E.J.** (1995). An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis.* 21: 283-9

**Wood K.V., De Luca M.** (1987). Photographic detection of luminescence in *Escherichia coli* containing the gene for firefly luciferase. *Analytical Biochemistry* 161:501-507.

**World Health Organization (WHO).** (1997). Report of the WHO Working Group meeting on Brucellosis control and research: The development of new/improved Brucellosis vaccines. <http://www.who.int/emc>.

**Wu S.S., Kaiser D.** (1996). Markerless deletions of *pil* genes in *Myxococcus xanthus* generated by counterselection with the *Bacillus subtilis sacB* gene. *J. Bacteriol.* 178: 5817-5821.

**Wykoff III J.** (2002). Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* 90: 395-415.

**Zygmunt M.S., Baucheron S., Vizcaino N., Bowden R.A., Cloeckert A.** (2002). Single-step purification and evaluation of recombinant BP26 protein for serological diagnosis of *Brucella ovis* infection in rams. *Vet Microbiol.* 87: 213-20.