



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

TESIS DOCTORAL

Desarrollo de nuevas vacunas frente a *Brucella ovis*: Estudio de genes implicados en la síntesis del núcleo del lipopolisacárido

Pedro Francisco Soler Lloréns

Pamplona, Julio 2014



Universidad de Navarra
Facultad de Ciencias

Desarrollo de nuevas vacunas frente a *Brucella ovis*: Estudio de genes implicados en la síntesis del núcleo del lipopolisacárido

Memoria presentada por D. Pedro Francisco Soler Lloréns para aspirar al
Grado de Doctor por la Universidad de Navarra

El presente trabajo ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Navarra, y autorizamos su presentación ante el tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, Julio de 2014

Dr. Ignacio López-Goñi

Dra. María Jesús Grilló Dolset

*Puede que no haya ido a donde quería ir,
pero creo que he terminado donde tenía que estar.*

Douglas Addams

Tras más de cuatro años en el departamento, de placas, geles, experimentos, carreras por los pasillos... esta memoria y la presentación que ha de venir suponen el final de un párrafo al que he de poner un punto y aparte. Para ser más exactos, esta etapa no la he escrito solo yo, es más bien un Pedro *et al.*, plagada de gente que durante este tiempo ha aportado en mayor o menor medida su granito científico, intelectual, psicológico o emocional para que este proyecto saliera adelante. Como dice un proverbio hebreo: “El que da, no debe volver a acordarse; pero el que recibe nunca debe olvidar”. Por ello no puedo hacer otra cosa que dar las gracias a todos.

Agradecer en primer lugar a mis directores de tesis, **Nacho López-Goñi** y a **María Jesús Grilló**. Ambos ejemplo de trabajo duro y capacidad para trabajar varios frentes a la vez. Nacho, gracias por tu dedicación y tu paciencia todos estos años. Gracias por difundir entusiasmo por la microbiología a la sociedad y contagiar a los demás (yo entre ellos) esa afición. MJ, gracias por tu ayuda y por tu plena disposición para lo que hiciera falta.

A **Nacho Moriyón** y **Maite Iriarte**, ayuda indispensable en estos últimos cuatro años de tesis. Durante este tiempo he recibido buenos consejos de vosotros, tanto en las reuniones del grupo *Brucella*, como fuera de ellas. Porque vuestros despachos siempre estuvieron abiertos a cualquier duda. No os preocupéis, que no me iré sin antes dejar todas las cepas, oligos y plásmidos bien ordenadas, y con ficha. A **Carlos Gamazo**, opinión siempre a tener en cuenta. Gracias por esos momentos de crítica constructiva, por las lecturas recomendadas y... por las collejas. A **Guillermo**, por el interés mostrado en estos últimos años.

A los profesores que estuvieron. Al **Doctor Díaz**, el tronco del que salen todas las ramas. Un tronco que a día de hoy sigue echando ramas. Por las conversaciones de los últimos años, ya fueran de *Brucella*, Francia o fútbol, entre otros. A **Isabel García Jalón**, que espero que esté disfrutando de su jubilación tras tantos años de trabajo.

A **Raquel Conde** y **David González**, las nuevas incorporaciones en el claustro microbiológico. David, que ya en la carrera conseguiste que mucha gente nos interesáramos por lo microscópico. Raquel, gracias por el tiempo brindado estos últimos años. Por interesarte por lo que estaba realizando y ofrecerme tu punto de

vista de muchos aspectos del trabajo. Por sacar tiempo para mí, sobre todo en esta nueva etapa en la que se te agregaron una pila de nuevas responsabilidades.

A **María Orbe**, secretaria y pieza indispensable del departamento. Gracias por hacer que todo funcione, por hacer de nexo departamental, no solo administrativo, sino en las continuas propuestas de excursiones, visitas y comidas.

Hablar de que todo funcione en el departamento es hablar también de **Begoña, Alberto y Rosario**. Gracias a los tres. Begoña, “gracias chiquitina”, por tu labor indispensable coordinando prácticas, llevando el laboratorio, ayudándonos y ayudándome siempre que te ha sido posible. Rosario, thanks for the work you do in the lab. Because you are an example that things can be achieved with effort. A Alberto, ejemplo de organización y trabajo constante que le llevan a conseguir lo que se proponga, ya sea licenciarse u otras cumbres más altas.

Toca ahora agradecer a las nuevas generaciones de doctores que he visto “nacer” en los últimos años. A **Vicky**, porque fue a la primera persona a la que vi en su etapa final de tesis y defensa. A **Cris Viadas**, por ayudarme en mis inicios con el master. **Ibai**, por su pasión por la investigación, y por los consejos a lo largo de estos años. Por mostrarme que cambiar radicalmente de tema de investigación también es una buena opción. A **Susana Sánchez**, maña de adopción. Por esos años extra que te pudiste quedar en el departamento, por el entusiasmo hacia la docencia y la investigación que pude ver en ti. A **Juli**, porque compartimos los inicios en el departamento, cursos de doctorado/máster. Por los ratos pasados en el laboratorio. A **losu**, otro de los doctores eméritos. Gracias por tu amistad y por tantos momentos compartidos en el laboratorio, con temporadas hablando en inglés, bajando a la biblioteca o ayudándonos para sacar los experimentos del otro adelante.

A **Ana**, de la que también he recibido buenos consejos. Gracias por tu ayuda, por tu disposición hacia la vida del departamento ya sea organizar batidas de congeladores o seminarios entre nosotros. Porque, aunque nos cueste movernos, no caían en saco roto.

A las chicas *Brucella*: **Yoli, Leyre y Amaia**. Gracias a las tres por vuestra paciencia conmigo en los inicios. Porque las tres hacíais el trabajo en el P3 más ameno.

A Leyre, recuerdo especialmente los momentos preparando las prácticas de virología. A Yoli, porque abrió el frente de *Brucella ovis* con el que yo continué. Por la alegría que transmites. A Amaia, amiga, compañera y “Pepito Grillo” a tiempo parcial. Por el apoyo durante estos años, por escucharme, animarme y aconsejarme. Porque fue una alegría inmensa saber que continuarías aquí después de la tesis.

A la generación 2.0 de chicas *Brucella*: **Estrella, Miriam y Leticia**. Estrella, ¡ole! ¡ole! y ¡ole! Gracias por tu alegría, tu energía, tu espíritu y léxico *granaíno*. Porque trabajar a tu lado es muy ameno. A Miriam, compañera también en estos últimos años. Porque al núcleo del LPS aún se le puede sacar más punta, ya verás como sí. A Leticia, que justo está empezando cuando yo termino. Espero que tu experiencia aquí sea tan buena o mejor que la mía.

A **Marijo y José**, las últimas adquisiciones en el “Equipo Gamazo”. Al igual que con Leticia, es una pena haber coincidido solamente en la etapa final. Al menos pudimos coincidir en mis últimos experimentos.

A los actuales “chicos Guillermo”. A **Raquel Ferrer**, mi compañera de cursos, prácticas y actividades. Por la euforia que nos provocó el *Proficiency*. Por tantas charlas y proyectos en los que nos embarcamos. A **Sergio**, que le he visto crecer desde asesorado-alumno interno hasta el doctorando que es hoy. Por los momentos compartidos en los descansos, con su Colacao “Sigma”.

A **Celia y Andrés**, parte del nuevo equipo *Leishmania* del Instituto de Salud Tropical, que espero que poco a poco vaya a más. A Celia, compañera de escritorio del último año y pico, que me ha sufrido en mi etapa final. Por traer aires de fuera que permiten ver las cosas desde otro enfoque, y por los cafés con compañía. A Andrés, por su perseverancia y dedicación a la investigación, por su simpatía y su sentido del humor.

A **Naiara**, porque el inicio en el laboratorio no habría sido lo mismo sin ti. Por la alegría y el buen humor con el que afrontas la vida, con el que consigues contagiar a los demás. A **Maria Inacia**, por todo lo que me aportó en mis comienzos. Por la fuerza y alegría transmite. A **Marcos Mancilla**, por todo lo que pude aprender los años que

estuviste en el departamento. A **Carlos Chacón**, por infundir su espíritu “pura vida” en aquellos momentos en los que no me salía nada.

A los miembros de otros departamentos e instituciones. Al equipo del IDAB, **Bea San Roman** y **Ana Zabalza**, por toda la ayuda recibida *in vivo*. Al **equipo del CITA**, por permitirme hacer una breve estancia caracterizando cepas y también por su ayuda *in vivo*. Al departamento de Microbiología de la Universidad de Salamanca, en concreto a **Nieves Vizcaíno**, por sus visitas en las reuniones de proyecto, en las que me permitía ver que hay más gente que investiga con *Brucella ovis*. Gracias también por la ayuda con el mutante *wadA*. Je veux remercier aussie **Axel Cloeckert**, **Michel Zygmunt**, **Nelly Bernardet** et tout l’équipe de l’ISP 233, du centre INRA à Tours. J’ai passé très bons temps dans votre laboratoire. Je suis ouvert à la possibilite de retourner la une troisieme fois. A **Juan Manuel Irache**, del departamento de Galénica, por dejarme hacer las medidas del potencial Z en su laboratorio.

A las “Vecinas de abajo” del departamento de Bioquímica: **Marina**, **Maidier**, **María** y **Antonia**. Porque siempre están ahí para lo que haga falta, café, hielo, reactivos... A **Eduarne**, por las “visitas” al departamento durante tu tesis, trabajando codo con codo en el P3. Por estar ahí dispuesta a escuchar.

A los miembros del grupo de teatro **Mutis por el Foro**: Santi, Naiara, María, los Danis, y tantos otros. Supieron entender que los ensayos empezaban cuando acababan los experimentos y a pesar de eso siempre me guardaron un papel y contaron conmigo.

A mi grupo de amigos de la carrera que podríamos denominar **“Re:Existe”**: Hugo, Isa, Santos, Teresa, Imanol y Peibol. Gracias por haber estado ahí desde el comienzo de la tesis día a día en nuestra cadena de mails, que a día de hoy suma 8.904 emails. Se dice pronto...

A **Peibol**, compañerísimo de piso, psiquiatra personal. Por la de “parientes” a los que visitar que nos han salido en los últimos años. A **María García de Andoín**, por aparecer en los momentos clave con una sonrisa, unas patatas y una cervecita. A **Íñigo**, compañero del último año y eje a ratos de los días sociales. A mis amigos del **día social**, cita indispensable con una periodicidad variable.

A mis científicos ambientales. A **Javi y Ana**, amigos a los que he podido ver evolucionar desde que entré en la carrera, aunque en los últimos años más desde la distancia. Gracias por los consejos y ayuda desde otro punto de vista. A **Noe**, compañera también en la aventura doctoral. Por las largas conversaciones en las que se mezclaban los bancos de diásporas de briófitos de hayedos con *Brucella* y sus aventuras.

A mi familia, los cimientos de todo esto. Gracias por vuestro apoyo incondicional. A los presidentes de la Fundación Papá y Mamá, Joaquín y Rosa Mari, por estar siempre ahí. A Rosa Mari, Pedro Torres, Pedrito y María. Porque a veces el camino más corto de Logroño $\leftarrow \rightarrow$ Zaragoza era, misteriosamente, pasando por Pamplona. Por lo sufrido y disfrutado estos últimos cuatro años. A Susana, Julián, Pablo, Martín y Norma Jr., porque ahora son una parada casi obligatoria en el camino a casa. A Norma “senior”, un ejemplo de perseverancia y profesionalidad, a la que le debo una visita por Mallorca (acabo la tesis y voy, no te preocupes). A Joaco, porque ni yo le entendía las explicaciones electrónicas ni él me entendía las biológicas, pero los dos nos escuchábamos. A Jon, apoyo fundamental e indispensable en estos últimos cuatro años y medio. Decir gracias se queda corto. A mis primos y tíos, que también me han acompañado estos últimos años.

Y no puedo cerrar estos agradecimientos sin mencionar a la **Universidad de Navarra**, mi casa de estos últimos diez años. Al Ministerio de Ciencia e Innovación, actualmente dentro del **Ministerio de Economía y Competitividad**, por haberme permitido disfrutar tanto de la Beca FPI como de la estancia breve en Francia, que me ha permitido escribir el libro aquí presente.

Índice	I
Índice de figuras	IV
Índice de tablas	VI
Abreviaturas	VII
RESUMEN	1
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	9
1.- <i>Bucella ovis</i> y la brucelosis	11
2.- Características del genoma de <i>B. ovis</i>	13
3.- La membrana externa de <i>Brucella</i>	15
3.1.- Lipopolisacárido (LPS)	15
Lípido A	17
Núcleo del LPS	18
Cadena O	20
3.2.- Fosfolípidos	23
3.3.- Las proteínas de membrana externa (OMPs)	23
4.- Propiedades de la membrana externa y su relación con la virulencia de <i>Brucella</i>	26
5.- Prevención frente a <i>B. ovis</i>	29
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
MATERIAL Y MÉTODOS	35
1.- Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	37
2.- Manipulaciones de DNA	37
3.- Vectores empleados	37
3.1 pCR™2.1	37
3.2 pJQK	39
4.- Análisis <i>in silico</i> de distintas cepas de <i>B. ovis</i>	40
5.- Construcción de mutantes en fase mediante PCR de extensión solapada	41
6.- Sensibilidad a fagos y colorantes	44
7.- Extracción del LPS	45
8.- Extracto de células muertas enteras	46
9.- Tricina SDS-PAGE y tinción de plata	46
10.- <i>Western-blot</i>	47

11.- ELISA indirecto	48
12.- Ensayo de autoaglutinación	49
13.- Sensibilidad a la polimixina B	50
14.- Sensibilidad a la acción bactericida del suero no inmune de carnero	50
15.- Potencial Zeta	51
16.- Experimentos de atenuación y de protección en ratones	51
RESULTADOS	55
I. EVALUACIÓN <i>IN SILICO</i> DE ORTÓLOGOS A GENES IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS DEL LPS DE <i>Brucella</i>	57
1. Comparación de genes implicados en la síntesis del LPS en distintas especies del género <i>Brucella</i>	57
2. Secuenciación de los genes relacionados con la síntesis del núcleo del LPS en aislamientos diferentes de <i>B. ovis</i> y comparación con las secuencia publicadas de <i>B. ovis</i>	64
II. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ELISA, SDS-PAGE y WESTERN BLOT DE MUTANTES EN EL LPS DE <i>Brucella</i>	67
1. ELISAS con células enteras	67
Síntesis del lípido A (<i>lpxE1</i> , <i>lpxE2</i> y <i>lptA</i>)	67
Glicosiltransferasas del núcleo (<i>BAB1_1620</i> , <i>wadA</i> , <i>wadB</i> y <i>wadC</i>)	70
Precusores de azúcares del LPS (<i>pgm</i> , <i>manB_{O-Ag}</i> y <i>manB_{core}</i>)	76
2. SDS-PAGE y <i>Western-blot</i>	79
III. COMPARACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LA ENVOLTURA CELULAR ENTRE LAS CEPAS REO Y PA DE <i>B. ovis</i>	81
IV. CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS MUTANTES EN GLICOSILTRANSFERASAS DEL NÚCLEO DEL LPS DE <i>B. ovis</i>	86
1. Caracterización fenotípica clásica	86
2. Propiedades físico-químicas y biológicas	86
3. Caracterización topológica de la superficie celular mediante ELISA	90
4. Análisis del LPS mediante SDS-PAGE con Tricina y <i>Western-blot</i>	92
5. Experimentos in vivo en el modelo murino	92
a) Ensayos de virulencia	92

b) Ensayos de protección frente a una infección por <i>B. ovis</i> PA	94
6. Reconocimiento de los mutantes por sueros de animales infectados	95
V. CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN DEL MUTANTE EN LA FOSFOMANOMUTASA <i>manB</i>_{O-Ag} DE <i>B. ovis</i>	97
1. Caracterización fenotípica clásica y propiedades físico-químicas y biológicas	97
2. Caracterización topológica de la envoltura celular mediante ELISA	99
3. Análisis del LPS mediante SDS-PAGE con tricina y <i>Western-blot</i>	101
DISCUSIÓN	103
1. Los genes implicados en la síntesis del LPS en <i>Brucella</i> : análisis comparativo <i>in silico</i>	105
2. Caracterización topológica de la superficie celular de mutantes en el LPS de <i>Brucella</i>	108
3. Comparación entre las cepas salvajes PA y REO de <i>B. ovis</i>	111
4. Los mutantes <i>wadA</i> , <i>wadB</i> , <i>wadC</i> y su implicación en la síntesis del núcleo del LPS de <i>B. ovis</i>	113
5. El caso de las fosfomanomutasas <i>manB</i> _{core} y <i>manB</i> _{O-Ag}	117
CONCLUSIONES	121
CONCLUSSIONS	125
BIBLIOGRAFÍA	129
ANEXO I	145
ANEXO II	
ANEXO III	

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la membrana externa de <i>B. melitensis</i> propuesta por Freer <i>et al.</i>	15
Figura 2. Representación esquemática de la estructura del LPS-S de <i>Brucella</i> propuesta por Klubber y Vinogradov	16
Figura 3. Modelo de síntesis de la cadena O y el núcleo del LPS de <i>Brucella</i>	22
Figura 4. Homologías de los distintos genes en las distintas especies de <i>Brucella</i> estudiadas.....	60
Figura 5. Comparación del gen <i>manB_{O-Ag}</i> en las distintas especies de <i>Brucella</i>	62
Figura 6. Topología de la superficie celular de los mutantes en los genes <i>lpxE</i> de <i>B. abortus</i> con MoAbs frente a distintos epítomos de OMPs (Anti-Omp), Cadena O (Anti-O) o LPS-R (Anti-R) ...	68
Figura 7. Topología de la superficie celular del mutante en el gen <i>lptA</i> de <i>B. melitensis</i> con MoAbs frente a distintos epítomos de OMPs (Anti-Omp), Cadena O (Anti-O) o LPS-R (Anti-R)	69
Figura 8. Topología de la superficie celular del mutante en el gen BAB1_1620 de <i>B. abortus</i> con MoAbs frente a distintos epítomos de OMPs (Anti-Omp), Cadena O (Anti-O) o LPS-R (Anti-R) ...	71
Figura 9. Topología de la superficie celular de los mutantes en el gen <i>wadA</i> de <i>B. suis</i> (A), <i>B. abortus</i> (B) y <i>B. melitensis</i> (C) con MoAbs frente a distintos epítomos de OMPs (Anti-Omp), Cadena O (Anti-O) o LPS-R (Anti-R)	73
Figura 10. Topología de la superficie celular de los mutantes en los genes <i>wadB</i> , <i>wadC</i> y doble mutante de <i>B. suis</i> (A), <i>B. abortus</i> (B) y <i>B. melitensis</i> (C) con MoAbs frente a distintos epítomos de OMPs (Anti-Omp), Cadena O (Anti-O) o LPS-R (Anti-R)	74
Figura 11. Topología de la superficie celular de los mutantes en los genes <i>per</i> , <i>wadC</i> y doble mutante de <i>B. abortus</i> (A) y <i>B. melitensis</i> (B) con MoAbs frente a distintos epítomos de OMPs (Anti-Omp), Cadena O (Anti-O) o LPS-R (Anti-R)	75
Figura 12. Topología de la superficie celular del mutante en el gen <i>pgm</i> de <i>B. melitensis</i> con MoAbs frente a distintos epítomos de OMPs (Anti-Omp), Cadena O (Anti-O) o LPS-R (Anti-R) ...	77
Figura 13. Topología de la superficie celular de los mutantes en los genes <i>manB_{O-Ag}</i> de <i>B. melitensis</i> (A) y <i>manB_{core}</i> de <i>B. abortus</i> (B) y <i>B. melitensis</i> (C) con MoAbs frente a distintos epítomos de OMPs (Anti-Omp), Cadena O (Anti-O) o LPS-R (Anti-R)	78
Figura 14. SDS-PAGE y <i>western blot</i> de mutantes en distintos genes del LPS en <i>B. abortus</i> (A), <i>B. melitensis</i> (B) y <i>B. suis</i> (C)	80
Figura 15. Ensayo de autoaglutinación de <i>B. ovis</i> PA y <i>B. ovis</i> REO	81
Figura 16. Potencial Z (mV) de la superficie bacteriana de <i>B. ovis</i> PA y <i>B. ovis</i> REO	82
Figura 17. Topología de la superficie celular de <i>B. ovis</i> PA y <i>B. ovis</i> REO con MoAbs frente a distintos epítomos del LPS-R (A) o de OMPs (B)	83

Figura 18. SDS-PAGE con Tricina (A) y <i>Western blot</i> (B-F) de los LPS de <i>B. ovis</i> REO (1) y <i>B. ovis</i> PA (2)	84
Figura 19. Topología de la superficie celular de <i>B. ovis</i> PA (en negro) y <i>B. ovis</i> REO (en gris) frente a sueros de carneros libres de <i>Brucella</i> (A) o infectados con <i>B. ovis</i> (B) o con <i>B. melitensis</i> (C) ..	85
Figura 20. Ensayo de autoaglutinación de los mutantes en genes del núcleo del LPS.....	88
Figura 21. Potencial Z (mV) de la superficie bacteriana de los mutantes en genes del núcleo del LPS de <i>B. ovis</i> PA	88
Figura 22. Topología de la superficie celular de distintos mutantes en genes del núcleo del LPS y su parental <i>B. ovis</i> PA con MoAbs frente a distintos epítomos del LPS-R (A) o de OMPs (B)	91
Figura 23. SDS-PAGE con Tricina (A) y <i>Western blot</i> (B-F) de los LPS de la cepa <i>B. ovis</i> PA (1) y sus mutantes en genes del núcleo del LPS <i>Bo</i> Δ <i>wadA</i> (2), <i>Bo</i> Δ <i>wadB</i> (3), <i>Bo</i> Δ <i>wadC</i> (4) y doble <i>Bo</i> Δ <i>wadB</i> Δ <i>wadC</i> (5)	93
Figura 24. Topología de la superficie celular de los mutantes en el núcleo del LPS de <i>B. ovis</i> frente a sueros de carneros libres de <i>Brucella</i> (A) o infectados con <i>B. ovis</i> (B) o con <i>B. melitensis</i> (C)	96
Figura 25. Ensayo de autoaglutinación del mutante <i>Bo</i> Δ <i>manB</i> _{O-Ag} y su cepa parental <i>B. ovis</i> PA	98
Figura 26. Potencial Z (mV) de la superficie bacteriana del mutante <i>Bo</i> Δ <i>manB</i> _{O-Ag} y su cepa parental <i>B. ovis</i> PA	98
Figura 27. Topología de la superficie celular del mutante <i>Bo</i> Δ <i>manB</i> _{O-Ag} y su parental <i>B. ovis</i> PA con MoAbs frente a distintos epítomos del LPS-R (A) o de proteínas de membrana externa (B)	99
Figura 28. Topología de la superficie celular de <i>Bo</i> Δ <i>manB</i> _{O-Ag} (en gris) y su parental <i>B. ovis</i> PA (en negro) frente a sueros de carneros libres de <i>Brucella</i> (A) o infectados con <i>B. ovis</i> (B) o con <i>B. melitensis</i> (C)	100
Figura 29. SDS-PAGE con Tricina (A) y <i>western blot</i> (D-F) de los LPS de la cepa <i>B. ovis</i> PA (1) y su mutante en el gen <i>Bo</i> Δ <i>manB</i> _{O-Ag} (2)	101
Figura 30. Síntesis del LPS de <i>Brucella</i> y papel propuesto de <i>WadA</i>	107
Figura 31. Mecanismo de acción de una fosfo-hexosamutasa	118
Figura S1. Representación esquemática del vector PCR TM 2.1 y detalle de la zona de la caja de clonado	147
Figura S2. Representación esquemática del vector pJQKm	147
Figura S3. Representación esquemática de la mutagénesis por PCR de extensión solapada	148
Figura S4. BOV_0540 (<i>manB</i> _{O-Ag}) y sus regiones anterior y posterior	150

Figura S5. BOV_0614 (<i>wadA</i>) y sus regiones anterior y posterior	152
Figura S6. BOV_0337 (<i>wadB</i>) y sus regiones anterior y posterior	155
Figura S7. BOV_1453 (<i>wadC</i>) y sus regiones anterior y posterior	156

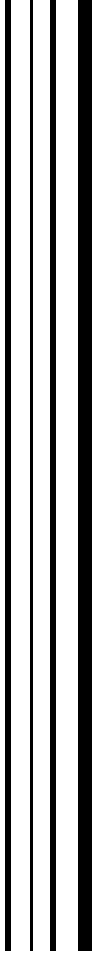
INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas empleadas en este trabajo	38
Tabla 2. Plásmidos empleados en este trabajo	39
Tabla 3. Cepas utilizadas para los estudios genéticos <i>in silico</i> y números de acceso al <i>National Center for Biotechnology Information</i> (NCBI) utilizadas en el apartado de comparación de secuencias	40
Tabla 4. MoAbs utilizados en este trabajo	48
Tabla 5. ORF de los genes relacionados con la síntesis del LPS estudiados en las distintas especies de <i>Brucella</i> y su homología en la secuencia proteica con respecto a <i>B. melitensis</i>	58
Tabla 6. Comparación de genes del núcleo del LPS en distintas cepas de <i>B. ovnis</i>	66
Tabla 7. Caracterización fenotípica de los mutantes construidos en este trabajo y las cepas revertientes de los mutantes simples correspondientes. Como controles se utilizaron las cepas <i>B. ovnis</i> PA	87
Tabla 8. Susceptibilidad a la acción bactericida del suero ovino no inmune	89
Tabla 9. Susceptibilidad a la acción bactericida de la polimixina B	90
Tabla 10. Evolución de la infección esplénica por <i>B. ovnis</i> PA y de las cepas mutantes en glicosiltransferasas y revertientes en el bazo de ratones BALB/c	94
Tabla 11. Protección conferida por los mutantes en genes del núcleo del LPS de <i>B. ovnis</i> , en ratones BALB/c frente a la infección por <i>B. ovnis</i>	95
Tabla 12. Susceptibilidad a la acción bactericida del suero ovino no inmune y la polimixina B...	97
Tabla S1. Cebadores empleados en este trabajo.....	158

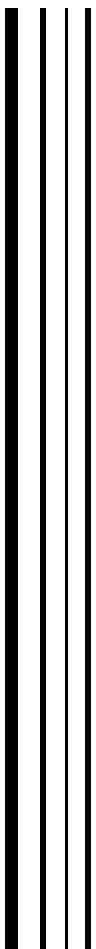
Listado de abreviaturas presentes en este trabajo

ABC	ATP binding casete
BAB	Base de agar sangre
BAB-S	BAB suplementado con 5% de suero
CIMA	Centro de Investigación Médica Aplicada
CITA	Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
SD	Desviación estándar
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Acido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Glc	Glucosa
Gm	Gentamicina
HEPES	Ácido 2-[4(2-hidroxietil)-1-piperacil] atanosulfónico
HS	Extracto salino caliente
I-ELISA	Enzimoinmunoinsayo indirecto
IL	Interleuquina
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IP	Intraperitoneal
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kb	Kilobase
Kdo	Ácido 3-deoxi-D-manno-2-octulosónico
Km	Kanamicina
L	Liso
LPS	Lipopolisacárido
LPS-R	Lipopolisacárido rugoso
LPS-S	Lipopolisacárido liso
Man	Manosa
ME	Membrana externa
MoAb	Anticuerpo monoclonal
Nal	Ácido nalidíxico
NgclN	Diaminoglucosa
OIE	Organización Mundial de Salud Animal
OMP	Proteína de membrana externa
ORF	Marco de lectura abierto
PAMP	patrón molecular asociado a patógeno
pb	Par de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PER	Perosamina
PI	Post-infección
PLSD	Test de las diferencias mínimas significativas protegidas de Fisher
Quin	Quinovosamina
R	Rugoso
Sac	Sacarosa
SC	Subcutaneo
SDS	Sodio dodecil sulfato
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SST	Solución salina tamponada

TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano
TSA	Caldo triptona y soja
TSA-YE-S	TSA suplementado con 0,5% YE y 5% de suero
TSB	Agar triptona y soja
TSB-YE-S	TSB suplementado con 0,5% YE y 5% de suero
UFC	Unidades formadoras de colonia
YE	Extracto de levadura



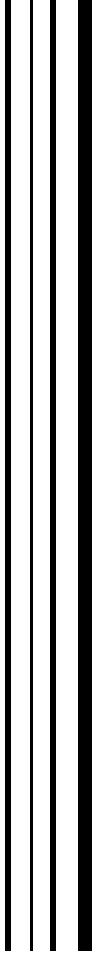
Resumen



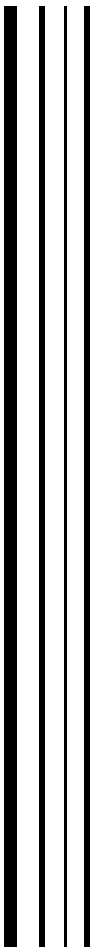
Brucella ovis produce una enfermedad que afecta al ganado ovino provocando grandes pérdidas económicas. La única vacuna existente consiste en la cepa viva *B. melitensis* Rev 1. Sin embargo, por su capacidad de provocar abortos en el ganado, su infectividad en humanos y su interferencia en el diagnóstico de *B. melitensis*, el empleo de Rev 1 está prohibido en muchas áreas donde se ha erradicado *B. melitensis*. En muchas de estas áreas, no obstante, existe una alta prevalencia de *B. ovis*. Por ello, el desarrollo de nuevas vacunas contra la infección por *B. ovis* es una necesidad.

El lipopolisacárido (LPS) es un factor de virulencia en *Brucella*. Recientemente se ha demostrado que el núcleo del LPS de *B. abortus* y *B. melitensis* es una estructura ramificada, y se han descrito al menos tres glicosiltransferasas *wadA*, *wadB* y *wadC* implicadas en su síntesis. Se ha comprobado en este trabajo que estos tres genes están muy conservados en la especie *B. ovis*. Mientras que la mutación en el gen *wadA* en *B. ovis* no generó alteraciones en las propiedades de la envoltura celular y no afectó a su supervivencia en el modelo murino, los genes *wadB* y *wadC* sí están implicados en la síntesis del núcleo del LPS de *B. ovis*. Además, los mutantes en *wadB* y *wadC* fueron atenuados y protegieron de una infección con *B. ovis* en el modelo murino. El mutante en *wadB* fue el más efectivo, superando incluso a la cepa vacunal Rev 1.

El análisis *in silico* de las secuencias de genes relacionados con la síntesis del LPS permitió observar una muy alta homología entre estos genes, mayor de la predicha inicialmente. El análisis de las secuencias demostró que la mutación en el pseudogen *manB_{core}*, que genera una pérdida de dos dominios funcionales esenciales para la actividad enzimática, es específica de *B. ovis*. Además, la mutación del gen *manB_{O-Ag}* de *B. ovis* generó deficiencias en el núcleo del LPS y provocó alteraciones en las propiedades de la membrana externa. La secuencia del gen *manB_{O-Ag}* fue idéntica en todas las cepas de *B. ovis* estudiadas, excepto en *B. ovis* REO. Es probable que en *B. ovis* el gen *manB_{O-Ag}* pueda estar supliendo la actividad del gen *manB_{core}*. La cepa *B. ovis* REO es la recomendada para la obtención de antígeno para el diagnóstico de *B. ovis*. Al compararla con la cepa *B. ovis* PA, se observó diferencias a nivel de la envoltura celular, compatibles con la delección en el gen *manB_{O-Ag}*.



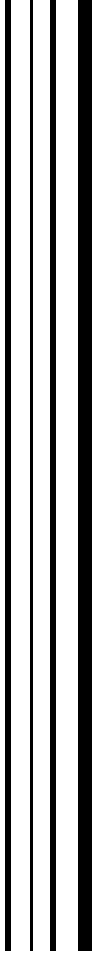
Abstract



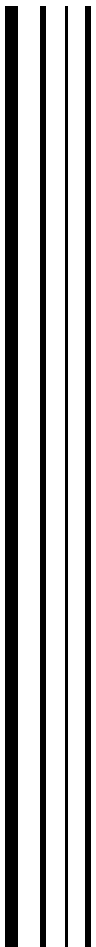
Brucella ovis produces a disease that affects sheep causing great economic losses. The only existing vaccine consists of live strain *B. melitensis* Rev 1. However, due to its ability to cause abortions in cattle, its infectivity in humans and its interference in the diagnosis of *B. melitensis*, Rev1 employment is prohibited in many areas where *B. melitensis* has been eradicated. In many of these areas, however, there is a high prevalence of *B. ovis*. Therefore, the development of new vaccines against infection by *B. ovis* is a must.

Lipopolysaccharide (LPS) is a virulence factor in *Brucella*. Recently it has been shown that the core of the LPS of *B. abortus* and *B. melitensis* is a branched structure, and at least three glycosyltransferases, *wadA*, *wadB* and *wadC* have been described to be involved in its synthesis. The present work found that these three genes are highly conserved in the species *B. ovis*. While mutation in the gene *wadA* in *B. ovis* did not generate alterations in the properties of the cell envelope and did not affect its survival in the murine model, *wadB* and *wadC* were involved in the synthesis of the core LPS of *B. ovis*. Furthermore, mutants *wadB* and *wadC* were attenuated and protected from an experimental *B. ovis* infection in the mouse model. The mutant *wadB* was the most effective, surpassing even the vaccine strain Rev 1.

In silico analysis of genes related to the synthesis of LPS sequences allowed to observe a very high homology between them, greater than initially predicted. The sequence analysis showed that the mutation in the pseudogene *manB_{core}*, which generates a loss of two functional domains essential for the enzymatic activity is specific to *B. ovis*. In addition, *B. ovis manB_{O-Ag}* gene deficiencies generated in the core of LPS caused alterations in the properties of the outer membrane. The sequence of *manB_{O-Ag}* gene was identical in all strains of *B. ovis* studied except *B. ovis* REO. It is likely that the *B. ovis manB_{O-Ag}* gene may be supplying *manB_{core}* gene activity. The strain *B. ovis* REO is recommended to obtain the antigen for the diagnosis of *B. ovis*. When compared with the strain *B. ovis* PA, differences in the cell envelope properties were found, compatible with the deletion of the gene *manB_{O-Ag}*.



Introducción



1. *Bucella ovis* y la brucelosis

El género *Brucella* está compuesto por pequeños cocobacilos Gram negativos capaces de infectar animales. Tradicionalmente se han descrito seis especies, que se clasificaron según su hospedador preferente: *B. abortus* infecta ganado vacuno, *B. melitensis* cabras y ovejas, *B. canis* perros, *B. suis* cerdos y pequeños roedores, *B. ovis* carneros, y *B. neotomae*, aislada de la rata-cambalachera desértica (Godfroid *et al.*, n.d.; Verger *et al.*, 1985; Moreno *et al.*, 2002; Whatmore, 2009; Godfroid *et al.*, 2011). Algunas de estas especies se subdividen también en biovariedades. A medida que la investigación ha avanzado se han aislado nuevas brucelas de otros hospedadores, por lo que se han propuesto nuevas especies de *Brucella*: *B. ceti* y *B. pinnipedialis* aisladas de mamíferos marinos cetáceos y pinnípedos, respectivamente (Cloekaert *et al.*, 2001; Jacques *et al.*, 2007; Foster *et al.*, 2007); *B. microti*, del topillo común, zorro y del suelo (Scholz *et al.*, 2008; Scholz, *et al.*, 2008; Scholz *et al.*, 2009), y *B. inopinata*, de un implante mamario, aunque se desconoce su reservorio natural (De *et al.*, 2008; Scholz *et al.*, 2010). Se han descrito también otros aislamientos de babuinos (Schlabritz-Loutsevitch *et al.*, 2009) y roedores salvajes de Australia (Tiller *et al.*, 2010), así como la cepa BO2, aislada de un paciente con neumonía crónica destructiva (Tiller *et al.*, 2010). Se propuso la inclusión de estos últimos dentro de la especie *B. inopinata* (Tiller *et al.*, 2010; Tiller *et al.*, 2010). En el año 2012, se han llegado a describir aislamientos de *Brucella* proveniente de ranas (Eisenberg *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 2012). Estas nuevas especies divergen en algunas de las características de las especies clásicas de *Brucella* y pueden comprometer los test serológicos empleados en su detección (Zygmunt *et al.*, 2012). *B. ovis*, *B. neotomae* y las biovariedades 2 y 5 de *B. suis* no infectan humanos (Godfroid *et al.*, 2011), y se desconoce el potencial zoonótico de las nuevas especies.

En general, la infección por las especies “clásicas” de *Brucella* en animales provoca infertilidad y aborto infeccioso en las hembras, y orquitis, epididimitis y esterilidad en los machos. La infección se puede establecer crónica y el patógeno puede excretarse por las glándulas mamarias o el semen. Algunas especies de *Brucella* pueden transmitirse a humanos causando una enfermedad zoonótica que se conoce como fiebres de Malta. La enfermedad en humanos ocurre principalmente en personas en contacto con el ganado o con el agente etiológico o el consumo de productos lácteos y

derivados no pasteurizados. No existe evidencia de transmisión persona-persona. La brucelosis humana provoca fiebres undulantes e irregulares, sudor, cefalea, dolores de espalda y debilidad física. En algunos pacientes, los síntomas agudos pueden durar cerca de un año y llegar a establecerse crónica (Castaño and Solera, 2009; Ögredici *et al.*, 2010). Requiere un tratamiento antibiótico prolongado y no existen vacunas en humanos (Pappas *et al.*, 2005).

B. ovis se aisló por primera vez en 1950 en Nueva Zelanda (McFarlane *et al.*, 1952), y unos años después en 1953 en Australia (Simmons and Hall, 1953). En un principio se describió como un mutante rugoso estable de *B. melitensis*, pero en 1956, Buddle propuso separarla como una especie diferente, *B. ovis* (Buddle, 1956). *B. ovis* es considerada el principal motivo de los problemas reproductivos en el ganado ovino. La enfermedad está muy extendida en el continente americano, Europa, Sudáfrica y Asia, y muy probablemente, ocurra en la mayoría de los países con explotaciones ovinas (Blasco, 1990). Además de en ovejas y carneros, se ha aislado en granjas de ciervo común (Ridler *et al.*, 2006). En los machos provoca epididimitis, orquitis, disminución importante de la fertilidad y un incremento de la mortalidad perinatal. En ovejas provoca placentitis, aunque los abortos son poco frecuentes (Alton, 1987; Blasco, 1990).

La transmisión venérea pasiva vía oveja es la forma más común de transmisión entre carneros, aunque también hay transmisión directa carnero-carnero (Blasco, 1990). Las ovejas infectadas pueden excretar *B. ovis* en descargas vaginales y la transmisión oveja-cordero puede ser también un mecanismo determinante de infección (Burgess, 1982). Tanto ovejas como carneros son importantes en la epidemiología de la transmisión, y el control y la erradicación de *B. ovis* sólo es posible si las hembras son incluidas en los correspondientes programas (Garin-Bastuji and Blasco, 2013).

B. ovis se puede aislar de muestras de leche, semen, hisopados vaginales o prepuciales (Blasco, 1990). Éstas se pueden teñir con el método de Stamp para el diagnóstico, pero no permite diferenciar de otras especies como *B. melitensis*, *Coxiella burnetti* y *Chlamydophila abortus*, que se aíslan también de las mismas muestras (Alton, 1987). El resultado debe confirmarse mediante el cultivo del microorganismo. En las necropsias, el órgano preferencial es el epidídimo, vesículas seminales, la *ampullae* y los

nódulos linfáticos inguinales en corderos, y los ganglios linfáticos supramamarios e ilíacos del útero en ovejas (Garin-Bastuji and Blasco, 2013).

Para las pruebas de diagnóstico se emplea como antígeno el extracto salino en caliente (HS) de la cepa *B. ovis* REO. Éste se compone de lipopolisacárido rugoso (R-LPS), proteínas de membrana externa (OMPs) del grupo 3 y otros componentes de la membrana externa (ME) (Gamazo *et al.*, 1989). Actualmente, el único test recomendado por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE) para el comercio internacional aprobado en la Unión Europea es la prueba de fijación del complemento (Garin-Bastuji and Blasco, 2013). Existen otras pruebas, como la doble inmunodifusión en gel de agarosa, que tiene una sensibilidad parecida y es más simple y económica. También se han desarrollado enzimoimmunoanálisis indirecto (I-ELISA) que es más sensible y específico que las anteriores, pero faltan estudios de validación y estandarización de esta prueba. Se dan casos de reactividad cruzada de animales infectados con *B. melitensis* o vacunados con *B. melitensis* Rev 1.

2.- Características del genoma de *B. ovis*.

Hasta la fecha tan solo se ha secuenciado y anotado el genoma de *B. ovis* ATCC25840 (NCTC10512), cepa 63/290 aislada de una oveja en Australia en 1960. El análisis mostró que el tamaño del genoma de *B. ovis* no es muy distinto al del resto de cepas de *Brucella*. Comparte con *B. abortus* 2308, *B. suis* 1330 y *B. melitensis* 16M entorno al 79% de los ORFeomas anotados y carece de 539, 675 y 610 proteínas hipotética, respectivamente. Por su parte, *B. ovis* tiene anotadas 33 proteínas ausentes en éstas otras cepas. Se han identificados 244 pseudogenes, con 40 proteínas hipotéticas o conservadas, 62 sistemas transportadores, 23 transposasas y 14 genes con funciones reguladoras, entre otros. Algunos de estos pseudogenes han sido relacionados con algunas de las características metabólicas de *B. ovis*: ausencia de actividad ureasa, incapacidad para utilizar piruvato, aminoácidos o glicerol como fuentes de carbono (debido a la ausencia del gen *pckA*), mecanismo oxidativo defectuoso de la arabinosa, galactosa, ribosa, xilosa, glucosa y eritritol, fenotipo oxidasa negativo, y deficiencia en enzimas del metabolismo del nitrógeno (Tsolis *et al.*, 2009).

B. ovis posee varias deleciones genómicas en sus dos cromosomas. Comparada con *B. suis*, probablemente la especie más cercana desde el punto de vista evolutivo, tiene tres grandes deleciones en el cromosoma I y dos en el cromosoma II. La primera deleción es una región de 15 Kb, la isla genómica GI-2 (Rajashekara *et al.*, 2004; Rajashekara *et al.*, 2008) que incluye los genes *wboA* y *wboB* (en *B. abortus* BAB1_0999 y BAB1_1000, respectivamente), que son dos glicosiltransferasas implicadas en la síntesis de la cadena O del lipopolisacárido (LPS) en *B. melitensis* y *B. abortus* (Vizcaíno *et al.*, 2004; Tsolis *et al.*, 2009). Esta isla está relacionada con la disociación de fenotipo liso a rugoso en *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis* (Mancilla *et al.*, 2010). La segunda deleción es otra isla genómica de 7,74 Kb, con tres proteínas hipotéticas, dos sitios específicos de recombinasas y dos tRNA-leu en los extremos. La tercera es otra región de 3,95 Kb (región BR1852-BR1853 en *B. suis*) que se predice que es una transposasa y que incluye un regulador transcripcional y una hipotética permeasa de un aminoácido ramificado (Paulsen *et al.*, 2002). Respecto al cromosoma II, *B. ovis* carece de una isla de 44,5 Kb, que incluye las ORF BRA1074-BRA1113 en *B. suis* y contiene un sistema transportador ABC, posiblemente relacionado con el transporte de oligopéptidos/dipéptidos y espermidina/putrescina (Jenner *et al.*, 2009), y reguladores transcripcionales. La isla IncP, un fragmento de 18,3 Kb, también está ausente en *B. ovis*, *B. melitensis* y *B. abortus*, mientras que se ha encontrado en *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae* y en aislamientos marinos (Lavigne *et al.*, 2005; Tsolis *et al.*, 2009).

El genoma de *B. ovis* contiene también una región en el cromosoma II de 26,5 Kb (BOV_A0482-BOV_A0515) que no aparece ni en *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* o *B. neotomae*, pero que se ha detectado en aislamiento *Brucella* de delfines (*Tursiops truncatus*). En esta región, que se ha denominado *B. ovis pathogenicity island* (BOPI-1) (Tsolis *et al.*, 2009), se encuentran varias transposasas, un transportador ABC, una hemaglutinina y varias proteínas hipotéticas. Un estudio reciente en el que se mutaron el gen de la hemaglutinina y dos genes del transportador ABC, demostró que estos últimos son esenciales para la supervivencia *in vitro* y en el modelo murino (Silva *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013).

3.- La membrana externa de *Brucella*

Las bacterias Gram negativas se encuentran envueltas por una doble membrana con un espacio periplásmico entre ellas. La ME es una bicapa asimétrica con el LPS orientado hacia el exterior y fosfolípidos hacia el interior en el que se encuentran insertadas proteínas (Figura 1). La ME constituye la primera línea de reconocimiento del sistema inmunitario del hospedador, por lo que esta barrera ha ido evolucionando para adaptarse a su hospedador.

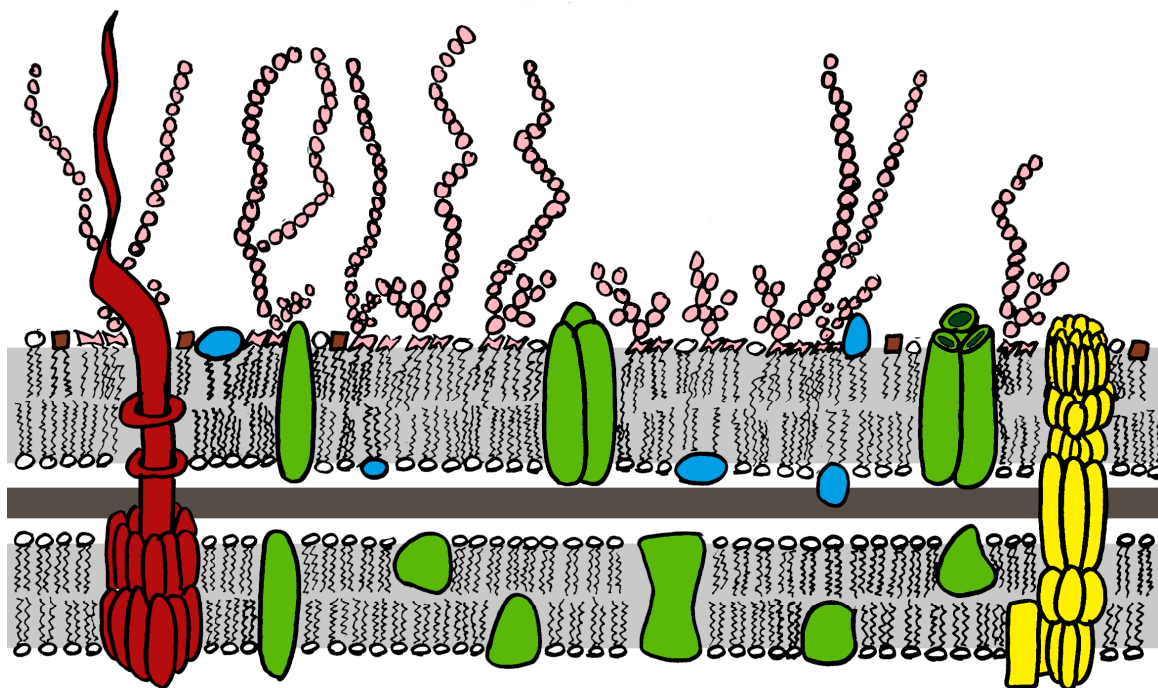


Figura 1. Estructura de la membrana externa de *B. melitensis* propuesta por Freer *et al.* (Freer *et al.*, 1996). Modificada de González y Vizcaíno y Cloeckart (González, 2003; Vizcaíno & Cloeckart, 2012). Rosa: LPS; verde: proteínas de membrana; azul: lipoproteínas; amarillo: sistema de secreción VirB; marrón: lípidos de ornitina; Rojo: flagelo; gris oscuro: peptidoglicano; blanco: fosfolípidos de membrana.

3.1 Lipopolisacárido (LPS)

Es la principal molécula de la cara externa de la ME. El LPS consiste de una estructura dividida en tres regiones: el lípido A, el núcleo y la cadena O (Figura 2).

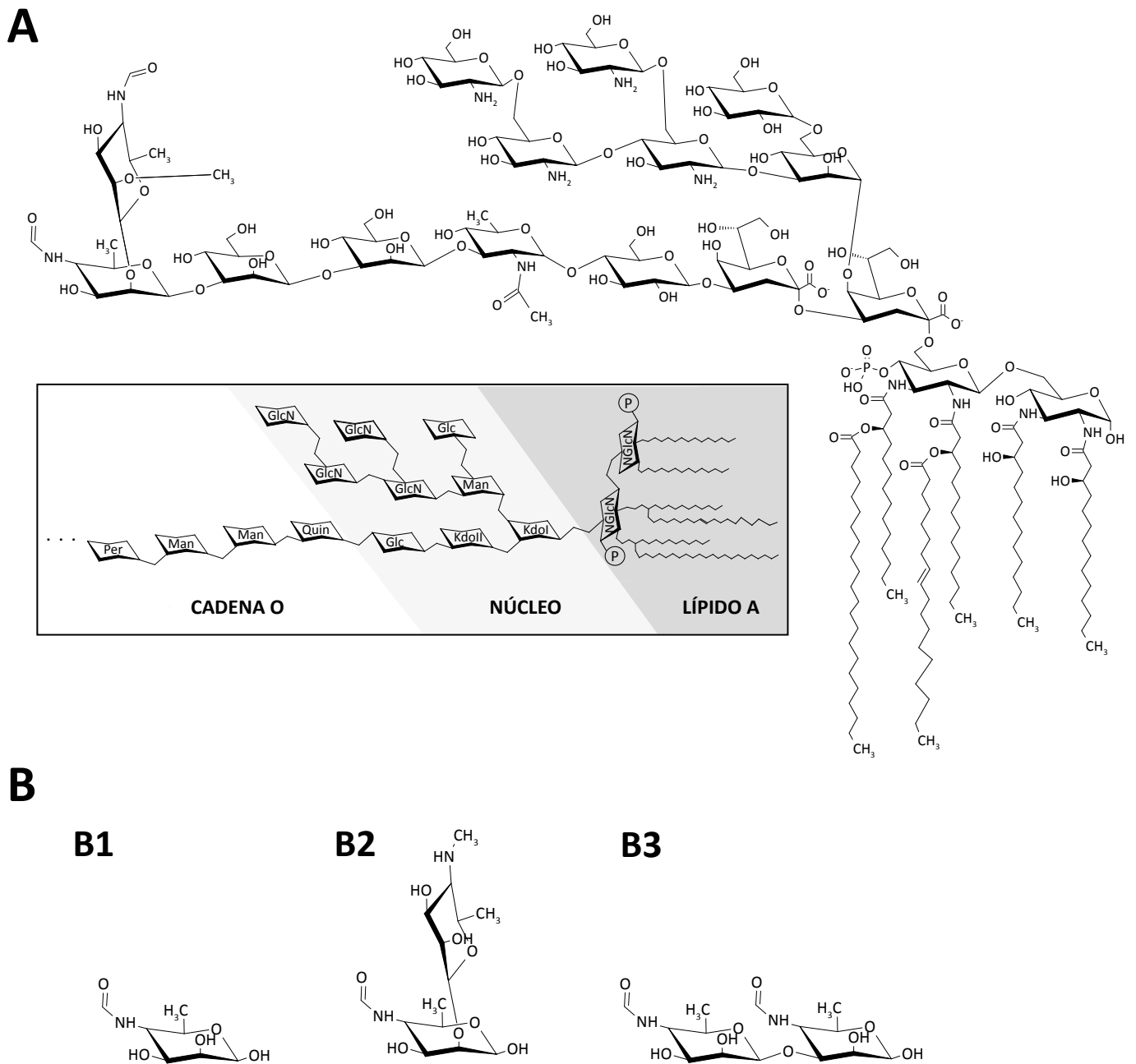


Figura 2 Representación esquemática de la estructura del LPS-S de *Brucella* propuesta por Klubber y Vinogradov (Kubler-Kielb and Vinogradov, 2013a). (A) Región del núcleo-lípido A e inicio de la cadena O. NGlcN: diaminoglucosa; Man: manosa; Glc: glucosa; GlcN: glucosamina; Quin: quinovosamina; Per: perosamina. (B) La cadena O es un homopolímero de perosamina (B1), unidas mediante enlaces alfa 1→2 (B2) o alfa 1→3 (B3).

Lípido A

Esta región de la molécula es la encargada del anclaje en la membrana, y está compuesta por un disacárido al que se le unen ácidos grasos. En la mayoría de bacterias Gram negativas está formado por dos glucosaminas fosforiladas unidas mediante enlaces tipo éster o amida a ácidos grasos de 12 o 14 C, de los cuales dos son beta-hidroxilados unidos por un enlace axiloxiacil con otros ácidos grasos (Raetz *et al.*, 2007). En el caso de *Brucella*, el disacárido puede aparecer mono o bisfosforilado y está compuesto por dos moléculas de diaminoglucosa a la que se le unen ácidos grasos de cadena larga, de 28 a 30 C (Iriarte *et al.*, 2004). Raetz *et al.* (Raetz *et al.*, 2007; Raetz *et al.*, 2009) describieron dos rutas para la síntesis del lípido A denominadas conservada y variable. La primera consistiría en la obtención del complejo Kdo2-lípido A, mientras que la segunda consistiría en modificar esta estructura mientras se transporta al exterior según factores del entorno.

La vía de síntesis del lípido A conservada, estudiada en detalle en *E. coli* y *Salmonella*, comenzaría con la O-acilación con un ácido graso de una UDP-N-acetilglucosamina a la que posteriormente se le deacila el grupo N-acetilo, para posteriormente acilarlo con un ácido graso, quedando una UDP-2,3-diacil-glucosamina. Estas etapas están catalizadas por LpxA, LpxC y LpxD, respectivamente, que presentan homólogos en *Brucella*. Es probable que *Brucella* parta de una molécula de UDP-N-acetildiaminoglucosa en lugar de UDP-acetilglucosamina, como ocurre en *Leptospira interrogans* (Sweet *et al.*, 2004; Sweet *et al.*, 2004). En algunas de estas moléculas, LpxH sustituye el UDP por un fosfato, y posteriormente LpxB une ésta molécula con un UDP-2,3-diacil-glucosamina, liberando el UDP. En *Brucella*, el disacárido se formaría con un enlace $\beta(1-6)$ de dos moléculas de diaminoglucosa. LpxB tiene una secuencia homóloga en *Brucella*. Sin embargo, al igual que otras bacterias Gram negativas, carece de ortólogos para LpxH. En *Caulobacter crescentus* se ha encontrado una enzima, LpxI que suple esta función, y existe una proteína homóloga en *B. melitensis* (Metzger *et al.*, 2012). Posteriormente, LpxK fosforila en C 4 de la primera glucosamina, y a la molécula resultante se la conoce como Lípido IV A. A esta estructura se le añaden dos moléculas de ácido 3-desoxi-D-mano-2octusolónico (Kdo) con la transferasa KdtA, presente también en *Brucella*. Finalmente, tras la adición de dos cadenas de ácidos grasos

mediada por LpxL y LpxM, se forma la molécula Kdo2-lípidoA. *Brucella* sólo posee una ORF ortóloga a estas enzimas, pero con una homología muy baja. Sin embargo, sí que posee un gen con una alta homología con la enzima LpxXL, una aciltransferasa que en *Rhizobium* incorpora ácidos grasos de cadena larga, de 28 a 32 C (Iriarte *et al.*, 2004). Terminada la molécula, ésta es traslocada de la cara interna a la cara externa de la membrana interna por el transportador ABC MsbA.

La vía de síntesis variable, presente en algunas bacterias, consiste en un conjunto de enzimas, la mayoría OMPs, que son capaces de modificar el complejo Kdo2-lípido A en su proceso de traslocación al exterior. La expresión de estas enzimas está regulada en función de las condiciones del entorno (pH, concentración de cationes divalentes, presencia de péptidos antimicrobianos, ...), y proporcionan mayor resistencia a péptidos catiónicos o reducen la endotoxicidad propia del lípido A (Raetz *et al.*, 2007). Las modificaciones más importantes tienen que ver con el patrón de acilación o la reducción de la carga negativa debida a la eliminación/sustitución de grupos fosfato. *Brucella* también presenta especies del lípido A mono y bisfosforiladas en un 50%. *Rhizobium leguminosarum* posee una enzima LpxE, capaz de eliminar el fosfato en posición 1. Sin embargo, tras la delección de los dos genes homólogos en *Brucella*, LpxE1 y LpxE2, siguen apareciendo especies monofosforiladas (Conde-Álvarez, 2008). Todavía no se ha encontrado la enzima encargada de esta desfosforilación. El género *Brucella*, a excepción de *B. abortus*, tiene una enzima LptA, encargada de la transferencia de una fosfoetanolamina al fosfato de una de las diaminoglucosas del lípido A (Gil-Ramírez, 2011).

Núcleo del LPS

La región del núcleo sirve de nexo entre el lípido A y la cadena O. Suele estar compuesto por una cadena de monosacáridos de diferentes características. En cepas rugosas esta es la parte más externa de la molécula del LPS, al carecer de cadena O unida. En *Brucella*, el núcleo está compuesto por quinovosamina, glucosa, manosa, glucosamina y Kdo. A diferencia de otras bacterias Gram negativas, carece de heptosas (azúcares normalmente unidos al Kdo), ortofosfatos y azúcares ácidos como el ácido galacturónico (Freer *et al.*, 1995; Holst, 1999; González *et al.*, 2008). El reciente análisis por NMR del núcleo de *B. melitensis* confirmó estos análisis (Kubler-Kielb and

Vinogradov, 2013a). Aunque la estructura del núcleo está bastante conservada dentro de cada grupo taxonómico, las distintas cepas de *Brucella* tienen un cierto grado de heterogeneidad (Freer *et al.*, 1995), y se han visto diferencias en el núcleo interno entre *B. abortus* 2308 y *B. melitensis* 16M, mediante el empleo de anticuerpos monoclonales (MoAbs) (González *et al.*, 2008). En el análisis del núcleo de *B. ovis* REO no se ha descrito quinovosamina aunque hay un azúcar que no se llegó a identificar (Suarez *et al.*, 1990).

La síntesis del núcleo se realizaría según el modelo descrito para *E. coli* o *Salmonella* (Iriarte *et al.*, 2004; González *et al.*, 2008): una vez que el Kdo es unido al disacárido del lípido A en formación y que éste está completamente acilado, diferentes glicosiltransferasas van uniendo de forma secuencial los azúcares que conformarán el núcleo.

Se han descrito varios genes implicados en la síntesis de azúcares precursores del núcleo: la fosfoglucomutasa *pgm* (BMEI1886), un gen metabólico de la ruta biosintética de la glucosa (Ugalde *et al.*, 2000; Ugalde *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008), y un par de genes de la ruta biosintética de la manosa, *manB_{core}* (BMEI10899) y *manC_{core}* (BMEI10900) (Allen *et al.*, 1998; Monreal *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008). Mutantes en el gen *manB_{core}* de *B. melitensis* generan mutantes rugosos profundos. En *B. ovis* el gen *manB_{core}* tiene una delección que provoca un codón de parada prematuro. Sin embargo, el LPS de esta especie no presenta defectos como los mutantes de *B. melitensis* o *B. abortus*, así que es posible que esta mutación no afecte a la enzima.

Respecto a las transferasas de azúcares al núcleo, por el momento se han conseguido describir tres: *wadA*, *wadB* y *wadC*. La glicosiltransferasa *wadA* (antes conocida como *wa***) (BMEI1326) (Monreal *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008) se encarga de la transferencia de un azúcar de la región más externa del núcleo que une con la cadena O. Los mutantes que se han obtenido de este gen en *B. abortus* y *B. melitensis* eran cepas rugosas que presentaban un núcleo ligeramente inferior en tamaño. En su interior, sin embargo, estas cepas contienen cadena O libre. Por su parte, la glicosiltransferasa *wadB* (BMEI1602) y la manosiltransferasa *wadC* (BMEI0509) también están relacionadas con la síntesis del núcleo del LPS (Gil-Ramírez, 2011; Conde-Álvarez *et al.*, 2012; Conde-Álvarez *et al.*, 2013). La interrupción de dichos genes *B. abortus* y *B. melitensis* produjo mutantes que se mantenían intacta la cadena O, pero

que tenían defectos en el núcleo. Estos mutantes permitieron demostrar que el núcleo del LPS posee una ramificación lateral con respecto de la cadena que se une con el polisacárido O. La supresión de esta rama lateral se ha visto que altera las propiedades biológicas de la bacteria: disminución de la resistencia a la acción bactericida del suero y a péptidos policatiónicos, y atenuación en células dendríticas y en ratones. Además, en *B. abortus* y *B. melitensis*, la vacunación con mutantes *wadB* y *wadC* protege en ratones frente a infecciones por una cepa salvaje (Gil-Ramírez, 2011; Conde-Álvarez *et al.*, 2012), por lo que se ha propuesto su uso en la mejora de vacunas (Conde-Álvarez *et al.*, 2013).

Por el momento, no se han descrito más glicosiltransferasas involucradas en la síntesis del núcleo del LPS. Gil-Ramírez (Gil-Ramírez, 2011) realizó un estudio *in silico* a partir del genoma de las principales especies secuenciadas del género *Brucella* y otras especies relacionadas, en busca de posibles glicosiltransferasas implicadas en la síntesis del LPS. La delección de la glicosiltransferasa BAB1_1620 en *B. abortus* no mostró ninguna diferencia fenotípica con respecto de su cepa parental. La ORF BMEI1540 aparece anotada como glicosiltransferasa y se apuntó también como posible candidata.

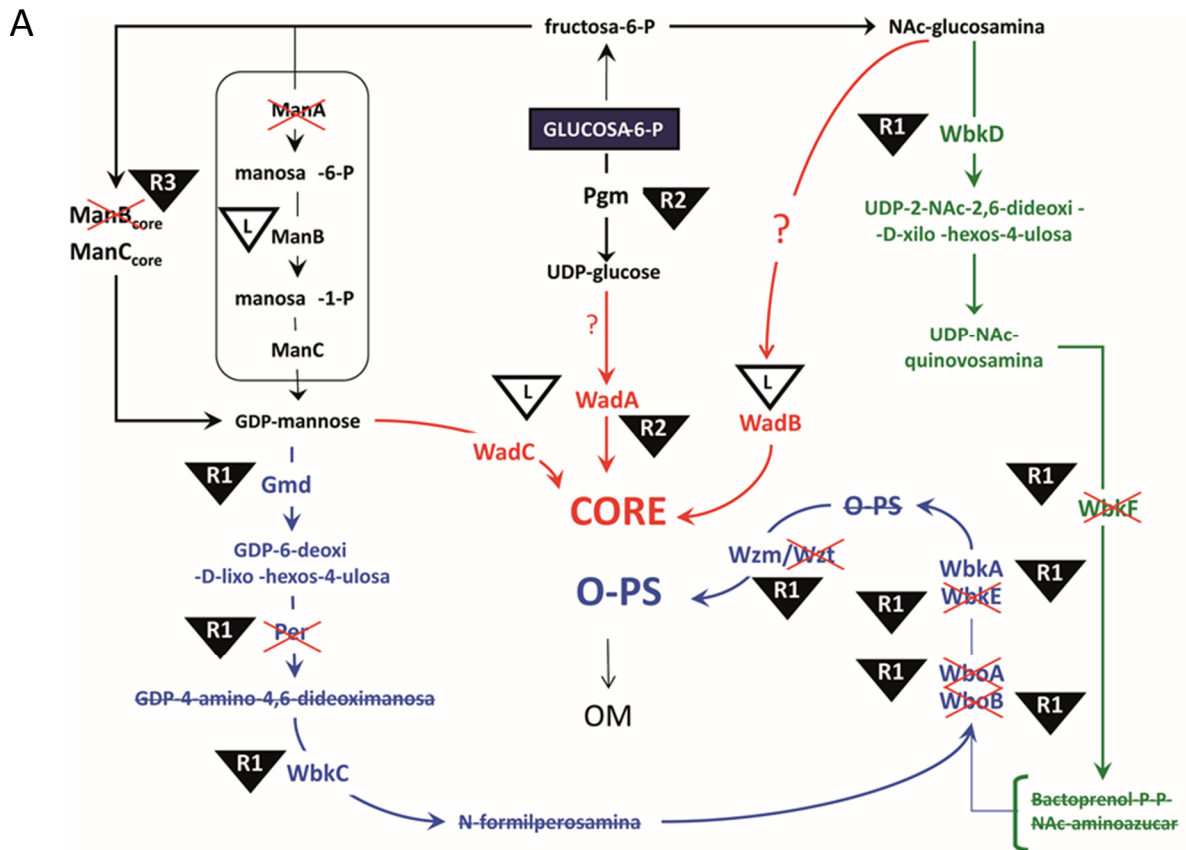
Cadena O

Esta molécula está compuesta por repeticiones de uno o dos azúcares que varían según la especie. En el caso de *Brucella*, se ha demostrado que está compuesta únicamente por N-formilperosaminas unidas mediante enlaces $\alpha(1-2)$ y $\alpha(1-3)$. Las cadenas O de las distintas especies varían según la proporción relativa de estos enlaces, y esto da lugar a tres epítomos básicos detectados mediante MoAbs: C (común a todos los tipos químicos de cadena O), M [presente sólo en los polisacáridos con enlaces $\alpha(1-3)$] y A [presente en aquellas que no tienen enlaces $\alpha(1-3)$, o con una proporción de enlaces $\alpha(1-2) : \alpha(1-3)$ mayor que 4:1] (Caroff *et al.*, 1984; Douglas and Palmer, 1988; Perry and Bundle, 1990; Kubler-Kielb and Vinogradov, 2013b). Las bases genéticas de estas sutiles diferencias en los enlaces no se conocen. También se da cierta reactividad cruzada con ciertas especies que utilizan derivados de la perosamina en el polisacárido O, como en *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio cholerae* (varios serotipos incluyendo el O:1), *Salmonella* del grupo N (O:30), *E. coli* O:157:H7, algunos serotipos de *Escherichia hermannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Francisella tularensis* presentan también derivados de la perosamina en su polisacárido O (Caroff *et al.*, 1984a; Perry y Bundle,

1990; Cherwonogrodzky et al., 1990; Kondo et al., 1993; Isshiki et al., 1995; Kondo et al., 1996; Sano et al., 1996). *B. ovis* y *B. canis* son cepas rugosas naturales que carecen de cadena O tanto en el exterior como almacenada en el interior.

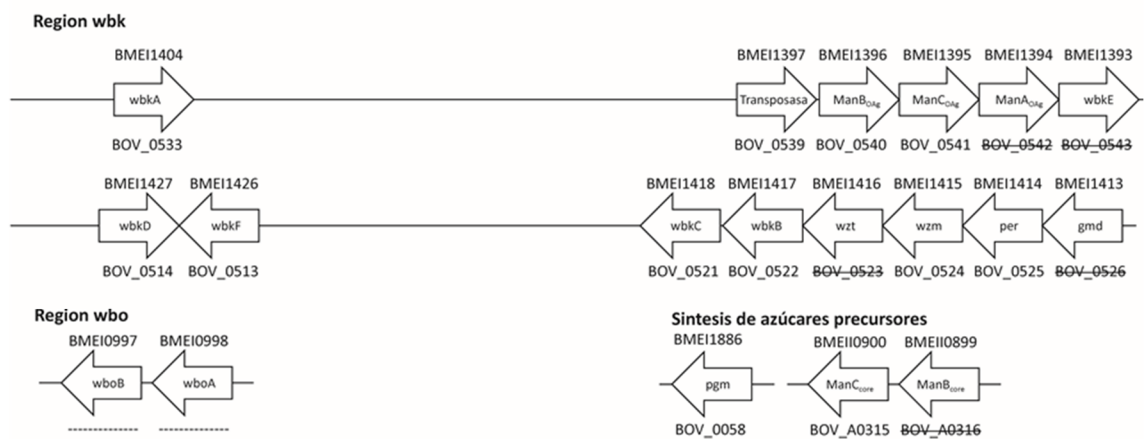
La Figura 3 muestra el esquema de síntesis de la cadena O. La síntesis de la N-formilperosamina se produce a partir de moléculas de manosa. La región genética *wbk* está bastante conservada en las diferentes especies de *Brucella*, incluso en cepas rugosas (Cloeckert et al., 2000). En esta región están los genes *manA_{O-Ag}*, *manB_{O-Ag}* y *manC_{O-Ag}*, cuya localización podría hacer pensar que estuvieran involucrados en la síntesis de la molécula de GDP-manosa para la construcción de la cadena O (Monreal et al., 2003). Sin embargo, la mutación del gen *manB_{O-Ag}* en *B. melitensis* no produjo disrupción en la cadena O. Curiosamente, existe otra región en el cromosoma II que contiene dos genes homólogos, llamados *manB_{core}* y *manC_{core}*, cuya disrupción provoca mutantes no solo carentes de cadena O, sino con un núcleo del LPS muy truncado (Monreal et al., 2003; González et al., 2008). Los genes *gmd*, *per* y *wbkC* se encargan de la modificación de la manosa hasta N-formilperosamina (Godfroid et al., 2000; Iriarte et al., 2004; González et al., 2008). Inicialmente se produce la adición de un aminoazúcar, probablemente la quinovosamina, a una molécula de bactoprenol pirofosfato. Los genes *wboA*, *wboB*, *wbkA* y *wbkE* codifican glicosiltransferasas que irían añadiendo los azúcares a la cadena O (Godfroid et al., 2000; Iriarte et al., 2004; González et al., 2008). Posteriormente, el transportador ABC *wzm/wzt* transportaría la molécula desde la ME y esta se uniría al lípido A-núcleo por la acción de la ligasa *waal* (Godfroid et al., 2000; Iriarte et al., 2004; González et al., 2008).

Como ya se ha comentado antes, el genoma de *B. ovis* se ha ido degradando y adaptándose a su hospedador (Tsolis et al., 2009). En el caso de la cadena O, la región de 14,5 Kb ausente en *B. ovis* contiene los genes *wboA* y *wboB* (Vizcaíno et al., 2004). Además, la región *wbk*, aunque presente, presenta suficientes diferencias como para que no sea funcional (Figura 3). No obstante, algunos genes mantienen su secuencia, con lo que no se puede descartar que desempeñen alguna función por concretar.



B

Síntesis de la cadena O



Síntesis del núcleo

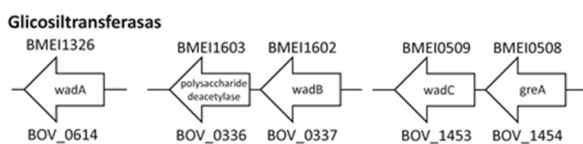


Figura 3. Modelo de síntesis de la cadena O y el núcleo del LPS de *Brucella*. (A) Esquema de las vías de síntesis del núcleo (core) y la cadena O (O-PS) (modificado de González et al 2008). Las proteínas tachadas corresponden con las ausentes en *B. ovis*. *Brucella* es capaz de crecer usando glucosa como única fuente de carbono y sintetizar LPS-S completo. En rojo aparece indicado la vía por la cual se añaden azúcares al núcleo. Algunos de estos genes han sido inactivados por inserción o deleción, y en la figura aparecen indicado si el fenotipo fue liso (triángulo blanco con una L) o rugoso con distintos niveles de alteración del núcleo (triángulo negro con R1, R2 y R3) (Godfroid *et al.*, 2000; González et al., 2008; Gil-Ramírez *et al.*, 2011; Conde-Álvarez *et al.*, 2012). La vía de síntesis hasta N-formilperosamina y su polimerización por las glicosiltransferasas Wbo y Wbk aparece marcada en azul, y la vía que lleva al cebado del bactoprenol para la polimerización de N-formilperosamina aparece en verde. Una vez la molécula está terminada, es trasladada al periplasma por el transportador ABC Wzm/Wzt y ligado al núcleo. (B) Localización en el genoma de *B. melitensis* 16M (BME) y de *B. ovis* ATCC 25840 (BOV) de los genes de síntesis de la cadena O y del núcleo del LPS (Iriarte *et al.*, 2004; González *et al.*, 2008). Las ORF anotadas como pseudogenes en *B. ovis* aparecen tachadas.

3.2 Fosfolípidos

El análisis de células enteras de *B. abortus* y *B. melitensis*, mostró que los principales fosfolípidos en estas dos especies son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, difosfatidilglicerol y fosfatidilglicerol (Vizcaíno and Cloeckert, 2012). Los dos primeros son más abundantes y son importantes para la virulencia en *B. abortus* 2308 (Conde-Álvarez *et al.*, 2006). La membrana también posee lípidos de ornitina, aunque se ha visto que la eliminación de éstos no provoca cambios en la bacteria (Palacios-Chaves *et al.*, 2011).

3.3 Las proteínas de membrana externa (OMPs)

Las OMPs han sido clasificadas según su abundancia relativa y según su tamaño molecular. Según su tamaño se pueden separar en grupo 1, 2 y 3 (Cloeckert *et al.*, 2002; Vizcaíno and Cloeckert, 2012). En el grupo 1 se encuentra la proteína minoritaria Omp89 o Omp1, de 88 a 94 kDa. En el grupo 2 encontramos proteínas de 36-38 kDa que están menos representadas y que son las porinas Omp2b y Omp2a. Las proteínas del grupo 3 son un grupo de proteínas mayoritarias que incluyen dos regiones, una de 25-27 kDa y otra de 31-34 kDa. En ellas se encuentran siete proteínas y se les conoce como familia Omp25/31.

La **proteína Omp2b** funciona como una porina (Marquis and Ficht, 1993). Existe un gen parálogo en *Brucella*, Omp2a, que comparte más del 85% de la secuencia, está orientado en dirección opuesta y separado de Omp2b por 900 pb. Esta región presenta una alta variabilidad en la secuencia, dando proteínas con distinta secuencia y tamaño, lo cual afecta también a los epítomos expuestos (Paquet *et al.*, 2001). Las secuencias de ambos genes codifican proteínas con 16 dominios transmembrana con ocho bucles orientados hacia el exterior (Paquet *et al.*, 2000). Sin embargo, no hay evidencia de que el gen *omp2a* se exprese en *Brucella* (Vizcaíno and Cloeckeaert, 2012).

La **proteína Omp25** (conocida también como Omp3a) está formada por ocho laminas beta transmembrana conectadas por giros cortos en el periplasma y largos bucles en el exterior (Cloeckeaert *et al.*, 2002; Vizcaíno and Cloeckeaert, 2012). En *B. suis* se ha visto que esta OMP es necesaria para la liberación de proteínas periplásmicas al exterior cuando el pH es ácido, como en los fagosomas (Boigegrain *et al.*, 2004). Además, tiene un efecto represor sobre la producción de TNF- α en experimentos en macrófagos, aunque el mecanismo se desconoce. En *B. ovis* tiene una delección de 36 pb en el extremo 3', y se cree que éste cambio en el extremo C-terminal es el causante de las diferencias antigénicas observadas en ésta molécula en *B. ovis* (Cloeckeaert *et al.*, 1996; Cloeckeaert *et al.*, 2002).

La **proteína Omp31** está compuesta por un barril beta de 8 láminas, con cuatro bucles expuestos al exterior más grandes que los de Omp25 (Cloeckeaert *et al.*, 2002; Vizcaíno and Cloeckeaert, 2012). En *B. abortus* está ausente (Vizcaíno *et al.*, 1997), mientras que en *B. ovis* difiere en siete aminoácidos con respecto a *B. melitensis* (Vizcaíno *et al.*, 2001). Tres de estos aminoácidos se encuentran en el bucle externo de la región N-terminal, mientras que los otros cuatro están en el cuarto bucle externo. Estas modificaciones son responsables de las diferencias antigénicas encontradas entre Omp31 de *B. ovis* y *B. melitensis* (Vizcaíno *et al.*, 2001; Cloeckeaert *et al.*, 2002). Se estima que Omp31 actúa como una porina (Vizcaíno *et al.*, 1996). Omp2b actúa como porina también aunque es un componente minoritario de la ME. Pero curiosamente, *B. abortus* carece del gen que codifica la Omp31 y Omp2b es una proteína mayoritaria de la ME en *B. abortus*, sugiriendo un posible mecanismo compensatorio (Vizcaíno and Cloeckeaert,

2012). Las deleciones en este gen en otras especies de *Brucella* no tienen efectos drásticos en la virulencia de *Brucella* (Martín-Martín *et al.*, 2008), posiblemente porque otras proteínas de la familia Omp25/Omp31 compensen su pérdida.

Con respecto al resto de la familia Omp25/Omp31: **Omp31b** tiene un codón de parada prematuro en *B. ovis* y *B. canis*, lo cual trunca la proteína (Vizcaíno *et al.*, 2004). Por otro lado, en *B. melitensis* tampoco es funcional ya que ha perdido el extremo 5' y la región que contiene el sitio de unión al ribosoma (Salhi *et al.*, 2003). Sí se ha detectado en *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis*. **Omp22** se ha detectado en *B. abortus*, *B. ovis* PA y *B. neotomae*, y su disrupción en *B. ovis* reduce su supervivencia en macrófagos y la colonización del bazo en ratones (Martín-Martín *et al.*, 2008). **Omp25b** se ha detectado experimentalmente tan sólo en *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* (Connolly *et al.*, 2006; Al Dahouk *et al.*, 2008). Este gen se encuentra en la isla genómica de 15 Kb ausente en *B. ovis* (Vizcaíno *et al.*, 2004). **Omp25c** ha sido hallada en las seis especies de *Brucella* tradicionales, y *B. ovis* la expresa en altas concentraciones (Martín-Martín *et al.*, 2009). **Omp25d** se ha detectado en *B. abortus* (Connolly *et al.*, 2006), y también en un mutante de *B. ovis* con el gen *omp25d* delecionado y complementado con un plásmido que sobreexpresa el gen salvaje *omp25d* (Martín-Martín *et al.*, 2009).

También existen lipoproteínas de membrana **Omp16**, **Omp10** y **Omp19** (Tibor *et al.*, 1999). Aunque la expresión de estas es minoritaria, la supresión de Omp10 y Omp19 produce la atenuación de las cepas resultantes, con una menor colonización del bazo (Tibor *et al.*, 2002). Además, Omp16 y Omp19 tienen propiedades inmunomoduladoras (Zwerdling *et al.*, 2008), y ésta última se ha identificado como un patrón molecular asociado a patógeno (PAMP) capaz de activar células dendríticas *in vivo* y conferir cierto grado de protección frente a una infección de ratones con *B. abortus* 544 (Pasquevich *et al.*, 2010).

Las OMP son moléculas inmunogénicas reconocidas por el hospedador. En las cepas lisas, la cadena O supone un impedimento estérico para el reconocimiento y limitan mucho su potencial empleo en el diagnóstico o desarrollo de vacunas. Sin embargo, en las cepas rugosas estas moléculas quedan expuestas siendo más relevantes

en la virulencia y en la interacción con el sistema inmunitario (Bowden *et al.*, 1995; Caro-Hernández *et al.*, 2007; Cassataro *et al.*, 2007)

4.- Propiedades de la membrana externa y su relación con la virulencia de *Brucella*

Brucella es un patógeno intracelular facultativo capaz de multiplicarse tanto en el interior de las células huésped como de sobrevivir en el exterior, si bien su presencia fuera del huésped es accidental (Moreno and Moriyón, 2002). Las bacterias Gram negativas poseen moléculas en la ME que son reconocidas por el sistema inmunitario innato, conocidas como PAMP. Sin embargo, no se han descrito factores clásicos de virulencia, como exotoxinas, exoproteasas, citolisinas, cápsulas, fimbria, formas de resistencia, variación antigénica, plásmidos o fagos lisogénicos (Moreno and Moriyón, 2002). La secuenciación de varios genomas completos de *Brucella* ha confirmado la ausencia de sistemas de secreción de tipo I, II y III completos, aunque ha mostrado la existencia de otros genes típicamente implicados en la virulencia, como hemolisinas, adhesinas e invasinas, así como de genes relacionados con el flagelo (DelVecchio *et al.*, 2002; Paulsen *et al.*, 2002; Halling *et al.*, 2005). Éstos últimos se ha visto que están relacionados con la multiplicación intracelular y persistencia en ratón (Fretin *et al.*, 2005; Delrue *et al.*, 2005; Cornelis, 2011)

Brucella posee sistemas que le permiten coordinar su respuesta para conseguir llegar a su nicho replicativo y establecer una infección. El sistema de **secreción de tipo IV virB** es un complejo proteico que atraviesa las dos membranas y juega también un papel esencial en el tráfico intracelular de *Brucella*. Éste trasloca moléculas efectoras bacterianas al citoplasma de la célula huésped (O'Callaghan *et al.*, 1999; Sieira *et al.*, 2000; Lacerda *et al.*, 2013). Por el momento, se han descrito los efectores VceA y VceC (de Jong *et al.*, 2008), RicA (de Barsey *et al.*, 2011), BPE123 (Marchesini *et al.*, 2011) y las proteínas BspA, BspB, BspC, BspE y BspF (Myeni *et al.*, 2013), aunque todavía se están realizando estudios sobre la naturaleza y función intracelular de estos efectores (Marchesini *et al.*, 2011). *Brucella* produce **glucanos cíclicos** en el periplasma. En el curso de la infección estas moléculas son liberadas al exterior, contribuyendo a alcanzar su nicho replicativo final derivado del retículo endoplasmático (Celli *et al.*, 2003; Arellano-Reynoso *et al.*, 2005). El sistema de dos componentes **BvrR-BvrS** contribuye también a

algunos aspectos de la virulencia de *Brucella*, como la adaptación del metabolismo de la bacteria a los nutrientes disponibles en el hospedador (Viadas *et al.*, 2010; Barbier *et al.*, 2011). La mutación de este sistema provoca una alteración profunda de la estructura de la ME así como una severa atenuación. Estos mutantes son incapaces de mantener la homeostasis de la ME (Sola-Landa *et al.*, 1998; Guzman-Verri *et al.*, 2002). El análisis transcriptómico del mutante *bvrR* de *B. abortus* mostró que la inactivación de este regulador provoca alteraciones en la expresión de genes relacionados con la envoltura celular y la ME, con el metabolismo del carbono y el nitrógeno, con la virulencia bacteriana y con otros genes reguladores (Viadas *et al.*, 2010). Los **reguladores quorum sensing** de *Brucella*, VjbR y BabR, están también involucrados en la regulación de muchos de los genes relacionados con la respuesta metabolismo y virulencia, incluyendo los potencialmente involucrados en la adaptación de *Brucella* al estrés oxidativo, nutricional y de pH encontrado en el hospedador (Letesson *et al.*, 2002; Weeks *et al.*, 2010; Uzureau *et al.*, 2010; Barbier *et al.*, 2011).

Brucella es capaz de atravesar las barreras de defensa del organismo y permanecer en el interior de las células, escapando así del sistema inmunitario (Delrue *et al.*, 2001; de Jong *et al.*, 2010). Tras atravesar las mucosas, entra en macrófagos y neutrófilos y, a través de ellos, se disemina por el organismo. *Brucella* es capaz de infectar y multiplicarse dentro de fagocitos profesionales (macrófagos, monocitos, trofoblastos, neutrófilos, células dendríticas) y no profesionales (células HeLa, células Vero, fibroblastos, células de riñón de hámster,...) tanto de humanos como en animales (Moreno and Gorvel, 2004; Billard *et al.*, 2005). Para ello, entra por macropinocitosis por balsas lipídicas (Watarai *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004). *Brucella* es capaz de inhibir la fusión con los lisosomas (Celli *et al.*, 2005), evitando así ser digerida por la célula. Posteriormente, *Brucella* llega a compartimentos relacionados con el retículo endoplasmático donde se replica extensivamente sin daño aparente para la célula huésped, bloqueando los mecanismos de apoptosis o muerte celular. La capacidad de sobrevivir y multiplicarse dentro de macrófagos puede considerarse un factor de virulencia ya que le permite a *Brucella* evadir los mecanismos de defensa extracelulares, como el complemento o los anticuerpos, y establecer una infección latente. Sin embargo, todavía no se han definido los factores críticos que determinan la invasión y

multiplicación intracelular de *Brucella* (Celli and Gorvel, 2004; Roop *et al.*, 2004). La supervivencia a largo tiempo en el sistema reticuloendotelial del bazo, hígado y médula ósea mantiene la infección crónica (Gorvel and Moreno, 2002). Posteriormente, estas bacterias invaden diversos tipos de células huésped y se multiplican dentro de ellas bloqueando la apoptosis y manteniéndolas vivas (Moreno and Gorvel, 2004), sin desencadenar una liberación fuerte de citoquinas (Barquero-Calvo *et al.*, 2009). La disociación espontánea de las cepas lisas en rugosas o por manipulación genética mostró que estos mutantes deficientes de cadena O son incapaces de evadir la fusión con lisosomas y su degradación. Sin embargo, la entrada de *B. ovis* y *B. canis* a la célula hospedadora depende también de componentes de las balsas lipídicas (Martín-Martín *et al.*, 2010).

Se ha propuesto que *Brucella* ha desarrollado una estrategia sigilosa de entrada al hospedador mediante la reducción de PAMP, asegurándose una baja actividad estimuladora y baja toxicidad en células (Barquero-Calvo *et al.*, 2007; Barquero-Calvo *et al.*, 2009; Palacios-Chaves *et al.*, 2011). Muchas de las características relacionadas con la virulencia de *Brucella* parecen estar concentradas en la superficie de la ME. El LPS es un factor de virulencia en el que tanto las peculiaridades de la cadena O como del núcleo-lípido A actúan como un escudo escondiendo los PAMP (Lapaque *et al.*, 2005; Conde-Álvarez *et al.*, 2012). El LPS de *Brucella* es muy poco endotóxico: estimula mínimamente a leucocitos polimorfonucleares (Rasool *et al.*, 1992), es poco reconocido por el sistema de receptores de patógenos CD14-MD2-TLR4, que reconoce LPS (Lapaque *et al.*, 2006; Barquero-Calvo *et al.*, 2007), y activa muy levemente citoquinas proinflamatorias como la interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 o el TNF- α (Roop *et al.*, 2009). Además, el LPS de *Brucella* presenta una reducción de grupos fosfato en el lípido A y ausencia de cargas negativas en el núcleo del LPS, que contribuyen a una disminución en la carga negativa de la membrana (Iriarte *et al.*, 2004; Conde-Álvarez *et al.*, 2012). Este cambio, junto con la acción de la cadena O como impedimento estérico, dificulta la unión de péptidos catiónicos endógenos y le confiere resistencia a la acción bactericida de éstos y a antibióticos basados en péptidos catiónicos, como la polimixina B o la colistina (Martínez de Tejada *et al.*, 1995; Freer *et al.*, 1996). El LPS de *Brucella* posee además ácidos grasos de cadena larga en el lípido A que ayudan a estabilizar la membrana mediante

interacciones hidrofóbicas (Moreno *et al.*, 1990; Velasco *et al.*, 2000). Esto hace que no requiera de cationes divalentes para su estabilización, haciéndola resistente a la acción de quelantes como el EDTA (Moriyón and Berman, 1982; Freer *et al.*, 1996). Sin embargo, es más permeable a sustancias hidrofóbicas (Martínez de Tejada and Moriyón, 1993). Por otro lado, la cadena O confiere a *Brucella* resistencia a la acción bactericida de suero no inmunizado, aunque las especies rugosas naturales también son resistentes al suero (Eisenschenk *et al.*, 1999; Martín-Martín *et al.*, 2011).

5.- Prevención frente a *B. ovis*.

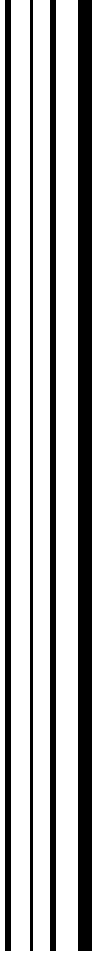
Actualmente la única vacuna que se dispone frente a *B. ovis* es *B. melitensis* Rev 1 (Garin-Bastuji and Blasco, 2013). Una administración única de 10⁹ CFU de la cepa viva vía subcutánea o conjuntival protege de manera segura y efectiva al ganado ovino frente a la infección por *B. ovis*. La vacunación conjuntival tiene la ventaja de que minimiza la respuesta serológica intensa y de larga duración provocada por la infección subcutánea, mejorando así su especificidad en pruebas serológicas (Blasco, 1997). En los países afectados por *B. ovis* pero libres de *B. melitensis* existe un riesgo de interferencia serológica entre animales infectados y vacunados, y se recomienda el uso conjuntival para minimizar el problema. Este problema, sin embargo, ha hecho que muchos países libres de *B. melitensis* prohíban la vacunación con *B. melitensis* Rev 1, aumentando la prevalencia de *B. ovis*.

Las cepas rugosas naturales son virulentas a pesar de no tener cadena O. Se ha predicho que las vacunas con cepas rugosas pueden ser más efectivas frente a *B. ovis* ya que los anticuerpos anti-cadena O no juegan un papel en la protección frente a estas bacterias (Moriyón *et al.*, 2004). La vacunación de carneros con las cepas *B. abortus* S19 y *B. abortus* RB51 no protegió a éstos frente a una infección experimental con *B. ovis* (Jiménez de Bagüés *et al.*, 1995; Moriyón *et al.*, 2004). En la búsqueda de vacunas frente a las *Brucella* lisas se probó a vacunar con mutantes de estas cepas rugosas, y se vio que éstas cepas eran insuficientes para proteger frente a infecciones de *Brucella* spp. lisas (Monreal *et al.*, 2003; Moriyón *et al.*, 2004; González *et al.*, 2008). Algunas de estas cepas han sido probadas también como potenciales vacunas frente a *B. ovis*. Así, los ensayos realizados en ratones con el mutante rugoso *B. melitensis* VTRM, que tiene interrumpido el gen *wbkA* (antes *rfbU*), mostró que esta cepa confiere una protección

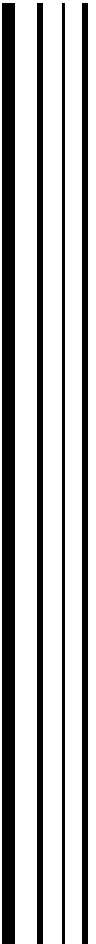
similar a *B. melitensis* Rev 1 (Winter *et al.*, 1996; Moriyón *et al.*, 2004). Otro estudio evaluó la capacidad de proteger frente a *B. ovis* en modelo murino de los mutantes rugosos *B. abortus per*, *B. abortus wbkA*, *B. abortus wadA*, *B. abortus manB_{core}*, y *B. abortus* S19. Los resultados mostraron que los mutantes *per* y *wbkA* conferían una protección similar a S19 y RB51 y que *wbkA* era capaz de eliminar la infección por *B. ovis* del bazo. En el caso del mutante *per*, tres de cada cinco ratones permanecieron infectados al sacrificio. Por su parte, los mutantes *wadA* y *manB_{core}* no proveyeron ninguna protección (Monreal *et al.*, 2003; Moriyón *et al.*, 2004).

Otra estrategia que se ha probado son vacunas acelulares (Martins *et al.*, 2012). Aunque se han utilizado bacterias enteras inactivadas como vacuna en Nueva Zelanda, su eficacia es limitada y pueden presentar problemas de inactivación (Martins *et al.*, 2012). Se han creado vacunas quimeras entre la lumazina sintasa de *Brucella* y Omp31, y coadministrada con adyuvantes se ha conseguido cierto grado de protección frente a *B. ovis* en carneros (Cassataro *et al.*, 2007; Estein *et al.*, 2009). Las vacunas con extracto salino encapsulado en nanopartículas manosiladas también ha dado buenos resultados y son alternativas muy interesantes (Martins *et al.*, 2012). Las principales desventajas de estas estrategias suelen ser su alto coste de producción y que algunas de ellas requieren de adyuvantes, dosis altas para estimular o dosis repetidas, limitando su utilidad práctica (Yang *et al.*, 2013).

En los últimos años, también se han hecho estudios de inactivación de genes en *B. ovis*. Se ha visto que la delección de genes del transportador ABC situado en la isla BOPI-1 está atenuada en carneros aunque es inmunogénico, y no se excreta en semen u orina (Silva *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2013). Las proteínas Omp25d y Omp22 son necesarias para la persistencia en ratones, mientras que Omp31, Omp25 y Omp25c no mostraron diferencias en la infección de ratones (Caro-Hernández *et al.*, 2007). La supresión de genes del sistema de secreción de tipo IV, el regulador *vjbR*, glucanos cíclicos y *bacA* dio como resultado mutantes atenuados en modelo murino excepto en el caso de *bacA* que se comportó como la parental (Martín-Martín *et al.*, 2012). Hasta la fecha no se han hecho estudios de inactivación de genes implicados en la síntesis del LPS de *B. ovis*.



Hipótesis y objetivos

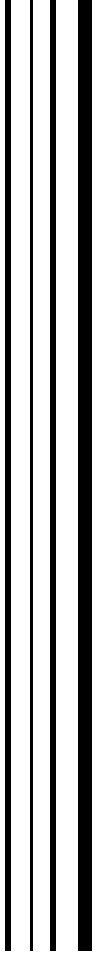


El presente trabajo es parte de un proyecto de investigación destinado a la construcción, caracterización, mejora y marcaje de nuevas vacunas vivas frente a *Brucella*. Según el LPS, *Brucella* incluye tanto especies lisas (LPS-S) como rugosas (LPS-R). El LPS-S es un factor de virulencia y los mutantes LPS-R afectados en la síntesis de la cadena O y/o en el núcleo del LPS son atenuados. Sin embargo, *B. ovis* es una de las especies naturalmente rugosa de *Brucella* y es virulenta en ovinos.

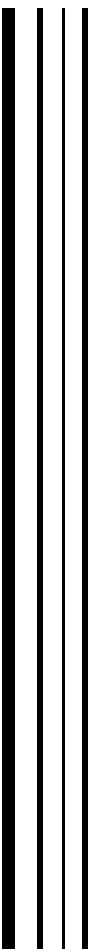
Se ha postulado que el núcleo del LPS-S de *Brucella* es una estructura ramificada. En *B. abortus* y *B. melitensis*, mutantes en el núcleo del LPS son reconocidos por el sistema inmune innato, por lo que representan ser candidatos para desarrollar vacunas que activen una respuesta inmune temprana y protectora.

La hipótesis de partida de este trabajo ha sido que es posible construir vacunas vivas más seguras y específicas frente a una infección por *B. ovis* modificando su LPS-R. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos concretos:

1. Comparar las secuencias de los genes implicados en la síntesis del LPS de *B. ovis* frente a otras especies del género.
2. Evaluar la cepa *B. ovis* REO frente a *B. ovis* PA como candidatas para deleccionar genes implicados en la síntesis del LPS-R.
3. Construir y caracterizar mutantes en los genes seleccionados, en la cepa elegida de *B. ovis*.
4. Estudiar su virulencia y su capacidad de protección frente a una infección por *B. ovis* en el modelo murino y en comparación con la cepa vacunal *B. melitensis* Rev 1.



Material y métodos



1.- Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.

Las cepas y plásmidos empleados en este estudio se muestran en las Tablas 1, 2 y 3. Los medios empleados fueron caldo tripticasa soja (TSB, Biomerieux) o TSB suplementado con 1,5% de agar bacteriológico (TSA, Pronadisa), ambos suplementados con un 0,5% extracto de levadura (YE, Merck) y suero ovino (Sigma) al 5% (TSB-YE-S y TSA-YE-S, respectivamente). Alternativamente, se emplearon placas de base de agar sangre (BAB nº 2, Biolife) suplementadas con suero fetal bovino (Gibco) al 5%, (BAB-S). Todos los cultivos se obtuvieron por incubación a 37°C durante 2-4 días, en atmósfera enriquecida con un 10% CO₂. Los cultivos en medio líquido se incubaron, además, con agitación de baja intensidad, durante 24-48 h. Las cepas se conservaron a -80°C en TSB con YE (0,5%) y DMSO.

2.- Manipulaciones de DNA.

Los DNA plasmídico o cromosómico fueron extraídos empleando los sistemas comerciales *Qiaprep Miniprep* (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) y *Ultraclean Microbial DNA Isolation* (MoBio Laboratories), respectivamente. En caso necesario, los fragmentos de DNA fueron extraídos desde el gel de agarosa empleando el sistema *Qiaquick Gel Extraction* (Qiagen). La secuenciación del DNA fue realizada por el servicio de secuenciación del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de la Universidad de Navarra y por la empresa MacroGen (Corea del Sur). Los oligonucleótidos cebadores se muestran en la Tabla S1 (Anexo 1) y fueron sintetizados por Sigma-Aldrich Ltd. (Haverhill, Reino Unido). El DNA cromosómico de los diferentes aislamientos de *B. ovis* fue proporcionado por el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) de Aragón.

3.- Vectores empleados.

Los plásmidos empleados en este estudio se muestran en la Tabla 2. Para su construcción se emplearon dos tipos de vectores:

3.1. pCRTM2.1. Es un vector bacteriano de 3,9 Kb comercializado por Invitrogen (Figura S1, Anexo 1). Contiene casetes de resistencia a la kanamicina y a la ampicilina para facilitar la selección de bacterias transformantes. Incluye también el gen *lacZ*, donde se

Tabla 1. Cepas empleadas en este trabajo

Cepa	Características relevantes	Referencia/procedencia
Brucella		
<i>B. ovis</i> PA	Cepa virulenta de referencia, LPS rugoso	Blasco et al 1993/ CITA de Aragón
<i>B. ovis</i> REO-198	Cepa rugosa CO ₂ - y suero- independiente	Freer et al. 1999/ UNAV
<i>B. ovis</i> PA-Gm ^R	Cepa <i>B. ovis</i> PA resistente a gentamicina	A. Zúñiga (no publicado)
BoΔ <i>wadA</i>	Mutante <i>B. ovis</i> PA <i>wadA</i> Δ58-679	Este trabajo
BoΔ <i>wadB</i>	Mutante <i>B. ovis</i> PA <i>wadB</i> Δ49-195	Este trabajo
BoΔ <i>wadC</i>	Mutante <i>B. ovis</i> PA <i>wadC</i> Δ17-306	Este trabajo
BoΔ <i>wadB</i> Δ <i>wadC</i>	Mutante <i>B. ovis</i> PA doble mutante Δ <i>wadB</i> Δ <i>wadC</i>	Este trabajo
BoΔ <i>man</i> _{O-Ag}	Mutante <i>B. ovis</i> PA <i>man</i> _{O-Ag} Δ48-425	Este trabajo
<i>B. abortus</i> 2308	Cepa <i>B. abortus</i> virulenta, biotipo 1, LPS liso	(Sangari and Agüero, 1991)/ CITA
<i>B. abortus</i> 2308-Nal ^R	Mutante espontáneo de <i>B. abortus</i> 2308 seleccionado por su resistencia al ácido nalidíxico (Nal ^R) y utilizado como cepa parental en la construcción de mutantes	(Sangari and Agüero, 1991)/ CITA
Ba::Tn5- <i>wadA</i>	2308 Nal ^R <i>wadA</i> ::Tn5; LPS rugoso	(Monreal et al., 2003)/ UNAV
BaΔ <i>wadB</i>	<i>B. abortus</i> 2308 <i>wadB</i> Δ49-195	(Gil-Ramírez, 2011)
BaΔ <i>wadC</i>	<i>B. abortus</i> 2308 <i>wadC</i> Δ16-308	(Conde-Álvarez et al., 2012)
BaΔ <i>wadB wadC</i>	<i>B. abortus</i> 2308 doble mutante Δ <i>wadC</i> Δ <i>wadB</i>	(Gil-Ramírez, 2011)
Ba::Tn5- <i>man</i> _{core}	<i>B. abortus</i> 2308 Nal ^R <i>man</i> _{core} ::Tn5; LPS rugoso	(Monreal et al., 2003)
BaΔ <i>lpxE1</i>	<i>B. abortus</i> 2308 <i>lpxE-1</i> Δ30-225	(Conde-Álvarez, 2008)
BaΔ <i>lpxE2</i>	<i>B. abortus</i> 2308 <i>lpxE-2</i> Δ40-272	(Conde-Álvarez, 2008)
BaΔ <i>lpxE1</i> Δ <i>lpxE2</i>	<i>B. abortus</i> 2308 doble mutante Δ <i>lpxE-1</i> Δ <i>lpxE-2</i>	(Conde-Álvarez, 2008)
BaΔ1620	<i>B. abortus</i> 2308 Δ1620 24-240	(Gil-Ramírez, 2011)
Ba::Tn5- <i>per</i>	<i>B. abortus</i> 2308 Nal ^R <i>per</i> ::Tn5; LPS rugoso	(Monreal et al., 2003)
Ba Δ <i>wadC</i> Δ <i>per</i>	<i>B. abortus</i> 2308 <i>wadC</i> Δ16-308 <i>per</i> Δ53-354	Conde-Álvarez (no publicado)
<i>B. suis</i> CITA	Cepa salvaje, virulenta, biovar 2, LPS liso	CITA
BsΔ <i>wadA</i>	<i>B. suis</i> CITA <i>wadA</i> Δ58-679	Mancilla (no publicado)
BsΔ <i>wadB</i>	<i>B. suis</i> CITA <i>wadB</i> Δ49-195	(Gil-Ramírez, 2011)
BsΔ <i>wadC</i>	<i>B. suis</i> CITA <i>wadC</i> Δ16-308	Mancilla (no publicado)
BsΔ <i>wadB</i> Δ <i>wadC</i>	<i>B. suis</i> CITA doble mutante Δ <i>wadC</i> Δ <i>wadB</i>	Mancilla (no publicado)
<i>B. melitensis</i> 16M	Cepa salvaje, virulenta, biotipo 1, LPS liso	(González et al., 2008)
BmΔ <i>wadA</i>	<i>B. melitensis</i> 16M Δ58-679	(González et al., 2008)
BmΔ <i>wadB</i>	<i>B. melitensis</i> 16M <i>wadB</i> Δ49-195	(Gil-Ramírez, 2011)
BmΔ <i>wadC</i>	<i>B. melitensis</i> 16M <i>wadC</i> Δ16-308	Conde-Álvarez (No publicado)
Bm::Tn5- <i>man</i> _{core}	<i>B. melitensis</i> H38 Nal ^R <i>man</i> _{core} ::Tn5; LPS rugoso	(González et al., 2008)
Bm::Tn5- <i>per</i>	<i>B. melitensis</i> H38 Nal ^R <i>per</i> ::Tn5; LPS rugoso	(González et al., 2008)
BmΔ <i>wadC</i> Δ <i>per</i>	<i>B. melitensis</i> 16M <i>wadC</i> Δ16-308 <i>per</i> Δ53-354	Conde-Álvarez (no publicado)
BmΔ <i>lptA</i>	<i>B. melitensis</i> 16M <i>lptA</i> Δ26-506	(Gil-Ramírez, 2011)
E. coli		
S17-1 λpir	Cepa conjugativa con el plásmido RP4 insertado en el cromosoma	(Simon et al., 1983)
Top 10 F'	F- <i>lacIq</i> Tn 10 (Tet ^R) <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) 80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1alaD139</i> <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen

inserta la caja de clonado. La disrupción de este gen por la inserción del fragmento a clonar permite diferenciar entre bacterias transformantes que contengan el plásmido recircularizado sin inserto o con inserto. Para ello, se utiliza el sustrato cromogénico X-gal que se degradará dando un compuesto azul, en caso de que el gen *lacZ* se encuentre activo. Este gen es inducible por la adición de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Se suministra en forma lineal, con ambos extremos solapantes compuestos por una timina en sus extremos 3'. La polimerasa utilizada en la reacción de PCR del producto a clonar (ver más adelante Sección 4) añade un nucleótido de adenina al final del producto. Además, se comercializa con una ligasa unida en un extremo del vector, que hace el proceso más sencillo.

3.2. pJQK. Este plásmido tiene un tamaño de 6,5 Kb y fue construido por Scupham y Triplet (Scupham and Triplett, 1997) (Figura S2, Anexo 1). Entre sus características para la selección posee un casete de resistencia a la kanamicina, así como el gen *sacB* que codifica una levan-sacarasa que en presencia de sacarosa produce un levano que es tóxico. Tiene también una zona de clonado en el gen *lacZ*. Este plásmido es movilizable a cepas de *Brucella*, pero es incapaz de replicarse fuera de enterobacterias.

Tabla 2. Plásmidos empleados en este trabajo

Plásmido	Características relevantes	Referencia/procedencia
pCR TM 2.1	Vector de clonación	Invitrogen
pJQK	Derivado de pJQ200KS+; Km ^R ; Gm ^S	(Scupham and Triplett, 1997)
pYRI-1	570 pb de DNA cromosómico de <i>B. ovis</i> que contiene el alelo deleciónado de <i>wadB</i> generado por PCR y clonado en pCR TM 2.1	(Gil-Ramírez, 2011)
pYRI-2	Fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Xba</i> I de pYRI-1 clonado en los sitios correspondientes de pJQK	(Gil-Ramírez, 2011)
pYRI-12	913 pb de DNA cromosómico de <i>B. abortus</i> que contiene el alelo deleciónado de <i>wadA</i> generado por PCR y clonado en pCR TM 2.1	Este trabajo
pYRI-13	Fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Xba</i> I de pYRI-12 clonado en los sitios correspondientes de pJQK	Este trabajo
pYRI-14	934 pb de DNA cromosómico de <i>B. ovis</i> que contiene el alelo deleciónado de <i>wadC</i> generado por PCR y clonado en pCR TM 2.1	Este trabajo
pYRI-15	Fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Xba</i> I de pYRI-14 clonado en los sitios correspondientes de pJQK	Este trabajo
pSIP-1	612 pb de DNA cromosómico de <i>B. ovis</i> que contiene el alelo deleciónado de <i>manB</i> _{OAg} generado por PCR y clonado en pCR TM 2.1	Este trabajo
pSIP-2	Fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Xba</i> I de pSIP-1 clonado en los sitios correspondientes de pJQK	Este trabajo

4.- Análisis *in silico* de distintas cepas de *B. ovis*.

Los análisis comparativos de las secuencias de DNA se llevaron a cabo con las cepas mostradas en la Tabla 3. Se amplificaron los genes *wadA*, *wadB*, *wadC*, BOV_0400, BOV_1547, BOV_A0124, *manB*_{O-Ag} y *manB*_{core} de las cepas *B. ovis* PA, *B. ovis* REO, *B. ovis* Argentina, *B. ovis* Croacia y *B. ovis* Francia (Tabla 3), mediante PCR con los cebadores marcados con asterisco (*) para cada gen en la Tabla S1 (Anexo I). Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo por MacroGen (Corea del Sur) con los cebadores de la Tabla S1 (Anexo 1).

Tabla 3. Cepas utilizadas para los estudios genéticos *in silico* y números de acceso al *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) utilizadas en el apartado de comparación de secuencias.

Cepa	Número de acceso NCBI (si no lo hay, origen de la cepa)	
<i>B. melitensis</i> 16M	NC_003317	NC_003318
<i>B. abortus</i> 2308	NC_007618	NC_007624
<i>B. ovis</i> 63/290 (ATCC 25840)	NC_009505	NC_009504
<i>B. suis</i> 1330	NC_004310	NC_004311
<i>B. pinnipedialis</i> B2/94	NC_015857	NC_015858
<i>B. canis</i> RM6/66 (ATCC 23365)	NC_010103	NC_010104
<i>B. microti</i> CCM 4915	NC_013119	NC_013118
<i>B. ovis</i> Argentina	Cepa aislada de carnero, colección de CITA referencia OV2325	
<i>B. ovis</i> Croacia	Cepa aislada de carnero, colección de CITA referencia OV2331	
<i>B. ovis</i> Francia	Cepa aislada de carnero, colección de CITA referencia OV2201	
<i>B. ovis</i> 63/96	NZ_AQKN00000000.1	
<i>B. ovis</i> 80/125	NZ_AQNP00000000.1	
<i>B. ovis</i> 81/8	NZ_AQKO00000000.1	
<i>B. ovis</i> F8/05B	NZ_AQNQ00000000.1	
<i>B. ovis</i> IntaBari-1993-758	NZ_AQIO00000000.1	
<i>B. ovis</i> IntaBari-2001-319-4082	NZ_AQIM00000000.1	
<i>B. ovis</i> IntaBari-2001-319-5096	NZ_AQIL00000000.1	
<i>B. ovis</i> IntaBari-2002-82-58	NZ_AQIK00000000.1	
<i>B. ovis</i> IntaBari-2006-46-332	NZ_AQII00000000.1	
<i>B. ovis</i> IntaBari-2006-46-348	NZ_AQIG00000000.1	
<i>B. ovis</i> IntaBari-2008-114-542	NZ_AQIN00000000.1	
<i>B. ovis</i> IntaBari-2009-88-3	NZ_ATHH00000000.1	
<i>B. ovis</i> IntaBari-2009-88-4	NZ_AQIF00000000.1	
<i>B. ovis</i> IntaBari-2010-47-268	NZ_AQIH00000000.1	
<i>B. ovis</i> IntaBari-2010-47-871	NZ_AQIJ00000000.1	

Las secuencias de nucleótidos y proteínas se obtuvieron tanto de la página web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://ncbi.nlm.nih.gov/>) como de la *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG; <http://www.genome.jp/kegg/>).

La búsqueda de homologías de DNA y proteínas entre las diferentes especies se llevó a cabo usando la herramienta *Basic Local Alignment Sequence Tool* (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y el servidor del *European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI; http://www.ebi.ac.uk/ebi_home.html), del cual se emplearon las herramientas *Needle* (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html), *Clustal Omega* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) e *Interpro* (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>). También, se empleó la herramienta *Translate* del *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB) (<http://web.expasy.org/translate>) para la predicción de proteínas a partir de secuencias de nucleótidos.

5.- Construcción de mutantes en fase mediante PCR de extensión solapada.

Los mutantes en fase (no polares) en los genes BOV_0540 (*manB_{O-Ag}*), BOV_0614 (*wadA*), BOV_0337 (*wadB*), BOV_1453 (*wadC*), y el doble mutante *wadB-wadC* se construyeron mediante PCR de extensión solapada usando como molde DNA genómico de *B. ovis* PA, a excepción del mutante en *wadB* para el cual se utilizó un plásmido construido previamente con DNA genómico de *B. abortus* (Figura S3, Anexo 1). Los cebadores para la mutagénesis se diseñaron mediante el programa *Primer3* (<http://159.237.78.167/primer3/input.htm>), según la secuencia del genoma de *B. ovis* ATCC 25840 disponible en la base de datos del NCBI (Tabla 3).

Para la construcción del mutante en el gen BOV_0540 (*manB_{O-Ag}*) se generaron en primer lugar dos fragmentos de PCR. Para ello, se emplearon los oligonucleótidos *manB_{O-Ag}-F1* y *manB_{O-Ag}-R2* para amplificar un fragmento de 307 pb que incluye los codones del 1 al 47 de la ORF de *manB_{O-Ag}* así como 166 pb previas al codón de inicio de *manB_{O-Ag}*; y los oligonucleótidos *manB_{O-Ag}-F3* y *manB_{O-Ag}-R4* para amplificar un fragmento de 325 pb que incluye los codones del 425 al 468 de la ORF de *manB_{O-Ag}* y los 173 pb posteriores al codón de parada de *manB_{O-Ag}* (Figura S4, Anexo 1). Ambos fragmentos se ligaron por PCR de extensión solapada utilizando los oligonucleótidos *manB_{O-Ag}-F1* y *manB_{O-Ag}-R4* para la amplificación, y las regiones complementarias entre *manB_{O-Ag}-R2* y *manB_{O-Ag}-F3* para el solapamiento. El fragmento resultante, que contiene el alelo deletado de *manB_{O-Ag}*, se clonó en el vector pCR2.1, para generar el plásmido

pSIP-1, que se secuenció para garantizar que mantenía el marco de lectura, y posteriormente se subclonó en las zonas de restricción *Bam*HI y *Xba*I del plásmido suicida pJQK. El plásmido mutador resultante (pSIP-2) se introdujo en *B. ovis* PA mediante conjugación (Conde-Álvarez *et al.*, 2012). La primera recombinación, consistente en la integración del vector suicida en el cromosoma, fue seleccionada por resistencia a ácido nalidíxico 12,5 µg/mL y a kanamicina 50 µg/mL, y la segunda recombinación, que consiste en la escisión del plásmido mutador dando como resultado la construcción de la cepa mutante por intercambio alélico, se seleccionó por resistencia a ácido nalidíxico 12,5 µg/mL y sacarosa 5% (P/V) y sensibilidad a la kanamicina. Las colonias resultantes se confirmaron mediante PCR con los cebadores *manB_{O-Ag}-F1* y *manB_{O-Ag}-R4*, los cuales amplifican un fragmento de 612 pb en las cepas mutantes y un fragmento de 1.743 pb en las cepas parentales. La mutación resultante supone la pérdida de un 81% de la ORF de *manB_{O-Ag}*. La cepa mutante así obtenida se denominó *BoΔmanB_{O-Ag}*.

La construcción del mutante en el gen BOV_0614 (*wadA*) se realizó de forma similar al anterior, comenzando por la generación de dos fragmentos de PCR. Para ello, se emplearon los oligonucleótidos *wadA-F1* y *wadA-R2* para amplificar un fragmento de 453 pb que contiene los codones del 1 al 47 del gen *wadA* así como 284 pb previos al codón de inicio de *wadA*; y los oligonucleótidos *wadA* y *wadA-R4* para amplificar un fragmento de 460 pb que incluye los codones del 680 al 704 de la ORF de *wadA* así como los 386 pb posteriores al codón de parada de *wadA* (Figura S5, Anexo 1). Ambos fragmentos fueron ligados mediante PCR de extensión solapada utilizando los oligonucleótidos *wadA-F1* y *wadA-R4* para la amplificación, y las regiones complementarias entre *wadA-R2* y *wadA-F3* para el solapamiento. El fragmento resultante, que contiene el alelo deleciónado de *wadA*, se clonó en un vector pCR2.1 para generar el plásmido pYRI 12, y se secuenció para confirmar que se mantenía el marco de lectura abierto de *wadA*. Posteriormente se subclonó en las zonas de restricción *Bam*HI y *Xba*I del plásmido suicida pJQK para producir el plásmido mutador pYRI-13. Este plásmido se introdujo en *B. ovis* PA por electroporación (Caro-Hernández *et al.*, 2007; Martín-Martín *et al.*, 2012) y el mutante deleciónado generado por intercambio alélico fue seleccionado por su resistencia al ácido nalidíxico y a la sacarosa

y por PCR usando los oligonucleótidos *wadA*-F1 y *wadA*-R4, que amplifican un fragmento de 913 pb en la cepa delecionada y un fragmento de 2.782 pb en la cepa parental. La mutación resultante supone la pérdida del 82% de la ORF de *wadA* y la cepa mutante se denominó *BoΔwadA*.

Dada la alta identidad entre las secuencias del gen *wadB* y sus regiones anteriores de *B. abortus* 2308 y *B. ovis* PA, para construir el mutante BOV_0337 (*wadB*) en *B. ovis* se usó el plásmido pYRI-2, que ya había sido empleado para construir los mutantes en *wadB* de *B. abortus* 2308 y *B. melitensis* 16M (Gil-Ramírez, 2011). Este plásmido contiene un fragmento de 570 pb que incluye los codones del 1 al 48 y 196 al 239 de la ORF de *B. abortus* 2308 *wadB* así como 152 pb previas al codón de inicio de *wadB* y 139 pb posteriores al codón de parada de *wadB* (Figura S6, Anexo 1). El plásmido pYRI-2 se introdujo en *B. ovis* por conjugación (Conde-Álvarez *et al.*, 2012). La primera recombinación fue seleccionada por resistencia a ácido nalidíxico y kanamicina, y la segunda recombinación por resistencia a ácido nalidíxico y sacarosa y sensibilidad a la kanamicina. Las colonias resultantes se examinaron por PCR con los cebadores *wadB*-F1 y *wadB*-R4, los cuales amplifican un fragmento de 570 pb en las cepas mutantes y un fragmento de 1.011 pb en las cepas parentales. La mutación resultante supone la pérdida de un 60% de la ORF de *wadB* y la cepa mutante se denominó *BoΔwadB*.

Para la construcción del mutante en el gen BOV_1453 (*wadC*) se emplearon los cebadores *wadC*-F1 y *wadC*-R2 para amplificar un fragmento de 473 pb que incluye los codones del 1 al 17 de la ORF de *wadC*, así como 424 pb previos al codón de inicio del gen *wadC*; y los cebadores *wadC*-F3 y *wadC*-R4 para amplificar un fragmento de 481 pb que incluye los codones 308 a 355 del ORF de *wadC* ORF y los 315 pb posteriores al codón de parada de *wadC* (Figura S7, Anexo 1). Se ligaron ambos fragmentos mediante PCR de extensión solapada usando los cebadores *wadC*-F1 y *wadC*-R4 y el fragmento que se obtuvo, que contiene el alelo delecionado, se clonó en un vector pCR2.1 para generar el plásmido pYRI-14, que se secuenció para confirmar que se mantenía el marco de lectura abierto de *wadC*. Posteriormente se subclonó en un vector pJQK para producir el plásmido mutador pYRI-15. Este plásmido se introdujo en *B. ovis* PA por conjugación (Conde-Álvarez *et al.*, 2012) y el mutante delecionado generado por intercambio alélico

fue seleccionado por su resistencia al ácido nalidíxico y a la sacarosa y su sensibilidad a la kanamicina, y por PCR usando los oligonucleótidos *wadC*-F1 y *wadC*-R4, que amplifica un fragmento de 934 pb en la cepa delecionada y un fragmento de 1.804 pb en la cepa parental. La mutación resultante supone la pérdida del 82% de la ORF de *wadC* y la cepa mutante se denominó *BoΔwadC*.

Para construir el doble mutante *wadB-wadC*, se introdujo el plásmido mutador pYRI-15, que contiene la mutación *wadC*, en la cepa *BoΔwadB* por conjugación (Conde-Álvarez *et al.*, 2012). Tras intercambio alélico, el mutante se seleccionó según lo descrito previamente utilizando los cebadores *wadC*-F1 y *wadC*-R4. La cepa doble mutante resultante se denominó *BoΔwadBΔwadC*.

Durante el proceso de la segunda recombinación, al producirse la salida del plásmido, éste puede llevar consigo de manera aleatoria el gen salvaje o el gen mutado. Se obtienen así dos tipos de colonias: cepas que han conservado el gen delecionado mutante, y otras que han conservado el gen salvaje original. En cada proceso de mutagénesis se conservaron también un aislamiento de estas últimas cepas revertidas a fenotipo salvaje, como control de otras posibles mutaciones indeseadas durante el proceso de mutagénesis. Estas cepas revertientes a genotipo salvaje se denominaron *BoΔwadA-Rev*, *BoΔwadB-Rev*, *BoΔwadC-Rev*, *BoΔmanB_{O-Ag}-Rev*, respectivamente

6.- Sensibilidad a fagos y colorantes.

Los mutantes seleccionados fueron analizados mediante las pruebas microbiológicas rutinarias para la identificación y tipificación de *Brucella* spp., siguiendo los procedimientos descritos por Alton *et al.* (Alton *et al.*, 1987). Brevemente, la identificación al nivel de género se llevó a cabo mediante las pruebas de catalasa, oxidasa, ureasa y aglutinación con acriflavina. Para la identificación al nivel de especie se utilizó la prueba de sensibilidad a los bacteriófagos Tb, Wb, Iz y R/C. Finalmente, para la tipificación al nivel de biovariedad se utilizaron las pruebas de aglutinación con los sueros monoespecíficos anti-A y anti-M y de crecimiento en placas de BAB y BAB-S conteniendo las concentraciones estándar de colorantes (20 µg/mL de tionina, 20 µg/mL de fucsina y 100 µg/mL de safranina; Panreac) y antibióticos (2,5 µg/mL de estreptomicina y 5 UI/mL de penicilina; Sigma). Además, se analizó la sensibilidad a los

fagos de *Brucella* específicos frente a bacterias lisas (Tb, Wb, Iz) y rugosas (R/C) evaluando la lisis de bacterias expuestas a diluciones decimales de la dilución corriente de prueba para cada fago (Alton *et al.*, 1987). La sensibilidad a los colorantes tionina, fucsina básica y safranina se realizó también según el método descrito por Alton *et al.* (Alton *et al.*, 1987). Para ello, las cepas se cultivaron en placas de BAB-S a 37°C durante 48 h y después se resuspendieron en solución salina tamponada estéril (SST; NaCl 0,15M, KH₂PO₄ 7,3mM, K₂HPO₄ 11,5mM; pH 6,8) para obtener una concentración de aproximadamente 10¹⁰ UFC/mL. A continuación, cada cepa bacteriana se sembró en placas de BAB-S (0,5 mL/placa) y BAB-S suplementado con tionina (10, 20 y 40 µg/mL), fucsina básica (10 y 20 µg/mL) o safranina (100 µg/mL), mediante siembra en estrías con un hisopo estéril. Las placas correspondientes se cultivaron a 37°C durante 3-4 días, para valorar la existencia de lisis por fagos y/o la inhibición del crecimiento bacteriano en presencia de los colorantes.

7.- Extracción del LPS.

Se realizó mediante la digestión de lisados celulares con proteinasa K, según descrito por Dubray y Limet (Dubray and Limet, 1987), con algunas modificaciones. Las bacterias se crecieron en 500 mL de TSB-YE-S durante 48 h y se inactivaron con fenol 0,5% durante otras 48 h. El cultivo fue centrifugado 15 min a 15.000 g y el precipitado se resuspendió con la ayuda de un sonicador en solución tamponada Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8) con 2% (wt/wt) SDS a razón de 1 g (peso húmedo) de células por 20 mL. Las muestras se calentaron a 100°C durante 10 min, y los lisados se dejaron atemperar a 55°C. Posteriormente, se añadió a las muestras proteinasa K (Merk) a una concentración final de 0,15 mg/mL y se incubaron a 55°C durante 3 h. Tras este tiempo, se dejaron a temperatura ambiente durante una noche. Al día siguiente, las muestras fueron centrifugadas a 20.000 g durante 30 min a 4°C. El LPS presente en el sobrenadante se precipitó mediante la adición de cuatro volúmenes de metanol al que se añadió 1% de metanol saturado con acetato de sodio (Met-NaAc) a 4°C. Las muestras se guardaron a -20°C durante 1 h, y el precipitado se recolectó mediante centrifugación a 5.000g durante 30 min a 4°C. Los sedimentos se lavaron con 10-15 mL de dH₂O y se precipitaron con 4 volúmenes de metanol con 1% Met-NaAc y guardados a -20°C durante 1 h. Se volvió a

recuperar el precipitado mediante centrifugación a 5.000g durante 30 min a 4°C. Los sedimentos se resuspendieron en 10-15 mL de solución 0,0625 M Tris-HCl (pH 6,8) y se trataron con RNasa y DNasa I (Boehringer), ambas a 0,01 mg/mL, a 37°C durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se realizó una última digestión con proteinasa K a 12,5 µg/mL durante 3 h a 55°C. Trascurrido este tiempo, se dejó a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Tras una tercera precipitación con metanol con 1% Met-NaAc y centrifugación, los sedimentos se congelaron y se liofilizaron.

Alternativamente, para los experimentos de electroforesis con tricina se realizó una versión simplificada de este protocolo. Para ello, a partir de cultivos en placa se prepararon suspensiones concentradas en solución Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8) con 2% (peso/peso) de SDS, que se inactivaron por calor. Posteriormente, se ajustaron a una DO₆₀₀ de 10, se tomaron 20 µL y se hirvieron a 100°C a 10 min, y los lisados se atemperaron a 55°C. Se añadió 5 µL de proteinasa K a una concentración de 0,10 mg/mL y se incubó a 55°C durante 1 h, tras lo cual se volvió a añadir proteinasa K y a incubar 1 h a 55°C. Tras el segundo tratamiento, las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante una noche y después fueron congeladas a -20°C.

8.- Extracto de células muertas enteras.

Las bacterias se crecieron a 37°C con un 10% CO₂ en TSB-YE-S durante 48 h y con agitación orbital a 110 rpm. A continuación, se inactivaron con la adición de fenol hasta una concentración final de 0,05% y se mantuvieron 72 h en agitación a 37°C. Los cultivos resultantes se sembraron e incubaron en placas de TSA-YE-S para comprobar la inactivación de las bacterias. Posteriormente, las bacterias se centrifugaron (5.000 g durante 15 min), se lavaron con H₂O y el sedimento se resuspendió en H₂O destilada estéril y se conservó mediante liofilización.

9.- Tricina SDS-PAGE y tinción de plata.

Las muestras de LPS se analizaron mediante el sistema Tris-tricina-HCl-glicina descrito por Lesse (Lesse *et al.*, 1990). Para ello, se preparó un gel de acrilamida-bisacrilamida con dos fases usando una solución concentrada 49,5% T 6% C de acrilamida-bisacrilamida para el gel de carrera, y de 49,5% T 3% C para el gel de concentración. Los geles se prepararon entre cristales de 16 × 20 cm, con una

concentración final de acrilamida del 18% para los geles de carrera y 4% para los geles de concentración, en una solución 3M Tris 0,3% SDS, a pH 8,45 en ambos casos. El gel se situó entre soluciones de ánodo (0,2M Tris HCl, pH 8,9) y de cátodo (0,2M Tris-HCl, 0,1M tricina, 0,1% SDS, pH 8,45). Los extractos de LPS se resuspendieron hasta obtener una concentración final de 0,04 M Tris-HCl, 4% glicerol, 0,00125% azul de bromofenol. Posteriormente, se llevó a cabo la electroforesis a voltaje constante de 30 V durante 1 h y de 70 V durante 20 h. Los geles se revelaron por el sistema de plata alcalina-periodato descrito por Tsai y Frasch (Tsai and Frasch, 1982). Para ello, los geles se fijaron en etanol al 40% y ácido acético durante 16 h y se oxidaron posteriormente con una solución 0,7% ácido periódico en agua. Posteriormente, se realizó la tinción con plata amoniacal (NaOH al 0,077%, amoniac [Merck] al 0,35% y nitrato de plata al 0,8%) durante 30 min y revelado con ácido cítrico al 0,005%-formaldehído al 0,0185%. La reacción se detuvo con ácido acético al 1%. Las imágenes fueron tomadas con una cámara Panasonic Lumix DMZ-6.

10.- Western-blot.

Los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa empapada en un tampón 0,048M Tris, 0,039 glicina, 0,0375% SDS, 20% (vol/vol) etanol, con intensidad constante de 0,8 mA/cm² durante 1 h. A continuación, las membranas fueron incubadas durante 45 min en una solución de leche desnatada en polvo (Regilait) al 1% en PBS, para bloquear la reacción y evitar reacciones inespecíficas. Posteriormente, se incubaron durante toda la noche con los MoAbs descritos en la Tabla 4. Después de dos lavados de 10 min con una suspensión de Tween20 (Sigma) al 0,05% en PBS (PBS-Tween) y uno con PBS, se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG (H+L) de ratón obtenido en cabra y marcado con peroxidasa (Calbiochem) y se incubó 1 h protegido de la luz. Finalmente, las membranas se lavaron tres veces con PBS y se revelaron por quimioluminiscencia (Supersignal West Pico Chemiluminiscent substrate, Thermo Scientific).

Tabla 4. MoAbs utilizados en este trabajo

	Especificidad	Nombre
Anti R		A68/10A06/B11
		A68/03F03/D5
		A68/24D08/G09
		A68/24G12/A08
		A76/10B10/A01
Anti O	C (A=M)	07F09
		A76/12G12/F12
	C (M>A)	12B12
	M	A15/05G02/E11
	C/Y (A=M)	A53/18H08/A2
	C/Y (A>M)	B66/04F09
	05D04	
	A	B66/02C08/C04
Anti Omp31		A59/10F09/G01
Anti Omp25		A59/05F01/C09
		02C12
Anti Omp16		A68/04G01/C06
		A76/08C03/G03
Anti Omp19		A68/25H10/A05
		A76/05C10/A08
Anti Omp2b		A68/15B06/C08
		A68/25G05/A05
		A63/04D11/G01

M y **A**: epítomos de la cadena O presentes en especies de *Brucella* M dominante y A dominante; **C**: epítomo común entre las cepas lisas de *Brucella*; **C/Y**: epítomo común entre las cepas lisas de *Brucella* y *Y. enterocolitica* O:9, con mayor afinidad por especies A- dominante (**A>M**), M- dominante (**M>A**) o similar en ambas (**A=M**) (Weynants *et al.*, 1997). Los anticuerpos fueron cedidos por Axel Cloeckaert y Michel Zygmunt (Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, Tours, Francia).

11.- ELISA indirecto.

Las células enteras inactivadas con fenol (ver apartado 8) de cada cepa obtenida y de *B. ovis* PA (control) se emplearon como antígeno, siguiendo los procedimientos descritos por Cloeckaert (Cloeckaert *et al.*, 1993; Cloeckaert *et al.*, 1993), con alguna modificación. Las bacterias liofilizadas se resuspendieron en PBS ajustando por espectrofotometría a una DO₆₀₀ de 1 y se distribuyeron 100 µL de la suspensión en placas de 96 pocillos de fondo plano (Maxisorp Nunc Immunoplate, Thermo Scientific) y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente para tapizar el fondo del pocillo. Al día siguiente, se lavaron los pocillos cinco veces con PBS-Tween, y, después, se

añadieron 100 μ L del correspondiente (Tabla 4) MoAb (sobrenadante del hibridoma diluido 1:3 en PBS-Tween) y se incubó a 37°C durante 1 h. Los anticuerpos que reaccionaron frente al correspondiente antígeno fueron detectados con IgG de afinidad purificada de cabra frente a ratón (cadenas ligera y pesada) conjugada con peroxidasa de rábano (Biorad; 1:6000) y se incubaron 1 h a temperatura ambiente. La actividad enzimática se reveló mediante la adición de sustrato de peroxidasa TMB ELISA (Interchim) y la reacción se detuvo con solución de frenado basada en HCl 1M (Uptima), después de 20 min de incubación a temperatura ambiente en oscuridad. Los resultados se leyeron a DO₄₅₀ con un lector de microplacas (Thermo Scientific).

Se evaluaron también las células enteras con sueros de carnero infectado con *B. ovis* o *B. melitensis*, según una modificación del protocolo de Ficapal et al. (Ficapal *et al.*, 1995). En este caso, el antígeno fue suspendido en solución carbonato/bicarbonato sódico pH 9,6 hasta una DO₆₀₀ de 1, ajustada por espectrofotometría. Se realizaron diluciones seriadas a partir de esta concentración, estimándose que la cantidad óptima de antígeno para el ELISA correspondía a la dilución de 1:400. Tras añadir 100 μ L/pocillo de la suspensión de antígeno, las placas de 96 pocillos de fondo plano se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se lavaron los pocillos cinco veces con PBS-Tween, para después añadir 100 μ L de diluciones seriadas de suero de carnero en PBS-Tween, e incubar la reacción a 37°C durante 1 h. Para evitar reacciones inespecíficas, las placas se incubaron durante 1 h a 37°C con PBS-leche desnatada al 1%. Los anticuerpos reaccionantes se detectaron añadiendo 100 μ L de proteína G conjugada con peroxidasa de rábano (Pierce) a 0,04 μ g/mL e incubando 1 h a temperatura ambiente. El mecanismo de revelado y detección fue el mismo que el descrito para los ELISA con MoAbs.

12.- Ensayo de autoaglutinación.

Para evaluar la capacidad de las bacterias de adherirse entre ellas, se crecieron las distintas cepas en placas de TSA-YE-S. Se resuspendieron en caldo de cultivo TSB-YE-S hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,8. A partir de ahí, se traspasó 1 mL a una cubeta de espectrofotómetro, se mantuvieron las suspensiones estáticas a temperatura ambiente y se realizaron medidas de densidad óptica a lo largo del tiempo hasta 48 h. Como

blanco, se empleó una cubeta con TSB-YE-S. Con los datos obtenidos, se calculó por cada tiempo el porcentaje de bacterias que se mantienen en suspensión, dividiendo el valor de DO obtenido en cada tiempo de lectura entre el valor obtenido a tiempo cero. Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar del ratio de DO obtenida, en cada punto de tiempo analizado, en tres ensayos independientes.

13.- Sensibilidad a la polimixina B.

A partir de cultivos en placa de TSA-YE-S, se prepararon soluciones ajustadas a una concentración de 2×10^4 UFC/mL en PBS y se distribuyeron (100 μ L/pocillo) en placas microtituladas que contenían polimixina B (Sigma, 8.060 UI/mg) a una concentración de 3 mg/mL en PBS o PBS solo, como control. Después de 1 h de incubación a 37°C en atmósfera enriquecida con un 10% de CO₂, se sembraron 50 μ L de cada muestra en placas TSA-YE-S, por triplicado. Los resultados se expresaron como la media y desviación estándar del porcentaje de UFC expuestas a polimixina B con respecto al control (UFC expuestas a PBS). Los resultados se analizaron mediante un test ANOVA de una vía seguido de análisis con el test de las mínimas diferencias significativas protegidas (PLSD) de Fisher. Se determinó también la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de la polimixina B en las cepas mutantes con placas de Müller-Hinton suplementado con suero por los procedimientos estándar.

14.- Sensibilidad a la acción bactericida del suero no inmune de carnero.

A partir de cultivos de cada cepa obtenidos en placas de TSA-YE-S, se prepararon suspensiones bacterianas que contenían 2×10^4 UFC/mL en PBS y se dispensaron por triplicado, 50 μ L de suspensión/pocillo, en placas de 96 pocillos que contenían 150 μ L/pocillo de suero convencional (no inmune) de carnero recién extraído o suero de los mismos animales que había sido previamente calentado a 56°C durante 30 min para inactivar el complemento. Tras la incubación de las placas durante 90 y 180 min a 37°C con un 10% de CO₂, se realizaron diluciones decimales seriadas y se sembraron 50 μ L de cada dilución en placas de TSA-YE-S, por triplicado, para determinar el número de bacterias viables por pocillo. Los resultados se expresaron como de la media y desviación estándar del porcentaje de UFC expuestas al suero convencional con respecto a las expuestas al suero descomplementado. El suero convencional no inmune de carnero fue

facilitado por M.J. de Miguel (CITA, Zaragoza). Los resultados se analizaron mediante un test ANOVA de una vía seguido de análisis con el test de las mínimas diferencias significativas protegidas (PLSD) de Fisher.

15.- Potencial Zeta.

Para detectar diferencias en el potencial de membrana de las distintas cepas se midió el potencial Z (González *et al.*, 2008). Para ello, se cultivaron las bacterias en TSA-YE-S durante 72 h, se inactivaron con fenol al 0,5% durante 24 h (ver Apartado 8), se centrifugaron ($7.000 \times g$, 15 min, 4°C), se lavaron una vez con CsCl 1 mM en HEPES 10 mM (pH 7,2) o KCl 0,1M y se resuspendieron en la misma solución hasta una DO_{600} igual a 0,2. El potencial Z se midió en un aparato Zetamaster (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, Gran Bretaña) con el programa PCS 1.27. Los resultados se analizaron mediante un test ANOVA de una vía seguido de análisis con el test de las mínimas diferencias significativas protegidas (PLSD) de Fisher.

16.- Virulencia y eficacia vacunal frente a la infección por *B. ovis* en ratones.

Se emplearon ratones hembra raza BALB/c de 8-10 semanas de vida, adquiridos en Charles River International (Francia). Los animales se distribuyeron y acomodaron en las instalaciones de la Universidad Pública de Navarra (código de registro ES/31-2016-000002-CR-SU-US) durante 1-2 semanas antes de empezar y durante los ensayos, en cajas apropiadas, con agua y alimento *ad libitum*. Los procedimientos que se llevaron a cabo fueron diseñados de acuerdo con las actuales legislaciones nacional y Europea (RD 53/2013 y Directiva UE 2010/63, respectivamente) respecto al uso de animales para experimentación y otros fines científicos. Las inoculaciones se llevaron a cabo con 0,1 mL de suspensión bacteriana previamente ajustada a una DO_{600} de 0,170 (alrededor de 1×10^9 UFC/mL) y diluida en PBS estéril hasta la dosis adecuada (Grilló *et al.*, 2006). La dosis exacta inoculada se determinó de forma retrospectiva mediante diluciones decimales en PBS y siembra en BAB-S.

Para los ensayos de virulencia, los ratones (n=10) fueron inoculados por vía intraperitoneal con $5-7 \times 10^5$ UFC/ratón de la correspondiente cepa bacteriana, y se determinó el número de bacterias viables en el bazo (n=5) a las 3 y 10 semanas post-inoculación, según lo descrito previamente (Grilló *et al.*, 2006). Como controles, se

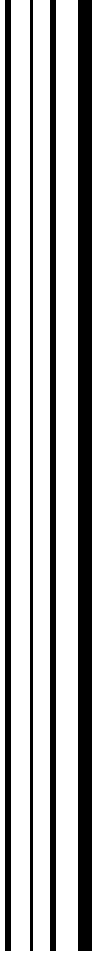
utilizaron ratones (n=10) inoculados en las mismas condiciones experimentales con la cepa virulenta de referencia *B. ovis* PA o la correspondiente cepa revertida a genotipo salvaje, para descartar que la atenuación fuera adquirida durante el proceso de mutagénesis de las cepas. La identidad de los aislamientos del bazo se confirmó en cada intervalo analizado, mediante PCR y comprobación de las características fenotípicas típicas de *B. ovis* (Alton *et al.*, 1987). Los niveles de infección esplénica se expresaron como la media \pm desviación estándar (n=5) de los \log_{10} UFC/bazo obtenidos a los intervalos de tiempo indicados (Grilló *et al.*, 2006).

Para los experimentos de protección, los ratones BALB/c (n=10) fueron vacunados por vía intraperitoneal con 1×10^8 UFC/ratón de la correspondiente cepa mutante de *B. ovis* PA, o por vía subcutánea con 1×10^5 UFC/ratón de la cepa vacunal de referencia *B. melitensis* Rev1, utilizada como control de vacunación estándar. Además, se incluyó un grupo de animales (n=10) inoculados con 0,1 mL de PBS (pH 6,8) como control de infección en animales no vacunados. Cuatro semanas después de la vacunación, se llevó a cabo el desafío en todos los ratones por vía intraperitoneal con 5×10^5 UFC/ratón de la cepa virulenta *B. ovis* PA-Gm^R (Tabla 1) y, 3 semanas después, se determinó el número de bacterias del desafío existentes en los bazos (Cloeckaert *et al.*, 2004). La diferenciación entre la cepa desafío y las bacterias vacunales residuales se llevó a cabo mediante siembra doble en BAB-S y BAB-S suplementado con Gm, que sólo permite el crecimiento de la cepa desafío. Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar (n=10) de los \log_{10} individuales de la cepa desafío *B. ovis* PA-Gm^R.

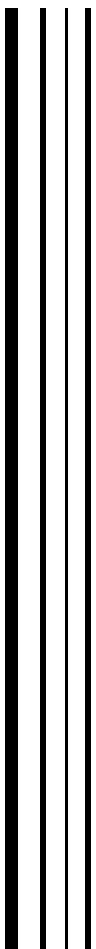
La virulencia de la cepa desafío *B. ovis* PA-Gm^R se estudió en un experimento preliminar con ratones BALB/c (n=5) infectados por vía intraperitoneal con 5×10^5 UFC/ratón y recuento bacteriano de los bazos a las 3 semanas post infección. Esta cepa mostró recuentos idénticos en BAB-S y BAB-S suplementado con Gm, y con respecto a los niveles de multiplicación mostrados por *B. ovis* PA en este modelo (datos no mostrados).

En todos los experimentos con animales, las comparaciones estadísticas de medias de los \log_{10} UFC/bazo se realizaron mediante un test ANOVA de una vía seguido de análisis con el test de las mínimas diferencias significativas protegidas (PLSD) de Fisher (Grilló *et al.*, 2006). La proporción de animales curados con respecto a los

analizados al final del estudio se comparó mediante un test de Chi-cuadrado de Fisher con la corrección de Fisher-Yates.



Resultados



I. EVALUACIÓN *IN SILICO* DE ORTÓLOGOS A GENES IMPLICADOS EN LA SÍNTESIS DEL LPS DE *Brucella*.

El genoma de *B. ovis* fue publicado por primera vez en 2009 (Tsolis *et al.*, 2009), lo que ha facilitado el análisis molecular de la bacteria. Como se ha comentado en la Introducción, *B. ovis* es una bacteria muy adaptada a su hospedador. En este proceso muchos genes se han degradado, e incluso algunas regiones han ido desapareciendo. Por ello, nos propusimos en primer lugar revisar las secuencias de algunos de los genes implicados en la síntesis del LPS en *B. ovis*. Para ello, primero se realizó una comparación *in silico* de secuencias entre las diferentes especies de *Brucella* y *B. ovis* ATCC 25840 (la única cepa de *B. ovis* secuenciada y anotada hasta la fecha de comienzo de este trabajo). Posteriormente, secuenciamos algunos de estos genes en cinco aislamientos diferentes de *B. ovis*. Por último, gracias a la publicación en NCBI de borradores del genoma de varias cepas de *B. ovis*, complementamos este estudio con una comparación entre todos ellos.

1. Comparación de genes implicados en la síntesis del LPS en distintas especies del género *Brucella*.

La Tabla 5 muestra algunas de las ORFs implicadas en la síntesis del LPS encontradas en las cepas de *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, *B. canis*, *B. pinnipedialis*, *B. microti* y *B. ovis*. Tomando como referencia el genoma de *B. melitensis*, se indica el porcentaje de homología en la secuencia proteica entre las distintas cepas. Estos resultados aparecen representados también en la Figura 4. Como se puede observar, todos los genes tienen una muy alta homología, situándose la mayoría entorno al 99%.

La construcción del núcleo del LPS se produce mediante la adición sucesiva de azúcares. Por el momento, sólo se han conseguido caracterizar tres glicosiltransferasas relacionadas directamente con la síntesis del núcleo: los genes *wadA*, *wadB* y *wadC*. Al analizar la secuencia del gen *wadA* observamos que la correspondiente proteína anotada en *B. melitensis* tiene un tamaño de 703 Aa, mientras que en el resto de las especies el tamaño era distinto. En *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. pinnipedialis* y *B. microti* la proteína WadA está anotada con un tamaño de 759 Aa, y la de *B. ovis* de 721 Aa. Sin embargo, al revisar la secuencia nucleotídica corriente arriba de esta ORF se

Tabla 5. ORF de los genes relacionados con la síntesis del LPS estudiados en las distintas especies de *Brucella* y su homología en la secuencia proteica con respecto a *B. melitensis*.

Gen	<i>B. melitensis</i>		<i>B. ovis</i>		<i>B. abortus</i>		<i>B. suis</i>		<i>B. canis</i>		<i>B. pinnipedialis</i>		<i>B. microti</i>	
	ORF	%	ORF	%	ORF	%	ORF	%	ORF	%	ORF	%	ORF	%
<i>wadA</i>	BMEI1326		BOV_0614	99,17	BAB1_0639	99,86	BR0615	99,57	BCAN_A0631	99,57	BPI_1652	99,86	BMI_1614	99,86
<i>wadB</i>	BMEI1602		BOV_0337	99,58	BAB1_0351	100	BR0321	99,58	BCAN_A0330	99,58	BPI_1356	99,58	BMI_1327	99,58
<i>wadC</i>	BMEI0509		BOV_1453	100	BAB1_1522	100	BR1503	100	BCAN_A1540	100	BPI_1557	100	BMI_1517	100
BMEI1540	BMEI1540		BOV_0400	99,40	BAB1_0417	98,81	BR0388	99,40	BCAN_A0393	-	BPI_1421	99,4	BMI_1392	99,4
BMEI0418	BMEI0418		BOV_1547	99,62	BAB1_1620	100	BR1605	99,23	BCAN_A1641	98,85	BPI_1659	99,62	BMI_11619	99,62
BMEI1101	BMEI1101		BOV_A0124	98,77	BAB2_0133	99,69	BRA0135	99,39	BCAN_B0139	99,39	BPI_1135	99,39	BMI_1135	99,39
<i>manBoAg</i>	BMEI1396		BOV_0540	96,97	BAB1_0560	99,3	BR0537	97,2	BCAN_A0549	97,2	-	-	BMI_1536	97,2
<i>manB_{core}</i>	BMEI0899		BOV_A0316	-	BAB2_0855	100	BRA0348	99,58	BCAN_B0350	99,58	BPI_11347	99,79	BMI_11344	99,37
<i>per</i>	BMEI1414		BOV_0525	98,82	BAB1_0544	100	BR0521	99,46	BCAN_A0533	99,46	BPI_1552	98,91	BMI_1523	99,72
<i>lpxE 1</i>	BMEI1212		BOV_0735	99,22	BAB1_0761	99,22	BR0740	99,61	BCAN_A0755	99,22	BPI_1777	99,61	BMI_1738	99,61
<i>lpxE 2</i>	BMEI1103		BOV_A0122	99,69	BAB2_0131	100	BRA0131	100	BCAN_B0135	99,38	BPI_11131	100	BMI_11131	100
<i>lptA</i>	BMEI0118		BOV_1874	99,63	BAB1_1949	-	BR1948	99,82	BCAN_A1992	99,82	BPI_12007	99,82	BMI_11970	99,63

comprobó que está conservada en todas las especies, por lo que asumimos que estas diferencias de tamaño en la proteína anotada se deben a un error en la anotación del gen. Al corregir las secuencias, la homología de esta proteína en todas las especies es superior al 99% (Tabla 5). La glicosiltransferasa *wadB* es idéntica entre *B. abortus* y *B. melitensis*, y difieren del resto de especies en el nucleótido 466: sustitución de una T por una C que provoca un cambio de una Phe por una Leu. La manosiltransferasa *wadC* de *B. melitensis* y de *B. canis*, difieren del resto en tres y un nucleótido, respectivamente. Sin embargo, estas mutaciones son silentes y no producen cambios en la secuencia proteica (100% de homología en todas ellas).

Gil-Ramírez ya revisó posibles ORFs que estuvieran relacionadas con la síntesis del LPS en *Brucella* (Gil-Ramírez, 2011). En nuestro trabajo hemos ampliado el estudio en tres ORFs concretas: BMEI0418, de la que se construyó un mutante en *B. abortus* (ORF BAB1_1620), pero no se llegó a encontrar relación con la síntesis del LPS; BMEI1540, que se anotó como posible glicosiltransferasa; y BMEII1101, una hipotética bactoprenol transferasa/bactoprenol aciltransferasa. En el primer caso (BMEI0418), la secuencia de *B. melitensis* está anotada también con posible codón de inicio ATG en 24 nucleótidos antes que el resto, con lo cual aparece una secuencia proteica ocho Aa más larga. En esta sección de 24 pares de bases, *B. ovis*, *B. pinnipedialis* y *B. microti* tienen una deleción de un nucleótido de G, generando un codón de parada prematuro. No obstante, el dominio glicosiltransferasa sigue intacto en la proteína final, por lo que es posible que en ambos casos la proteína esté activa con una diferencia en la región inicial. El gen BMEI1540 tiene un corrimiento en el marco de lectura en su homólogo en *B. canis* (BCAN_A0393) generando una secuencia no funcional. *B. abortus* y *B. melitensis* tienen sendos aminoácidos diferentes con respecto a la secuencia del resto de cepas: Gly por Ala en posición 99 en *B. melitensis* y Leu por Pro en posición 111 en *B. abortus*. En cuanto BMEII1101, *B. ovis*, *B. abortus* y *B. melitensis* difieren en uno, uno y dos aminoácidos respectivamente, conservando la funcionalidad según las predicciones (Interpro): Tyr por Phe en posición 223 en *B. ovis*, Ser por Asn en posición 32 en *B. melitensis*, y Asp por Gly en posición 165 en *B. melitensis* y *B. abortus*.

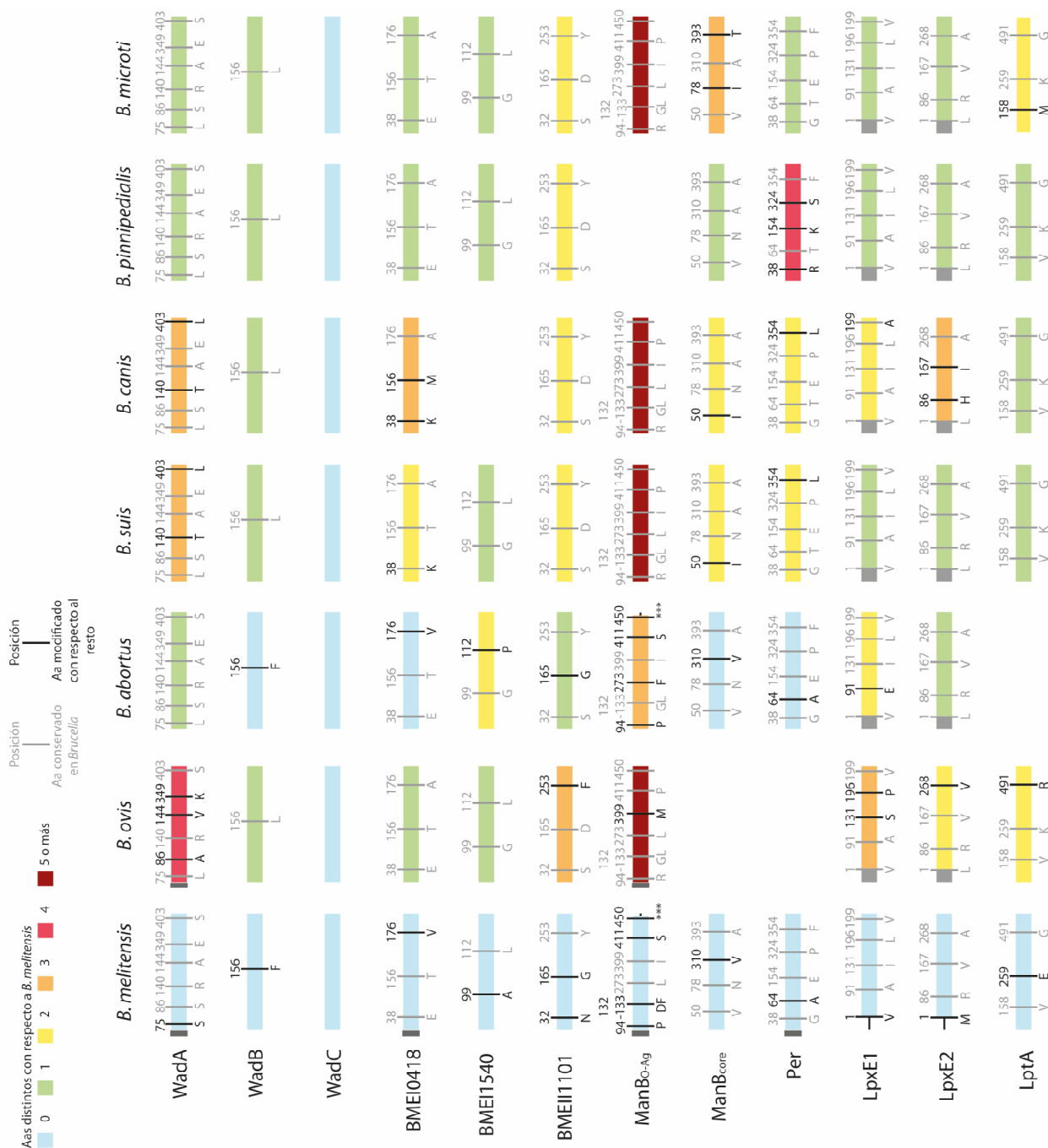


Figura 4. Homologías de los distintos genes en las distintas especies de *Brucella* estudiadas. La escala de color indica el número de aminoácidos diferentes con respecto a *B. melitensis*. Las zonas en gris corresponden a los inicios alternativos que aparecen anotados y no se tienen en cuenta. Los aminoácidos que varían con respecto al resto de las cepas que aparecen resaltados en negro. Los asteriscos indican la zona a partir de la cual la secuencia de aminoácidos diverge.

Otros genes involucrados en la síntesis del LPS de *Brucella* son aquellos encargados de la modificación de azúcares, para su posterior incorporación en el LPS. Aquí revisamos tres de estos genes: *per*, *manB_{core}* y *manB_{O-Ag}*. El gen *per* de la perosamina sintasa aparece en todas las especies de *Brucella*, generando una proteína de 367 Aa en la mayoría de los casos. Sin embargo, en *B. ovis* está anotada como una proteína de 255 Aa porque tiene una deleción en un nucleótido que hace que la proteína sea no funcional, por lo que debería estar anotado como un pseudogen y no como una aminotransferasa (aunque la región carboxi-terminal tiene un dominio aminotransferasa). Además, en *B. melitensis* el gen *per* aparece con un inicio de transcripción distinto, y por ello anotada como una proteína de 380 Aa. No existen, sin embargo, diferencias en las secuencias corriente arriba con las otras especies, por lo que se sugiere que la proteína esté mal anotada en *B. melitensis*.

El gen *manB_{core}* codifica una fosfomanomutasa. Este se encuentra situado en el cromosoma II y su final se superpone con el gen *manC_{core}*. La disrupción de este gen en *B. abortus* y *B. melitensis* genera mutantes que son rugosos y mediante SDS-PAGE se puede observar que el tamaño aparente del núcleo de estas cepas es inferior. Estos mutantes se postula que son incapaces de sintetizar la cadena O y muchos azúcares del núcleo, al anular la vía de síntesis de sus precursores. La secuencia en *B. ovis* aparece anotada como un pseudogen. Zygmunt et al. describieron que este gen posee una deleción de una base que hace que la proteína termine de forma prematura, pero, según estos autores, sin afectar a su función (Zygmunt *et al.*, 2009). El análisis funcional de la proteína con la herramienta Interpro muestra que la proteína está dividida en cuatro dominios funcionales *B. melitensis*. En el caso de *B. ovis*, los dominios III y IV están ausentes, por lo que parece improbable que esta proteína esté activa, contrariamente a lo sugerido con anterioridad.

```

B. canis -----MVYVSAFLQHLSHNFSYETVYVGADLRESSPK
B. microti -----MVYVSAFLQHLSHNFSYETVYVGADLRESSPK
B. suis -----MVYVSAFLQHLSHNFSYETVYVGADLRESSPK
B. ovis -----MPVAFGTSGLRGESVDFTDNVCMVYVSAFLQHLSHNFSYETVYVGADLRESSPK
B. melitensis MRKTTEMPVAFGTSGLRGESVDFTDNVCMVYVSAFLQHLSHNFSYETVYVGADLRESSPK
B. abortus -----MVYVSAFLQHLSHNFSYETVYVGADLRESSPK
*****

B. canis ITISCYRAIELTGRRAIWAGNVPTPALAAYAMARNAPAIMITGSHIPEAYNGIKFYRPDG
B. microti ITISCYRAIELTGRRAIWAGNVPTPALAAYAMARNAPAIMITGSHIPEAYNGIKFYRPDG
B. suis ITISCYRAIELTGRRAIWAGNVPTPALAAYAMARNAPAIMITGSHIPEAYNGIKFYRPDG
B. ovis ITISCYRAIELTGRRAIWAGNVPTPALAAYAMARNAPAIMITGSHIPEAYNGIKFYRPDG
B. melitensis ITISCYRAIELTGRRAIWAGNVPTPALAAYAMA P NAPAIMITGSHIPEAYNGIKFYRPDG
B. abortus ITISCYRAIELTGRRAIWAGNVPTPALAAYAMA P NAPAIMITGSHIPEAYNGIKFYRPDG
*****

B. canis EFLKDDEAPVRGLAEELLSKVVDGQRSVNLPAPLADVAEEYVSRSIGAFGRDTLAGMKIG
B. microti EFLKDDEAPVRGLAEELLSKVVDGQRSVNLPAPLADVAEEYVSRSIGAFGRDTLAGMKIG
B. suis EFLKDDEAPVRGLAEELLSKVVDGQRSVNLPAPLADVAEEYVSRSIGAFGRDTLAGMKIG
B. ovis EFLKDDEAPVRGLAEELLSKVVDGQRSVNLPAPLADVAEEYVSRSIGAFGRDTLAGMKIG
B. melitensis EFLKDDEAPVR D FAEELLSKVVDGQRSVNLPAPLADVAEEYVSRSIGAFGRDTLAGMKIG
B. abortus EFLKDDEAPVRGLAEELLSKVVDGQRSVNLPAPLADVAEEYVSRSIGAFGRDTLAGMKIG
*****. : *****

B. canis IDLHSAVGRDILVRIFKGLGAEVYPFRRTENFVAVDTEALDPADISRARTFIAEHGLDAV
B. microti IDLHSAVGRDILVRIFKGLGAEVYPFRRTENFVAVDTEALDPADISRARTFIAEHGLDAV
B. suis IDLHSAVGRDILVRIFKGLGAEVYPFRRTENFVAVDTEALDPADISRARTFIAEHGLDAV
B. ovis IDLHSAVGRDILVRIFKGLGAEVYPFRRTENFVAVDTEALDPADISRARTFIAEHGLDAV
B. melitensis IDLHSAVGRDILVRIFKGLGAEVYPFRRTENFVAVDTEALDPADISRARTFIAEHGLDAV
B. abortus IDLHSAVGRDILVRIFKGLGAEVYPFRRTENFVAVDTEALDPADISRARTFIAEHGLDAV
*****

B. canis VSTDGDRPLVIDDQGRQVNGDTLGILTARYLRAKTVVTPPLSTTSALEESGWFIHRT
B. microti VSTDGDRPLVIDDQGRQVNGDTLGILTARYLRAKTVVTPPLSTTSALEESGWFIHRT
B. suis VSTDGDRPLVIDDQGRQVNGDTLGILTARYLRAKTVVTPPLSTTSALEESGWFIHRT
B. ovis VSTDGDRPLVIDDQGRQVNGDTLGILTARYLRAKTVVTPPLSTTSALEESGWFIHRT
B. melitensis VSTDGDRPLVIDDQGRQVNGDTLGILTARYLRAKTVVTPPLSTTSALEESGWFIHRT
B. abortus VSTDGDRPLVIDDQGRQVNGDTLGILTARY F RAKTVVTPPLSTTSALEESGWFIHRT
*****. : *****

B. canis RIGSPYVVVEMARAVAHVPVGFEEANGGFLGDDVALKTGLLRRLPTRDAVLPVAVLAQA
B. microti RIGSPYVVVEMARAVAHVPVGFEEANGGFLGDDVALKTGLLRRLPTRDAVLPVAVLAQA
B. suis RIGSPYVVVEMARAVAHVPVGFEEANGGFLGDDVALKTGLLRRLPTRDAVLPVAVLAQA
B. ovis RIGSPYVVVEMARAVAHVPVGFEEANGGFLGDDVALKTGLLRRLPTRDAVLPVAVLAQA
B. melitensis RIGSPYVVVEMARAVAHVPVGFEEANGGFLGDDVALKTGLLRRLPTRDAVLPVAVLAQA
B. abortus RIGSPYVVVEMARAVAHVPVGFEEANGGFLGDDVALKTGLLRRLPTRDAVLPVAVLAQA
*****

B. canis KDQGMRLSEMVATLPSRFMKADRVEKVPDRAAPFLHAIETSQSFRSNFSPLIAEPEAIS
B. microti KDQGMRLSEMVATLPSRFMKADRVEKVPDRAAPFLHAIETSQSFRSNFSPLIAEPEAIS
B. suis KDQGMRLSEMVATLPSRFMKADRVEKVPDRAAPFLHAIETSQSFRSNFSPLIAEPEAIS
B. ovis KDQGMRLSEMVATLPSRFMKADRVEKVPDRAAPFLHAIETSQSFRSNFSPLIAEPEAIS
B. melitensis KDQGMRLSEMVATLPSRFMKADRVEKVPDRAAPFLHAIETSQSFRSNFS S LIAEPEAIS
B. abortus KDQGMRLSEMVATLPSRFMKADRVEKVPDRAAPFLHAIETSQSFRSNFS S LIAEPEAIS
*****. : *****

B. canis TVDGVRMAFANGDTVHFRQSGNAPEMRIYIETDSAECTDRMLSEFIAKLSETI
B. microti TVDGVRMAFANGDTVHFRQSGNAPEMRIYIETDSAECTDRMLSEFIAKLSETI
B. suis TVDGVRMAFANGDTVHFRQSGNAPEMRIYIETDSAECTDRMLSEFIAKLSETI
B. ovis TVDGVRMAFANGDTVHFRQSGNAPEMRIYIETDSAECTDRMLSEFIAKLSETI
B. melitensis TVDGVRMAFANGDTVHFRQSGNAPEMRIY R NGRFGEN-----
B. abortus TVDGVRMAFANGDTVHFRQSGNAPEMRIY R NGRFGEN-----
*****. : .*:

```

Figura 5. Comparación del gen *manB*_{O-Ag} en las distintas especies de *Brucella*.

El gen *manB_{O-Ag}* se sitúa dentro de la región *wbk* del genoma de *Brucella*, una región que concentra genes implicados en la síntesis de la cadena O del LPS. Al estar situado próximo a los genes *manA_{O-Ag}*, *manC_{O-Ag}*, *gmd* y *per*, inicialmente se pensó que *manB_{O-Ag}* podría estar relacionada con la síntesis azúcares precursores del LPS (Iriarte *et al.*, 2004; González *et al.*, 2008). Sin embargo, los correspondientes mutantes en *B. abortus* y *B. melitensis* no generaron un fenotipo LPS rugoso. Al comparar las secuencias proteicas entre las distintas especies, se pueden observar diferencias en *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. ovis*. En el inicio de la proteína, *B. melitensis* está anotada con 28 Aa más y *B. ovis* con 22 Aa. Sin embargo, el análisis de estas regiones en el DNA demuestra que la región corriente arriba en todas las especies es idéntica, lo que sugiere que estas diferencias de Aa se deben de nuevo a un error en la anotación en *B. melitensis* y *B. ovis*. Además, en *B. abortus* y *B. melitensis* hay una modificación al final de la proteína, debido a que aparece una delección de dos nucleótidos (posiciones 1277-1278 en el resto de especies) que genera un cambio en la secuencia al final del gen (Figura 5). Al analizar la proteína completa ManB_{O-Ag} con Interpro, se confirmó que esta proteína se asocia a una fosfomanomutasa con cuatro dominios funcionales. Sin embargo, las secuencias de *B. abortus* y *B. melitensis* generan una proteína en la que el último dominio aparece truncado, y por tanto no es funcional. Sin embargo, este gen sí posee los cuatro dominios en *B. ovis*, por lo que podría pensarse que estuviera supliendo la función del pseudogen *manB_{core}* en la síntesis del núcleo. Además, en *B. pinnipedialis* tiene un elemento *IS711* de 842 pb insertado dentro de la ORF que lo inactiva (Zygmunt *et al.*, 2009). En conjunto, los datos demuestran que la proteína ManB_{O-Ag} es la más polimórfica de las analizadas, con homologías que van del 96,9 hasta 99,3, nunca el 100%.

Los genes *lpxE1* y *lpxE2* codifican fosfatasa que son ortólogos al gen *lpxE* de *Rhizobium leguminosarum*, una fosfatasa encargada de modificar el esqueleto del lípido A una vez sintetizado alterando el PAMP. En los mutantes obtenidos en *B. abortus* BaΔ*lpxE1*, BaΔ*lpxE2* y el doble mutante BaΔ*lpxE1*Δ*lpxE2* seguían apareciendo formas monofosforiladas del LPS, lo que hizo dudar de su exclusividad o su función como fosfatasa del lípido A (Conde-Álvarez, 2008). Estos genes muestran una alta homología entre todas las especies de *Brucella* analizadas. Sin embargo, en *B. melitensis* ambos genes tienen un inicio de la transcripción anotado diferente. Las secuencias de 600

nucleótidos corriente arriba tampoco mostraron diferencias, por lo que es posible que el inicio de la transcripción esté erróneamente anotado en el caso de *B. melitensis*. El gen *lptA* codifica una enzima encargada de transferir una etanolamina-fosfato al lípido A tras ser sintetizado, probablemente al esqueleto de diaminoglucosa. Está presente en el género *Brucella*, aunque *B. abortus* tiene una delección que provoca un codón de parada prematuro. Se postula que ésta modificación provoca un impedimento estérico al sistema inmunitario innato, escondiendo así los PAMPs (Gil-Ramírez, 2011). Así, se vio que el mutante en *B. melitensis* provoca cambios en la respuesta frente a suero y a polimixina B (Gil-Ramírez, 2011). La secuencia de la proteína tan sólo se diferencia en un aminoácido en *B. microti*, otro en *B. melitensis* y otro en *B. ovis*, sin llegar a afectar a la funcionalidad de la proteína.

2. Secuenciación de los genes relacionados con la síntesis del núcleo del LPS en aislamientos diferentes de *B. ovis* y comparación con las secuencias publicadas de *B. ovis*.

Para este estudio comparativo se emplearon muestras de DNA genómico de cinco aislamientos de *B. ovis* de muy diferente origen geográfico: PA, REO, Francia, Croacia y Argentina. Mediante PCR se amplificaron los genes *wadA*, *wadB*, *wadC*, *manB_{core}*, *manB_{O-Ag}*, BOV_0400 (ortólogo de BMEI1540), BOV_A0124 (ortólogo de BMEI1101) y BOV_1547 (ortólogo de BMEI00418). Los resultados se compararon con las secuencias publicadas de 15 cepas de *B. ovis* y de la cepa ATCC 25840 que se empleó como referencia (números de acceso en Tabla 3).

La secuenciación del gen *wadA* mostró que de los cinco aislamientos secuenciados sólo *B. ovis* REO mantuvo el 100% de identidad con la cepa de referencia *B. ovis* ATCC 25840. Lo mismo ocurrió con las secuencias de las cepas 63/96 y 80/125. Sin embargo, tanto *B. ovis* PA como el resto de aislamientos y las trece secuencias disponible en internet poseían un cambio de nucleótido, una A por una G en la posición 1213 desde el inicio de la ORF (Tabla 6). Esta modificación provoca un cambio en el Aa 349 de un Lys a Glu. Como hemos visto en el apartado anterior, en el resto de cepas de *Brucella* ese Aa también es Glu. En el caso del gen *wadB*, las cinco cepas secuenciadas en este trabajo mantuvieron el 100% de identidad de la ORF con la cepa de referencia. Sin

embargo, el análisis de las secuencias corriente arriba antes del inicio de esta ORF demostró un cambio de una base en la posición -280 en *B. ovis* REO. Al revisar las secuencias de los 15 borradores disponibles, encontramos ese mismo cambio en todas ellas excepto en las cepas 63/96 y la 80/125. No obstante, este cambio no afecta a la proteína. Los resultados de la secuenciación del gen *wadC* mostraron una homología del 100% en todas las cepas, también en los 15 borradores disponibles. Respecto a las supuestas glicosiltransferasas BOV_0400, BOV_1547 y BOV_A0124, todas ellas resultaron también 100% idénticas a la secuencia de la cepa de referencia.

Puesto que solo hay una cepa de *B. ovis* anotada, quisimos averiguar si la delección descrita en la ORF correspondiente a *manB_{core}* era una característica de la especie *B. ovis* o, por el contrario, una peculiaridad de esta única cepa secuenciada. El análisis comparativo demostró que la secuencia de este gen era idéntica en todas las cepas estudiadas. En todos los casos, esta ORF aparece truncada, lo que demuestra que es una característica de la especie *B. ovis* y sugiere que el gen *manB_{core}* esté inactivo. Respecto al gen *manB_{O-Ag}*, los datos de secuenciación no mostraron ninguna diferencia entre cuatro aislamientos, las 15 secuencias disponibles, y la secuencia de referencia, con la única excepción de la cepa *B. ovis* REO. En esta cepa, se observó una delección de una base en la posición 672 desde el codón de inicio, lo que provoca un codón de parada prematuro, creando una proteína de 233 aminoácidos en lugar de la proteína completa de 467. Al analizar este fragmento, se observó que la proteína delecionada resultante carece de los dominios fosfomanomutasa II, III y IV, lo que dejaría inactivada esta enzima en la cepa REO.

Tabla 6. Comparación de genes del núcleo del LPS en distintas cepas de *B. ovis*.

Cepa	Porcentaje de homología con respecto a <i>B. ovis</i> ATCC 25840							
	<i>wadA</i>	<i>wadB</i>	<i>wadC</i>	BOV_0400	BOV_1547	BOV_A0124	<i>manB</i> _{core}	<i>manB</i> _{O-Ag}
<i>B. ovis</i> PA	99 (1213 G) ^a	100 (-170 G) ^b	100	100	100	100	100	100
<i>B. ovis</i> REO	100	100	100	100	100	100	100	99 (Δ672T) ^c
<i>B. ovis</i> Verger	99 (1213 G) ^a	100 (-170 G) ^b	100	100	100	100	100	100
<i>B. ovis</i> Croacia	99 (1213 G) ^a	100 (-170 G) ^b	100	100	100	100	100	100
<i>B. ovis</i> Argentina	99 (1213 G) ^a	100 (-170 G) ^b	100	100	100	100	100	100
<i>B. ovis</i> 63/96	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>B. ovis</i> 80/125	100	100	100	100	100	100	100	100
<i>B. ovis</i> IntaBari-2009-88-4	99 (1213 G) ^a	100 (-170 G) ^b	100	100	100	100	100	100
<i>B. ovis</i> IntaBari-2006-46-348	99 (1213 G) ^a	100 (-170 G) ^b	100	100	100	100	100	100
<i>B. ovis</i> IntaBari-2010-47-268	99 (1213 G) ^a	100 (-170 G) ^b	100	100	100	100	100	100
<i>B. ovis</i> IntaBari-2006-46-332	99 (1213 G) ^a	100 (-170 G) ^b	100	100	100	100	100	100
<i>B. ovis</i> IntaBari-2010-47-871	99 (1213 G) ^a	100 (-170 G) ^b	100	100	100	100	100	100
<i>B. ovis</i> IntaBari-2002-82-58	99 (1213 G) ^a	100 (-170 G) ^b	100	100	100	100	100	100
<i>B. ovis</i> IntaBari-2001-319-5096	99 (1213 G) ^a	100 (-170 G) ^b	100	100	100	100	100	100
<i>B. ovis</i> IntaBari-2001-319-4082	99 (1213 G) ^a	100 (-170 G) ^b	100	100	100	100	100	100
<i>B. ovis</i> IntaBari-2008-114-542	99 (1213 G) ^a	100 (-170 G) ^b	100	100	100	100	100	100
<i>B. ovis</i> IntaBari-1993-758	99 (1213 G) ^a	100 (-170 G) ^b	100	100	100	100	100	100
<i>B. ovis</i> 81/8	99 (1213 G) ^a	100 (-170 G) ^b	100	100	100	100	100	100
<i>B. ovis</i> F8/05B	99 (1213 G) ^a	100 (-170 G) ^b	100	100	100	100	100	100
<i>B. ovis</i> IntaBari-2009-88-3	99 (1213 G) ^a	100 (-170 G) ^b	100	100	100	100	100	100

^a: Sustitución de un nucleótido de Adenina por otro de Guanina en la posición 1213 de la secuencia nucleotídica del gen *wadA*; ^b: Sustitución de un nucleótido de Adenina por otro de Guanina 170 nucleótidos corriente arriba del codón de inicio del gen *wadB*; ^c: Delección de una Timina en posición 672 de la secuencia nucleotídica del gen *manB*_{O-Ag}

II. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE ELISA, SDS-PAGE y WESTERN BLOT DE MUTANTES EN EL LPS DE *Brucella*.

De la colección de mutantes de *Brucella* del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Navarra, se seleccionaron aquellas cepas derivadas de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* con mutaciones en genes que estaban o podrían estar implicados en la síntesis del LPS, para profundizar en su caracterización (Tabla 1). Se excluyeron de este estudio mutantes en la cadena O, exceptuando los mutantes en el gen *per* de *B. melitensis* y *B. abortus* que se emplearon como control de núcleo del LPS completo. La caracterización incluyó un análisis mediante i-ELISA con siete MoAbs frente a la cadena O del LPS-S, cuatro frente al LPS rugoso y tres frente a OMPs (Omp25 y Omp31). Algunos mutantes fueron además analizados mediante SDS-PAGE y *Western blot* con MoAbs frente al núcleo del LPS.

1. ELISAS con células enteras.

Síntesis del lípido A (*lpxE1*, *lpxE2* y *lptA*)

El análisis de los mutantes en *B. abortus* $Ba\Delta lpxE1$, $Ba\Delta lpxE2$ y $Ba\Delta lpxE1\Delta lpxE2$ mediante ELISA (Figura 6), mostró que la delección de estos genes no afectaba de forma significativa al reconocimiento con MoAbs frente a la Omp25, Omp31 y la cadena O y el núcleo del LPS. En el mutante *B. melitensis* $Bm\Delta lptA$ (Figura 7) se observó un aumento significativo en la reacción con los MoAbs 05D04 y B66/04F09 anti-cadena O y un ligero aumento también con los MoAbs anti-OMPs. El resto de MoAbs frente a la cadena O y el LPS-R se mantuvo a niveles similares al control.

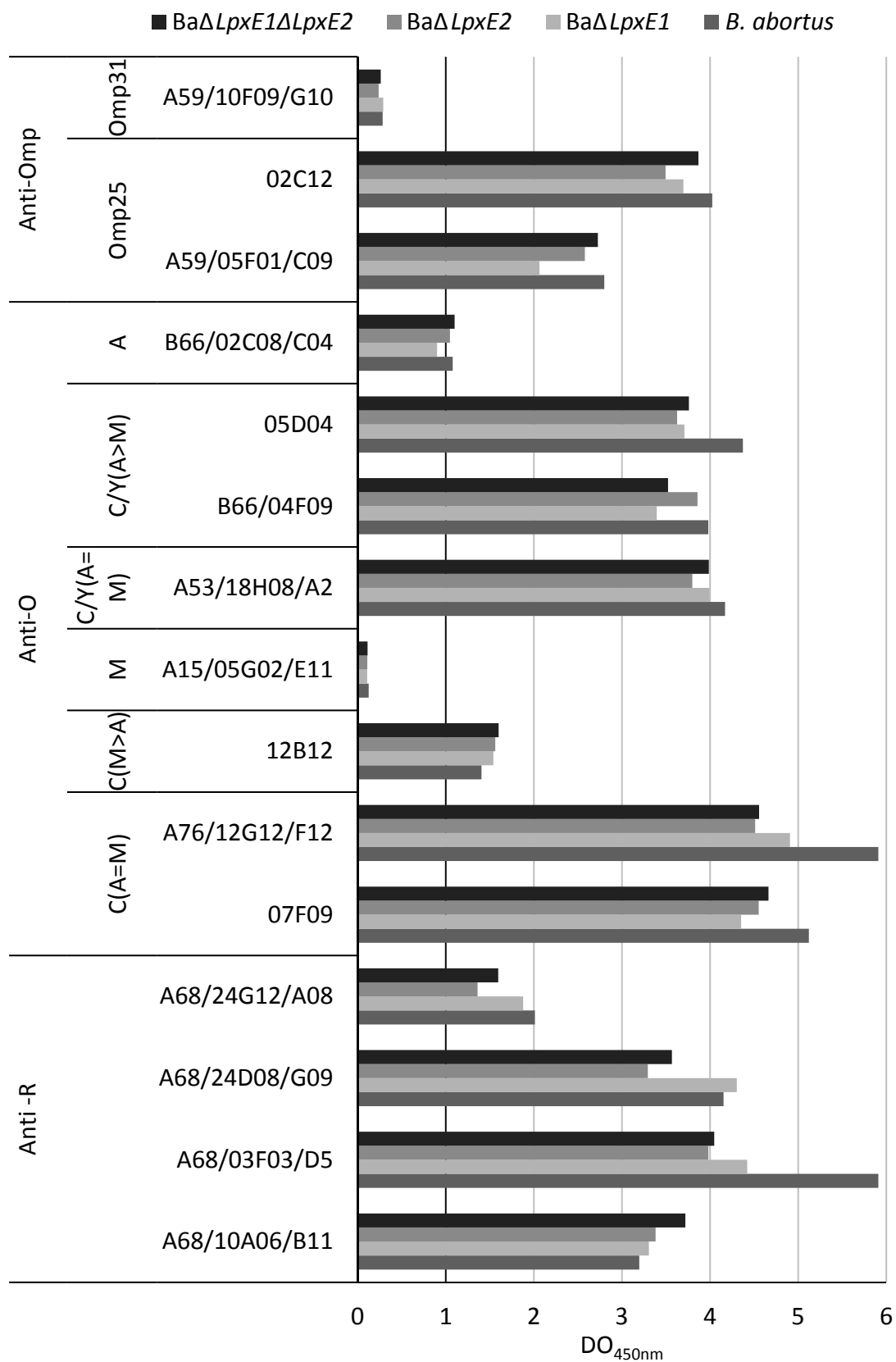


Figura 6. Topología de la superficie celular de los mutantes en los genes *lpxE* de *B. abortus* con MoAbs frente a distintos epítomos de OMPs (Anti-Omp), Cadena O (Anti-O) o LPS-R (Anti-R). La reactividad con los MoAbs se midió (DO_{450nm}) mediante la técnica de i-ELISA, utilizando como antígeno células muertas de la correspondiente cepa bacteriana.

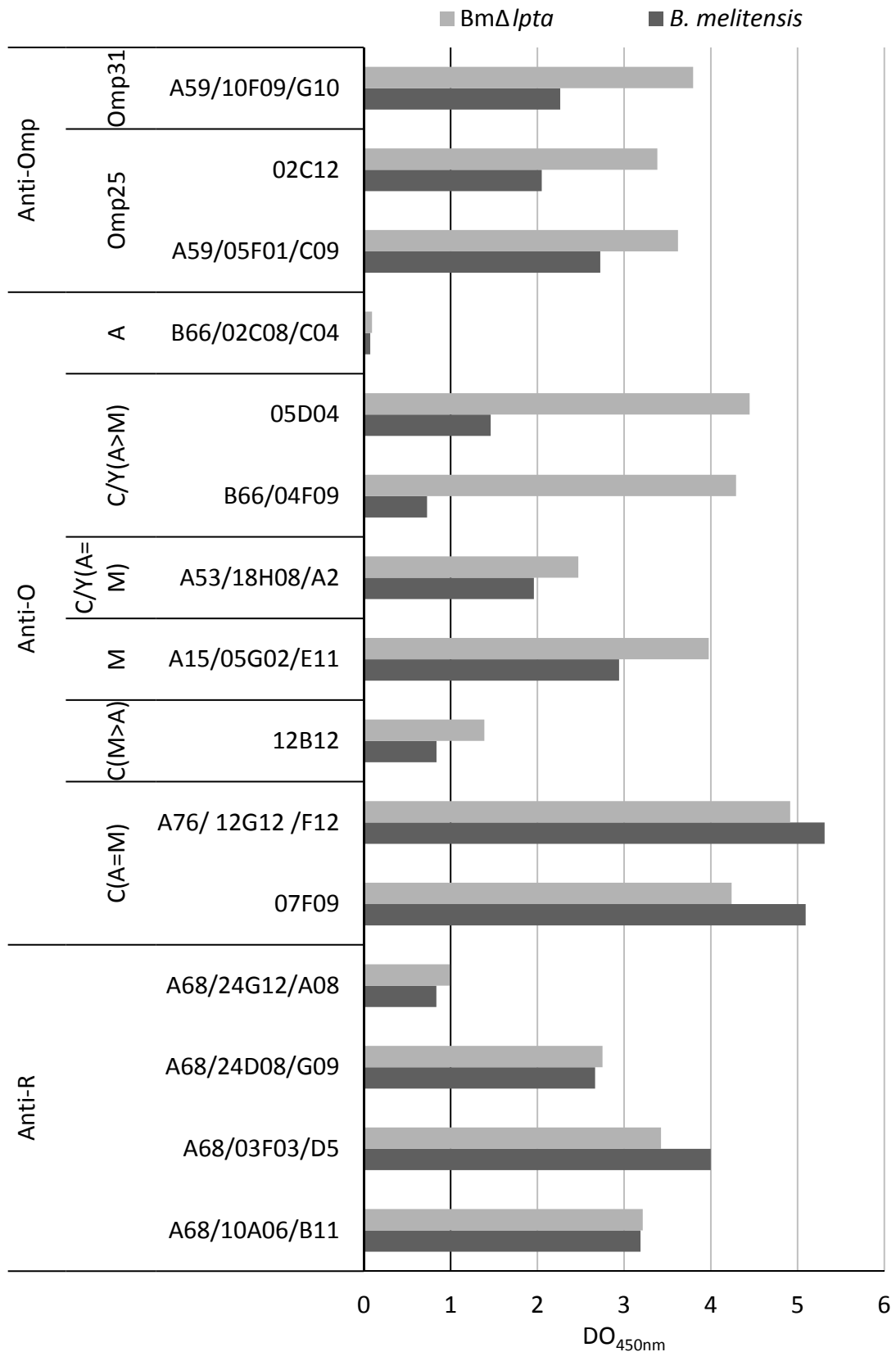


Figura 7. Topología de la superficie celular del mutante en el gen *lptA* de *B. melitensis* con MoAbs frente a distintos epítomos de OMPs (Anti-Omp), Cadena O (Anti-O) o LPS-R (Anti-R). La reactividad con los MoAbs se midió (DO_{450nm}) mediante la técnica de i-ELISA, utilizando como antígeno células muertas de la correspondiente cepa bacteriana.

Glicosiltransferasas del núcleo (*BAB1_1620*, *wadA*, *wadB* y *wadC*)

Los resultados obtenidos con el mutante *B. abortus* Ba Δ 1620 (Figura 8) no reflejaron ninguna diferencia respecto al control con la cepa salvaje.

Los mutantes en *wadA* en *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis* dan como resultado cepas rugosas (LPS-R), que carecen de la cadena O en el exterior pero que la poseen en el interior de la célula (Monreal *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008). Estos mutantes poseen un núcleo del LPS incompleto (tipo R2, Figura 3), y en estudios previos se observó que reaccionaban con otros MoAbs frente al núcleo (Monreal *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008). Los análisis mediante ELISA con estos mutantes se muestran en la Figura 9. En los tres mutantes se observó que la afinidad del MoAb A68/24G12/A08 frente al LPS-R aumentó significativamente respecto a las cepas parentales. Respecto a los MoAbs anti-cadena O, mientras que en el mutante *B. abortus* Ba::Tn5-*wadA* los niveles de todos los anticuerpos se mantuvieron muy bajos, en *B. suis* Bs Δ *wadA* los anticuerpos 05D04 y B66/04F09 (C/Y(A>M)) presentaron niveles altos y similares a la cepa parental. Además, a diferencia de la cepa parental, *B. suis* Bs Δ *wadA* reaccionó con el anticuerpo A15/05G02/E11 (M). Por su parte, *B. melitensis* Bm Δ *wadA* presentó una reactividad similar a la de la cepa parental con los MoAbs A76/12G12/F12 y 07F09 (C(A=M)). Respecto a los MoAbs anti OMPs, hubo una tendencia en los tres mutantes a una mayor reacción frente a la Omp25 (especialmente con el anticuerpo A59/05F01/C09) y frente a la Omp31 en el caso de *B. melitensis* Bm Δ *wadA*.

Respecto a los genes *wadB* y *wadC* ya han sido caracterizados en *B. abortus* y *B. melitensis* (Gil-Ramírez, 2011; Conde-Álvarez *et al.*, 2012). Cuando se eliminaron por delección se observó que estos mutantes eran lisos (LPS-S), aunque presentaban el núcleo del LPS alterado. Al analizar el LPS mediante *Western blot* se observó que perdía las zonas de reconocimiento del MoAb anti-LPS-R A68/24G12/A08 (Gil-Ramírez, 2011; Conde-Álvarez *et al.*, 2012). En la Figura 10 se comparan los resultados del análisis con toda la colección de MoAbs de estos mutantes en *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*. Los mutantes en *wadB* y *wadC* en *B. melitensis* pierden la reactividad contra los cuatro MoAb anti LPS-R, confirmando la alteración del núcleo del LPS. En el caso de los mutantes en *B. abortus* y *B. suis*, se ensayó también el doble mutante Δ *wadB* Δ *wadC*. El

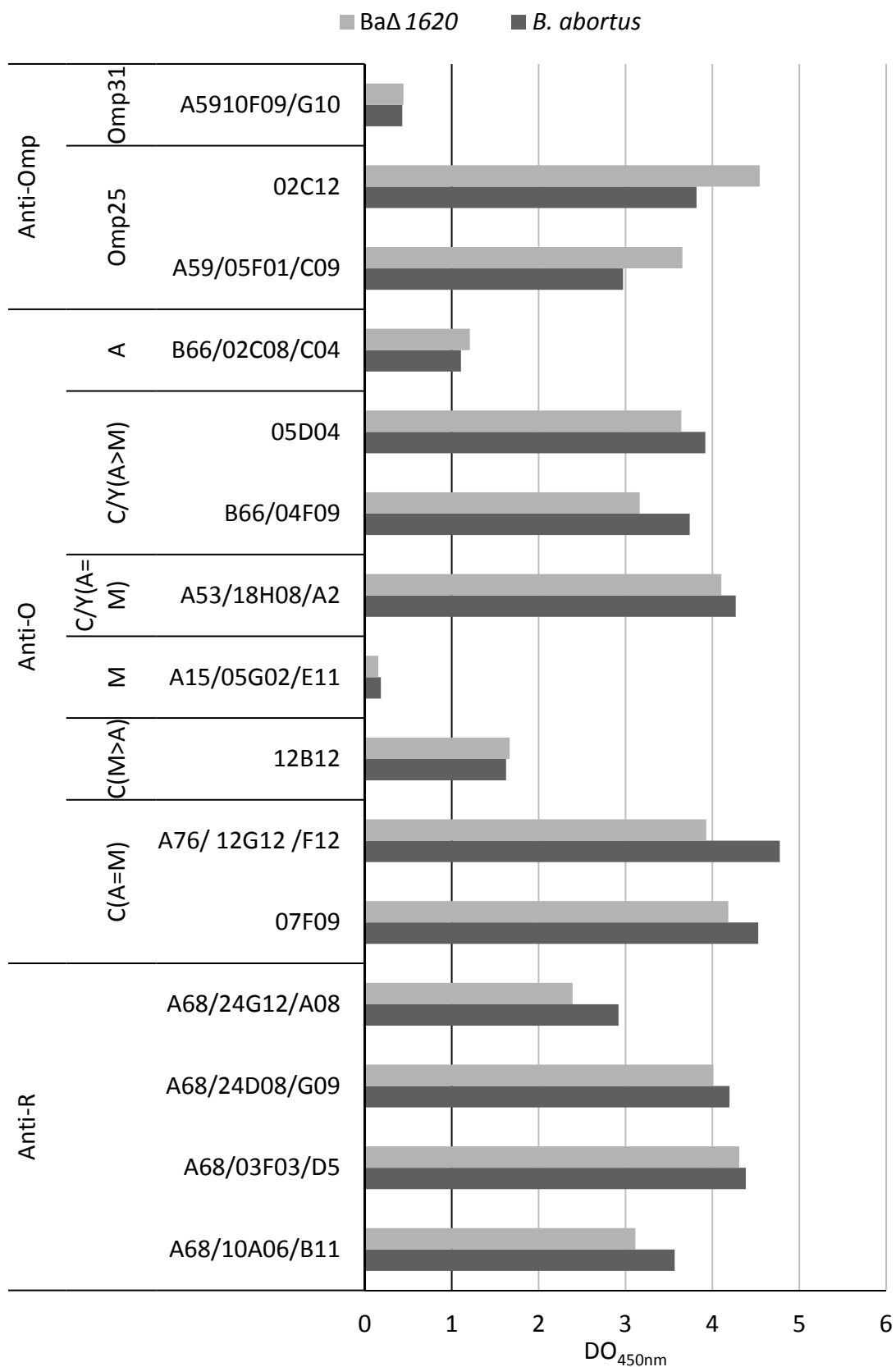


Figura 8. Topología de la superficie celular del mutante en el gen *BAB1_1620* de *B. abortus* con MoAbs frente a distintos epítomos de OMPs (Anti-Omp), Cadena O (Anti-O) o LPS-R (Anti-R). La reactividad con los MoAbs se midió (DO_{450nm}) mediante la técnica de i-ELISA, utilizando como antígeno células muertas de la correspondiente cepa bacteriana.

perfil de reacción fue muy similar entre ambas especies. Los mutantes *BaΔwadB* y *BsΔwadB* reaccionaron con menor intensidad frente a los cuatro MoAbs anti R-LPS, mientras que *BaΔwadC*, *BsΔwadC* y los dobles mutantes presentaron niveles inferiores en tres de los cuatro MoAbs. El perfil de reacción de los mutantes en *wadC* y los doble mutantes (*wadB/wadC*) fue similar entre ellos. El anticuerpo A68/03F03/D05 fue el que peor discriminó entre estos mutantes y la cepa parental. Respecto a los MoAbs anti cadena O, en general todos los mutantes reaccionaron de manera muy similar las cepas parentales, con algunas pequeñas excepciones: *BmΔwadB* y *BmΔwadC* reaccionaron más que la cepa parental con los MoAbs B66/04F09 y 05D04 (C/Y(A>M)); y *BaΔwadB* reaccionó con el anticuerpo A15/05G02/E11 (M). Tampoco hubo diferencias con respecto a la reactividad con los MoAbs anti-Omp25 en los mutantes en *B. abortus* y *B. suis*. Sin embargo, ambos mutantes en *B. melitensis* reaccionaron más con los anticuerpos anti-Omp25 y Omp31.

El gen *per* de la perosamina sintetasa es necesario como paso previo a la generación de N-formil-perosamina, azúcar que forma la cadena O y que no aparece en el núcleo del LPS. Los mutantes en *per* carecen por tanto de cadena O, son LPS-R, y tienen el núcleo completo (Iriarte *et al.*, 2004; González *et al.*, 2008). Para completar el estudio del núcleo del LPS de *Brucella*, se comparó la reactividad entre mutantes *per* (LPS sin la cadena O y con el núcleo completo), *wadC* (LPS son cadena O, pero con el núcleo alterado) y dobles mutantes *wadC/per* (LPS-R sin la cadena O y con el núcleo alterado). Los resultados se muestran en la Figura 11. Como puede observarse, se comprobó que con todos los MoAbs los mutantes *per* y el doble *wadC/per* se comportaban igual entre sí, tanto en *B. abortus* como en *B. melitensis*, puesto que no reaccionaban con los MoAbs anti-cadena O, pero sí con los anti-LPS-R. Este último resultado demostró que, en contra de lo esperado, el doble mutante *wadC/per* no se comportaba como el mutante simple en el gen *wadC* con ninguno de los anticuerpos frente a LPS-R, alcanzando niveles similares a los de la cepa parental.

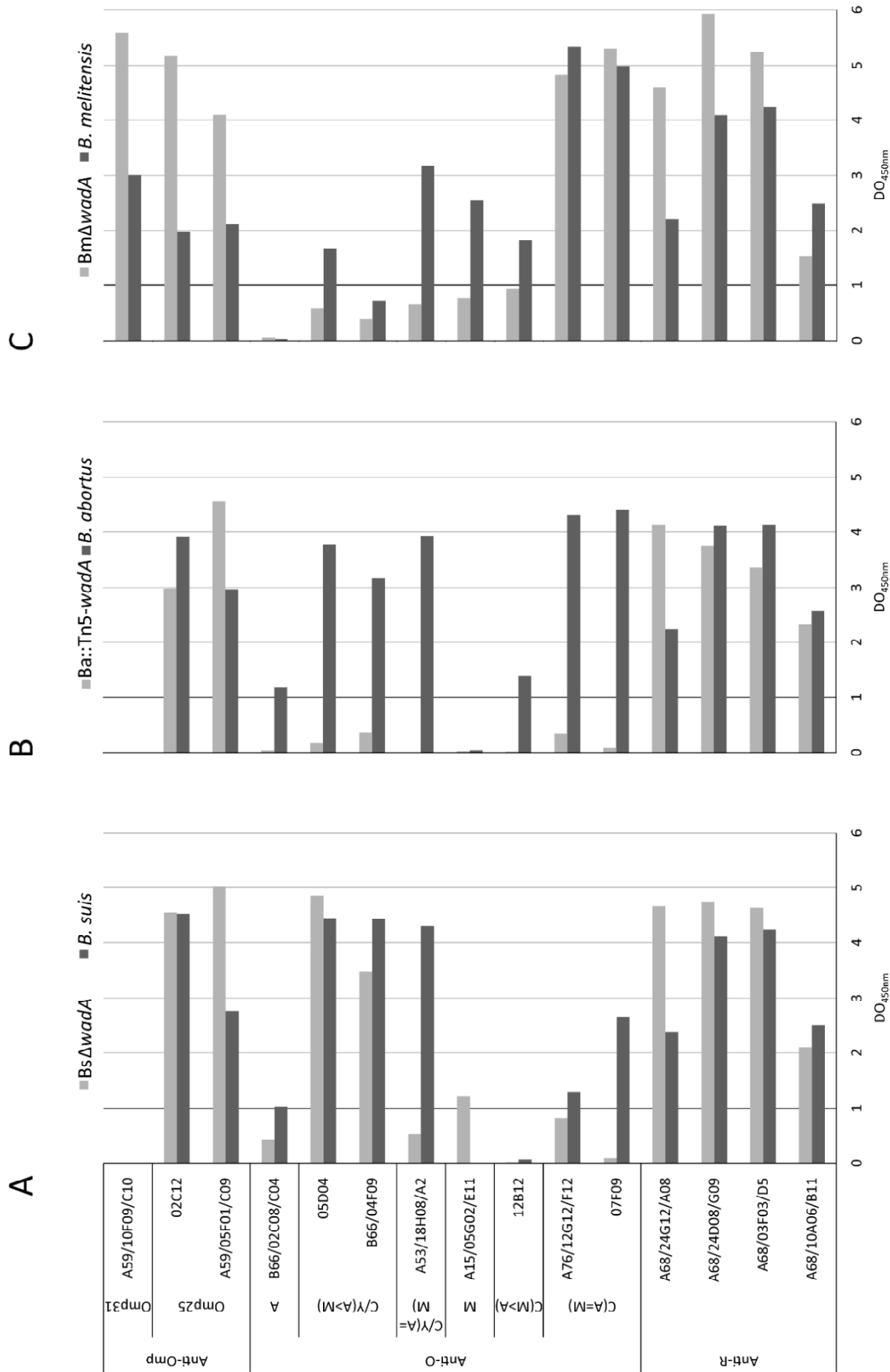


Figura 9. Topología de la superficie celular de los mutantes en el gen *wadA* de *B. suis* (A), *B. abortus* (B) y *B. melitensis* (C) con MoAbs frente a distintos epítomos de OMPs (Anti-Omp), Cadena O (Anti-O) o LPS-R (Anti-R). La reactividad con los MoAbs se midió (DO_{450nm}) mediante la técnica de i-ELISA, utilizando como antígeno células muertas de la correspondiente cepa bacteriana.

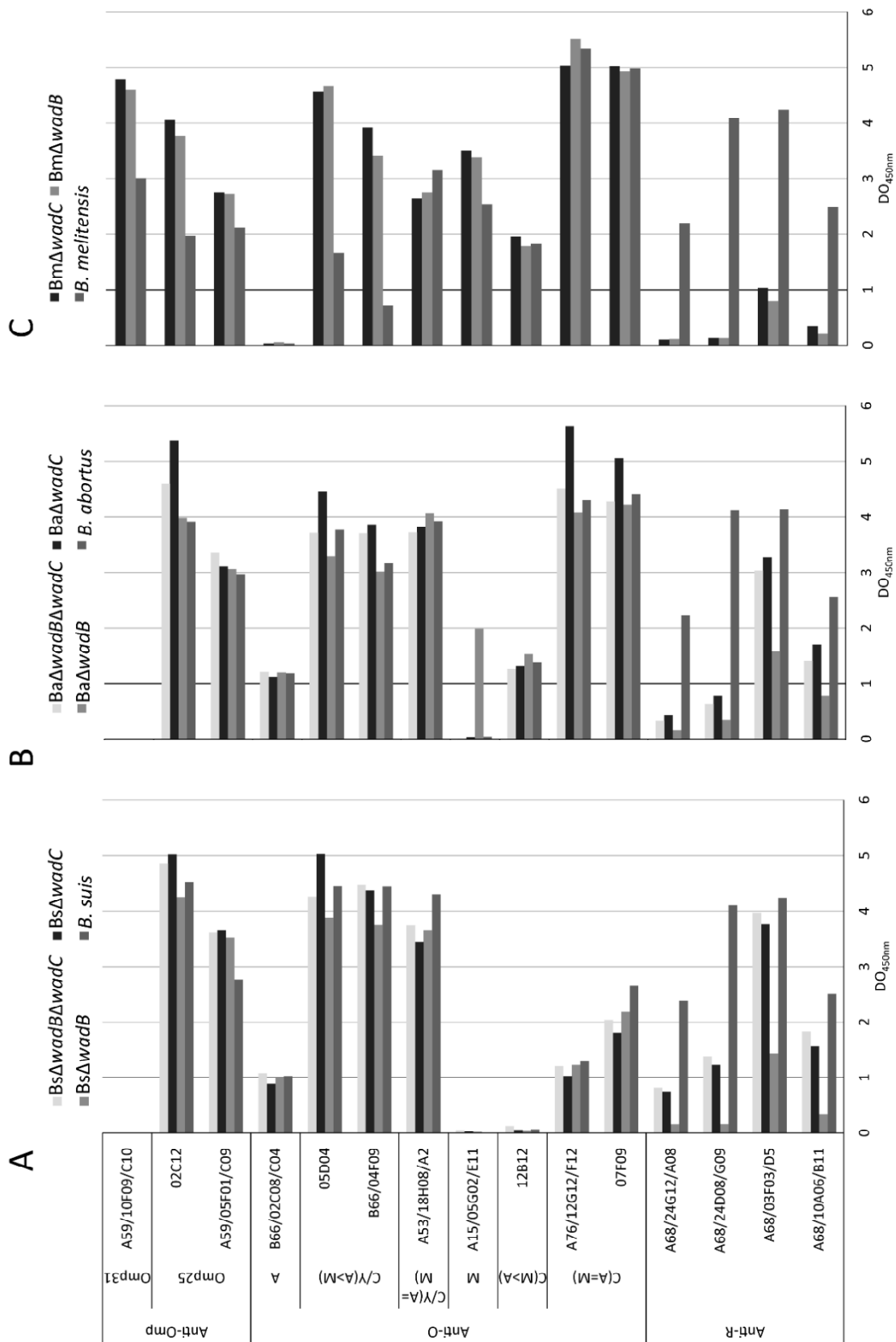


Figura 10. Topología de la superficie celular de los mutantes en los genes *wadB*, *wadC* y doble mutante de *B. suis* (A), *B. abortus* (B) y *B. melitensis* (C) con MoAbs frente a distintos epitopos de OMPs (Anti-Omp), Cadena O (Anti-O) o LPS-R (Anti-R). La reactividad con los MoAbs se midió (DO_{450nm}) mediante la técnica de i-ELISA, utilizando como antígeno células muertas de la correspondiente cepa bacteriana.

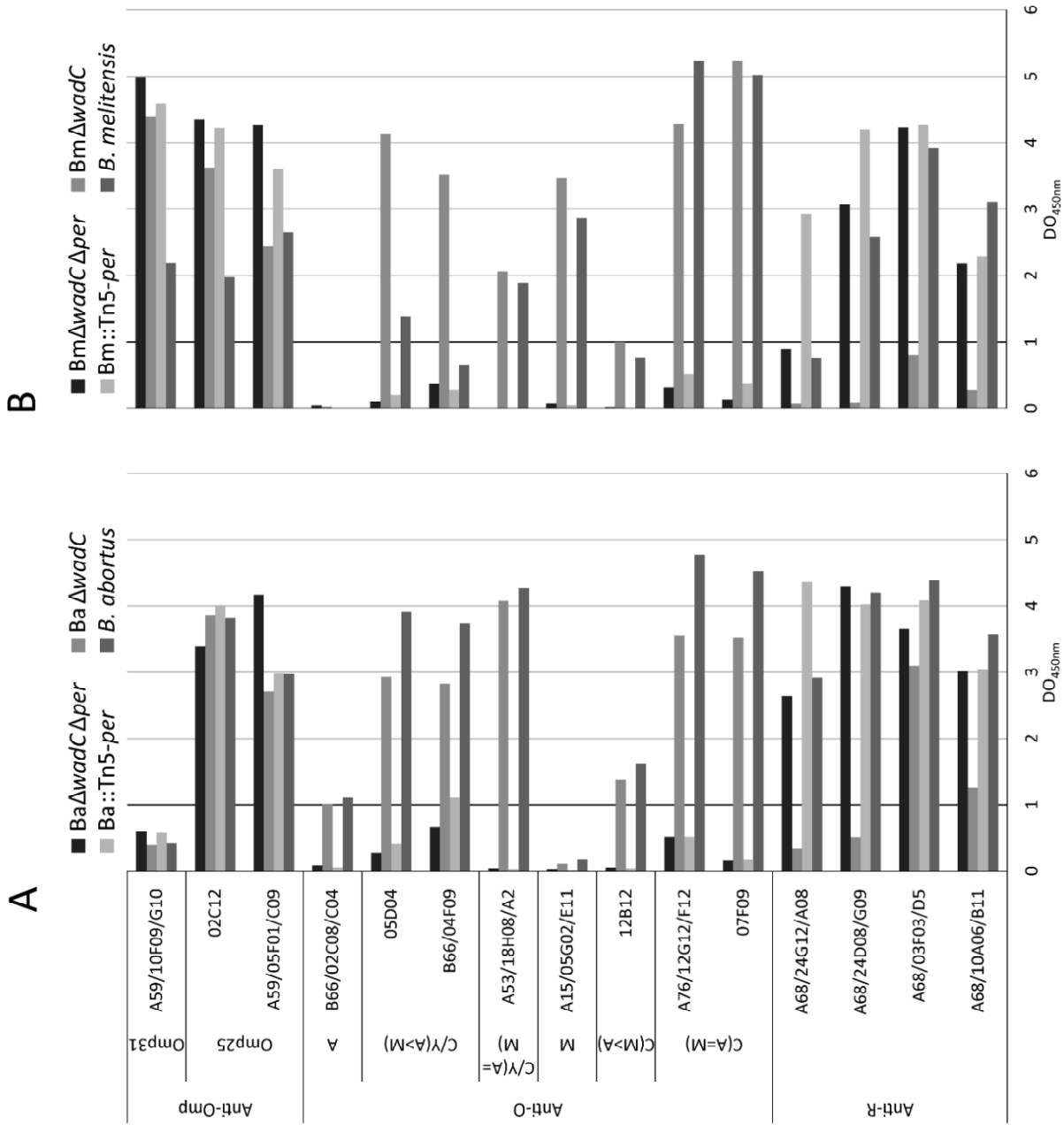


Figura 11. Topología de la superficie celular de los mutantes en los genes *per*, *wadC* y doble mutante de *B. abortus* (A) y *B. melitensis* (B) con MoAbs frente a distintos epítomos de OMPs (Anti-Omp), Cadena O (Anti-O) o LPS-R (Anti-R). La reactividad con los MoAbs se midió (DO_{450nm}) mediante la técnica de i-ELISA, utilizando como antígeno células muertas de la correspondiente cepa bacteriana.

Precusores de azúcares del LPS (*pgm*, *manB_{OAg}* y *manB_{core}*)

La enzima fosfoglucomutasa (Pgm) es responsable de la conversión de glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato. El mutante en el gen *per* no sintetiza el azúcar-nucleótido UDP-Glucosa y es incapaz de formar ningún polisacárido que contenga glucosa, galactosa o ningún otro azúcar cuya síntesis dependa de éste como intermediario. Mutantes en éste gen generan un fenotipo rugoso (LPS-R), aunque son capaces de sintetizar y acumular el polisacárido O en el interior de la célula (Ugalde *et al.*, 2000; Ugalde *et al.*, 2003). La Figura 12 muestra los resultados obtenidos mediante ELISA para el mutante Bm::*Tn5-pgm*. No se apreciaron diferencias importantes entre la cepa parental y el mutante Bm::*Tn5-pgm*, salvo en el anticuerpo A68/24G12/A08 anti-LPS-R, que se unió con mayor afinidad en el caso de la cepa mutante.

El análisis del mutante Bm Δ *manB_{OAg}* (Figura 13A) únicamente mostró diferencias con respecto a la cepa parental por su mayor reactividad con los MoAbs B66/04F09 y 05D04 (C/Y(A>M)). Respecto a los mutantes en *manB_{core}* los resultados obtenidos mostraron una reactividad similar entre los mutantes *B. abortus* Ba::*Tn5-manB_{core}* y *B. melitensis* Bm::*Tn5-manB_{core}*, con anticuerpos frente al núcleo del LPS-R. Además sorprendentemente, se observó una clara reactividad de ambos mutantes *manB_{core}* con los MoAbs anti-cadena O 07F09, A76/12G12/F12, A53/18H08/A02, B66/04F09 y 05D04 (Figuras 13B y 13C). Estos resultados contrastan con las hipótesis previas y serán discutidos más adelante.

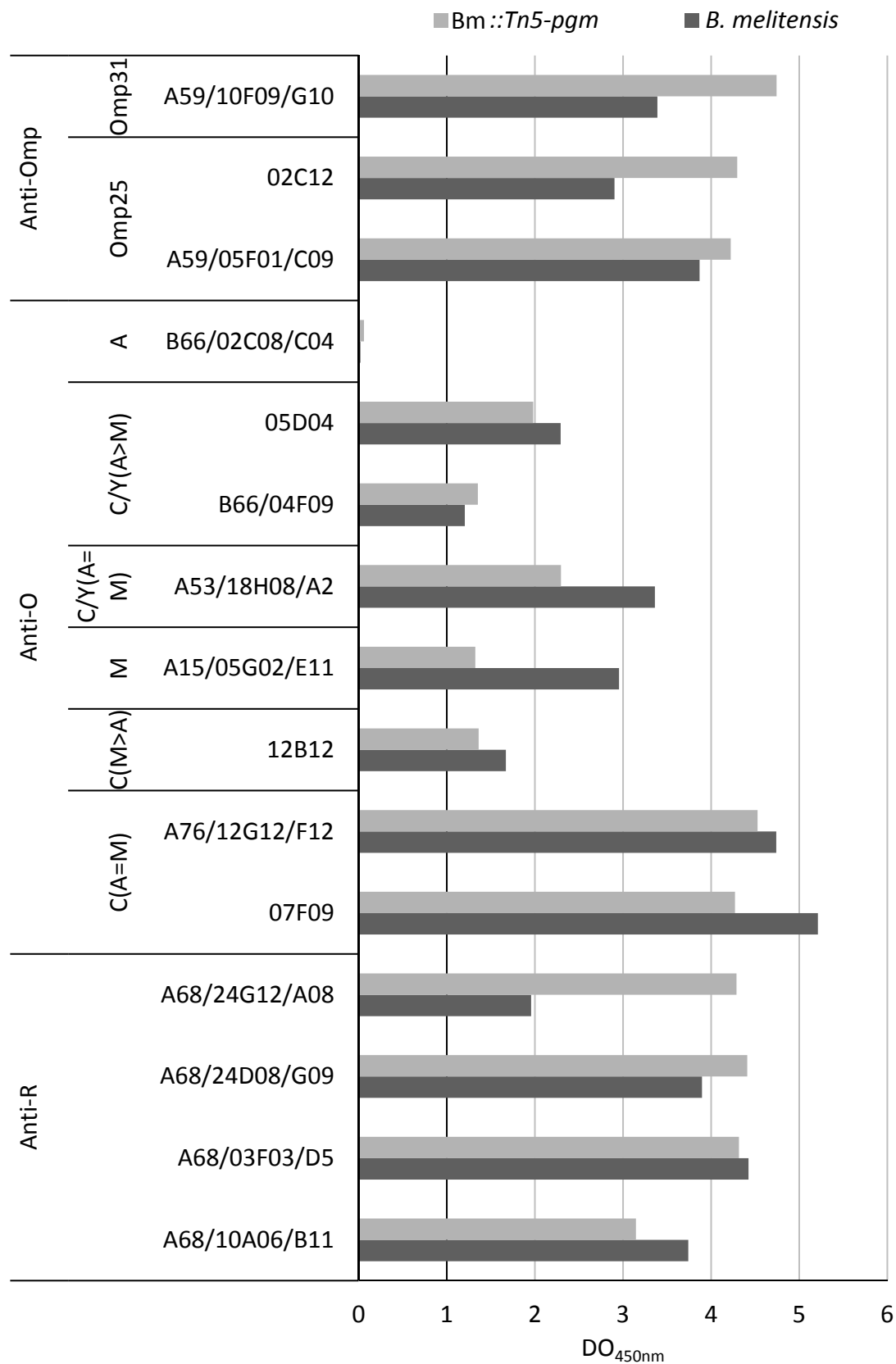


Figura 12. Topología de la superficie celular del mutante en el gen *pgm* de *B. melitensis* con MoAbs frente a distintos epítomos de OMPs (Anti-Omp), Cadena O (Anti-O) o LPS-R (Anti-R). La reactividad con los MoAbs se midió (DO_{450nm}) mediante la técnica de i-ELISA, utilizando como antígeno células muertas de la correspondiente cepa bacteriana.

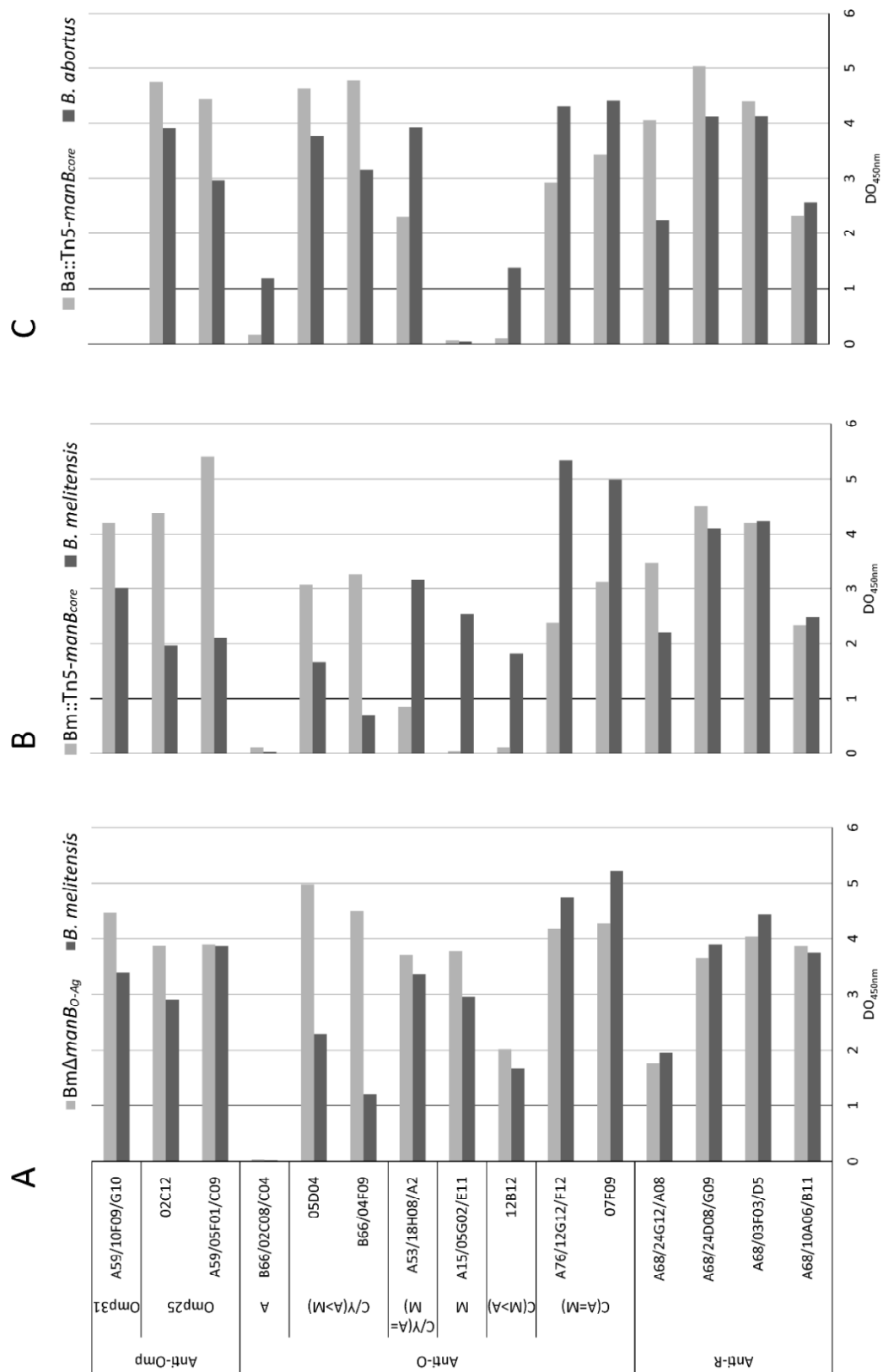


Figura 13. Topología de la superficie celular de los mutantes en los genes *manB_{O-Ag}* de *B. melitensis* (A) y *manB_{core}* de *B. abortus* (B) y *B. melitensis* (C) con MoAbs frente a distintos epítomos de OMPs (Anti-Omp), Cadena O (Anti-O) o LPS-R (Anti-R). La reactividad con los MoAbs se midió (DO_{450nm}) mediante la técnica de i-ELISA, utilizando como antígeno células muertas de la correspondiente cepa bacteriana.

SDS-PAGE y *Western blot*

El análisis mediante SDS-PAGE y *Western blot* de los mutantes en distintos genes del LPS en *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* se muestra en la Figura 14. La concentración de acrilamida en los geles fue optimizada para resolver mejor posibles diferencias en la sección de la cadena O. En estas condiciones, no se detectaron diferencias evidentes en los distintos patrones de migración de las bandas correspondiente a núcleo-lípido A, excepto en el caso de los mutantes *wadB* y *wadC* donde se pudo apreciar que la banda era diferente (en tamaño y color) respecto de la cepa salvaje en las tres especies de *Brucella*. Esta diferencia en los mutantes *wadB* y *wadC* se confirmó mediante *Western blot* con una mezcla de anticuerpos frente a núcleo del LPS: ausencia de reacción en estos mutantes. El análisis mediante *Western blot* también confirmó la ausencia de reactividad en la región de la cadena O del LPS en los mutantes *manB_{core}*, *wadA* y *per*.

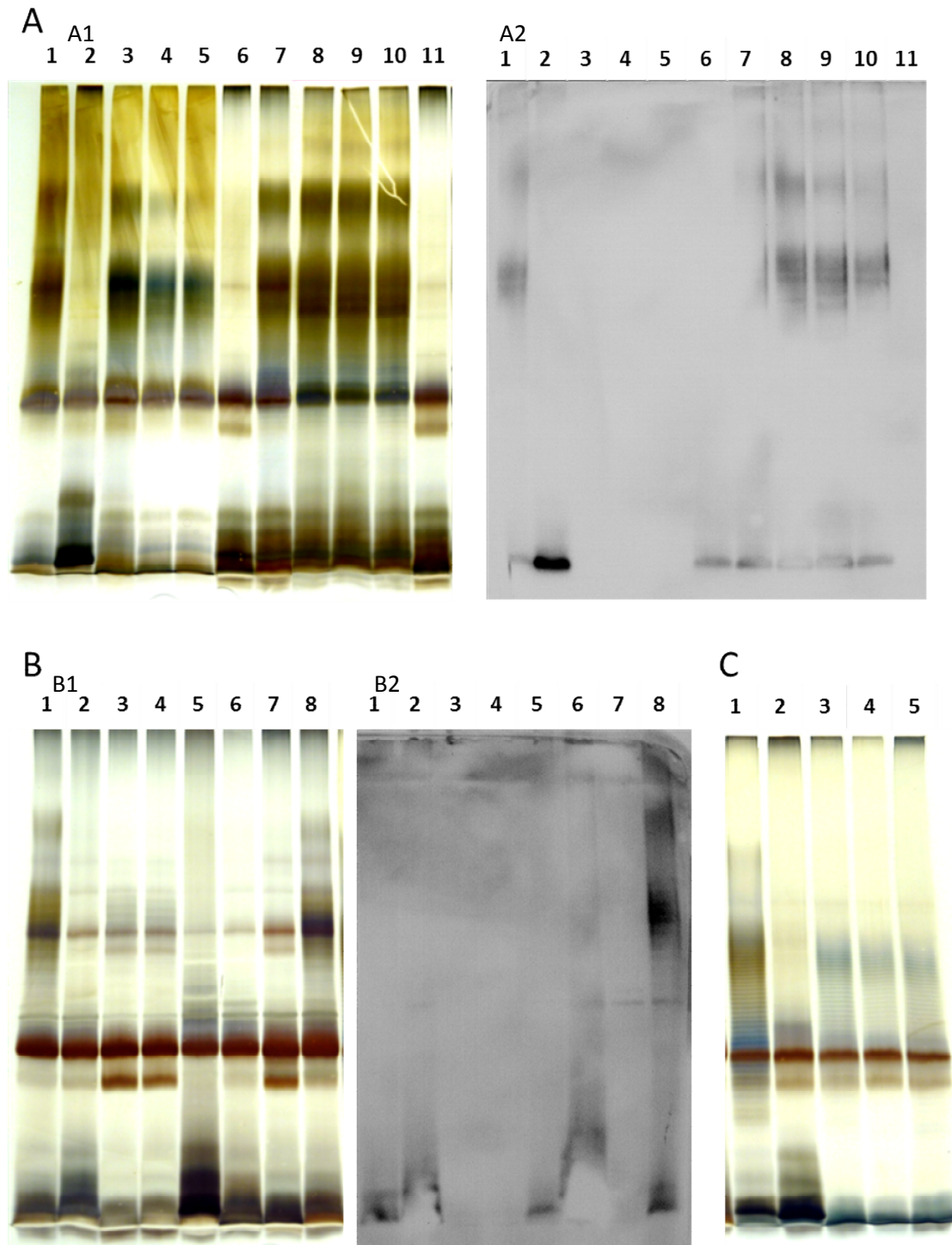


Figura 14. SDS-PAGE y *western blot* de mutantes en distintos genes del LPS en *B. abortus* (A), *B. melitensis* (B) y *B. suis* (C). Los cepas fueron analizadas mediante SDS-PAGE (paneles A1, B1 y C) y *Western blot* (paneles A2 y B2) con anticuerpos frente al núcleo del LPS. Panel A: 1, cepa parental 2308; 2, Ba::Tn5-*wadA*; 3, Ba Δ *wadB*; 4, Ba Δ *wadC*; 5, Ba Δ *wadB* Δ *wadC*; 6, Ba::Tn5-*manB*_{core}; 7, Ba Δ 1620; 8, Ba Δ *lpxE1*; 9, Ba Δ *lpxE2*; 10, Ba Δ *lpxE1* Δ *lpxE2*; 11, Ba Δ *wadC* Δ *per*. Panel B: 1, cepa parental 16M; 2, Bm Δ *wadA*; 3, Bm Δ *wadB*; 4, Bm Δ *wadC*; 5, Bm::Tn5-*manB*_{core}; 6, Bm::Tn5-*per*; 7, Bm Δ *wadC* Δ *per*; 8, Bm Δ *lptA*. Panel C: 1, cepa parental CITA; 2, Bs Δ *wadA*; 3, Bs Δ *wadB*; 4, Bs Δ *wadC*; 5, Bs Δ *wadB* Δ *wadC*

III. COMPARACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LA ENVOLTURA CELULAR ENTRE LAS CEPAS REO Y PA DE *B. ovis*

B. ovis REO es la cepa utilizada para obtener el antígeno para las pruebas de diagnóstico de *B. ovis* en carneros, según el manual de la OIE (Garin-Bastuji and Blasco, 2013). A diferencia de otras cepas de *B. ovis*, es avirulenta y no necesita de CO₂ para cultivo. Sin embargo, no se conocen las posibles diferencias moleculares entre REO y el resto de cepa de *B. ovis*. Por ello, nos propusimos comparar las características de la envoltura celular entre las cepas REO y PA de *B. ovis*.

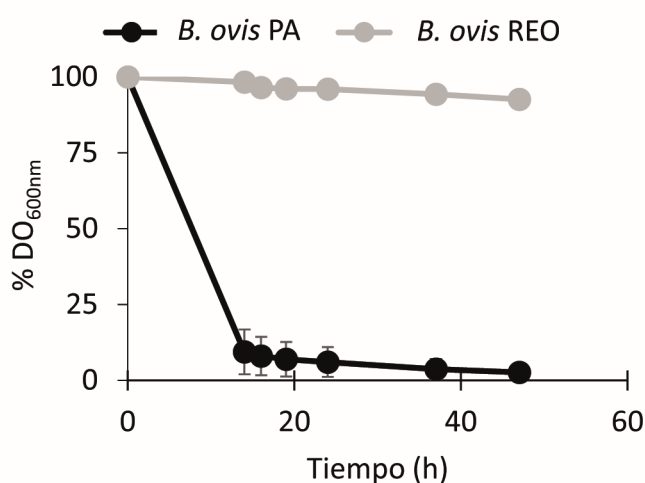


Figura 15. Ensayo de autoaglutinación de *B. ovis* PA y *B. ovis* REO. Los resultados representan la media y SD de tres experimentos independientes.

La autoaglutinación es una propiedad característica de algunas cepas de *Brucella* rugosas. Cuando están suspendidas en medio líquido, las células se unen entre sí y aglutinan al fondo del tubo. Con este sencillo experimento se quiso visualizar posibles diferencias de aglutinación que fueran reflejo de distintas propiedades de la envoltura celular. Los resultados (Figura 15) muestran un comportamiento muy diferente entre las dos cepas de *B. ovis*: mientras que la suspensión de células de *B. ovis* PA aglutinaron completamente en menos de 24 h (reducción del 90% con respecto al valor inicial de DO₆₀₀), *B. ovis* REO se mantuvo en suspensión hasta al menos 48 horas.

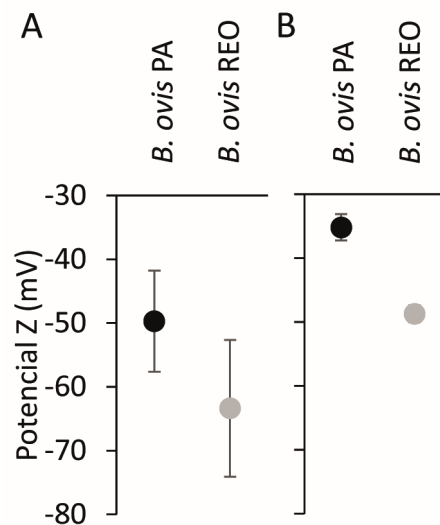


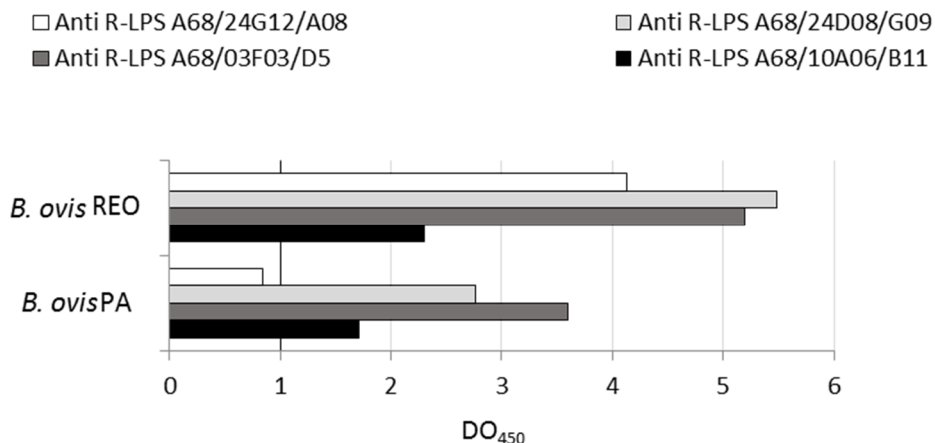
Figura 16. Potencial Z (mV) de la superficie bacteriana de *B. ovnis* PA y *B. ovnis* REO. (A) con células resuspendidas en CsCl 10mM; (B) con células resuspendidas KCl 0,1 M. Los resultados representan la media y SD de 10 medidas.

Las diferencias en la autoaglutinación pueden ser debidas a cambios en la carga neta de la superficie de la bacteria. Por eso, se comparó el potencial Z de ambas cepas (bacterias muertas) resuspendidas en dos soluciones distintas CsCl 10 mM y KCl 0,1 M. Los resultados (Figura 16) mostraron que la carga neta superficial de ambas cepas era negativa. Sin embargo, en las dos condiciones ensayadas *B. ovnis* REO presentó una carga neta más negativa que la cepa PA.

A continuación, se analizó la topología de la superficie celular de ambas cepas con MoAbs anti LPS-R y anti-OMPs (Omp2b, Omp31, Omp25, Omp19, Omp16). Los resultados (Figura 17) demostraron que con todos los MoAbs ensayados *B. ovnis* REO reaccionaba más intensamente que *B. ovnis* PA.

Por último, como el LPS de *B. ovnis* es rugoso, se decidió también analizar el LPS purificado de ambas cepas mediante SDS-PAGE con Tricina, según se describe en el apartado de Material y Métodos. Esto permitió resolver con una mayor precisión las diferencias a nivel del núcleo del LPS. Los resultados se muestran en la Figura 18. El LPS de ambas cepas se resolvió en al menos tres componentes I, II y III principales. Sin embargo, la proporción relativa entre estos componentes fue diferente: mientras que *B.*

A



B

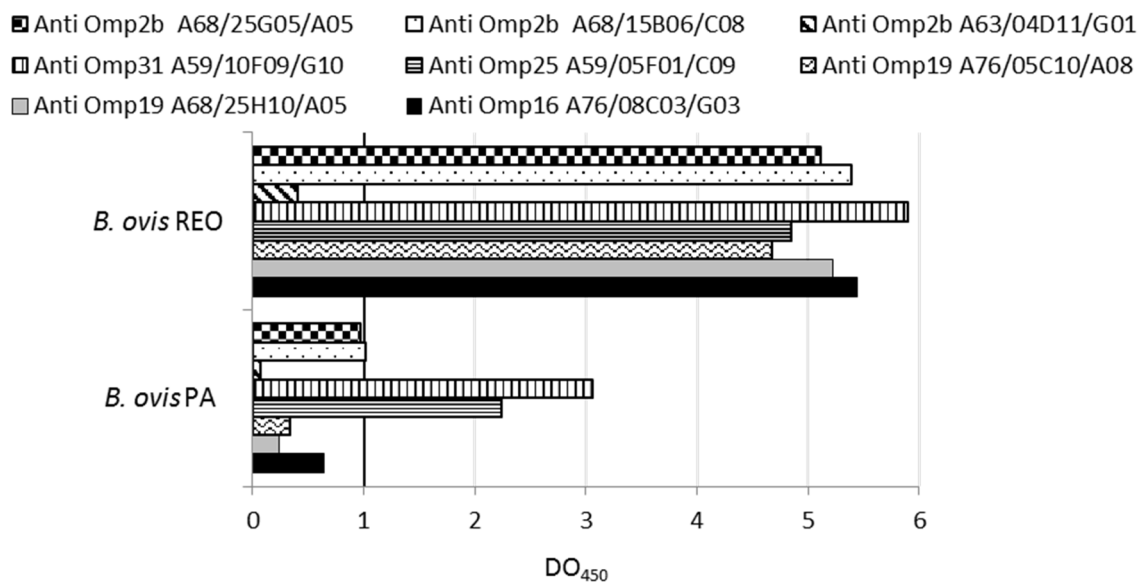


Figura 17. Topología de la superficie celular de *B. ovnis* PA y *B. ovnis* REO con MoAbs frente a distintos epítomos del LPS-R (A) o de OMPs (B). La reactividad con los MoAbs se midió (DO_{450nm}) mediante la técnica de i-ELISA, utilizando como antígeno células muertas de la correspondiente cepa bacteriana.

ovnis REO mostró una mayor intensidad del componente II, en la cepa *B. ovnis* PA el componente mayoritario fue el I. Además, tras la transferencia de estos gels a una membrana de nitrocelulosa, los *blots* fueron revelados con los MoAbs anti R-LPS A68/10A06/B11, A68/24G12/A08, A68/03F03/D05, A68/24D08/G09 y A76/10B10/A01. En todos los casos, estos MoAbs anti R-LPS solo reaccionaron con el componente I del LPS de ambas cepas, pero *B. ovnis* REO exhibió un marcaje muy débil comparado con la cepa de *B. ovnis* PA.

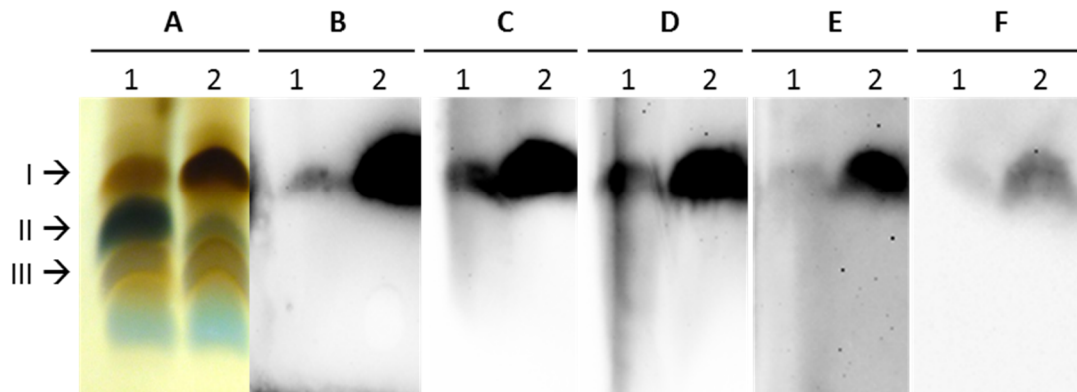


Figura 18. SDS-PAGE con Tricina (A) y Western blot (B-F) de los LPS de *B. ovis* REO (1) y *B. ovis* PA (2). Se indican los componentes I, II y III en el gel de acrilamida teñido con plata amoniaca. Los MoAbs anti LPS-R empleados fueron A68/10A06/B11 (B), A68/24G12/A08 (C), A68/24D08/G09 (D), A68/03F03/D05 (E) y A76/10B10/A01 (F).

Todos estos resultados demostraron diferencias a nivel de la envoltura celular entre ambas cepas. Por ello, se analizó si estas diferencias podrían tener consecuencias en el reconocimiento de las bacterias por el propio huésped natural. Para ello, se analizaron mediante ELISA células inactivadas de estas dos cepas frente a una colección de sueros de carneros infectados naturalmente por *B. melitensis* y *B. ovis*. Como control se emplearon sueros de animales *Brucella-free*. Los resultados (Figura 19) no mostraron diferencias en el reconocimiento de la superficie de ambas cepas.

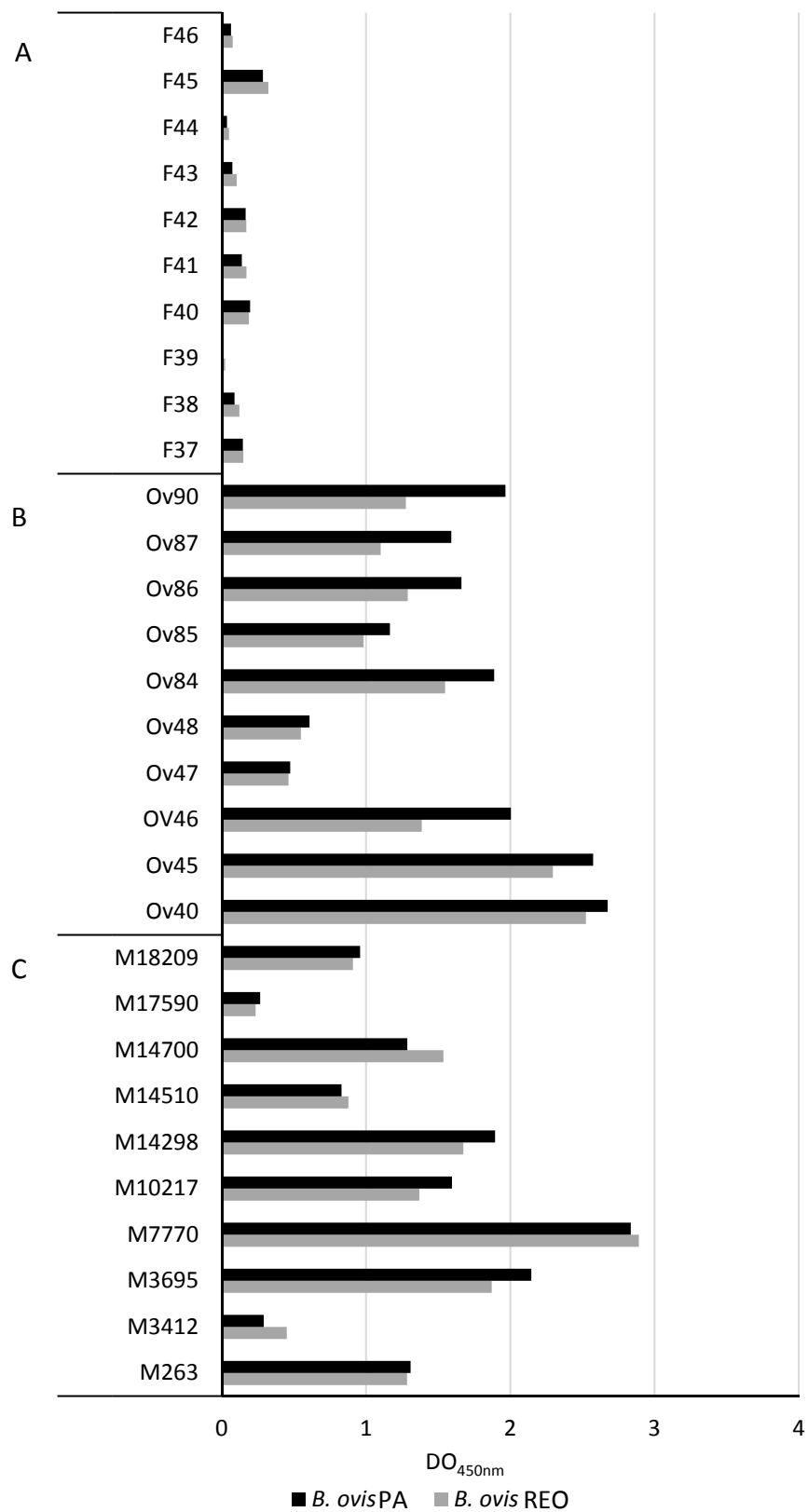


Figura 19. Topología de la superficie celular de *B. ovis* PA (en negro) y *B. ovis* REO (en gris) frente a sueros de carneros libres de *Brucella* (A) o infectados con *B. ovis* (B) o con *B. melitensis* (C). La reactividad con los anticuerpos se midió (DO_{450nm}) mediante la técnica de i-ELISA, utilizando como antígeno células muertas de la correspondiente cepa bacteriana.

IV. CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS MUTANTES EN GLICOSILTRANSFERASAS DEL NÚCLEO DEL LPS DE *B. ovís*

A la vista de los resultados anteriores, se decidió construir mutantes en los genes de las glicosiltransferasas involucradas en la síntesis del núcleo del LPS en *B. ovís* PA: *BoΔwadA*, *BoΔwadB*, *BoΔwadC* y el doble *BoΔwadBΔwadC*, tal y como se detalla en la sección de Material y Métodos. Se obtuvieron además como controles las correspondientes cepas revertidas al genotipo parental (*BoΔwadA*-rev, *BoΔwadB*-rev y *BoΔwadC*-rev). La amplificación por PCR y la secuenciación del *loci* de cada mutante confirmó la inactivación de los genes respectivos y el mantenimiento del marco de lectura (ver Material y Métodos).

1. Caracterización fenotípica clásica.

Los mutantes fueron sometidos a un conjunto de pruebas clásicas de caracterización y tipificación bioquímica y molecular de *B. ovís*, para analizar si las mutaciones en glicosiltransferasas del núcleo del LPS de *B. ovís* alteraban las características microbiológicas de la cepa parental (ver Material y Métodos). Como se muestra en la Tabla 7, todos los mutantes conservaban las características clásicas de *B. ovís* PA.

2. Propiedades físico-químicas y biológicas.

Dentro de las propiedades físico-químicas se midió la capacidad de autoaglutinación y la carga neta (potencial Z) de los mutantes. En los experimentos de autoaglutinación (Figura 20), el mutante *BoΔwadA* y las cepas revertidas de cada uno de los mutantes se comportaron igual que la cepa parental *B. ovís* PA, mostrando una reducción del 90% con respecto al valor inicial de DO₆₀₀ en menos de unas pocas horas. Por el contrario, los mutantes *BoΔwadB*, *BoΔwadC* y el doble *BoΔwadBΔwadC* se mantuvieron en suspensión hasta al menos 48 horas.

Los resultados de los experimentos de medida del potencial Z, mostraron un aumento de la carga neta negativa en los mutantes *BoΔwadB*, *BoΔwadC* y el doble mutante *BoΔwadBΔwadC*. Por el contrario, el mutante *BoΔwadA* y las cepas revertidas

Tabla 7: Caracterización fenotípica de los mutantes construidos en este trabajo y las cepas revertientes de los mutantes simples correspondientes. Como controles se utilizaron las cepas *B. ovis* PA.

Cepa	Sensibilidad			Requerimiento de CO ₂	Reacción de Ureasa/Oxidasa	Aglutinación			Crecimiento en presencia de CO ₂							
	Tb Wb Iz R/C					Acriflavina A M			Tionina (µg/mL)		Fucsina (µg/mL)		Safranina (µg/mL)			
	10	20	40			10	20	40	10	20	10	20	100			
<i>B. ovis</i> 63/290	-	-	-	10 ⁻⁶	+	-/-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>B. ovis</i> PA	-	-	-	10 ⁻⁶	+	-/-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
BoΔ <i>wadA</i>	-	-	-	10 ⁻⁶	+	-/-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
BoΔ <i>wadB</i>	-	-	-	10 ⁻⁶	+	-/-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
BoΔ <i>wadC</i>	-	-	-	10 ⁻⁶	+	-/-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
BoΔ <i>wadB</i> Δ <i>wadC</i>	-	-	-	10 ⁻⁶	+	-/-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
BoΔ <i>manB</i> _{O-Ag}	-	-	-	10 ⁻⁶	+	-/-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
BoΔ <i>wadB</i> -rev	-	-	-	10 ⁻⁶	+	-/-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
BoΔ <i>wadC</i> -rev	-	-	-	10 ⁻⁶	+	-/-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

presentaron la misma carga que la cepa parental (Figura 21). Similar a lo ocurrido anteriormente, las diferencias fueron más evidentes al medir el potencial Z en las bacterias muertas resuspendidas en KCl 0,1M, que mostró además resultados más homogéneos.

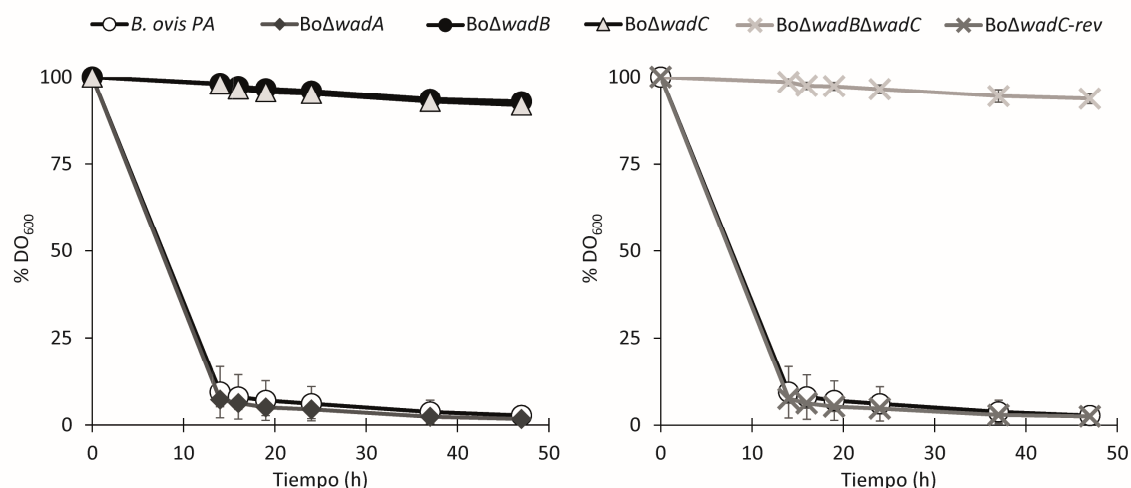


Figura 20. Ensayo de autoaglutinación de los mutantes en genes del núcleo del LPS. Los resultados representan la media y SD de tres experimentos independientes.

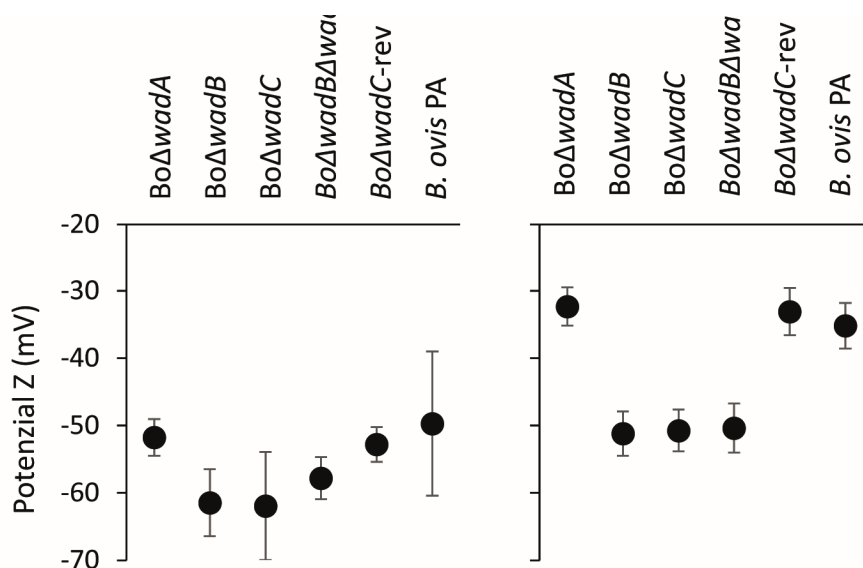


Figura 21. Potencial Z (mV) de la superficie bacteriana de los mutantes en genes del núcleo del LPS de *B. ovnis* PA. (A) con células resuspendidas en CsCl 10mM; (B) con células resuspendidas KCl 0,1 M. Los resultados representan la media y SD de 10 medidas.

Brucella es naturalmente resistente a la muerte mediada por el sistema del complemento y a los péptidos catiónicos bactericidas. Para determinar si estas propiedades biológicas se veían afectadas por las alteraciones en el núcleo del LPS de los mutantes en genes de glicosiltransferasas, se realizó un experimento de supervivencia en presencia de suero ovino no inmune convencional y descomplementado. Como puede observarse en la Tabla 8, las cepas Bo Δ wadA y Bo Δ wadC-rev (usada como control) eran igual de resistentes a la acción bactericida del suero ovino que la cepa parental *B. ovis* PA, con más del 90% de supervivencia bacteriana. Sin embargo, los mutantes Bo Δ wadB, Bo Δ wadC y Bo Δ wadB Δ wadC eran significativamente ($p < 0,05$) más susceptibles que su parental, con valores de supervivencia inferiores al 74%.

Tabla 8. Susceptibilidad a la acción bactericida del suero ovino no inmune

Cepa	% Supervivencia bacteriana (media \pm SD)
<i>B. ovis</i> PA	93 \pm 5,5
Bo Δ wadA	92 \pm 4,8
Bo Δ wadB ^a	74 \pm 3,9
Bo Δ wadC ^a	68 \pm 3,2
Bo Δ wadB Δ wadC ^a	74 \pm 4,7
Bo Δ wadC-rev	101 \pm 6,9

Comparaciones estadísticas mediante el test PLSD: ^aP<0,05

Se empleó la polimixina B como modelo de péptido catiónico para comprobar si los cambios en la envoltura celular de los mutantes afectaban a la característica resistencia de *Brucella* a estos péptidos. Los resultados de CMI y CMB (Tabla 9) mostraron pequeñas diferencias: los mutantes Bo Δ wadB, Bo Δ wadC y el doble Bo Δ wadB Δ wadC fueron ligeramente más resistentes a la inhibición y a la acción bactericida de la polimixina B. En el experimento de supervivencia a una exposición de polimixina B, no se observaron sin embargo diferencias significativas en el recuento de bacterias entre las distintas cepas.

Tabla 9. Susceptibilidad a la acción bactericida de la polimixina B

Cepa	CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CMB ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Supervivencia bacteriana (Media \pm SD)
<i>B. ovis</i> PA	31	125	88 \pm 9
Bo Δ wadA	31	250	78 \pm 18
Bo Δ wadB	62	125	94 \pm 12
Bo Δ wadC	62	250	84 \pm 8
Bo Δ wadBC	62	250	94 \pm 7
Bo Δ wadC-rev	31	125	92 \pm 13

Comparaciones estadísticas mediante el test PLSD.

3. Caracterización topológica de la superficie celular mediante i-ELISA con MoAbs.

El análisis de la superficie de la envoltura mediante i-ELISA mostró diferencias tanto en el LPS como en las OMPs (Figura 22). En el caso de los MoAbs anti LPS-R, en general los mutantes Bo Δ wadB, Bo Δ wadC y el doble Bo Δ wadB Δ wadC reaccionaron menos que la cepa parental. El perfil de Bo Δ wadC fue el más afectado, mientras que el doble mutante Bo Δ wadB Δ wadC reaccionó de manera similar a Bo Δ wadB. El mutante Bo Δ wadA mostró un perfil de reacción casi idéntico al de la cepa parental. En concreto, con los mutantes Bo Δ wadB, Bo Δ wadC y el doble Bo Δ wadB Δ wadC los MoAbs A68/24G12/A08, A68/10A6/B11 y A68/24D08/G09 reaccionaron menos que con la cepa parental. Sin embargo, el MoAb A68/03F03/D05 fue el que se unió con mayor afinidad en todos los casos, aunque se redujo con el mutante Bo Δ wadC. Estos resultados se asemejan a los obtenidos con otras especies de *Brucella* (ver Figura 10), con la diferencia de que en el caso de *B. ovis* el mutante en el gen *wadC*, y no en el gen *wadB*, es el menos reactivo.

El análisis mediante MoAbs anti-OMPs mostró también diferencias de reactividad entre las distintas cepas. De nuevo, el mutante Bo Δ wadC mostró una menor reactividad con todos los anticuerpos frente a OMPs. Por el contrario, el mutante Bo Δ wadB reaccionó mucho más con los MoAbs frente a Omp25, Omp31 y las lipoproteínas Omp16 y Omp19. El doble mutante Bo Δ wadB Δ wadC ofreció un perfil intermedio que no se parecía a ninguno de los dos mutantes individuales: reaccionó frente a los MoAbs anti Omp25 y Omp16, pero no frente a los anti Omp31 ni Omp19. La reactividad del mutante Bo Δ wadA fue muy similar a la de la cepa parental, excepto en el anticuerpo

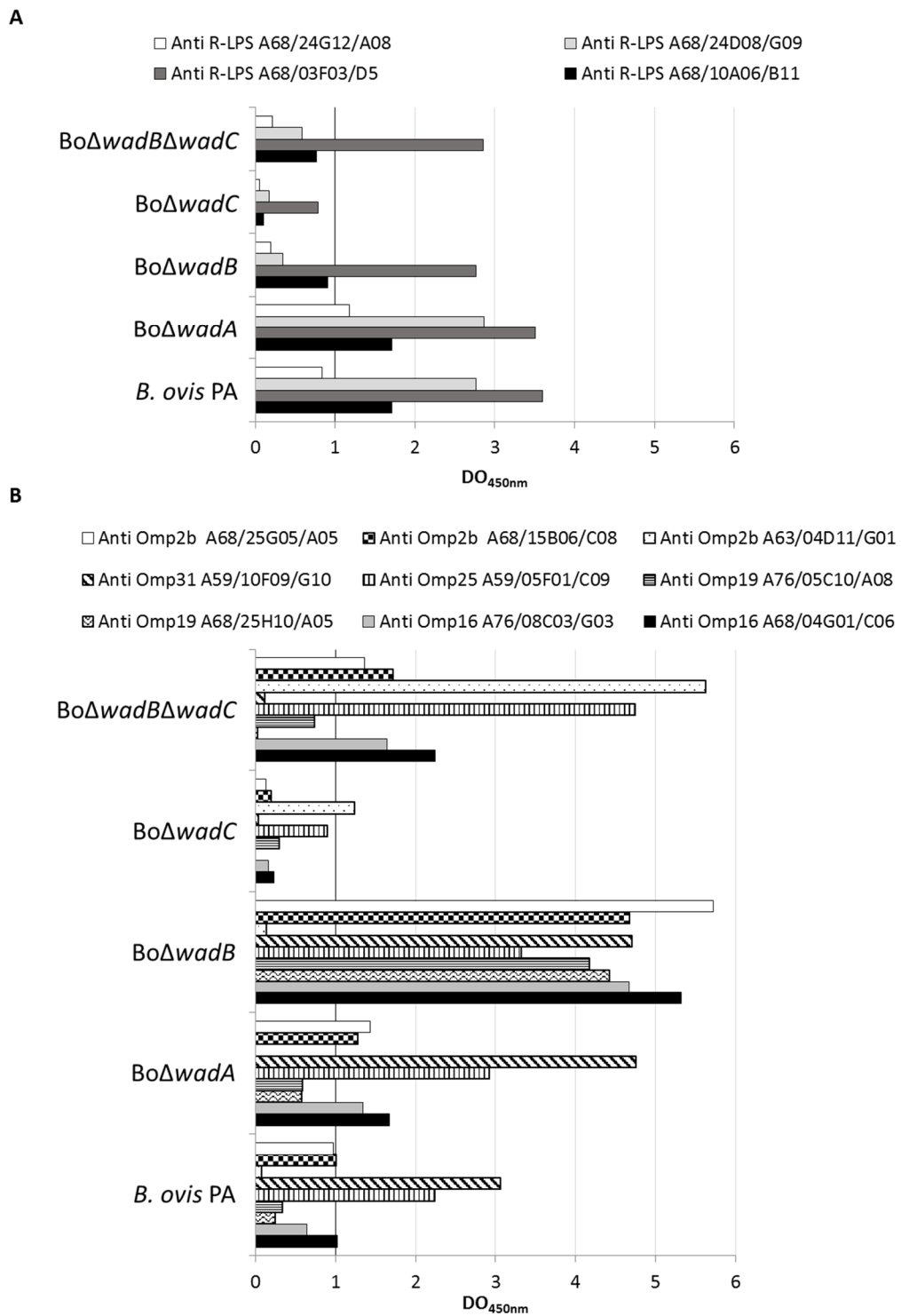


Figura 22. Topología de la superficie celular de distintos mutantes en genes del núcleo del LPS y su parental *B. ovis* PA con MoAbs frente a distintos epítomos del LPS-R (A) o de OMPs (B). La reactividad con los MoAbs se midió (DO_{450nm}) mediante la técnica de i-ELISA, utilizando como antígeno células muertas de la correspondiente cepa bacteriana.

A59/10F09/G10 frente a la Omp31, el cual mostró un incremento de reactividad. En el caso concreto de los MoAbs anti-Omp2b, se observó una mayor afinidad de los MoAbs A68/25G05/A05 y A68/15B06/C08 con los mutantes en Bo Δ wadB y Bo Δ wadB Δ wadC y menor con el mutante Bo Δ wadC comparados con la cepa parental. Por el contrario, el anticuerpo A63/04D11/G01 sólo reaccionó con los mutantes Bo Δ wadC y Bo Δ wadB Δ wadC. Todos estos resultados sugieren que las mutaciones en los genes wadB y wadC tienen efectos diferentes en la membrana externa de *B. ovis* y también afectan de distinta manera a la exposición y/o conformación de las principales OMPs.

4. Análisis del LPS mediante SDS-PAGE con Tricina y Western blot

Como se ha comentado anteriormente, la modificación con tricina de la técnica de SDS-PAGE permitió visualizar tres componentes distintos en el LPS de la cepa de *B. ovis* PA, siendo el mayoritario el componente I. El mismo patrón de migración fue obtenido con el LPS del mutante Bo Δ wadA (Figura 23A) y con los de las cepas revertidas de cada mutante (no mostrados). Sin embargo, el análisis de los LPS de los mutantes Bo Δ wadB, Bo Δ wadC y del doble Bo Δ wadB Δ wadC mostró claramente la ausencia del componente I de mayor peso molecular, lo que demuestra una deficiencia en la estructura del oligosacárido del núcleo de estos LPSs. El marcaje de las membranas con los MoAbs frente a LPS-R A68/10A06/B11, A68/24G12/A08, A68/03F03/D05, A68/24D08/G09 y A76/10B10/A01 confirmó el resultado anterior. Bo Δ wadA y Bo Δ wadC-Rev (utilizada como control) fueron marcadas con todos los anticuerpos probados. La ausencia de reactividad de estos anticuerpos con los LPS de los mutantes Bo Δ wadB, Bo Δ wadC y del doble Bo Δ wadB Δ wadC confirmó la ausencia de este fragmento de oligosacárido del núcleo.

5. Experimentos *in vivo* en el modelo murino

a. Ensayos de virulencia

La capacidad de colonización y de persistencia *in vivo* de los mutantes se evaluó mediante sacrificio y recuento de bacterias en bazo a las 3 y 10 semanas tras una infección peritoneal con $5-7 \times 10^5$ UFC/ratón. La infección producida por el mutante Bo Δ wadA alcanzó niveles muy similares a los de la cepa parental *B. ovis* PA (Tabla 10).

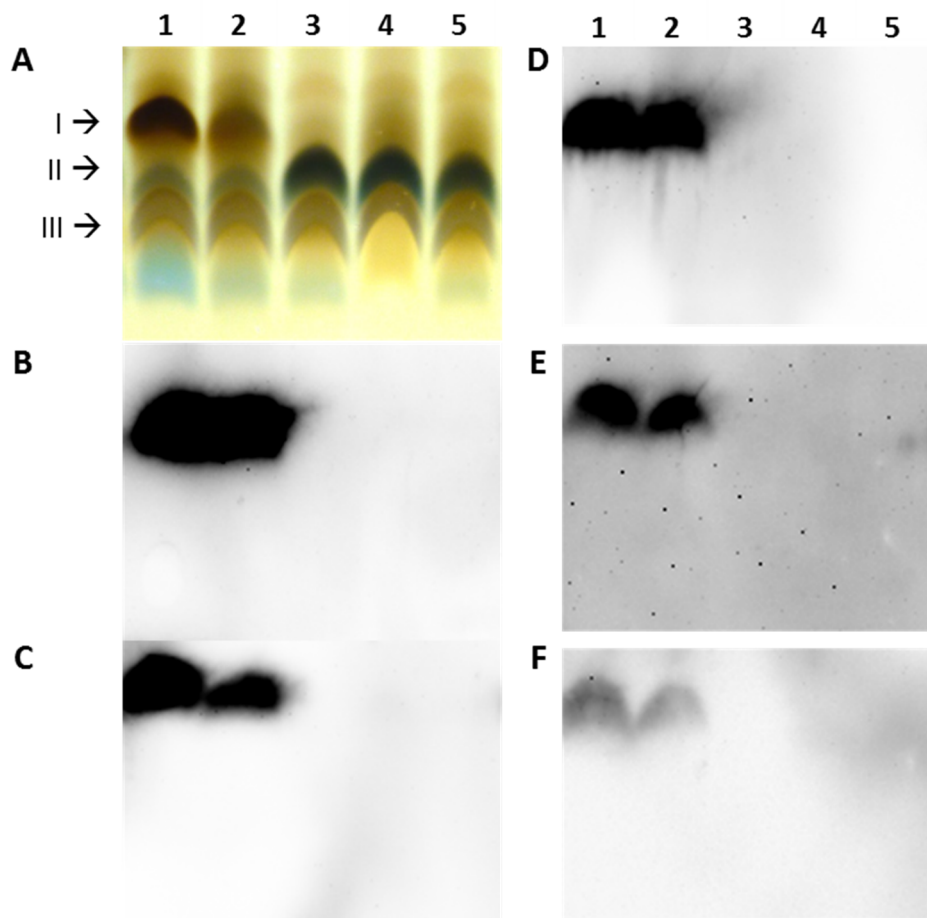


Figura 23. SDS-PAGE con Tricina (A) y *Western blot* (B-F) de los LPS de la cepa *B. ovis* PA (1) y sus mutantes en genes del núcleo del LPS *Bo* Δ *wadA* (2), *Bo* Δ *wadB* (3), *Bo* Δ *wadC* (4) y doble *Bo* Δ *wadB* Δ *wadC* (5). Se indican los componentes I, II y III en el gel de acrilamida teñido con plata amoniacal. Los MoAbs anti LPS-R empleados fueron A68/10A06/B11 (B), A68/24G12/A08 (C), A68/24D08/G09 (D), A68/03F03/D05 (E) y A76/10B10/A01 (F).

Por el contrario, los mutantes *Bo* Δ *wadB*, *Bo* Δ *wadC* y el doble *Bo* Δ *wadB* Δ *wadC* mostraron una atenuación significativa ($p < 0,005$). En concreto, la colonización del bazo (expresada como \log_{10} de las UFC en bazo) de estos tres mutantes a las tres semanas post infección [cuando la infección alcanza su máximo en este modelo (Grilló *et al.*, 2006)] fue significativamente inferior ($P < 0,005$) a la de la cepa parental. En los recuentos a las diez semanas post infección, el mutante *Bo* Δ *wadA* mantuvo una infección similar a la de la cepa parental, mientras que los mutantes *Bo* Δ *wadB*, *Bo* Δ *wadC* y el doble *Bo* Δ *wadB* Δ *wadC* mostraron una persistencia significativamente más reducida que la cepa *B. ovis* PA ($p < 0,005$). Al final del estudio, la mayoría de los ratones inoculados con *Bo* Δ *wadB*, *Bo* Δ *wadC* o *Bo* Δ *wadB* Δ *wadC* habían eliminado la cepa de sus bazos,

mostrando una menor persistencia ($p < 0,05$) que su cepa parental (Tabla 10). La infección con el doble mutante $Bo\Delta wadB\Delta wadC$ no mostró diferencias significativas con las de los mutantes simples $Bo\Delta wadB$ y $Bo\Delta wadC$. Además, los resultados con las cepas revertidas al genotipo salvaje ($Bo\Delta wadB$ -rev y $Bo\Delta wadC$ -rev) que alcanzaron niveles de infección y persistencia en bazo muy similares a los obtenidos con la cepa parental, demuestran que la atenuación de los mutantes en los genes *wadB* y *wadC* no era atribuible al propio proceso de mutagénesis.

Tabla 10. Evolución de la infección esplénica por *B. ovis* PA y de las cepas mutantes en glicosiltransferasas y revertientes en el bazo de ratones BALB/c.

Cepa (<i>B. ovis</i>)	Log ₁₀ UFC en bazo (media ± SD)		Nº de animales curados/ total analizados 10 semanas PI
	3 semanas PI	10 Semanas PI	
<i>B. ovis</i> PA	6,56 ± 0,52	4,67 ± 0,86	0/5
$Bo\Delta wadA$	6,78 ± 0,40	4,41 ± 2,01	0/5
$Bo\Delta wadB$	2,31 ± 1,91 ^a	0,80 ± 0,42 ^a	5/5 ^b
$Bo\Delta wadC$	3,82 ± 0,72 ^a	1,11 ± 0,77 ^a	4/5 ^b
$Bo\Delta wadB\Delta wadC$	4,19 ± 1,07 ^a	1,58 ± 1,52 ^a	3/5 ^b
$Bo\Delta wadB$ -rev	5,89 ± 0,77	4,90 ± 0,45	0/5
$Bo\Delta wadC$ -rev	6,49 ± 0,23	4,71 ± 1,68	0/5

Grupos de 10 ratones fueron inoculados por vía intraperitoneal con aproximadamente 10⁶ UFC/animal y sacrificados (n=5) a las 3 y 10 semanas post-infección (PI), para realizar los correspondientes recuentos bacterianos en los bazos. La comparación estadística de las medias se realizó mediante el test de las PSLD de Fisher: ^a $P < 0,005$ vs. *B. ovis* PA; y el porcentaje de animales curados mediante un test de Chi-cuadrado: ^b $P < 0,05$ vs. *B. ovis* PA.

b. Ensayos de protección frente a una infección por *B. ovis* PA

La atenuación de los mutantes en los genes *wadB* y *wadC* sugirió realizar un experimento de vacunación, para evaluar su poder de protección frente a una infección por *B. ovis* PA. Se seleccionaron los mutantes $Bo\Delta wadB$, $Bo\Delta wadC$ y el doble $Bo\Delta wadB\Delta wadC$ para el ensayo y los resultados se muestran en la Tabla 11. Se puede observar que los tres mutantes protegieron frente a una infección por *B. ovis* PA. La protección que confirió la cepa $Bo\Delta wadB$ resultó ser la más efectiva, mejorando de manera significativa ($p < 0,05$) la conferida por la cepa vacunal control de *B. melitensis* Rev 1 y previniendo la infección en 7 de los 10 ratones.

Tabla 11. Protección conferida por los mutantes en genes del núcleo del LPS de *B. ovis*, en ratones BALB/c frente a la infección por *B. ovis*.

Vacunación (dosis/ vía de inoculación)	Log ₁₀ UFC <i>B. ovis</i> en bazo (media ± SD)	Número de animales no infectados por <i>B. ovis</i> / Totales analizados
BoΔ <i>wadB</i> (10 ⁸ /IP)	1,08 ± 1,22 ^{a, c}	7/10 ^{a, c}
BoΔ <i>wadC</i> (10 ⁸ /IP)	2,18 ± 1,59 ^a	5/10 ^b
BoΔ <i>wadB</i> Δ <i>wadC</i> (10 ⁸ /IP)	3,13 ± 2,58 ^b	4/10
<i>B. melitensis</i> Rev 1 (10 ⁵ /SC)	2,75 ± 1,26 ^b	2/10
PBS (Control sin vacunar)	6,24 ± 0,48 ^c	0/10

Grupos de 10 ratones fueron vacunados por vía intraperitoneal (IP) con la dosis óptima (10⁸ UFC/animal) de los mutantes BoΔ*wadB*, BoΔ*wadC* o BoΔ*wadB*Δ*wadC*. Como controles, se utilizaron animales (n=10) vacunados con *B. melitensis* Rev 1 en condiciones estándar (10⁵ UFC/animal, vía subcutánea -SC-) y sin vacunar (inoculados con PBS, vía IP). Todos ellos fueron infectados experimentalmente 4 semanas después de la vacunación, con la cepa virulenta *B. ovis* PA-Gm^R y sacrificados 3 semanas después de la infección, para determinar el log₁₀ UFC/bazo de la cepa virulenta. Comparaciones estadísticas mediante el test de la PLSD de Fisher: ^a p<0,005 y ^b p<0,05 vs. control sin vacunar; ^c p<0,05 vs. control Rev 1.

6. Reconocimiento de los mutantes por sueros de animales infectados

La caracterización de los mutantes demuestra diferencias a nivel de la membrana externa entre ambas cepas. Por ello, se analizó si estas diferencias podrían tener consecuencias en el reconocimiento de las bacterias por el propio huésped natural. Para ello, se analizaron mediante ELISA células inactivadas de estos mutantes frente a una selección de sueros de carneros infectados naturalmente por *B. melitensis* y *B. ovis*. El estudio mediante i-ELISA usando como anticuerpo primario el suero de carneros infectados con *B. ovis* no mostró ninguna diferencia entre la cepa parental y ninguno de los mutantes (Figura 24). Se emplearon también sueros de carneros infectados por *B. melitensis*, para evaluar si estas cepas podían discriminar mejor entre carneros infectados por *B. ovis* y *B. melitensis*. Sin embargo, los resultados no mostraron diferencias (Figura 24).

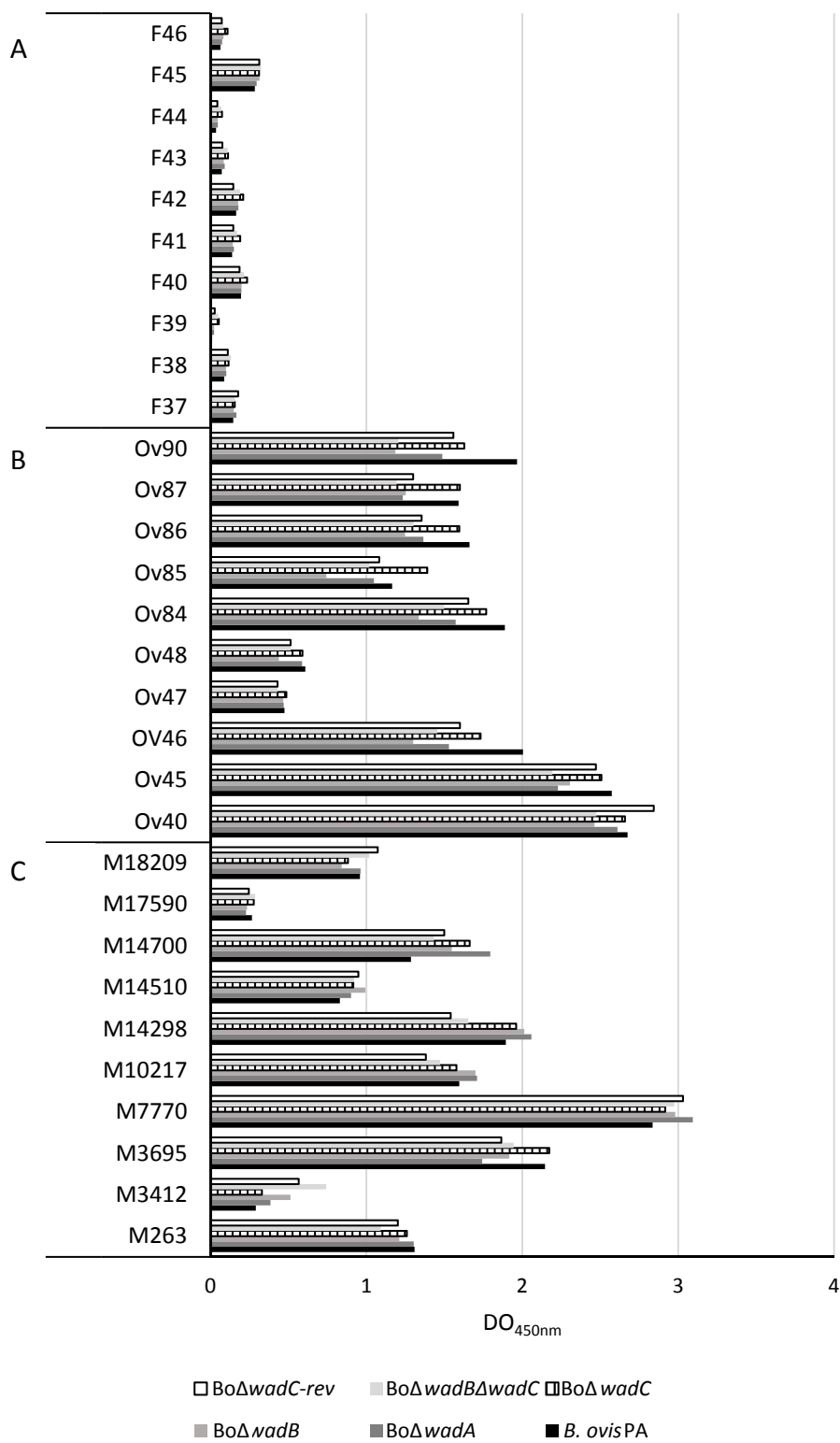


Figura 24. Topología de la superficie celular de los mutantes en el núcleo del LPS de *B. ovis* frente a sueros de carneros libres de *Brucella* (A) o infectados con *B. ovis* (B) o con *B. melitensis* (C). La reactividad con los anticuerpos se midió (DO_{450nm}) mediante la técnica de i-ELISA, utilizando como antígeno células muertas de la correspondiente cepa bacteriana.

V. CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN DEL MUTANTE EN LA FOSFOMANOMUTASA *manB*_{O-Ag} DE *B. ovis*

Se ha demostrado que, en *B. abortus* y *B. melitensis*, el gen *manB*_{core} es una fosfomanomutasa implicada en la síntesis de azúcares precursores del LPS (Monreal *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008). Como hemos visto previamente, en el caso de *B. ovis* este gen *manB*_{core} posee una mutación natural que lo inactivaría.

Respecto al gen *manB*_{O-Ag} no está clara su función. En *B. melitensis* la mutación en *manB*_{O-Ag} no genera diferencias en el LPS con respecto a su cepa parental (González *et al.*, 2008). En el caso de *B. ovis* la secuencia de este gen *manB*_{O-Ag} tiene una alta homología con *B. suis*, *B. canis* y *B. microti*, y conserva la secuencia carboxi terminal que contiene el cuarto dominio de la enzima fosfomanomutasa. Para comprobar si en *B. ovis* éste gen podría estar supliendo la función del gen *manB*_{core}, se construyó el mutante por delección *Bo*Δ*manB*_{O-Ag}, según el método descrito en Material y Métodos. La amplificación por PCR y secuenciación del locus del mutante confirmó la inactivación del gen respectivo, así como que mantenía el marco de lectura.

1. Caracterización fenotípica clásica y propiedades físico-químicas y biológicas

El mutante fue analizado con las pruebas de caracterización y tipificación bioquímica y molecular mencionadas previamente. Los resultados no mostraron ninguna diferencia con respecto a la cepa parental (Tabla 7).

Los resultados de la autoaglutinación del mutante *Bo*Δ*manB*_{O-Ag} se muestran en la Figura 25. Se observa como el mutante pierde la propiedad de aglutinar entre sí cuando se mantiene en suspensión estática. Respecto al potencia Z (Figura 26) la carga

Tabla 12. Susceptibilidad a la acción bactericida del suero ovino no inmune y la polimixina B.

Cepa	% Supervivencia bacteriana (media ± SD)	
	Suero no inmune	Polimixina B
<i>B. ovis</i> PA	93 ± 5,5	88±9
<i>Bo</i> Δ <i>manB</i> _{O-Ag}	95±4,1	99±4

Comparaciones estadísticas mediante el test PLSD

neta del mutante $Bo\Delta manB_{O-Ag}$ fue más negativa que la de la cepa parental *B. ovis* PA. En relación a la sensibilidad al suero no inmune y a la polimixina B, el mutante $Bo\Delta manB_{O-Ag}$ no mostró diferencias en la supervivencia frente a una exposición a suero no inmune de carnero ni a la polimixina B (Tabla 12).

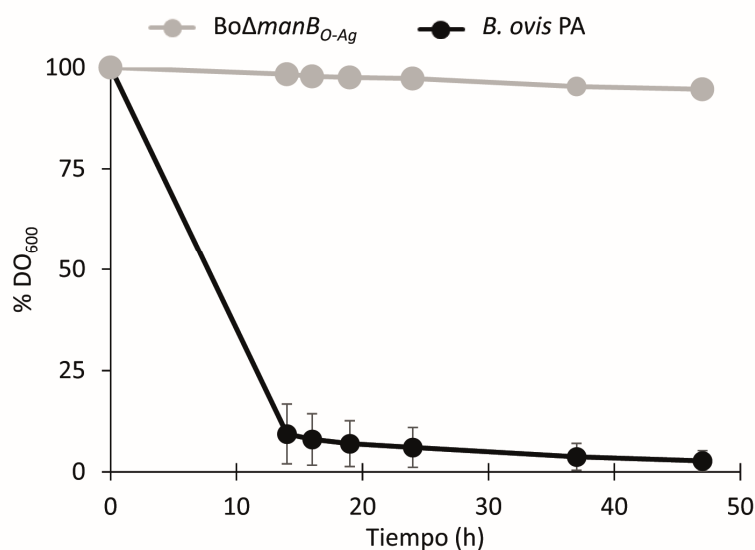


Figura 25. Ensayo de autoaglutinación del mutante $Bo\Delta manB_{O-Ag}$ y su cepa parental *B. ovis* PA. Los resultados representan la media y SD de tres experimentos independientes.

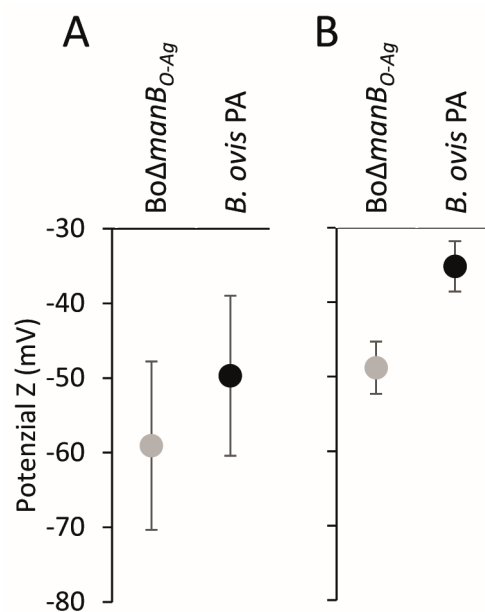
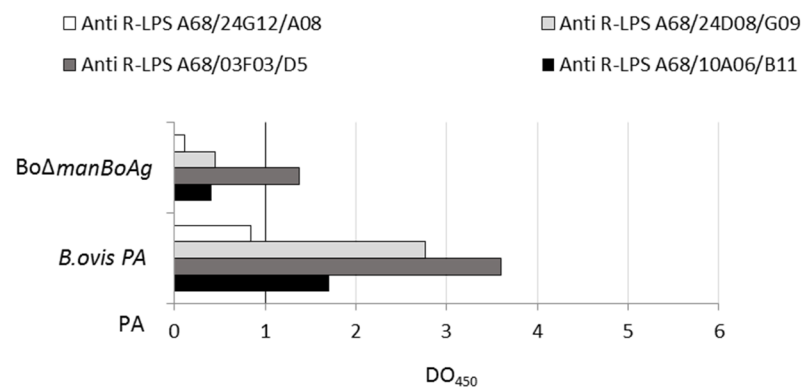


Figura 26. Potencial Z (mV) de la superficie bacteriana del mutante $Bo\Delta manB_{O-Ag}$ y su cepa parental *B. ovis* PA. (A) con células resuspendidas en CsCl 10mM; (B) con células resuspendidas en KCl 0,1 M. Los resultados representan la media y SD de 10 medidas.

2. Caracterización topológica de la envoltura celular mediante i-ELISA con MoAbs

El análisis de la superficie celular del mutante *Bo* Δ *man**Bo-Ag* mediante ELISA (Figura 27) mostró un descenso generalizado de la reactividad con anticuerpos frente a LPS-R y OMPs. De hecho, únicamente se observaron valores de D.O. superiores a 1 en presencia de los MoAbs A68/03F03/D05 (anti LPS-R), A59/05F01/C09 (anti Omp25) y A59/10F09/G10 (anti Omp31). Éstos MoAbs fueron también los que reaccionaron más

A



B

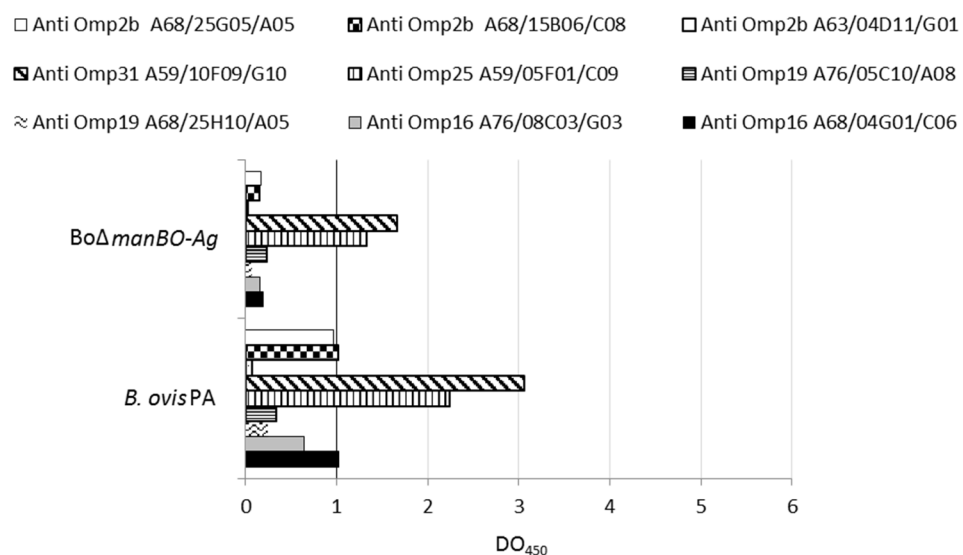


Figura 27. Topología de la superficie celular del mutante *Bo* Δ *manBo-Ag* y su parental *B. ovis* PA con MoAbs frente a distintos epítomos del LPS-R (A) o de proteínas de membrana externa (B). La reactividad con los MoAbs se midió (DO_{450nm}) mediante la técnica de i-ELISA, utilizando como antígeno células muertas de la correspondiente cepa bacteriana.**

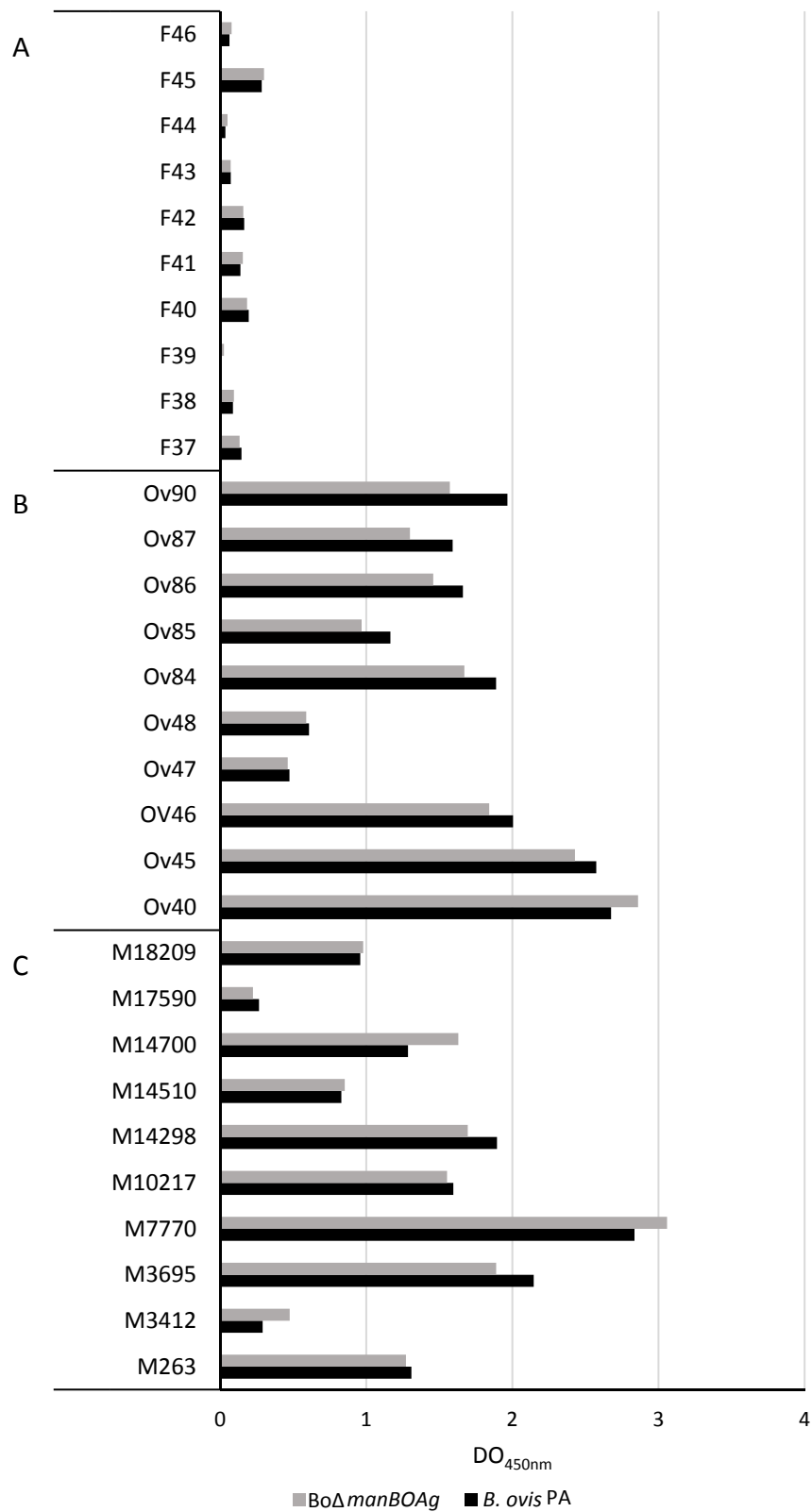


Figura 28. Topología de la superficie celular de *BoΔmanBOAg* (en gris) y su parental *B. ovis* PA (en negro) frente a sueros de carneros libres de *Brucella* (A) o infectados con *B. ovis* (B) o con *B. melitensis* (C). La reactividad con los anticuerpos se midió (DO_{450nm}) mediante la técnica de i-ELISA, utilizando como antígeno células muertas de la correspondiente cepa bacteriana.

intensamente con la cepa parental *B. ovis* PA. Al evaluar este mutante con sueros de carnero infectados con *B. ovis* y con *B. melitensis*, no se observó ninguna diferencia con respecto de la cepa parental (Figura 28).

3. Análisis del LPS mediante SDS-PAGE con tricina y *Western blot*

El análisis mediante SDS-PAGE con tricina (Figura 29) se observó una disminución en la intensidad de la banda correspondiente al componente I, mientras que aumentó la banda correspondiente al componente II, un patrón muy similar al encontrado en la cepa de *B. ovis* REO (ver Figura 18). La transferencia de los geles a una membrana de nitrocelulosa y posterior marcaje de ésta con los MoAbs anti LPS-R A68/10A06/B11, A68/24G12/A08, A68/03F03/D05 y A68/24D08/G09 mostró en todos los casos una disminución de la intensidad de banda correspondiente al componente I (Figura 29).

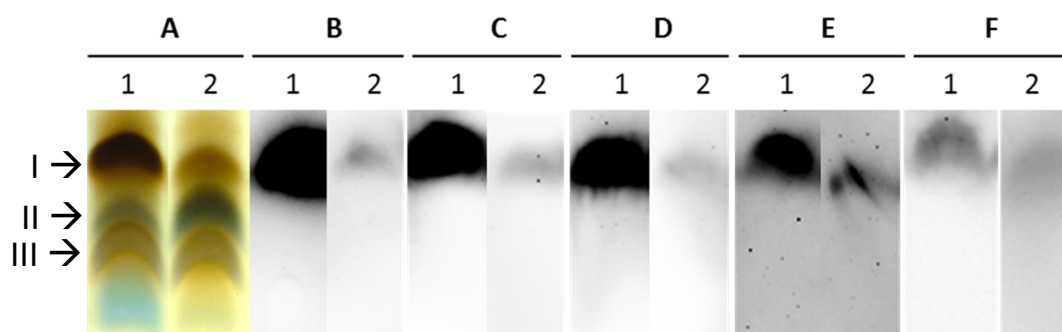
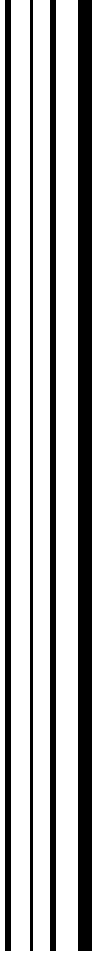
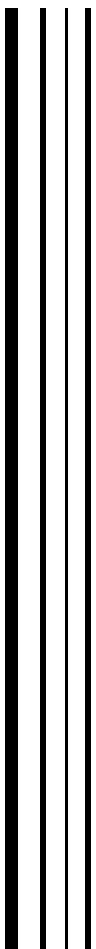


Figura 29. SDS-PAGE con Tricina (A) y *western blot* (D-F) de los LPS de la cepa *B. ovis* PA (1) y su mutante en el gen *BoΔmanB_{O-Ag}* (2). Se indican los componentes I, II y III en el gel de acrilamida teñido con plata amoniaca. Los MoAbs anti LPS-R empleados fueron A68/10A06/B11 (B), A68/24G12/A08 (C), A68/24D08/G09 (D), A68/03F03/D05 (E) y A76/10B10/A01 (F).



Discusión



I. Los genes implicados en la síntesis del LPS en *Brucella*: análisis comparativo *in silico*.

El género *Brucella* presenta una alta homología a nivel genómico. La hibridación del DNA de las distintas especies del género *Brucella* presentan una homología del 97-100% entre sus genomas (Verger *et al.*, 1985). Esta es una de las razones por las que algunos autores sugirieron unificar las distintas especies en una sola relegando las especies tradicionales a biovariedades: *B. abortus* sería *B. melitensis* biovariedad *abortus*, por ejemplo (Verger *et al.*, 1985). No obstante, por razones prácticas, esta propuesta no ha tenido el consenso de la comunidad científica y finalmente ha prevalecido la clasificación clásica y mantenerlas separadas (Moreno *et al.*, 2002). La progresiva publicación de los genomas de *B. melitensis* (DelVecchio *et al.*, 2002), *B. abortus* (Chain *et al.*, 2005), *B. suis* (Paulsen *et al.*, 2002), *B. pinnipedialis* (Audic *et al.*, 2011), *B. canis* (Wattam *et al.*, 2009), *B. ovis* (Tsolis *et al.*, 2009) y *B. microti* (Audic *et al.*, 2009) y de otras muchas cepas, disponibles en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>, permite ya un análisis comparativo mucho más detallado. El genoma de *B. ovis*, por ejemplo, no difiere en tamaño con respecto al genoma del resto de especies de *Brucella* (Tsolis *et al.*, 2009), pero, sin embargo posee un alto número de pseudogenes y secuencias de inserción (Halling *et al.*, 1993; Ouahrani *et al.*, 1993; Ocampo-Sosa and García-Lobo, 2008; Gyuranecz *et al.*, 2013). Además, carece de algunas regiones implicadas en la virulencia de las otras especies de *Brucella*, como por ejemplo la región *wbo* (Vizcaíno *et al.*, 2004; Rajashekara *et al.*, 2008).

El tema central de este trabajo ha sido profundizar en la caracterización del núcleo del LPS de *B. ovis*. No obstante, en el análisis *in silico* estudiamos también otros genes implicados en la modificación de estructuras relacionadas, como las diaminogluosas del lípido A o la perosamina de la cadena O, genes que ya han sido caracterizados previamente en *Brucella* (Monreal *et al.*, 2003; Conde-Álvarez, 2008; González *et al.*, 2008; Gil-Ramírez, 2011; Conde-Álvarez *et al.*, 2012). Una de las primeras evidencias que se comprobó es que las anotaciones de las secuencias en las bases de datos acumulan bastantes fallos. Por ejemplo, los genes *wadA*, *lpxE1*, *lpxE2*, *per*, BMEI0418 y *manB_{O-Ag}* en *B. melitensis* difieren en el inicio del gen con respecto al resto de especies comparadas sin tener una base genética que apoye estas diferencias.

La corrección de la anotación de estas secuencias permite comprobar como en algunos casos la homología entre las especies de *Brucella* es mayor de lo que se corresponde. En otros casos, como es la ORF ortóloga a *per* de *B. ovis*, se puede deducir que es un pseudogen mal anotado.

Otro evidencia es que, en general, los genes relacionados con la síntesis del núcleo del LPS y el lípido A están muy conservados en *Brucella* y presentan una muy alta homología entre las distintas especies. Los pequeños cambios de algunos aminoácidos no parece que vayan a provocar un cambio en la funcionalidad de las proteínas. Tampoco se observó polimorfismo genético en estas secuencias al analizar las distintas cepas y aislamientos de *B. ovis*. Estos resultados son esperados en tanto en cuanto ambas estructuras (el lípido A y al menos la parte interna del núcleo del LPS) son esenciales para la viabilidad de la bacteria. Además, nuestro estudio confirmó las observaciones ya descritas anteriormente (Gil-Ramírez, 2011).

Respecto a la glicosiltransferasa WadA, para comprobar cómo podrían afectar a la proteína los pequeños cambios de aminoácidos encontrados en algunas secuencias, se realizó un análisis bioinformático de la secuencia proteica y se observó que la estructura es más compleja de lo esperado. El análisis con interpro mostró que WadA de *Brucella* posee un dominio glicosiltransferasa de la familia 25 en el extremo carboxi-terminal con orientación al citoplasma, ocho dominios transmembrana, otro dominio WzyC antígeno O ligasa seguido de seis dominios transmembrana. En otras especies, el dominio WzyC aparece dentro de la enzima WaaL (antes RfaL) que se ha descrito como una ligasa de antígeno O, encargada de la unión de la cadena O unida al bactoprenol con la región del núcleo-lípido A en la membrana interna y orientada hacia el periplasma (Klena *et al.*, 1992; Abeyrathne *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2008). Esta proteína WaaL presenta muy baja homología entre distintas especies bacterianas. Por ejemplo, en *E. coli* difiere mucho de la de *Salmonella*, por lo que se cree que es específica del complejo núcleo-lípido A de cada especie bacteriana (Klena *et al.*, 1992; Iriarte *et al.*, 2004). En *Brucella*, no se ha encontrado esta proteína y no se ha descrito el mecanismo exacto por el cual se une la cadena O al complejo núcleo-Lípido A y (Iriarte *et al.*, 2004). Sin embargo, esta predicción estructural de WadA sugiere que podría llevar a cabo más funciones que sólo

la de glicosiltransferasa: tras la adición de una glucosa para completar la sección del núcleo-lípido A (glicosiltransferasa), esta molécula completa sería trasladada al periplasma para su posterior unión con la cadena O (ligasa) (Figura 30). La baja homología de *waaL* entre las bacterias ha podido ocultar esta actividad enzimática de WadA en *Brucella*. Esta interpretación concuerda con los resultados al realizar una búsqueda con Blastp de la secuencia WadA de *Brucella* en otras especies. La secuencia está conservada en algunas especies de los géneros *Mesorhizobium*, *Ochrobactrum* y *Rhizobium*. En muchas de estas especies, la secuencia está anotada como dos genes, ya que entre la región glicosiltransferasa y la región WaaL aparece un solapamiento entre el codón de parada de la primera y el de inicio de la segunda, ATGA. Se ha descrito que esta secuencia ATGA es un mecanismo de regulación que provoca la reiniciación de la

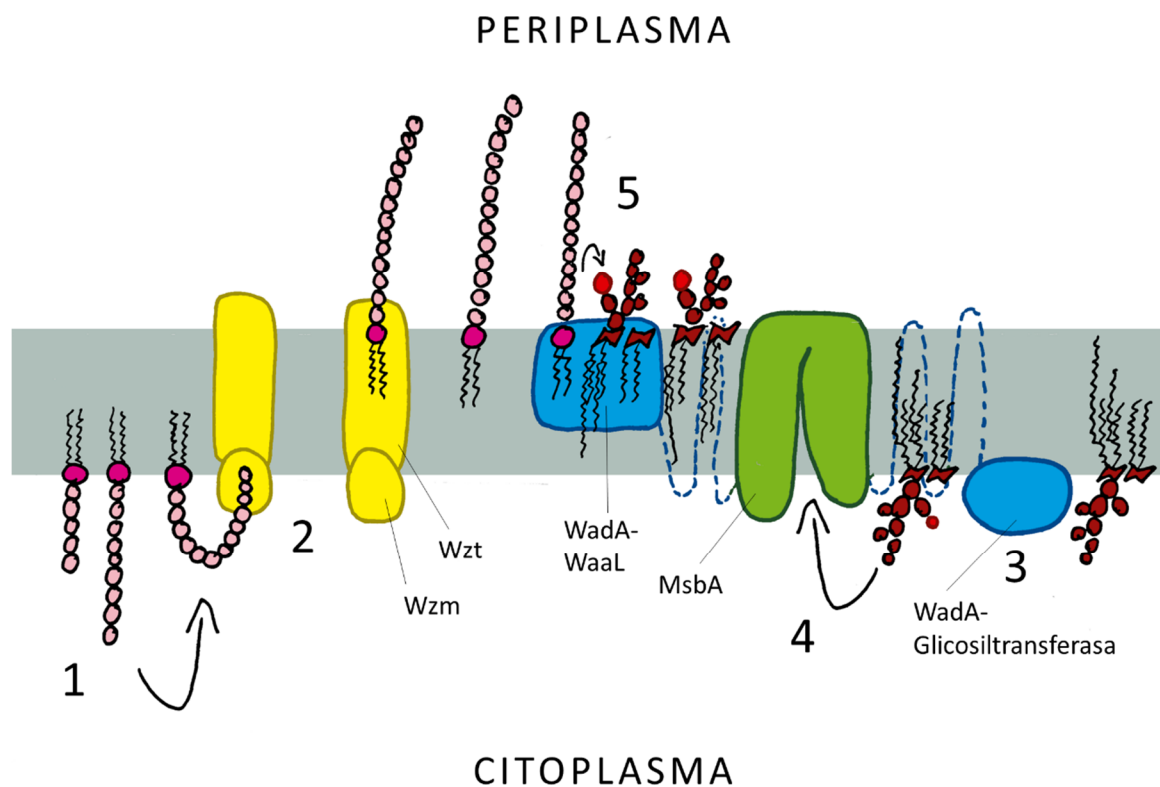


Figura 30. Síntesis del LPS de *Brucella* y papel propuesto de WadA. Por un lado se produce la síntesis de la cadena O (1) y posterior salida al periplasma mediante Wzm/Wzt (2). Por otro lado, tras la adición del último azúcar al núcleo por parte del dominio glicosiltransferasa-WadA (3), es transportada al periplasma por la proteína MsbA (4). Finalmente la región WaaL-WadA se encargaría de transferir la cadena O al núcleo-lípido A y completar la molécula (5).

transcripción en *E. coli* (Gold, 1988). Así se conseguiría que la traducción de la ligasa de la cadena O, fuera directamente seguida de la traducción de la glicosiltransferasa que completa el núcleo del LPS. En *Brucella* al no encontrarse ese codón de parada, se traduce como una proteína con ambas funciones.

Respecto a los genes *manB*, la delección en *manB_{core}* está conservada en todas las cepas y asilamientos de *B. ovis* estudiados, por lo que se puede considerar sin lugar a duda un pseudogen en esta especie. En el caso de *manB_{O-Ag}*, la proteína correspondiente es la más polimórfica de las analizadas en este estudio. Además, se había descrito su inactivación en las cepas marinas de *Brucella* y una delección en el final del gen en *B. melitensis* y *B. abortus* (Zygmunt *et al.*, 2009). Las implicaciones de estas mutaciones serán discutidas más adelante en esta discusión.

2.- Caracterización topológica de la superficie celular de mutantes en el LPS de *Brucella*.

Los MoAbs utilizados han sido previamente caracterizados con distintas cepas de *Brucella* (Cloeckart *et al.*, 1993; Cloeckart *et al.*, 1993; Bowden *et al.*, 1995; Cloeckart *et al.*, 1998; Baucheron *et al.*, 2002; Zygmunt *et al.*, 2012; Zaccheus *et al.*, 2013). Al modificar el núcleo del LPS, no se puede descartar que se generan además cambios conformacionales de la molécula completa y/o que afectan también a la conformación del entorno, esto es las OMPs. Por ello, antes de proceder a la construcción de los mutantes en el núcleo del LPS de *B. ovis*, se analizó cómo mutaciones en genes relacionados con el LPS en otras especies de *Brucella* afectaban a la conformación de la membrana externa (LPS y OMPs).

Para interpretar los resultados de los experimentos de los ELISAS, hay que tener en cuenta algunas limitaciones metodológicas. *Brucella* es un patógeno clasificado como BSL-3, y por ello estos ensayos no pudieron realizarse con células frescas, que hubiera sido lo idóneo. Las células fueron inactivadas con fenol y liofilizadas, y para homogeneizar las suspensiones celulares, éstas se sonicaron. Por ello, es probable que estas manipulaciones pudieran alterar la estructura de la envoltura y modificar algún epítipo o exponerlo al exterior cuando en realidad esté oculto en células vivas y enteras.

De los mutantes estudiados, solo los afectados en el gen *lpxE* y en la glicosiltransferasa *BAB1_1620* no mostraron ningún cambio significativo. Esto está en consonancia con los resultados obtenidos previamente (Conde-Álvarez, 2008; Gil-Ramírez, 2011).

En los mutantes rugosos *per*, *wadA*, *manB_{core}* y *pgm* el anticuerpo A68/24G12/A08 es el único anti LPS-R que aumenta su afinidad. Muy probablemente, la pérdida de la cadena O facilita el acceso de este anticuerpo al núcleo del LPS. Por ello, en los mutantes lisos que no tienen alterado el núcleo *lpxE*, *BAB1_1620*, *manB_{O-Ag}* y *lptA* la afinidad es similar a la de las cepas parentales respectivas. Por el contrario, los mutantes *wadB*, *wadC* y *wadB-wadC* reaccionan mucho menos con este MoAb: los mutantes en *B. abortus* y *B. melitensis* pierden casi toda la reactividad, mientras que en *B. suis* (*BsΔwadC* y *BsΔwadBΔwadC*), mantienen algo de reactividad. Estos resultados, por tanto, sugieren que el A68/24G12/A08 está reconociendo específicamente la rama lateral del núcleo del LPS de *Bucella*, por lo que este MoAb puede ser un buen marcador de que se ha modificado esa rama del núcleo.

Los anticuerpos anti LPS-R A68/03F03/D05, A68/24D08/G09 y A68/10A06/B11 sólo mostraron diferencias en los mutantes *wadB* y *wadC* de *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis*. El A68/03F03/D05 es el que mostró una mayor reactividad, y de hecho los mutantes *wadC* y *wadB-wadC* de *B. abortus* y *B. suis* mantuvieron unos niveles de reactividad similares a las cepas parentales. Este anticuerpo A68/03F03/D05 puede estar reconociendo, por tanto, epítomos muy conservados en el núcleo. Sin embargo, resulta sorprendente que el mutante *wadB* pierda toda reactividad, mientras que el doble mutante *wadB-wadC* no se encuentre alterado. Una posible explicación sería que el mutante *wadB*, que probablemente no elimine toda la rama lateral del núcleo del LPS, provoque un cambio conformacional en el epítomo que reconocen estos anticuerpos mayor que en el caso de eliminar la rama por completo. Sin embargo, al igual que el doble mutante *wadB-wadC*, el doble mutante *per-wadC* de *B. melitensis* y *B. abortus* no se comportan como el mutante *wadC*, respecto a la reactividad con MoAbs frente al núcleo. Estos dos mutantes mantienen una afinidad similar al mutante *per* y a la cepa parental. Es posible que el orden en el que se construyen estos dobles mutantes juegue

un papel importante en la alteración de las propiedades de la envoltura. Sería interesante disponer de dobles mutantes construidos en el orden inverso, esto es *wadC-wadB* y *wadC-per*, así como un mutante *per-wadB* que pudieran arrojar más luz sobre estas diferencias en el reconocimiento del núcleo del LPS por parte de estos MoAbs.

Aunque los resultados obtenidos con los MoAbs frente a la cadena O 12B12, B66/02C08/C04, A53/18H08/A2 y A15/05G02/E11 permitieron distinguir claramente entre las cepas lisas y rugosas, algunos otros MoAbs anti LPS-S reaccionan con mutantes que se identifican como rugosos. Por ejemplo, el anticuerpo 12B12, que está descrito como C(M>A) y no reaccionó con ninguna cepa de *B. suis*, reaccionó con las cepas lisas en *B. abortus* y *B. melitensis* y no con las rugosas. Sin embargo, esto no fue así en el caso de los mutantes rugosos *pgm* y *wadA* de *B. melitensis*. Estos genes no están involucrados en la síntesis de la cadena O pero sus mutantes son rugosos y no expresan la cadena O en el exterior, pero pueden retenerla en su interior. Al sonicar para resuspender las células, estos epítomos pueden haber quedado expuestos y reaccionar con el MoAb. En el caso del anticuerpo B66/02C08/C04 (anti A), que no reaccionó con *B. melitensis*, aunque mostró baja afinidad en *B. abortus* y *B. suis*, sí que se observó que los mutante rugosos reaccionaban menos. El anticuerpo A15/05G02/E11, por su parte, posee una especificidad anti M y reconoce epítomos expuestos en las células lisas en *B. melitensis*, pero no en las rugosas. En contra de lo esperado, este anticuerpo se unió de manera bastante afín en los mutantes *B. abortus* Ba Δ *wadB* y *B. suis* Bs Δ *wadA*, lo que puede estar en relación a lo comentado anteriormente de que ya se han descrito la presencia de epítomos similares al M en cepas rugosas de *B. abortus* (Cloeckaert *et al.*, 2002).

Sin embargo, los resultados con los anticuerpos B66/04F09 y 05D04 que reconocen epítomos comunes con *Yersinia enterocolitica* O:9 (C/Y(A>M)), fueron confusos. En general, la cepa parental *B. melitensis* 16M no reaccionó con intensidad con estos anticuerpos. Sin embargo, los mutantes en *B. melitensis* *lptA*, *wadB* y *wadC* reaccionaron con mayor afinidad. Es probable que, en *B. melitensis*, los cambios provocados por la ausencia de estructuras en el lípido A o en el núcleo del LPS, dejan más expuesta zonas reconocidas por estos dos anticuerpos.

Los resultados con los mutantes *manB_{core}* merecen ser discutidos en profundidad. Estos mutantes, según lo descrito anteriormente y lo observado en los *Western blot* de este trabajo, son cepas rugosas con un núcleo del LPS muy alterado (Monreal *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008). Esto concuerda con nuestros resultados, los mutantes *manB_{core}* reaccionan más con los MoAbs anti OMPs y con el anticuerpo anti LPS-R A68/24G12/A08 y con menor intensidad con cinco de los MoAbs anti LPS-S. Sin embargo, en los ELISAS con células enteras los anticuerpos anti LPS-S B66/04F09 y 05D04 reaccionan intensamente con los mutantes *manB_{core}* de ambas *B. melitensis* y *B. abortus*. Aunque no se puede concluir la presencia de cadena O en el LPS de estos mutantes, Monreal *et al.* ya han descrito que la inmunización con LPS de *manB_{core}* de *B. abortus* produce bajos títulos de cadena O (Monreal, 2003), y los mutantes *manB_{core}* de *B. abortus* y *B. melitensis* reaccionan levemente con sueros policlonales anti LPS-S (González, 2003; Monreal, 2003). Además, los resultados obtenidos por SDS-PAGE y *Western blot* con anticuerpos frente al núcleo no mostraron reacción a la altura del LPS completo, por lo que en caso de haber un polisacárido éste no está unido al núcleo-lípido A. En la caracterización original de estos mutantes (Monreal *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008), se demostró que reaccionaban intensamente con los MoAbs anti LPS-R Baro-1 y Baro-2. Estos MoAbs reconocen epítopos del núcleo externo y zonas más conservadas, respectivamente. En nuestros ELISAS, ambos mutantes reaccionaron más intensamente con el anticuerpo anti LPS-R A68/24G12/A08, pero de forma similar a las cepas parentales con los otros tres MoAbs anti LPS-R. Esto demuestra que los epítopos del núcleo que reconocen los MoAbs Baro-1, Baro-2 y los empleados en este trabajo son diferentes.

3.- Comparación entre las cepas salvajes PA y REO de *B. ovis*

La cepa *B. ovis* REO ha sido ampliamente utilizada por ser más sencilla de manejar en el laboratorio, ya que no requiere de CO₂ ni de suero para su cultivo, por lo que se recomienda para la obtención de antígeno para las pruebas de diagnóstico de la brucelosis ovina (Garin-Bastuji and Blasco, 2013). Esta cepa es además avirulenta. En células HeLa se elimina tras dos horas de infección (Freer *et al.*, 1999). La supervivencia de *B. ovis* REO se ve muy afectada en medio ácido y en suero (Martín-Martín *et al.*,

2011), lo que podría relacionarse con su baja supervivencia intracelular. En un experimento con ratones IRF-1^{-/-}, cuya supervivencia tras una infección por *Brucella* no supera a las dos semanas, los animales infectados por *B. ovis* REO seguían vivos al final del experimento, a diferencia de los infectados con *B. canis*, *B. neotomae* y *B. melitensis* (Rajashekara *et al.*, 2008). A diferencia de REO, la cepa *B. ovis* PA es virulenta y es capaz de infectar tanto células HeLa como macrófagos J774.A 1 (Martín-Martín *et al.*, 2008).

Freer *et al.* compararon las propiedades de la membrana externa de esta cepa con las de mutantes rugosos de *B. abortus* y observaron que *B. ovis* REO poseía una membrana más permeable a sondas hidrofóbicas y más susceptible a los péptidos catiónicos (Freer *et al.*, 1999). Martín-Martín comparó también las propiedades de la membrana externa de las seis cepas clásicas de *Brucella* e incluyó las cepas PA y REO de *B. ovis* (Martín-Martín *et al.*, 2011). A diferencia de los resultados obtenidos por Freer (Freer *et al.*, 1999), ambas cepas sobreviven a exposiciones de polimixina B y de detergentes.

En este trabajo hemos observado diferencias en la envoltura celular entre *B. ovis* PA y REO. El análisis mediante SDS-PAGE con tricina demostró que la proporción de las bandas del LPS-R entre ambas cepas era diferente: el LPS de REO se resolvió con una disminución del componente I a favor del II. Estos cambios contribuyen obviamente a las claras diferencias observadas en las propiedades de la envoltura celular: mayor carga neta negativa, no autoaglutinación, mayor reactividad con los MoAbs anti OMPs y LPS-R, en REO respecto PA. El perfil del LPS de REO (disminución del componente I a favor del II), se asemeja más al del mutante Bo Δ *manB*_{O-Ag} y, en parte, al de los mutantes en la rama lateral del núcleo *wadB* y *wadC*, que carecen del componente I y el II es mayoritario. Además, el mutante Bo Δ *manB*_{O-Ag} tampoco autoaglutina y presenta una mayor carga neta negativa, los mismo que REO. El análisis de las secuencias genéticas del gen *manB*_{O-Ag} reveló además un corrimiento en el marco de lectura de este gen en *B. ovis* REO que inactivaría el gen. Aunque las propiedades del *B. ovis* REO y del mutante Bo Δ *manB*_{O-Ag} no son equivalentes, todos estos resultados sugieren que la cepa REO presenta algún tipo de alteración en el núcleo del LPS-R, en comparación con *B. ovis* PA. Esta interpretación concuerda con el hecho de que el LPS de *B. ovis* REO tiene una baja

composición en manosa comparada con las cepas rugosas *B. abortus* 45/20, *B. melitensis* B115 y *B. canis*, y éstas a su vez más baja que una cepa lisa de *B. abortus* (Moreno *et al.*, 1984).

Las diferencias encontradas entre estas dos cepas de *B. ovis* no son sin embargo suficientes como para alterar el reconocimiento de sueros de carneros infectados por *B. ovis* o *B. melitensis*. Por ello, no es recomendable ni práctico emplear la cepa *B. ovis* PA en vez de la REO para la producción de antígeno (REO es más fácil de cultivar y PA es virulenta). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que no es recomendable emplear la cepa REO como modelo de *B. ovis*. Sería muy interesante secuenciar y analizar el genoma completo de *B. ovis* REO para caracterizar las diferencias metabólicas que facilitan su cultivo y poder aplicarlas así en otras cepas como *B. ovis* PA o *B. ovis* ATCC 25840.

4.- Los mutantes *wadA*, *wadB*, *wadC* y su implicación en la síntesis del núcleo del LPS de *B. ovis*.

Las distintas especies de *Brucella* presentan diferencias en la estructura del LPS. Estas diferencias se han relacionado en su mayoría con la cadena O, ya que en las cepas lisas es el principal antígeno de membrana reconocido y se utiliza tanto en diagnóstico como en el serotipado. La ausencia de cadena O en las cepas rugosas naturales es otro rasgo de variabilidad que en un principio puso en duda su identidad como especie, o mutante rugoso de *B. melitensis* (McFarlane *et al.*, 1952; Buddle, 1956). El núcleo del LPS se considera una estructura conservada en *Brucella*, aunque existe cierta heterogeneidad (Moreno *et al.*, 1984; Freer *et al.*, 1995; Freer *et al.*, 1999). Las bases por las cuales *B. ovis* carece de cadena O ya han sido mencionadas en la introducción: además de la delección de la región *wbo* (Vizcaíno *et al.*, 2004; Tsolis *et al.*, 2009), la región *wbk* se ha degradado y muchos de los genes implicados en su síntesis no son funcionales (Zygmunt *et al.*, 2009).

Recientemente se han publicado la estructura del núcleo del LPS y de fragmentos repetidos del polisacárido-O de *B. abortus* biovar 4, *B. melitensis* biovar 3 y *B. suis* biovar 4, extraídos tras hidrólisis ácida del LPS liso (Kubler-Kielb and Vinogradov, 2013). La estructura disponible para el núcleo del LPS (Figura 2) revela la existencia de una cadena

lateral oligosacáridica compuesta de cuatro residuos de glucosamina, uno de glucosa y otro más manosa, este último unido al Kdo I, y con un Kdo II unido a otra glucosa a la cual se uniría el polisacárido-O. Aunque la estructura precisa del LPS de *B. ovis* aún no ha sido determinada, existe un trabajo previo inmunológico con el LPS-R extraído de *B. ovis* REO198, en el que se encontraron fragmentos de 2, 4, 6 y 7 azúcares, que incluían manosa, glucosa, glucosamina, Kdo y un azúcar no identificado (Suarez *et al.*, 1990). Hasta la fecha tan sólo se han encontrado tres glicosiltransferasas implicadas en la síntesis del núcleo del LPS de *B. abortus* y *B. melitensis* (*wadA*, *wadB* y *wadC*) y, como hemos visto, *B. ovis* contiene las ORFs correspondientes. Aunque la homología de estas glicosiltransferasas sugiere que la composición del núcleo de *B. ovis* es similar al de otras especies de *Brucella*, los análisis antigénicos e inmunogénicos demuestran ciertas diferencias (Díaz and Bosseray, 1973; Moreno *et al.*, 1984).

En *B. abortus* y *B. melitensis*, la delección de *wadA* produce cepas con fenotipo rugoso y un núcleo alterado (Monreal *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008). En *B. melitensis*, el mutante *wadA* tiene un núcleo del LPS defectivo, aunque también sintetiza el polisacárido O en el interior libre, lo que hizo concluir que *wadA* codifica una glicosiltransferasa involucrada en la síntesis de la sección del núcleo que une con la cadena O (González *et al.*, 2008). Ya se ha mencionado previamente la posibilidad de que esta enzima lleve además acoplada la posibilidad de ligar el núcleo completo con la cadena O. Teniendo en cuenta la estructura descrita y los análisis electroforéticos previos del LPS-R, podemos suponer que *wadA* puede estar llevando a cabo la adición de la glucosa previa a la quinovosamina (Figura 2). En el caso de *B. ovis*, al carecer de cadena O estos cambios son menos evidentes. De hecho la reactividad con MoAbs, las propiedades de la superficie de la bacteria, los análisis electroforéticos del LPS y los ensayos de virulencia mostraron un comportamiento similar entre el mutante *BoΔwadA* y la cepa parental. La quinovosamina no está presente en el LPS de *B. ovis* REO 198 (Moreno *et al.*, 1984; Suarez *et al.*, 1990), y es con toda probabilidad el azúcar al que se une el bactoprenol para la síntesis de la cadena O (González *et al.*, 2008). Como *B. ovis* contiene una mutación en *wbkF*, involucrada en la transferencia de un aminoazúcar al bactoprenol, la estructura del oligosacárido del LPS podría tener una glucosa terminal, carente en los mutantes *wadA*. Ese pequeño defecto sería consistente con el hecho de

que el mutante *B. ovis* $\Delta wadA$ ha sido prácticamente indistinguible con respecto de la cepa parental. Por otro lado, la supresión de la posible función *waaL* en *B. ovis* no supondría ninguna diferencia ya que no tiene cadena O que ligar al núcleo.

Los mutantes en las glicosiltransferasas *wadB* y *wadC* de *B. abortus* y *B. melitensis* muestran que la cadena O permanece unida al LPS, aunque su núcleo esté alterado (Gil-Ramírez, 2011; Conde-Álvarez *et al.*, 2012; Conde-Álvarez *et al.*, 2013) y Conde R., Arce-Gorvel V., Iriarte M., Gorvel J.P. and Moriyón I. no publicado). Observando la estructura propuesta por Klubber y Vinogradov (Figura 2) podemos concluir que las glicosiltransferasas *wadB* y *wadC* son responsables de la síntesis de la rama de glucosamina que deriva del Kdo II. Concretamente, se ha propuesto que *wadC* podría estar implicada en la transferencia de la primera manosa a la cadena lateral, mientras que *wadB* podría transferir otro azúcar (Gil-Ramírez, 2011; Conde-Álvarez *et al.*, 2013). Éste sería el motivo por el cual una cepa doble mutante *wadB-wadC* no tiene un efecto aditivo. En *B. abortus*, ambos mutantes inducen una respuesta proinflamatoria más elevada que la producida por la cepa salvaje y están atenuadas en células dendríticas y en ratones (Gil-Ramírez, 2011; Conde-Álvarez *et al.*, 2012; Conde-Álvarez *et al.*, 2013). Estas cepas son además más sensibles a la acción del suero no inmunizado y a péptidos catiónicos. (Gil-Ramírez, 2011; Conde-Álvarez *et al.*, 2012; Conde-Álvarez *et al.*, 2013). Se ha probado también que los defectos del núcleo del LPS mejoran el reconocimiento por el sistema receptor/co-receptor TLR4-MD2 y consecuentemente, que la rama de glucosaminas del núcleo del LPS de *B. abortus* y *B. melitensis* actúa como un escudo frente a el reconocimiento frente a varios sistemas inmunitarios innatos, representando un mecanismo de virulencia de estas *Brucella* spp (Conde-Álvarez *et al.*, 2012). En *B. ovis*, el LPS de los mutantes $\Delta wadB$ y $\Delta wadC$ carece también de una parte del oligosacárido del núcleo. Estos defectos generan un aumento en el valor negativo del potencial Z que puede ser explicado por la pérdida de toda o parte de los residuos de glucosamina de la rama cargada positivamente (Figura 2). La pérdida de esta estructura se relacionaría también con la pérdida de reactividad de los MoAbs anti LPS-R frente a los mutantes $Bo\Delta wadB$, $Bo\Delta wadC$ y $Bo\Delta wadB\Delta wadC$. A diferencia de *B. suis* y *B. abortus*, donde *wadB* era el mutante peor reconocido por los MoAbs anti LPS-R, en *B. ovis* esto sucede en el mutante $Bo\Delta wadC$. En el caso del

mutante Bo Δ wadB Δ wadC el perfil se asemeja más al de Bo Δ wadB, siendo reconocido mejor que Bo Δ wadC. Esta situación es parecida a la de *B. abortus* y *B. suis*, aunque al revés. Es posible que el núcleo del LPS posea algo más de heterogeneidad de lo pensado inicialmente entre las distintas especies de *Brucella*, aunque no se puede descartar que el orden en el que se obtienen los dobles mutantes influya en los resultados.

La atenuación de los mutantes Bo Δ wadB, Bo Δ wadC y del doble mutante Bo Δ wadB Δ wadC en ratones muestra, por primera vez, que el LPS de una especie patogénica de *Brucella rugosa* natural (como es el caso de *B. ovis*) actúa como un factor de virulencia. Aunque el mecanismo exacto todavía no se ha elucidado, este defecto en el núcleo probablemente facilita el reconocimiento del LPS de *B. ovis* por el sistema inmunitario innato. En efecto, esta hipótesis está apoyada por los resultados obtenidos con los mutantes homólogos en *B. abortus* y *B. melitensis*, y por el hecho de que, más que el polisacárido O, es la estructura de la región lípido A-núcleo lo que reconocen los sistemas de inmunidad innata (Monreal *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008; Gil-Ramírez, 2011; Conde-Álvarez *et al.*, 2012; Conde-Álvarez *et al.*, 2013). No obstante, no se pueden descartar otros efectos, ya que los mutantes Bo Δ wadB y Bo Δ wadC se ven afectados no solo en el LPS sino también en la topología de la membrana externa, como se ha puesto de manifiesto con los MoAbs frente a OMPs. A pesar de las diferencias en la topología superficial, los sueros policlonales de animales infectados con *B. ovis* o *B. melitensis* reaccionando con la misma afinidad en todos los casos, lo que sugiere que la integridad del resto de estructuras superficiales reconocidas en una infección no se ve alterada. No obstante, aunque estas estructuras sean reconocidas por sueros de carneros infectados por *B. ovis*, tampoco es descartable que estos cambios afecten a la virulencia de *Brucella* en una infección *de novo* en carneros. Se ha visto que no todos los mutantes rugosos de *B. melitensis* son equivalentes en las propiedades de su superficie y la topología de la membrana externa, y tienen diferente nivel de interacción con células hospedadoras, diferente virulencia y capacidad vacunal (Moriyón *et al.*, 2004; González *et al.*, 2008).

Recientemente, Conde-Álvarez *et al.* (Conde-Álvarez *et al.*, 2013) han propuesto una nueva estrategia para desarrollar vacunas frente a la brucelosis basadas en el concepto de que las moléculas de la superficie de *Brucella* evaden de manera efectiva

una detección temprana del sistema inmunitario innato (Barquero-Calvo *et al.*, 2007), y que los cambios que se producen introduciendo mutaciones que afectan la rama de glucosamina del núcleo del LPS pueden mejorar el reconocimiento produciendo una respuesta protectora Th1. La propuesta se basa en una comparación del poder protector del mutante *BaΔwadC* frente a la vacuna *B. abortus* S19, en modelo murino (Conde-Álvarez *et al.*, 2013). Los resultados de nuestro trabajo añaden peso al valor de esta estrategia y muestran la posibilidad de obtener vacunas frente a la brucelosis causada por *B. ovis*, que son más efectivas que la cepa vacuna *B. melitensis* Rev 1, no requieren calendarios de vacunaciones sucesivas y que puedan ser usadas en áreas libres de *B. melitensis*. Un defecto potencial de estas vacunas sería su interferencia en el diagnóstico de *B. ovis*, el cual se lleva a cabo usando ensayos que detectan tanto anticuerpos frente a ambos LPS-R como OMPs (Riezu-Boj *et al.*, 1986). Estos problemas podrían ser solucionados mediante el uso de vacunas marcadas antigénicamente, una estrategia que se ha visto efectiva para la vacuna *B. abortus* S19 en el modelo murino (Chacón-Díaz *et al.*, 2011).

5.- El caso de las fosfomanomutasas *manB_{core}* y *manB_{O-Ag}*

Los mutantes en *manB_{core}* en *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis* son rugosos con un claro defecto en el núcleo del LPS (Foulongne *et al.*, 2000; Monreal *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008). El gen *manB_{core}* es necesario para la síntesis de los precursores de la cadena O y de otros azúcares del núcleo. En *B. ovis* el gen presenta una deleción que lo inactiva y, como hemos demostrado en este trabajo, este defecto se conserva en todas las cepas de *B. ovis* estudiadas. Cabría pensar que esta mutación es la responsable del fenotipo rugoso de *B. ovis*, pero esta especie tiene además un gran deleción de 15 Kb que incluye los genes *wboA* y *wboB* involucrados en la biosíntesis de la cadena O de *Brucella* (Vizcaíno *et al.*, 2004).

Respecto al gen *manB_{O-Ag}*, situado en la región *wbk* implicada en la síntesis de la cadena O, se pensó en un principio que estaba también relacionado con la síntesis de precursores (Allen *et al.*, 1998). Sin embargo, en este caso los mutantes en *manB_{O-Ag}* en *B. abortus* y *B. melitensis* no son rugosos (González *et al.*, 2008), por lo que se duda de su implicación en la síntesis de la cadena O. Como hemos visto en este trabajo, de las

secuencias analizadas, la proteína ManB_{O-Ag} es la más polimórfica entre las brucelas y sugiere que este gen podría no ser funcional en *B. melitensis* y *B. abortus*. Sin embargo, nuestro estudio de la topología superficial con MoAbs mostraron diferencias del mutante BmΔ*manB*_{O-Ag} con la cepa parental, en concreto con los anticuerpos B66/04F09 y 05D04, lo que sugiere que este gen tiene alguna relación con el LPS, al menos en esta especie. Sin embargo, su función concreta no está clara.

Las enzimas que como ManB codifican para fosfo-hexosamutasas son proteínas que normalmente poseen cuatro dominios funcionales (Regni *et al.*, 2004). Catalizan la reacción de transferencia de un grupo fosfato del C1 al C6 del azúcar, mediante la

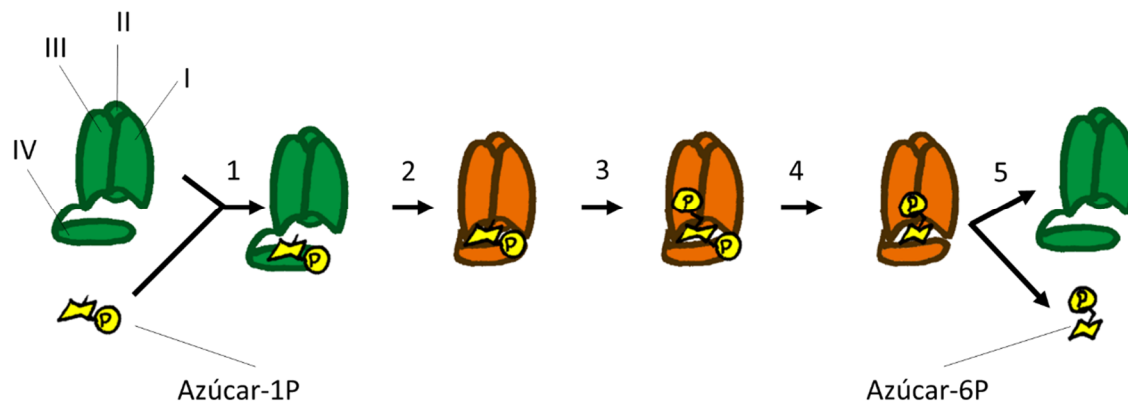


Figura 31. Mecanismo de acción de una fosfo-hexosamutasa. Aparecen señalados los dominios del I al IV. Inicialmente se produce la entrada del azúcar (1) (glucosa o manosa, según) al bolsillo formado por los dominios I,II, III mediante el movimiento del dominio IV (2). La enzima añade un fosfato al C6 creando un intermedio bisfosforilado (3). Posteriormente, el dominio IV se encarga también de la torsión de la molécula para reorientar el azúcar y ceder el azúcar en posición 1 a la enzima (4). Por último, la estructura se relaja y sale el azúcar-6P (5). (Regni *et al.*, 2006)

creación de un intermediario bis-fosforilado (Figura 31). Los tres primeros dominios de la enzima son grandes y crean una cavidad central donde se insertará el monosacárido. El cuarto dominio es un fragmento pequeño separado por una cadena que le permite cierta flexibilidad. Este cuarto dominio es capaz de una cierta torsión y “cerrar” la estructura para que ocurra la reacción enzimática (Regni *et al.*, 2004; Regni *et al.*, 2006). La división de la enzima en dos fragmentos distintos, uno con los dominios 1, 2 y 3 y el otro con el 4º dominio, permitió comprobar que ambos fragmentos por separado son incapaces de catalizar la reacción. Sin embargo, cuando se mezclaban los fragmentos se

recupera su función, siendo más eficientes a igual concentración de dominios (Schramm *et al.*, 2010). El defecto que hemos observado en las secuencias de *manB_{O-Ag}* en *B. melitensis* y *B. abortus* altera el dominio 4 de la proteína, lo que muy probablemente reduce o inhabilita su actividad enzimática. En estas dos especies, recordemos que la mutación *manB_{core}* resulta en cepas rugosas que carecen de cadena O y tienen el núcleo alterado (Monreal *et al.*, 2003; González *et al.*, 2008).

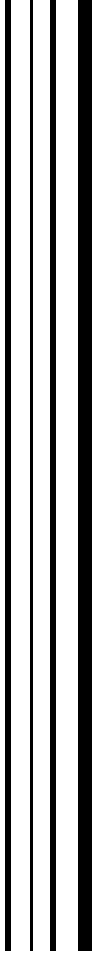
Sin embargo, nuestros análisis sugieren que el caso de *B. ovis* es el contrario. Como hemos dicho, la secuencia del gen *manB_{core}* traduce una proteína incompleta que tan sólo tiene dos de los 4 dominios funcionales de la enzima. Aunque previamente se ha sugerido que esta mutación posiblemente no afecte al LPS de *B. ovis*, (Zygmunt *et al.*, 2009), esta hipótesis no parece compatible con la pérdida de los dominios de la enzima. Sin embargo, el gen *manB_{O-Ag}* en *B. ovis* sí que parece poseer los cuatro dominios funcionales de la enzima. Se podría pensar, por tanto, que en *B. ovis* el gen *manB_{O-Ag}* esté supliendo las funciones del gen *manB_{core}* defectuoso. Para demostrar esta hipótesis, se construyó y caracterizó el mutante *BoΔmanB_{O-Ag}*.

Nuestros resultados con *BoΔmanB_{O-Ag}* demuestran que, por primera vez, se ha conseguido encontrar un fenotipo a un mutante en dicho gen. El análisis del LPS-R muestra una disminución del componente I y un aumento del II, que como ya se ha comentado, es similar al de la cepa REO, que casualmente tiene mutado este gen. Estas alteraciones en el núcleo vuelven a cambiar la superficie de la membrana como se puede observar en la autoaglutinación y la mayor carga negativa del potencial Z. Al igual que con los mutantes *BoΔwadB* y *BoΔwadC*, estas alteraciones no provocan cambios en la supervivencia al suero y a la polimixina B. El mutante *BoΔmanB_{O-Ag}* tiene un perfil de OMPs similar al de su cepa parental, pero inferior reactividad. Aun con todo, al exponerlo a sueros policlonales de animales infectados no se encuentran diferencias entre el mutante y la cepa parental.

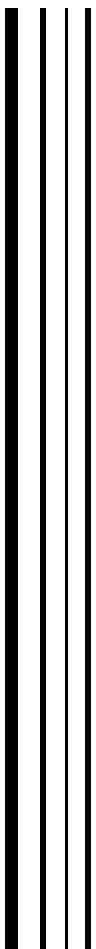
B. ovis no necesita manosa como precursor para la cadena O, pero sí necesita para el núcleo. En este escenario es posible que la copia del gen *manB_{O-Ag}* sea suficiente para suplir esa actividad. Además, como se ha mencionado anteriormente *B. ovis* REO que carece tanto de *manB_{core}* como de *manB_{O-Ag}* tiene una menor cantidad de manosa

en el LPS comparada con *B. canis*, *B. abortus* 45/20 y *B. melitensis* B115 (Moreno *et al.*, 1984). Aunque sea poco, esta cepa es capaz de procesar la manosa por otra vía. Como se ha mencionado antes, fosfomanomutasas y fosfoglucomutasas tienen una secuencia muy conservada ya que manosa y glucosa son epímeros que difieren en el carbono 2 (Regni *et al.*, 2004; Regni *et al.*, 2006), con lo que no se puede tampoco descartar que alguna otra enzima como *pgm* esté supliendo parcialmente en esta vía.

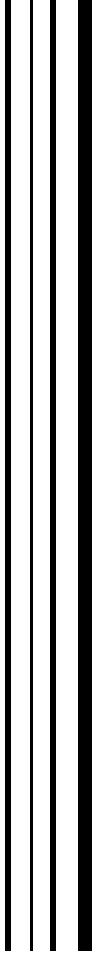
La anotación inicial del genoma de las especies de *Brucella* describe dos enzimas con actividad fosfomanomutasa: *manB_{core}* y *manB_{O-Ag}*. Hasta el momento, y según lo visto a lo largo de esta tesis, en *B. abortus* y *B. melitensis* el gen *manB_{O-Ag}* no es funcional y el gen *manB_{core}* realiza la actividad fosfomanomutasa en la vía de síntesis de azúcares precursores del LPS. Por el contrario, en *B. ovis* *manB_{core}* no se traduce y al eliminar el gen *manB_{O-Ag}* se producen defectos en el LPS. Estas tres especies de *Brucella* han prescindido de uno de los genes que codifican una fosfomanomutasa y se han adaptado para utilizar la otra. Sin embargo, otras especies como *B. suis* y *B. microti* conservan ambos genes completos y probablemente activos. En principio, tanto *manB_{core}* como *manB_{O-Ag}* podrían estar traduciéndose en estas especies para realizar la transformación de la manosa en la vía de síntesis del LPS. Sin embargo, se ha descrito un mutante *manB_{core}* por transposición en *B. suis* (Foulongne *et al.*, 2000; Kohler *et al.*, 2002) que es rugoso y su supervivencia intracelular en macrófagos está muy afectada. Este resultado sugiere que es el gen *manB_{core}* el que juega un papel importante en la síntesis de la cadena O en *B. suis*, al igual que en *B. abortus* y *B. melitensis* y a diferencia de lo que ocurre en *B. ovis*.



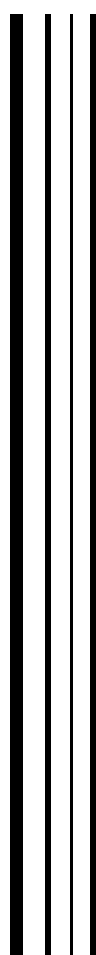
Conclusiones



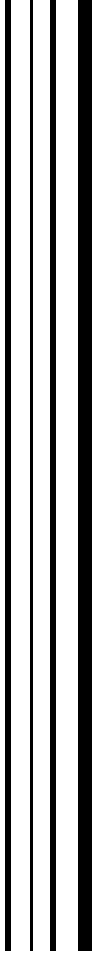
1. La mutación en el pseudogen *manB_{core}*, que genera una pérdida de dos dominios funcionales esenciales para la actividad enzimática, es específica de *Brucella ovis*.
2. La mutación del gen *manB_{O-Ag}* genera alteraciones en el núcleo del lipopolisacárido y modifica algunas de las propiedades de la membrana externa de *Brucella ovis*.
3. La secuencia del gen *manB_{O-Ag}* es idéntica en todas las cepas de *Brucella ovis* estudiadas a excepción de la cepa *Brucella ovis* REO.
4. Las propiedades de la envoltura celular de la cepa *Brucella ovis* REO difieren de las de *Brucella ovis* PA, y son compatibles con la delección en el gen *manB_{O-Ag}*.
5. Los genes que codifican las glicosiltransferasas WadA, WadB y WadC se encuentran muy conservados en la especie *Brucella ovis*.
6. La mutación en el gen *wadA* de *Brucella ovis* no altera las propiedades de la envoltura celular estudiadas ni afecta a su capacidad de multiplicación y supervivencia en el modelo murino.
7. Los genes *wadB* y *wadC* están implicados en la síntesis del núcleo del lipopolisacárido de *Brucella ovis*.
8. Un núcleo del lipopolisacárido completo es esencial para la virulencia de *Brucella ovis*, puesto que los mutantes en los genes *wadB* y *wadC* están atenuados, presentando una menor capacidad de multiplicación y supervivencia respecto a *Brucella ovis* PA en el modelo murino.
9. Los mutantes *BoΔwadB* y *BoΔwadC* confieren protección frente a una infección con *Brucella ovis* PA en modelo murino. El mutante *BoΔwadB* fue el más efectivo, superando incluso a la cepa vacunal *Brucella melitensis* Rev 1 en este modelo. El mutante *BoΔwadB* es el mejor candidato para su futura evaluación en ganado ovino.



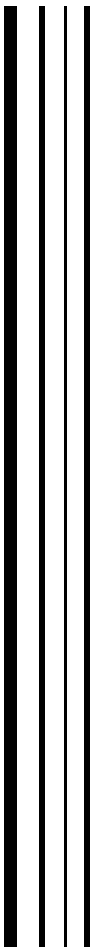
Conclusions



1. Mutation present in the *manB_{core}* pseudogene, which results in the loss of two functional domains essential for the enzymatic activity, is specific of *Brucella ovis*.
2. Mutation of the *manB_{O-Ag}* gene generates alterations at the core of the LPS and modifies some of the properties of the outer membrane of *Brucella ovis*.
3. The sequence of the *manB_{O-Ag}* gene is identical in all the *Brucella ovis* strains studied, except for *Brucella ovis* REO.
4. Cell envelope properties of the strain *Brucella ovis* REO differ from those of *Brucella ovis* PA, and are compatible with the deletion at the *manB_{O-Ag}* gene.
5. The genes that code for the glycosyltransferases WadA, WadB and WadC are highly conserved genes in *Brucella ovis* species.
6. Mutation of the gene *wadA* in *Brucella ovis* does not generate alterations in the properties of the cellular envelope and does not affect its ability for multiplication and survival in murine model.
7. The genes *wadB* and *wadC* are involved in the synthesis of the core of the lipopolysaccharide of *Brucella ovis*.
8. A complete core of the lipopolysaccharide is essential for the virulence in *Brucella ovis*, since mutants in the genes *wadB* and *wadC* are attenuated, presenting lower ability for multiplication and survival than *Brucella ovis* PA in the murine model.
9. Mutants *BoΔwadB* y *BoΔwadC* confer protection against an infection with *Brucella ovis* PA in mice. The mutant *BoΔwadB* was the most effective, surpassing even the vaccine strain *Brucella melitensis* Rev 1 in this model. The mutant *BoΔwadB* is the best candidate for its future evaluation in ovine model.



Bibliografía



- Abeyrathne, P.D., Daniels, C., Poon, K.K.H., Matewish, M.J., and Lam, J.S. (2005) Functional characterization of WaaL, a ligase associated with linking O-antigen polysaccharide to the core of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *J Bacteriol* **187**: 3002–12.
- Allen, C.A., Adams, L.G., and Ficht, T.A. (1998) Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infect Immun* **66**: 1008–16.
- Alton, G. G., Jones, L. M., Angus, R. D., and Verger, J. M. (1988) *Techniques for the brucellosis laboratory*. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Paris, France.
- Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A.E., Ugalde, R., et al. (2005) Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat Immunol* **6**: 618–25.
- Audic, S., Lescot, M., Claverie, J.M., Cloeckaert, A., and Zygmunt, M.S. (2011) The genome sequence of *Brucella pinnipedialis* B2/94 sheds light on the evolutionary history of the genus *Brucella*. *BMC Evol Biol* **11**: 200.
- Audic, S., Lescot, M., Claverie, J.M., and Scholz, H.C. (2009) *Brucella microti*: the genome sequence of an emerging pathogen. *BMC Genomics* **10**: 352.
- Barbier, T., Nicolas, C., and Letesson, J.J. (2011) *Brucella* adaptation and survival at the crossroad of metabolism and virulence. *FEBS Lett* **585**: 2929–34.
- Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Weiss, D.S., Guzmán-Verri, C., Chacón-Díaz, C., Rucavado, A., et al. (2007) *Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection. *PLoS One* **2**: e631.
- Barquero-Calvo, E., Conde-Álvarez, R., Chacón-Díaz, C., Quesada-Lobo, L., Martirosyan, A., Guzmán-Verri, C., et al. (2009) The differential interaction of *Brucella* and *Ochrobactrum* with innate immunity reveals traits related to the evolution of stealthy pathogens. *PLoS One* **4**: e5893.
- Barsy, M. de, Jamet, A., Filopon, D., Nicolas, C., Laloux, G., Rual, J.F., et al. (2011) Identification of a *Brucella* spp. secreted effector specifically interacting with human small GTPase Rab2. *Cell Microbiol* **13**: 1044–58.
- Baucheron, S., Grayon, M., Zygmunt, M.S., and Cloeckaert, A. (2002) Lipopolysaccharide heterogeneity in *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Res Microbiol* **153**: 277–80.
- Billard, E., Cazevielle, C., Dornand, J., and Gross, A. (2005) High susceptibility of human dendritic cells to invasion by the intracellular pathogens *Brucella suis*, *B. abortus*, and *B. melitensis*. *Infect Immun* **73**: 8418–24.
- Blasco, J.M. (1997) A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev Vet Med* **31**: 275–83.
- Blasco, J.M. (1990) *Brucella ovis*. In *Animal Brucellosis*. Nielsen, K., and Duncan, J. (eds). CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Boigegrain, R.A., Salhi, I., Álvarez-Martínez, M.T., Machold, J., Fedon, Y., Arpagaus, M., et al. (2004) Release of periplasmic proteins of *Brucella suis* upon acidic shock involves the outer membrane protein Omp25. *Infect Immun* **72**: 5693–703.

- Bowden, R.A., Cloeckart, A., Zygmunt, M.S., and Dubray, G. (1995) Outer-membrane protein- and rough lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies protect mice against *Brucella ovis*. *J Med Microbiol* **43**: 344–7.
- Buddle, M.B. (1956) Studies on *Brucella ovis* (n.sp.), a cause of genital disease of sheep in New Zealand and Australia. *J Hyg (Lond)* **54**: 351–64.
- Burgess, G.W. (1982) Ovine contagious epididymitis: a review. *Vet Microbiol* **7**: 551–75.
- Caroff, M., Bundle, D.R., Perry, M.B., Cherwonogrodzky, J.W., and Duncan, J.R. (1984) Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3. *Infect Immun* **46**: 384–8.
- Caro-Hernández, P., Fernández-Lago, L., Miguel, M.J. de, Martín-Martín, A.I., Cloeckart, A., Grilló, M.J., and Vizcaíno, N. (2007) Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. *Infect Immun* **75**: 4050–61.
- Cassataro, J., Pasquevich, K.A., Estein, S.M., Laplagne, D.A., Zwerdling, A., la Barrera, S. de, et al. (2007) A DNA vaccine coding for the chimera BLSOmp31 induced a better degree of protection against *B. ovis* and a similar degree of protection against *B. melitensis* than Rev.1 vaccination. *Vaccine* **25**: 5958–67.
- Castaño, M.J., and Solera, J. (2009) Chronic brucellosis and persistence of *Brucella melitensis* DNA. *J Clin Microbiol* **47**: 2084–9.
- Celli, J., Chastellier, C. de, Franchini, D.M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., and Gorvel, J.P. (2003) *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* **198**: 545–56.
- Celli, J., and Gorvel, J.P. (2004) Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol* **7**: 93–7.
- Celli, J., Salcedo, S.P., and Gorvel, J.P. (2005) *Brucella* coopts the small GTPase Sar1 for intracellular replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1673–8.
- Chacón-Díaz, C., Muñoz-Rodríguez, M., Barquero-Calvo, E., Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E., Grilló, M.J., and Moreno, E. (2011) The use of green fluorescent protein as a marker for *Brucella* vaccines. *Vaccine* **29**: 577–82.
- Chain, P.S.G., Comerci, D.J., Tolmasky, M.E., Larimer, F.W., Malfatti, S.A., Vergez, L.M., et al. (2005) Whole-genome analyses of speciation events in pathogenic *Brucellae*. *Infect Immun* **73**: 8353–61.
- Cloeckart, A., Grayon, M., Verger, J.M., Letesson, J.J., and Godfroid, F. (2000) Conservation of seven genes involved in the biosynthesis of the lipopolysaccharide O-side chain in *Brucella* spp. *Res Microbiol* **151**: 209–16.
- Cloeckart, A., Jacques, I., Bowden, R.A., Dubray, G.I., and Limet, J.N. (1993) Monoclonal antibodies to *Brucella* rough lipopolysaccharide: characterization and evaluation of their protective effect against *B. abortus*. *Res Microbiol* **144**: 475–84.
- Cloeckart, A., Jacques, I., Grilló, M.J., Marín, C.M., Grayon, M., Blasco, J.M., and Verger, J.M. (2004) Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single and double deletion mutants of the *bp26* and *omp31* genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. *Vaccine* **22**: 2827–35.

- Cloekaert, A., Verger, J.M., Grayon, M., Paquet, J.Y., Garin-Bastuji, B., Foster, G., and Godfroid, J. (2001) Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the *omp2* locus. *Microbes Infect* **3**: 729–38.
- Cloekaert, A., Verger, J.M., Grayon, M., Zygmunt, M.S., and Grépinet, O. (1996) Nucleotide sequence and expression of the gene encoding the major 25-kilodalton outer membrane protein of *Brucella ovis*: Evidence for antigenic shift, compared with other *Brucella* species, due to a deletion in the gene. *Infect Immun* **64**: 2047–55.
- Cloekaert, A., Vizcaíno, N., Paquet, J.Y., Bowden, R.A., and Elzer, P.H. (2002) Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future. *Vet Microbiol* **90**: 229–47.
- Cloekaert, A., Weynants, V., Godfroid, J., Verger, J.M., Grayon, M., and Zygmunt, M.S. (1998) O-Polysaccharide Epitopic Heterogeneity at the Surface of *Brucella* spp. Studied by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Flow Cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* **5**: 862–70.
- Cloekaert, A., Zygmunt, M.S., Dubray, G., and Limet, J.N. (1993) Characterization of O-polysaccharide specific monoclonal antibodies derived from mice infected with the rough *Brucella melitensis* strain B115. *J Gen Microbiol* **139**: 1551–6.
- Cloekaert, A., Zygmunt, M.S., and Guilloteau, L.A. (2002) *Brucella abortus* vaccine strain RB51 produces low levels of M-like O-antigen. *Vaccine* **20**: 1820–2.
- Conde-Álvarez, R. (2008) A study on the role of phosphatidylcholine and inner lipopolysaccharide sections in *Brucella* virulence.
- Conde-Álvarez, R., Arce-Gorvel, V., Gil-Ramírez, Y., Iriarte, M., Grilló, M.J., Gorvel, J.P., and Moriyón, I. (2013) Lipopolysaccharide as a target for brucellosis vaccine design. *Microb Pathog* **58**: 29–34.
- Conde-Álvarez, R., Arce-Gorvel, V., Iriarte, M., Manček-Keber, M., Barquero-Calvo, E., Palacios-Chaves, L., et al. (2012) The lipopolysaccharide core of *Brucella abortus* acts as a shield against innate immunity recognition. *PLoS* **8**: e1002675.
- Conde-Álvarez, R., Grilló, M.J., Salcedo, S.P., Miguel, M.J.M.J. de, Fugier, E., Gorvel, J.P., et al. (2006) Synthesis of phosphatidylcholine, a typical eukaryotic phospholipid, is necessary for full virulence of the intracellular bacterial parasite *Brucella abortus*. *Cell Microbiol* **8**: 1322–35.
- Connolly, J.P., Comerci, D., Alefantis, T.G., Walz, A., Quan, M., Chafin, R., et al. (2006) Proteomic analysis of *Brucella abortus* cell envelope and identification of immunogenic candidate proteins for vaccine development. *Proteomics* **6**: 3767–80.
- Cornelis, P. (2011) Peculiarities of the regulation of the *Brucella* flagellum. *Microbiology* **157**: 1251–2.
- Dahouk, S. Al, Jubier-Maurin, V., Scholz, H.C., Tomaso, H., Karges, W., Neubauer, H., and Köhler, S. (2008) Quantitative analysis of the intramacrophagic *Brucella suis* proteome reveals metabolic adaptation to late stage of cellular infection. *Proteomics* **8**: 3862–70.
- De, B.K., Stauffer, L., Koylass, M.S., Sharp, S.E., Gee, J.E., Hesel, L.O., et al. (2008) Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *J Clin Microbiol* **46**: 43–9.
- Delrue, R.M., Deschamps, C., Léonard, S., Nijskens, C., Danese, I., Schaus, J.M., et al. (2005) A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cell Microbiol* **7**: 1151–61.

- Delrue, R.M., Martínez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., *et al.* (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., *et al.* (2002) The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 443–8.
- Díaz, R., and Bosseray, N. (1973) Identificación d'un composé antigénique spécifique de la phase rugueuse (R) des *Brucella*. *Ann Vet Res* **4**: 283–92.
- Douglas, J.T., and Palmer, D.A. (1988) Use of monoclonal antibodies to identify the distribution of A and M epitopes on smooth *Brucella* species. *J Clin Microbiol* **26**: 1353–6.
- Dubray, G., and Limet, J. (1987) Evidence of heterogeneity of lipopolysaccharides among *Brucella* biovars in relation to A and M specificities. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **138**: 27–37.
- Eisenberg, T., Hamann, H.P., Kaim, U., Schlez, K., Seeger, H., Schauerte, N., *et al.* (2012) Isolation of potentially novel *Brucella spp.* from frogs. *Appl Environ Microbiol* **78**: 3753–5.
- Eisenschenk, F.C., Houle, J.J., and Hoffmann, E.M. (1999) Mechanism of serum resistance among *Brucella abortus* isolates. *Vet Microbiol* **68**: 235–44.
- Estein, S.M., Fiorentino, M.A., Paolicchi, F.A., Clause, M., Manazza, J., Cassataro, J., *et al.* (2009) The polymeric antigen BLSOmp31 confers protection against *Brucella ovis* infection in rams. *Vaccine* **27**: 6704–11.
- Ficapal, A., Alonso-Urmeneta, B., Velasco, J., Moriyón, I., and Blasco, J.M. (1995) Diagnosis of *Brucella ovis* infection of rams with an ELISA using protein G as conjugate. *Vet Rec* **137**: 145–7.
- Fischer, D., Lorenz, N., Heuser, W., Kämpfer, P., Scholz, H.C., and Lierz, M. (2012) Abscesses associated with a *Bucella inopinata*-like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*). *J Zoo Wildl Med* **43**: 625–8.
- Foster, G., Osterman, B.S., Godfroid, J., Jacques, I., and Cloeckert, A. (2007) *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 2688–93.
- Foulongne, V., Bourg, G., Cazevieille, C., Michaux-Charachon, S., and O'Callaghan, D. (2000) Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an in vitro human macrophage infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infect Immun* **68**: 1297–303.
- Freer, E., Moreno, E., Moriyón, I., Pizarro-Cerdá, J., Weintraub, A., and Gorvel, J.P. (1996) *Brucella*-Salmonella lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than are their native *Brucella* sp. counterparts. *J Bacteriol* **178**: 5867–76.
- Freer, E., Pizarro-Cerdá, J., Weintraub, A., Bengoechea, J.A., Moriyón, I., Hultenby, K., *et al.* (1999) The outer membrane of *Brucella ovis* shows increased permeability to hydrophobic probes and is more susceptible to cationic peptides than are the outer membranes of mutant rough *Brucella abortus* strains. *Infect Immun* **67**: 6181–6.
- Freer, E., Rojas, N., Weintraub, A., Lindberg, A.A., and Moreno, E. (1995) Heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Res Microbiol* **146**: 569–78.

- Fretin, D., Fauconnier, A., Köhler, S., Halling, S., Léonard, S., Nijskens, C., *et al.* (2005) The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. *Cell Microbiol* **7**: 687–98.
- Gamazo, C., Winter, A.J., Moriyón, I., Riezu-Boj, J.I., Blasco, J.M., Díaz, R., *et al.* (1989) Comparative analyses of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. *Infect Immun* **57**: 1419–26.
- Garin-Bastuji, B., and Blasco, J.M. (2013) Ovine epididymitis. In *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)*. OIE (ed.). World Organization for Animal Health.
- Gil-Ramírez, Y. (2011) Papel de una etanolamina-fosfato transferasa y una glicosil transferasa en la síntesis del lipopolisacárido de *Brucella* y utilización de una acetil transferasa para la modificación epitópica de la cadena O..
- Godfroid, F., Cloeckert, A., Taminiau, B., Danese, I., Tibor, A., Bolle, X. de, *et al.* (2000) Genetic organisation of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of *Brucella melitensis* 16M (*wbk*). *Res Microbiol* **151**: 655–68.
- Godfroid, J., Cloeckert, A., Liautard, J.P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens, K., *et al.* From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res* **36**: 313–26.
- Godfroid, J., Scholz, H.C., Barbier, T., Nicolas, C., Wattiau, P., Fretin, D., *et al.* (2011) Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Prev Vet Med* **102**: 118–31.
- Gold, L. (1988) Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem* **57**: 199–233.
- González, D. (2003) Análisis genético, inmunoquímico y biológico de mutantes rugosos de *Brucella melitensis*.
- González, D., Grilló, M.J., Miguel, M.J. De, Ali, T., Arce-Gorvel, V., Delrue, R.M., *et al.* (2008) Brucellosis vaccines: assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *PLoS One* **3**: e2760.
- Gorvel, J.P., and Moreno, E. (2002) *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* **90**: 281–97.
- Grilló, M.J., Manterola, L., Miguel, M.J. de, Muñoz, P.M., Blasco, J.M., Moriyón, I., and López-Goñi, I. (2006) Increases of efficacy as vaccine against *Brucella abortus* infection in mice by simultaneous inoculation with avirulent smooth *bvrS/bvrR* and rough *wbkA* mutants. *Vaccine* **24**: 2910–6.
- Guzman-Verri, C., Manterola, L., Sola-Landa, A., Parra, A., Cloeckert, A., Garin, J., *et al.* (2002) The two-component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the *Rhizobiaceae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 12375–80.
- Gyuranecz, M., Kreizinger, Z., Horváth, G., Rónai, Z., Dán, A., Nagy, B., *et al.* (2013) Natural *IS711* insertion causing *omp31* gene inactivation in *Brucella ovis*. *J Vet Diagn Invest* **25**: 234–8.
- Halling, S.M., Peterson-Burch, B.D., Bricker, B.J., Zuerner, R.L., Qing, Z., Li, L.L., *et al.* (2005) Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J Bacteriol* **187**: 2715–26.

- Halling, S.M., Tatum, F.M., and Bricker, B.J. (1993) Sequence and characterization of an insertion sequence, IS711, from *Brucella ovis*. *Gene* **133**: 123–7.
- Holst, O. (1999) Chemical structure of the core region of lipopolysaccharides. In *Endotoxins in Health and Disease*. Brade, H., Opal, S.M., Vogel, S.N., and Morrison, D.. (eds). Marcel Dekker, New York. pp. 115–54.
- Iriarte, M., González, D., Delrue, R.M., Monreal, D., Conde, R., López-Goñi, I., et al. (2004) *Brucella* lipopolysaccharide: structure, biosynthesis and genetics. In *Brucella: molecular and cellular biology*. Horizon Bioscience, Wymondham, UK. pp. 159–91.
- Jacques, I., Grayon, M., and Verger, J.M. (2007) Oxidative metabolic profiles of *Brucella* strains isolated from marine mammals: contribution to their species classification. *FEMS Microbiol Lett* **270**: 245–9.
- Jenner, D.C., Dassa, E., Whatmore, A.M., and Atkins, H.S. (2009) ATP-Binding Cassette Systems of *Brucella*. *Comp Funct Genomics* 354649.
- Jiménez de Bagüés, M.P., Barberán, M., Marín, C.M., and Blasco, J.M. (1995) The *Brucella abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine* **13**: 301–4.
- Jong, M.F. de, Rolán, H.G., and Tsolis, R.M. (2010) Innate immune encounters of the (Type) 4th kind: *Brucella*. *Cell Microbiol* **12**: 1195–202.
- Jong, M.F. de, Sun, Y.H., Hartigh, A.B. den, Dijk, J.M. van, and Tsolis, R.M. (2008) Identification of VceA and VceC, two members of the VjbR regulon that are translocated into macrophages by the *Brucella* type IV secretion system. *Mol Microbiol* **70**: 1378–96.
- Kim, S., Watarai, M., Suzuki, H., Makino, S., Kodama, T., and Shirahata, T. (2004) Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*. *Microb Pathog* **37**: 11–9.
- Klena, J.D., Pradel, E., and Schnaitman, C.A. (1992) Comparison of lipopolysaccharide biosynthesis genes *rfaK*, *rfaL*, *rfaY*, and *rfaZ* of *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **174**: 4746–52.
- Kohler, S., Foulongne, V., Ouahrani-Bettache, S., Bourg, G., Teyssier, J., Ramuz, M., and Liautard, J.P. (2002) The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15711–6.
- Kubler-Kielb, J., and Vinogradov, E. (2013a) The study of the core part and non-repeating elements of the O-antigen of *Brucella* lipopolysaccharide. *Carbohydr Res* **366**: 33–7.
- Kubler-Kielb, J., and Vinogradov, E. (2013b) Reinvestigation of the structure of *Brucella* O-antigens. *Carbohydr Res* **378**: 144–7.
- Lacerda, T.L.S., Salcedo, S.P., and Gorvel, J.P. (2013) *Brucella* T4SS: the VIP pass inside host cells. *Curr Opin Microbiol* **16**: 45–51.
- Lapaque, N., Moriyón, I., Moreno, E., and Gorvel, J.P. (2005) *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol* **8**: 60–6.
- Lapaque, N., Takeuchi, O., Corrales, F., Akira, S., Moriyón, I., Howard, J.C., and Gorvel, J.P. (2006) Differential inductions of TNF- α and iNOS, iL1 β by structurally diverse classic and non-classic lipopolysaccharides. *Cell Microbiol* **8**: 401–13.
- Lavigne, J.P., Vergunst, A.C., Bourg, G., and O'Callaghan, D. (2005) The IncP island in the genome of *Brucella suis* 1330 was acquired by site-specific integration. *Infect Immun* **73**: 7779–83.

- Lesse, a J., Campagnari, A.A., Bittner, W.E., and Apicella, M. a (1990) Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Immunol Methods* **126**: 109–17.
- Letesson, J.J., Lestrade, P., Delrue, R.M., Danese, I., Bellefontaine, F., Fretin, D., *et al.* (2002) Fun stories about *Brucella*: the “furtive nasty bug”. *Vet Microbiol* **90**: 317–28.
- Mancilla, M., López-Goñi, I., Moriyón, I., and Zárraga, A.M. (2010) Genomic island 2 is an unstable genetic element contributing to *Brucella* lipopolysaccharide spontaneous smooth-to-rough dissociation. *J Bacteriol* **192**: 6346–51.
- Marchesini, M.I., Herrmann, C.K., Salcedo, S.P., Gorvel, J.P., and Comerci, D.J. (2011) In search of *Brucella abortus* type IV secretion substrates: screening and identification of four proteins translocated into host cells through VirB system. *Cell Microbiol* **13**: 1261–74.
- Marquis, H., and Ficht, T.A. (1993) The *omp2* gene locus of *Brucella abortus* encodes two homologous outer membrane proteins with properties characteristic of bacterial porins. *Infect Immun* **61**: 3785–90.
- Martínez de Tejada, G., and Moriyón, I. (1993) The outer membranes of *Brucella spp.* are not barriers to hydrophobic permeants. *J Bacteriol* **175**: 5273–5.
- Martínez de Tejada, G., Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E., and Moriyón, I. (1995) The outer membranes of *Brucella spp.* are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect Immun* **63**: 3054–61.
- Martín-Martín, A.I., Caro-Hernández, P., Orduña, A., Vizcaíno, N., and Fernández-Lago, L. (2008) Importance of the Omp25/Omp31 family in the internalization and intracellular replication of virulent *B. ovis* in murine macrophages and HeLa cells. *Microbes Infect* **10**: 706–710.
- Martín-Martín, A.I., Caro-Hernández, P., Sancho, P., Tejedor, C., Cloeckert, A., Fernández-Lago, L., and Vizcaíno, N. (2009) Analysis of the occurrence and distribution of the Omp25/Omp31 family of surface proteins in the six classical *Brucella* species. *Vet Microbiol* **137**: 74–82.
- Martín-Martín, A.I., Sancho, P., Miguel, M.J. de, Fernández-Lago, L., and Vizcaíno, N. (2012) Quorum-sensing and BvrR/BvrS regulation, the type IV secretion system, cyclic glucans, and BacA in the virulence of *Brucella ovis*: similarities to and differences from smooth *Brucellae*. *Infect Immun* **80**: 1783–93.
- Martín-Martín, A.I., Sancho, P., Tejedor, C., Fernández-Lago, L., and Vizcaíno, N. (2011) Differences in the outer membrane-related properties of the six classical *Brucella* species. *Vet J* **189**: 103–5.
- Martín-Martín, A.I., Vizcaíno, N., and Fernández-Lago, L. (2010) Cholesterol, ganglioside GM1 and class A scavenger receptor contribute to infection by *Brucella ovis* and *Brucella canis* in murine macrophages. *Microbes Infect* **12**: 246–51.
- Martins, R.C. Da, Gamazo, C., Sánchez-Martínez, M., Barberán, M., Peñuelas, I. and Irache, J.M. (2012) Conjunctival vaccination against *Brucella ovis* in mice with mannosylated nanoparticles. *J Control Release* **162**: 553–60.
- Martins, R.C. Da, Irache, J.M., and Gamazo, C. (2012) Acellular vaccines for ovine brucellosis: a safer alternative against a worldwide disease. *Expert Rev Vaccines* **11**: 87–95.
- McFarlane, D., Salisbury, R.M., Osborne, H.G., and Jebson, J.L. (1952) Investigation into sheep abortion in New Zealand during the 1950 lambing season. *Aust Vet J* **28**: 221–6.

Metzger, L.E., Lee, J.K., Finer-Moore, J.S., Raetz, C.R.H., and Stroud, R.M. (2012) LpxI structures reveal how a lipid A precursor is synthesized. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 1132–8.

Monreal, D. (2003) Obtención y caracterización genética y biológica de mutantes rugosos de *Brucella abortus*.

Monreal, D., Grilló, M.J., González, D., Marín, C.M., Miguel, M.J. De, López-Goñi, I., *et al.* (2003) Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model. *Infect Immun* **71**: 3261–71.

Moreno, E., Cloeckert, A., and Moriyón, I. (2002) *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet Microbiol* **90**: 209–27.

Moreno, E., and Gorvel, J.P. (2004) Invasion, Intracellular Trafficking and Replication of *Brucella* Organisms in Professional and Non-Professional Phagocytes. In *Brucella: molecular and cellular biology*. López-Goñi, I., and Moriyón, I. (eds). Horizon Bioscience, Wymondham, UK.

Moreno, E., Jones, L.M., and Berman, D.T. (1984) Immunochemical characterization of rough *Brucella* lipopolysaccharides. *Infect Immun* **43**: 779–82.

Moreno, E., and Moriyón, I. (2002) *Brucella melitensis*: a nasty bug with hidden credentials for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 1–3.

Moreno, E., Stackebrandt, E., Dorsch, M., Wolters, J., Busch, M., and Mayer, H. (1990) *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria. *J Bacteriol* **172**: 3569–76.

Moriyón, I., and Berman, D.T. (1982) Effects of nonionic, ionic, and dipolar ionic detergents and EDTA on the *Brucella* cell envelope. *J Bacteriol* **152**: 822–8.

Moriyón, I., Grilló, M.J., Monreal, D., González, D., Marín, C., López-Goñi, I., *et al.* (2004) Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet Res* **35**: 1–38.

Myeni, S., Child, R., Ng, T.W., Kupko, J.J., Wehrly, T.D., Porcella, S.F., *et al.* (2013) *Brucella* modulates secretory trafficking via multiple type IV secretion effector proteins. *PLoS Pathog* **9**: e1003556.

O'Callaghan, D., Cazevieuille, C., Allardet-Servent, A., Boschioli, M.L., Bourg, G., Foulongne, V., *et al.* (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.

Ocampo-Sosa, A.A., and García-Lobo, J.M. (2008) Demonstration of IS711 transposition in *Brucella ovis* and *Brucella pinnipedialis*. *BMC Microbiol* **8**: 17.

Ögredici, Ö., Erb, S., Langer, I., Pilo, P., Kerner, A., Haack, H.G., *et al.* (2010) Brucellosis reactivation after 28 years. *Emerg Infect Dis* **16**: 2021–2.

Ouahrani, S., Michaux, S., Sri Widada, J., Bourg, G., Tournebize, R., Ramuz, M., and Liautard, J.P. (1993) Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella spp.*: relationship between genomic structure and the number of IS6501 copies. *J Gen Microbiol* **139**: 3265–73.

Palacios-Chaves, L., Conde-Álvarez, R., Gil-Ramírez, Y., Zúñiga-Ripa, A., Barquero-Calvo, E., Chacón-Díaz, C., *et al.* (2011) *Brucella abortus* ornithine lipids are dispensable outer membrane components devoid of a marked pathogen-associated molecular pattern. *PLoS One* **6**: e16030.

- Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M., and Tsianos, E. (2005) Brucellosis. *N Engl J Med* **352**: 2325–36.
- Paquet, J.Y., Díaz, M.A., Genevrois, S., Grayon, M., Verger, J.M., Bolle, X. de, *et al.* (2001) Molecular, antigenic, and functional analyses of Omp2b porin size variants of *Brucella spp.* *J Bacteriol* **183**: 4839–47.
- Paquet, J.Y., Vinals, C., Wouters, J., Letesson, J.J., and Depiereux, E. (2000) Topology prediction of *Brucella abortus* Omp2b and Omp2a porins after critical assessment of transmembrane beta strands prediction by several secondary structure prediction methods. *J Biomol Struct Dyn* **17**: 747–57.
- Pasquevich, K.A., García Samartino, C., Coria, L.M., Estein, S.M., Zwerdling, A., Ibañez, A.E., *et al.* (2010) The protein moiety of *Brucella abortus* outer membrane protein 16 is a new bacterial pathogen-associated molecular pattern that activates dendritic cells in vivo, induces a Th1 immune response, and is a promising self-adjuvanting vaccine against systemic a. *J Immunol* **184**: 5200–12.
- Paulsen, I.T., Seshadri, R., Nelson, K.E., Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., Read, T.D., *et al.* (2002) The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13148–53.
- Pérez, J.M., McGarry, M.A., Marolda, C.L., and Valvano, M.A. (2008) Functional analysis of the large periplasmic loop of the *Escherichia coli* K-12 WaaL O-antigen ligase. *Mol Microbiol* **70**: 1424–40.
- Perry, M.B., and Bundle, D.R. (1990) Antigenic relationships of the lipopolysaccharides of *Escherichia hermannii* strains with those of *Escherichia coli* O157:H7, *Brucella melitensis*, and *Brucella abortus*. *Infect Immun* **58**: 1391–5.
- Raetz, C.R.H., Guan, Z., Ingram, B.O., Six, D.A., Song, F., Wang, X., and Zhao, J. (2009) Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. *J Lipid Res* **50 Suppl**: S103–8.
- Raetz, C.R.H., Reynolds, C.M., Trent, M.S., and Bishop, R.E. (2007) Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem* **76**: 295–329.
- Rajashekara, G., Covert, J., Petersen, E., Eskra, L., and Splitter, G. (2008) Genomic island 2 of *Brucella melitensis* is a major virulence determinant: functional analyses of genomic islands. *J Bacteriol* **190**: 6243–52.
- Rajashekara, G., Glasner, J.D., Glover, D.A., and Splitter, G.A. (2004) Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. *J Bacteriol* **186**: 5040–51.
- Rasool, O., Freer, E., Moreno, E., and Jarstrand, C. (1992) Effect of *Brucella abortus* lipopolysaccharide on oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils. *Infect Immun* **60**: 1699–702.
- Regni, C., Naught, L., Tipton, P.A., and Beamer, L.J. (2004) Structural Basis of Diverse Substrate Recognition by the Enzyme PMM/PGM from *P. aeruginosa*. *Structure* **12**: 55–63.
- Regni, C., Schramm, A.M., and Beamer, L.J. (2006) The reaction of phosphohexomutase from *Pseudomonas aeruginosa*: structural insights into a simple processive enzyme. *J Biol Chem* **281**: 15564–71.
- Ridler, A.L., West, D.M., Stafford, K.J., and Wilson, P.R. (2006) Persistence, serodiagnosis and effects on semen characteristics of artificial *Brucella ovis* infection in red deer stags. *N Z Vet J* **54**: 85–90.
- Riezu-Boj, J.I., Moriyón, I., Blasco, J.M., Marín, C.M., and Díaz, R. (1986) Comparison of lipopolysaccharide and outer membrane protein-lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection. *J Clin Microbiol* **23**: 938–42.

Roop, R.M., Bellaire, B.H., Valderas, M.W., and Cardelli, J.A. (2004) Adaptation of the *Brucellae* to their intracellular niche. *Mol Microbiol* **52**: 621–30.

Roop, R.M., Gaines, J.M., Anderson, E.S., Caswell, C.C., and Martin, D.W. (2009) Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Med Microbiol Immunol* **198**: 221–38.

Salhi, I., Boigegrain, R.A., Machold, J., Weise, C., Cloeckert, A., and Rouot, B. (2003) Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp. *Infect Immun* **71**: 4326–32.

Schlabritz-Loutsevitch, N.E., Whatmore, A.M., Quance, C.R., Koylass, M.S., Cummins, L.B., Dick, E.J., et al. (2009) A novel *Brucella* isolate in association with two cases of stillbirth in non-human primates - first report. *J Med Primatol* **38**: 70–3.

Scholz, H.C., Hofer, E., Vergnaud, G., Fleche, P. Le, Whatmore, A.M., Dahouk, S. Al, et al. (2009) Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria. *Vector Borne Zoonotic Dis* **9**: 153–6.

Scholz, H.C., Hubalek, Z., Nesvadbova, J., Tomaso, H., Vergnaud, G., Flèche, P. Le, et al. (2008) Isolation of *Brucella microti* from soil. *Emerg Infect Dis* **14**: 1316–7.

Scholz, H.C., Hubalek, Z., Sedláček, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Dahouk, S. Al, et al. (2008) *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 375–82.

Scholz, H.C., Nöckler, K., Göllner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., et al. (2010) *Bucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**: 801–8.

Schramm, A.M., Karr, D., Mehra-Chaudhary, R., Doren, S.R. Van, Furdui, C.M., and Beamer, L.J. (2010) Breaking the covalent connection: Chain connectivity and the catalytic reaction of PMM/PGM. *Protein Sci* **19**: 1235–42.

Scupham, A.J., and Triplett, E.W. (1997) Isolation and characterization of the UDP-glucose 4'-epimerase-encoding gene, *galE*, from *Brucella abortus* 2308. *Gene* **202**: 53–9.

Sieira, R., Comerci, D.J., Sánchez, D.O., and 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.

Silva, A.P., Macêdo, A.A., Costa, L.F., Turchetti, A.P., Bull, V., Pessoa, M.S., et al. (2013) *Brucella ovis* lacking a species-specific putative ATP-binding cassette transporter is attenuated but immunogenic in rams. *Vet Microbiol* **167**: 546–53.

Silva, T.M.A., Paixão, T.A., Costa, E.A., Xavier, M.N., Sá, J.C., Moustacas, V.S., et al. (2011) Putative ATP-binding cassette transporter is essential for *Brucella ovis* pathogenesis in mice. *Infect Immun* **79**: 1706–17.

Simmons, G.C., and Hall, W.T.K. (1953) Epididymitis of rams: Preliminary Studies on the Occurrence Pathogenicity of a *Brucella*- Like Organism. *Aust Vet J* **29**: 33–40.

Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nat Biotechnol* **1**: 784–91.

Sola-Landa, A., Pizarro-Cerda, J., Grilló, M.J., Moreno, E., Moriyón, I., Blasco, J.M., et al. (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.

- Suarez, C.E., Pacheco, G.A., and Vigliocco, A.M. (1990) Immunochemical studies of oligosaccharides obtained from the lipopolysaccharide of *Brucella ovis*. *Vet Microbiol* **22**: 329–34.
- Sweet, C.R., Ribeiro, A.A., and Raetz, C.R.H. (2004) Oxidation and transamination of the 3"-position of UDP-N-acetylglucosamine by enzymes from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Role in the formation of lipid A molecules with four amide-linked acyl chains. *J Biol Chem* **279**: 25400–10.
- Sweet, C.R., Williams, A.H., Karbarz, M.J., Werts, C., Kalb, S.R., Cotter, R.J., and Raetz, C.R.H. (2004) Enzymatic synthesis of lipid A molecules with four amide-linked acyl chains. LpxA acyltransferases selective for an analog of UDP-N-acetylglucosamine in which an amine replaces the 3"-hydroxyl group. *J Biol Chem* **279**: 25411–9.
- Tibor, A., Decelle, B., and Letesson, J.J. (1999) Outer membrane proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of *Brucella spp.* are lipoproteins. *Infect Immun* **67**: 4960–2.
- Tibor, A., Wansard, V., Bielartz, V., Delrue, R.M., Danese, I., Michel, P., *et al.* (2002) Effect of *omp10* or *omp19* deletion on *Brucella abortus* outer membrane properties and virulence in mice. *Infect Immun* **70**: 5540–6.
- Tiller, R. V, Gee, J.E., Frace, M.A., Taylor, T.K., Setubal, J.C., Hoffmaster, A.R., and De, B.K. (2010) Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. *Appl Environ Microbiol* **76**: 5837–45.
- Tiller, R. V, Gee, J.E., Lonsway, D.R., Gribble, S., Bell, S.C., Jennison, A. V, *et al.* (2010) Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. *BMC Microbiol* **10**: 23.
- Tsai, C.M., and Frasch, C.E. (1982) A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **119**: 115–9.
- Tsolis, R.M., Seshadri, R., Santos, R.L., Sangari, F.J., Lobo, J.M.G., Jong, M.F. de, *et al.* (2009) Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism. *PLoS One* **4**: e5519.
- Ugalde, J.E., Comerci, D.J., Leguizamón, M.S., and Ugalde, R.A. (2003) Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucomutase (*pgm*) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. *Infect Immun* **71**: 6264–9.
- Ugalde, J.E., Czubener, C., Feldman, M.F., and 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.
- Uzureau, S., Lemaire, J., Delaive, E., Dieu, M., Gaigneaux, A., Raes, M., *et al.* (2010) Global analysis of quorum sensing targets in the intracellular pathogen *Brucella melitensis* 16 M. *J Proteome Res* **9**: 3200–17.
- Velasco, J., Bengoechea, J.A., Brandenburg, K., Lindner, B., Seydel, U., González, D., *et al.* (2000) *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum spp.*, differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. *Infect Immun* **68**: 3210–8.
- Verger, J.M., Grimont, F., Gmont, P.A.D., and Grayon, M. (1985) *Brucella*, a Monospecific Genus as Shown by Deoxyribonucleic Acid Hybridization. *Int J Syst Bacteriol* **35**: 292–5.
- Viadas, C., Rodríguez, M.C., Sangari, F.J., Gorvel, J.P., García-Lobo, J.M., and López-Goñi, I. (2010) Transcriptome analysis of the *Brucella abortus* BvrR/BvrS two-component regulatory system. *PLoS One* **5**: e10216.

Vizcaíno, N., Caro-Hernández, P., Cloeckert, A., and Fernández-Lago, L. (2004) DNA polymorphism in the *omp25/omp31* family of *Brucella* spp.: identification of a 1.7-kb inversion in *Brucella* cetaceae and of a 15.1-kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide. *Microbes Infect* **6**: 821–34.

Vizcaíno, N., and Cloeckert, A. (2012) Biology and Genetics of the *Brucella* Outer Membrane. In *Brucella: Molecular microbiology and genomics*. López-Goñi, I., and O'Callaghan, D. (eds). Horizon Press, Norfolk, UK. pp. 133–61.

Vizcaíno, N., Cloeckert, A., Zygmunt, M.S., and Dubray, G. (1996) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis omp31* gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. *Infect Immun* **64**: 3744–51.

Vizcaíno, N., Kittelberger, R., Cloeckert, A., Marín, C.M., and Fernández-Lago, L. (2001) Minor nucleotide substitutions in the *omp31* gene of *Brucella ovis* result in antigenic differences in the major outer membrane protein that it encodes compared to those of the other *Brucella* species. *Infect Immun* **69**: 7020–8.

Vizcaíno, N., Verger, J.M., Grayon, M., Zygmunt, M.S., and Cloeckert, A. (1997) DNA polymorphism at the *omp-31* locus of *Brucella* spp.: evidence for a large deletion in *Brucella abortus*, and other species-specific markers. *Microbiology* **143** (Pt 9): 2913–21.

Watarai, M., Makino, S.I., Fujii, Y., Okamoto, K., and Shirahata, T. (2002) Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cell Microbiol* **4**: 341–55.

Wattam, A.R., Williams, K.P., Snyder, E.E., Almeida, N.F., Shukla, M., Dickerman, A.W., *et al.* (2009) Analysis of ten *Brucella* genomes reveals evidence for horizontal gene transfer despite a preferred intracellular lifestyle. *J Bacteriol* **191**: 3569–79.

Weeks, J.N., Galindo, C.L., Drake, K.L., Adams, G.L., Garner, H.R., and Ficht, T.A. (2010) *Brucella melitensis* VjbR and C12-HSL regulons: contributions of the N-dodecanoyl homoserine lactone signaling molecule and LuxR homologue VjbR to gene expression. *BMC Microbiol* **10**: 167.

Weynants, V., Gilson, D., Cloeckert, A., Tibor, A., Denoel, P.A., Godfroid, F., *et al.* (1997) Characterization of smooth lipopolysaccharides and O polysaccharides of *Brucella* species by competition binding assays with monoclonal antibodies. *Infect Immun* **65**: 1939–43.

Whatmore, A.M. (2009) Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infect Genet Evol* **9**: 1168–84.

Winter, A.J., Schurig, G.G., Boyle, S.M., Sriranganathan, N., Bevins, J.S., Enright, F.M., *et al.* (1996) Protection of BALB/c mice against homologous and heterologous species of *Brucella* by rough strain vaccines derived from *Brucella melitensis* and *Brucella suis* biovar 4. *Am J Vet Res* **57**: 677–83.

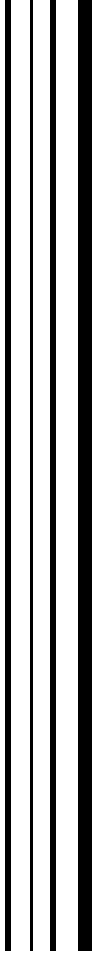
Yang, X., Skyberg, J.A., Cao, L., Clapp, B., Thornburg, T., and Pascual, D.W. (2013) Progress in *Brucella* vaccine development. *Front Biol (Beijing)* **8**: 60–77.

Zaccheus, M. V, Ali, T., Cloeckert, A., Zygmunt, M.S., Weintraub, A., Iriarte, M., *et al.* (2013) The epitopic and structural characterization of *Brucella suis* biovar 2 O-polysaccharide demonstrates the existence of a new M-negative C-negative smooth *Brucella* serovar. *PLoS One* **8**: e53941.

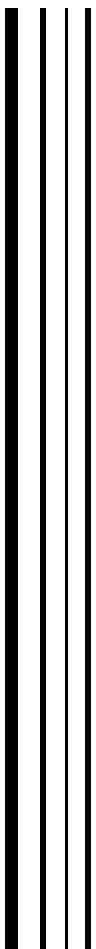
Zwerdling, A., Delpino, M.V., Barrionuevo, P., Cassataro, J., Pasquevich, K.A., García Samartino, C., *et al.* (2008) *Brucella* lipoproteins mimic dendritic cell maturation induced by *Brucella abortus*. *Microbes Infect* **10**: 1346–54.

Zygmunt, M.S., Blasco, J.M., Letesson, J.J., Cloeckaert, A., and Moriyón, I. (2009) DNA polymorphism analysis of *Brucella* lipopolysaccharide genes reveals marked differences in O-polysaccharide biosynthetic genes between smooth and rough *Brucella* species and novel species-specific markers. *BMC Microbiol* **9**: 92.

Zygmunt, M.S., Jacques, I., Bernardet, N., and Cloeckaert, A. (2012) Lipopolysaccharide heterogeneity in the atypical group of novel emerging *Brucella* species. *Clin Vaccine Immunol* **19**: 1370–73.



Anexo I



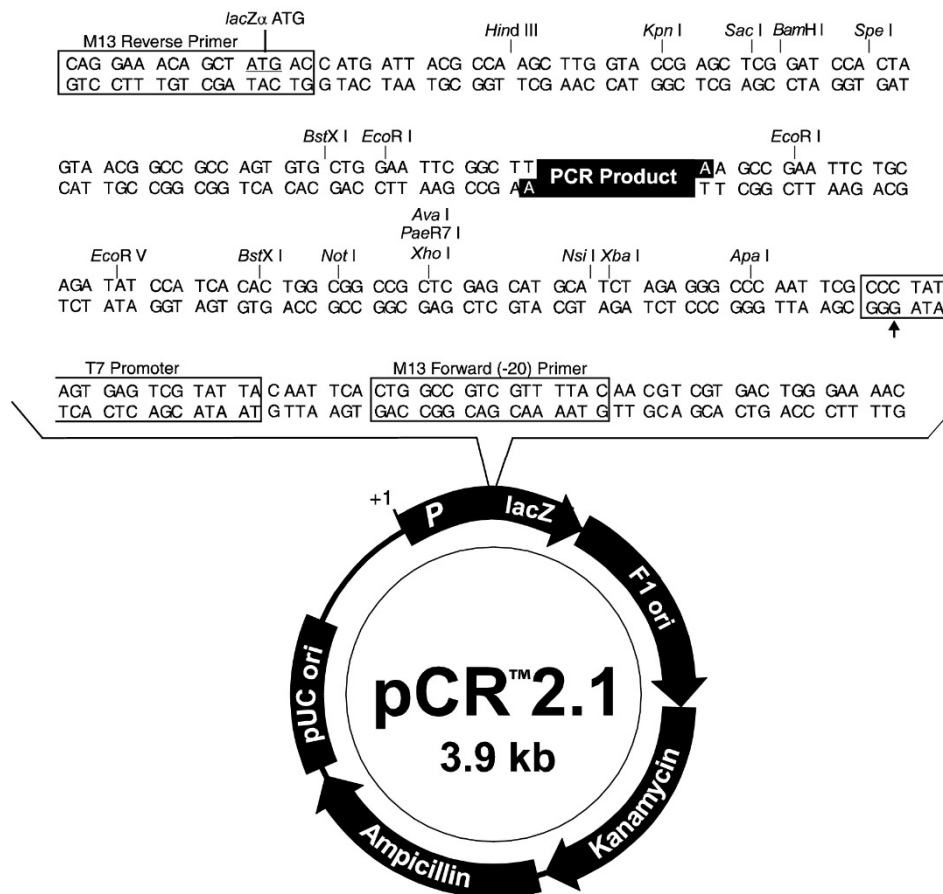


Figura S1. Representación esquemática del vector PCR™2.1 y detalle de la zona de la caja de clonado. PCR Product: lugar de inserción del producto de PCR (Imagen tomada de Invitrogen)

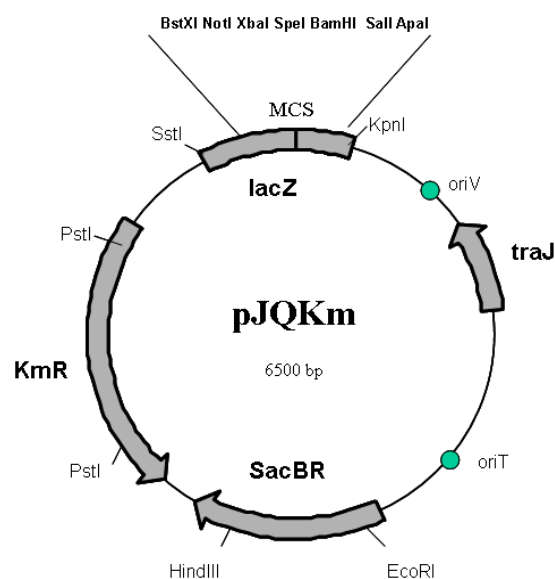
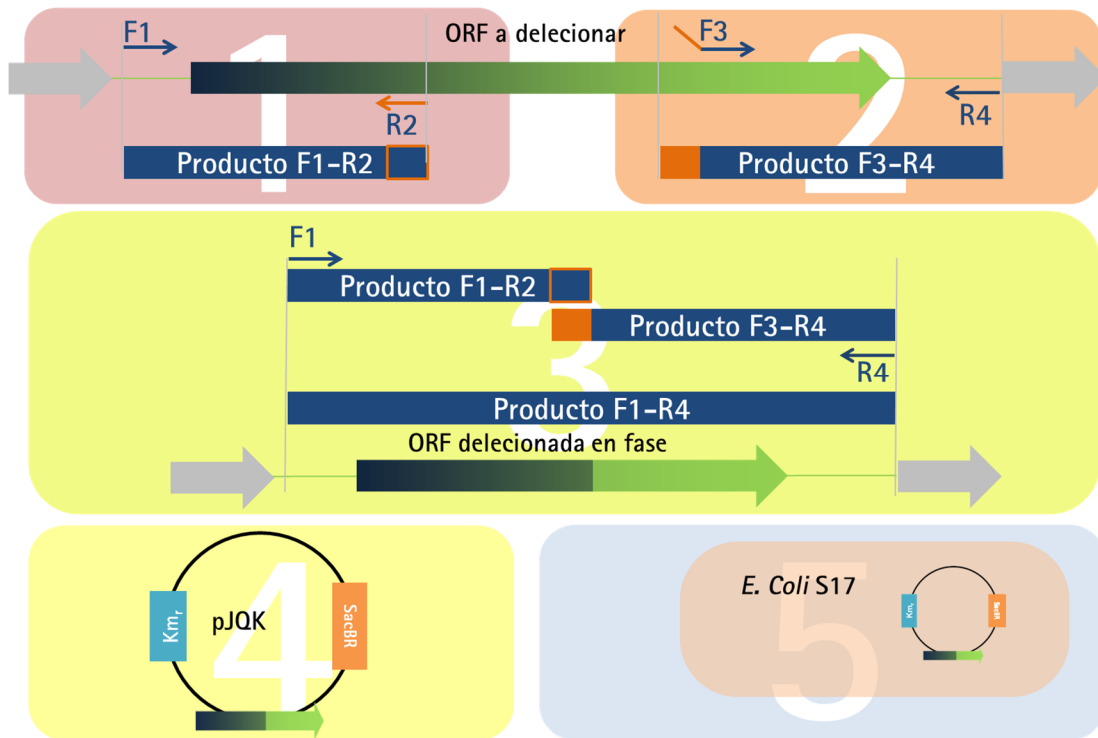


Figura S2. Representación esquemática del vector pJQKm (Scupham & Triplett, 1997).



Primera recombinación (conjugación)

E. coli S17
pJQK ORF
delecionada
Km^r Sac^s Nal^s



Brucella con el plásmido integrado

Km^r Sac^s Nal^r

Segunda recombinación (escisión del plásmido)

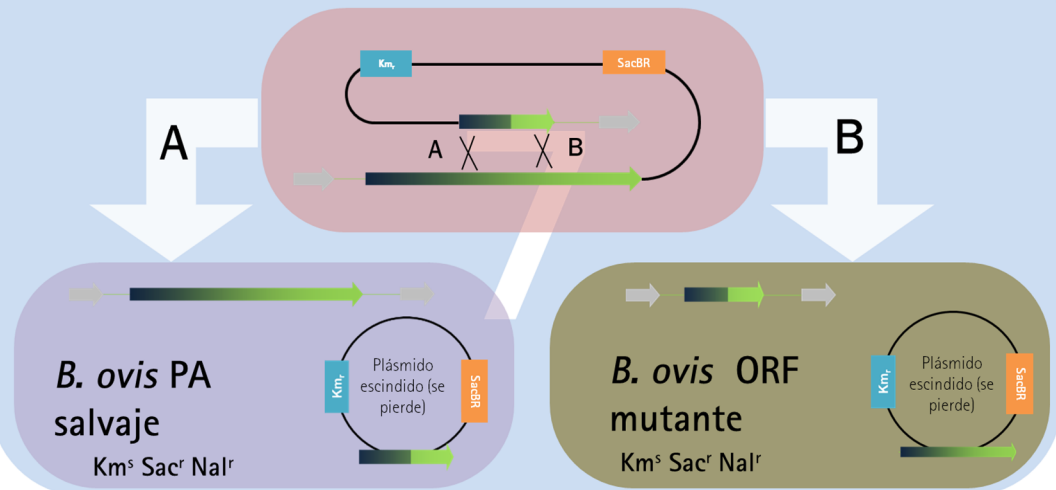


Figura S3. Representación esquemática de la mutagénesis por PCR de extensión solapada. Las ORFs a delecionar (Paneles 1 y 2) y delecionada (Paneles 3-7) se representadan con una flecha degradada de azul a verde y las hipotéticas ORFs anterior y posterior se representan con flechas grises. Los cebadores utilizados para la PCR solapada se designan como F1, R2, F3 y R4. La zona complementaria de F3 con el cebador R2 se muestra en naranja (Paneles 1-3). Km: 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina; Sac: 5% de sacarosa; Nal: 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido nalidíxico. Los cuadrados azules y naranjas representan los casetes de resistencia a Km y sensibilidad a Sac, respectivamente (Paneles 4-7).

Tras una primera reacción de PCR F1-R2 (panel 1) y una segunda F3-R4 (panel 2) usando como molde el DNA genómico de *B. ovis* PA, se extrajeron las bandas correspondientes y se usaron como molde en una tercera PCR F1-R4 generando un producto F1-R4 que contiene la ORF delecionada en fase (panel 3). Este producto se insertó en un vector pJQK (panel 4) y se transformó en *E. coli* S17 (panel 5). La cepa S17 es capaz de conjugarse con *Brucella* (panel 6) pero el plásmido pJQK no se replica en esta especie bacteriana. Por ello, el pJQK sólo se mantiene en *Brucella* cuando se ha integrado por recombinación homóloga en el cromosoma. Posteriormente, la escisión y salida espontánea del plásmido (panel 7) se facilita mediante crecimiento en medio sin Km. Esto puede suponer la pérdida del gen mutante (cepa revertida a salvaje; panel 7A) o del gen completo (cepa mutante; panel 7B).

5' manBoAg F1→

3'

aacaagatggcctccagaaaaccCGGGGCGGTTCAAAGCGTGAATC
 ttataaacgTCGATACGCTTTAGTAAATAGATGGTCTATCTGTAATTTTTATTAGCTT
 taatttGTGCCATCCATCATGTGAACCTACATTTAAGTTAGATTGAGGAAAACCACAGAG

INICIO BOV_0540

1 atgCCTGTTGCCTTTGGAACCTTCTGGCTTGAGGGGAGAGTCCGTCGATTTACGGACAAT
~~M P V A F G T S G L R G E S V D F T D N~~
 61 gtttGTATGGTGTATGTTAGCGCTTTCTACAGCATCTTCTCATAATTTTTCATATGAA
 V C M V Y V S A F L Q H L S H N F S Y E

← manBoAg R2

3' **gtcaaatgcaacctcggctg** 5'

121 acagtttacgTTGGAGCCGACETTEGGGAGTETAGCEETAATAACEATATEATGTTAT
 T V Y V G A D L R E S S P K I T I S C Y
 181 agagetattGAACTGAECGGGAAGGAGAGEGATTTGGGETGGAATGTTCEGAEGEGEGE
 R A I E L T C R R A I W A G N V P T P A
 241 etegegggettattGAAATGGETEgeaatGCAECTGCCATEATGATAAECGGGAAGCEATE
 L A A Y A M A R N A P A I M I T C S H I
 301 ecagaggectacaatGGCATTAAATTCTATCGGECTGACGGAGAATTTCTGAAGGAEGAT
 P E A Y N G I K F Y R P D G E F L K D D
 361 gaageacecgtacgTGGTCTTGGCGAAGAATTATTGAGTAAGGTTGTTGAECGGGAEEGG
 E A P V R C L A E E L L S K V V D G Q R
 421 teegteaatttGECTGEGEECTTGGETGATGTTGCAAGAATAATGTGAGECGTTCEATE
 S V N L P A P L A D V A E E Y V S R S I
 481 ggegettttGGEEGGGAACAACTGGETGGAATGAAAATEGGAATGATETTCATTEEGE
 G A F C R D T L A C M K I G I D L H S A
 541 gttgggegagatattcttGTAEGTATATTTAAAGGACTTGGAGEGGAGGTTTATECEATE
 V C R D I L V R I F K G L G A E V Y P F
 601 egtagaacggaaaatttCGTTGCCGTTGATACAGAAGEGTTGATECCAGEGGATATATCT
 R R T E N F V A V D T E A L D P A D I S
 661 eeggegegeacatttateGEEGAAACATGGGETEGATGCAGTAGTGTGACAGATGGAGAE
 R A R T F I A E H C L D A V V S T D G D
 721 ggtgataggectetggTEATTGAEGATECAGGGAAGACAGGTGAATGGEGATAAECTGGGT
 G D R P L V I D D Q G R Q V N G D T L G
 781 attetgaeggetegatatectCGTGEAAAACAGTEGTGAEGEEGETEAGTAECAEGAGE
 I L T A R Y L R A K T V V T P L S T T S
 841 geactagaggagagTGGTGGTTGAGAAATATCCACAGAACAACGGATTGGGTGCECTAT
 A L E E S C W F E N I H R T R I G S P Y
 901 gttgtggteGAAATGGEGEGTGGGTGGEGEATECCAGTTGTTGTTTGGAGGEGAATGG
 V V V E M A R A V A H P V V C F E A N G
 961 ggettttetaetEGGEGACGATGTGGCGTTGAAGAETGGTTTATTGCGEGECTTECAAE
 G F L L C D D V A L K T G L L R R L P T
 1021 eeggatGCAGTTTTGCCEAGEAGTGGGTGTTCTTGGEGAGGEGAAAAGACCAGGGTATGEGA
 R D A V L P A V A V L A Q A K D Q C M R
 1081 ttgagtgagatggteGETAACCTTCTCTGTTTTCATGAAAGECGATAGGGTTAAGGAA
 L S E M V A T L P S R F M K A D R V K E
 1141 gtteeeggagacegegeEAGETCCATTTTGCACGETATGGAAACGTECAATEATTTEGT
 V P C D R A A P F L H A M E T S Q S F R
 1201 tetaatttetececgTtgattGEEGAAECGGAAGCAATETEGACTGTGAEAGGEGTGE
 S N F S P L I A E P E A I S T V D C V R

manBoAg F3→

5' **cagtttacgTTGGAGCCGAC** 3'

1261 atggggttttGEG**aatggcgatacggttcattt**CCGACAATCAGGCAATGCTCCGGAATG
 M A F A N G D T V H F R Q S G N A P E M
 1321 cggatttatatagaaaCCGATTCCCGGGAGAAAACACTGATCGAATGTTGAGCGAATTTATT
 R I Y I E T D S A E K T D R M L S E F I

FIN BOV_0540

1381 gcaaagctctctGAAACGACCTGAA*****ATTTCATCCCGGAAAGGAAGTTAAAGTGCGTGAAATG
 A K L S E T T
 ttgatgagaccagtagtttGGCCGGCGAAAAGGTACGAGATTGTGGCCGATGTCGCGC

3' **ctga**


```
tcgcaacgccccaaaacagtttctggctctgactggcgaactcagcctctttcagatgact
      ←manBoAg R4
aaactttgctaacagcct 5'
ttgaaacgattgtcgga
```

Figura S4. BOV_0540 (*manB_{O-Ag}*) y sus regiones anterior y posterior. La secuencia de DNA está registrada en el NCBI con el número de acceso 148559635 (Gene ID: 5203394). Los codones de inicio y parada están resaltados en azul y verde, respectivamente. Los cebadores usados para la mutagénesis están resaltados en rojo y en negrita. Los caracteres tachados representan aminoácidos y nucleótidos eliminados en el mutante *BoΔmanB_{O-Ag}*.

5' wadA F1 → 3'

FIN BOV_0615

gggcacgacgcccgga cccacgctgct tag tacggt tcgagccataagtgtgaaacggtt
 ttgcgggaaaagcttttagccgcgccggtctgtcacaaacgtaataattaaataattacac
 aagatatacatagtgaatcataatgatcgcacacgcataatgacaccggctaaaaag
 ggtggcataatcagacagaaatcctttgatgggtgatgagcggaccataaagggtgcatct
 gataagttgaagggcggtcatcatgcaaaaaatcgcaagtgcgctgaggcaagcgaatta

INICIO BOV_0614

1 atg atattgcccgtatttcgtcacatcaatatggcctcgcagcctgccgcctataagaccgtc
 M I L P V F V I N M A S Q P A A Y K T V

61 gcagcctccattgaagcttacgggcagggtttccagcttcacaggatcgatgcggttaat
 A A S I E A Y G Q G F Q L H R I D A V N

← wadA R2

121 gggcatacagcgacacagcgcattggcattgacgatgcacgcttttgatg egateaatgge
 G H T A T Q R I G I D D A R F D A ~~I N G~~

181 egtgaaatgctgcccgggtgaatacgggtgttategcageccatttgaaggeattggaaage
 R E M L P C E Y C C Y R S H L K A L E S

241 ttettatecgaecgggetccccctacggcctcatttetggaagatgatgtgtgttttttaactgaa
 F L S D C S P Y C L I L E D D V V F T E

301 aetaeateggeggegeatcattcatgacatecattaaaaagcctgcctgatttegaectegtgtgaag
 T T S A R I H D I I K S L P D F D V V K

361 etegttaatecategetcaccettatttcattgagcctgcttgaaacagatgcaggtgacagg
 L V N H R S P L F M S L L E T D A G D R

421 ateggeegageccattcatggccccagggatctgcccgcgcctatctegtcagecagagaa
 I C R A I H C P Q C S A A A Y L V S R E

481 ggegeceeggaagetttttatecgeactategaccatggaactgcegtgggaecttgcctg
 G A R K L L S A L S T M E L P W D V A M

541 gagegatttttggeatecacaagaecceggctgttcagecagegatgaaaaacatectegctttt
 E R F W H H K A R L F S S D E N I L A F

601 tttteteacagegaaatctcaaatatttccgatcagaattcaggttatgatgaggecaag
 S S H S E I S N I S D Q N S G Y D E A K

661 eaaccttgggtatatgcegettggaaegtcattatttgcacttttgattattatgtgegt
 H P W Y M R L R T S L F R T F D Y Y V R

721 gttcaccatacattatttgaacctcaaaatcccgatggcagecageatgaaaaagecagtee
 V H H T L L Q P Q N P D C S S M K S Q S

781 ggageetataagetgccccgaatttcattaactggcgaactgattgcegeccateagettg
 G A Y K L P C I S L T C E L I A A I S L

841 etggttttcatgtetaecggatgggttagagaecggaecgectacagatatatagecccteggt
 L V F M S T V W V E T D A Y R Y I A L G

901 ttttggttgggetgcattgatccggttatgcccgcaccgattttctggaataacgaaaaacca
 F V V A A L I R Y A R T D F W K Y E K P

961 atggtegggetgggcccgettaactttgcgtggcgtggacatttetatgtctctgggegaggtte
 M V G W A G L L C V A W T F Y V L A R F

1021 geatataatetatttetatacccgaaatgggcaecggcteggeagaggggeatataatett

```

A Y I Y L F Y P E M G T G S A E G I Y L
1081 ttecegettttttctacccgacattgggggtttgegttaactgctttttatecgaeggccattt
F P L F Y P T L C F A L L L F I R R P F
1141 etcattgeggtegeccttcatggcgatcagcctcgtaatttctcatatteggettecaetat
L I A V A F M A I S L V I L I F G F H Y
1201 gatetategtggaacgaagageegttaegtgtgetccagcataateccgateccatgeggget
D L S W N E R A V T L L Q H N P I H A A
1261 gteageagtggettttatecgcctatgcegaatggcttttggcattcacaggttgaatege
V S S C F I A L C A M A F G I H T L N R
1321 aaeagetegataaccagagegeegtctgttttggctgtctgegegettgetactttttatt
N T L D T R A R V V L C L L A L A T F I
1381 ggggeectgattgeaatetacagecctctattcaaaaaggggtctgtggetcgeaatggcaatt
A A L I A I Y S L Y S K C V W L A M A I
1441 geatttccgaacttttcgtggctccttggctgctgacagataaaaagccagacctcagcgatg
A F P T F V V L V A L T D K S Q T S R M
1501 getgcactgggtgtgcaattctcattggcttgggtgagtggtttgcaggagaacatactctg
A A L V C I L I G L L S V F A C E H I L
1561 eaaegtgtggeggeaataactgccaatacactcctgggaattgttateggaacctcaagaag
Q R V C C N T A N T S W E L L S D L K T
1621 ggggataaacatcatgcaggatttccgacaaaagccatcaaaaaccgggaaacaggectgagc
G D N I M Q D F D K A I K N P E T C L S
1681 gagegegaaagecctgatgatatgggccaacacgctgcatatctggcataagaatecgata
E R E R L M I W A N T L H I W H K N P I
1741 tttggegeagggttttcgtggettcaactattgggaaaaagegcecttateageaaaecgae
F C A C V S W L H Y W E K R P Y Q Q T D
1801 tteacectgetccacaatggatatctggaaattgceattcgtatggatttctggggettg
F T L L H N C Y L E I A I R Y C F L G L
1861 etgttctatggcggttttgaecggtetgggeggttegatgcacatggcaagccacgegagea
L F Y G V L T V W A V R C T W Q A T R A
1921 ggtctcctegacagtgctgctcttcaatgetacgtcgeaacactgggtattttttgcaagtg
G L I D S A A F Q C Y V A T L V F F A V
                    wadA F3 →
                    5' attgacgatgcacggttttgatgca
1981 aegatettgtcaaaactetaatgttctgtctggcaataggagaatectatattggcaactggca
T I L S N S N V R L A I G E S Y M A L A
                                3'
2041 ttccggtttgccttttatgtgccagtaccttctgcaacaacacaacagacaatacccgcgc
F G F A F Y C Q Y L L Q Q H N R Q Y P R
                FIN BOV_0614                FIN BOV_0613
2101 acctacttctaaagagcggttccacttttacacagccggtggaaccggtgtcttttctcaaa
T Y F *
tcagcggcatgtccgacgagcttgtcaaaaagcagccctgacaagcctgtaatgttccagc
aactcatattctatgcttcaatatccggcaatccggcaacgcgacagagctcacgc

```

```

ataccgggcggaattgatccagccctgcgctatcgttcaggcaaagccgtatcgccctgg
ctgagattggtgtagaagcgatgcgctccacaaggccatccaccattgcagggctgca
aagaatggatcaaggtttgccagcacttcttcggttgcaaattggacgcggttttcttc
                                     ←wadA R4
3' cgtttaaccgctatttgag 5'
acatacccggcaagggttgcaaattgggcgataaactccagatcgataatgccgcccggc
ttcagctttaagtcccaatcatcccgcggcggttttcttcgcgatcagttccctcatc

```

Figura S5. BOV_0614 (*wadA*) y sus regiones anterior y posterior. La secuencia de DNA está registrada en el NCBI con el número de acceso 14856689 (Gene ID: 5202086). Los codones de inicio y parada están resaltados en azul y verde, respectivamente. Los cebadores usados para la mutagénesis están resaltados en rojo y en negrita. Los caracteres tachados representan aminoácidos y nucleótidos eliminados en el mutante Bo Δ *wadA*.

agcacagggttttttcggtatctggtatatgctgcgcaatttcccgcagagccaatggaac
 attcgtatttgcggaatttagctggcagggtgaaacacccatgactggagcgcggaacga
 5' wadB F1→ 3' FIN BOV_0337
 cagtggatcaaggaaaaaatcaaatcggccatgattaccgccgtgatctgagccggtaat
 tataccggcccttatgcctctctccggtggatttcggtcgtttttgcatgccattttgtcga
 aatgccaaatttcgtgcatataacgcgctttcctgaaatcacagccatcgggtcccgcgtcc
 INICIO BOV_0337
 1 atgaacgtcaaggcattcatcattcacctcaaacgcgcgaccgatcgtgcgccgcaggtg
 M N V K A F I I H L K R A T D R A P Q V
 61 gaaaaactcatcaaggaattgccggtcaaggccgaagtcacgaagccgtcgaatagccgt
 E K L I K E L P V K A E V I E A V D S R
 ←wadB R2
 3' gagttgtttctgctctaacgc 5'
 121 gcgctcaacaaagacgagattgcccgeatattataaaacgcgcctgcacaactccgcgetat
 A L N K D E I A R I Y K R R L H T P R Y
 181 ecetttgcctcagegcgaacgagattgectgttttctgtctgcacccgcgaaggeatggcag
 P F A L S R N E I A C F L S H R K A W Q
 241 gegattategaccggaagcttgatgcgggttcatectgtggaagacgatattgcaactgacg
 A I I D R K L D A C F I V E D D I A L T
 301 gaaaaactteatgggtgcataaccgggcccgcggtcgatcctctggaaccgggtggcttcate
 E N F M C A Y R A A V D H L E P G G F I
 361 egetttacattccgggacgaccgcgagcattggccgtgaggttttccgggacgaagcgggtg
 R F T F R D D R E H G R E V F R D E A V
 421 eggatcctcctccggaaccgacgcttggcattggttgcgcagcttgttttctctatgat
 R I I I P N P I C L C M V A Q L V S Y D
 481 ggggccccaaaaactgctcgacatacccccagcgttcgaccggcctgtcgatacgaagcgtg
 A A Q K L L D I T Q T F D R P V D T T V
 wadBF3→
 5' ctcaacaaagacgagattgcg
 541 eagalgcgctgggtaacgggectgcaaccccttttcggtcattccgggtggcgtgaaggaa
 Q M R W V T C L Q P L S V I P G G V K E
 3'
 601 atcctcgctcacaactgggcggaaccacgatccagcacaaaaagaacttttcagacaagctt
 I S S Q L G G T T I Q H K K N F S D K L
 FIN BOV_0337
 661 gcgcgcgaaattttacgccccatctaccggatgcgtgtgcgcgccattatcgaatgga
 A R E I L R P I Y R M R V R A Y S S K *
 INICIO BOV_0336
 gttttatgatgcctgtacctattcttttgatcaccagatcgcgccattaccggccaaaa
 acattccattccgcgcttgcgtggttcatcctgaccgcttccgcagccagatgcgctggc
 ←wadB R4
 3' cttctccgagccgatagt 5'
 tgaagaggctcggctatcaaggtctctcgctgcgcgatgccatgccctatatcaagggtg
 aaaagaccggaaaagtggccgtcatcacctttgatgatggttatctcaatgtgctggaga
 atgccggacctgttcttgccgaatacggtttttacggccaccaattatttgtcgccaacc

Figura S6. BOV_0337 (*wadB*) y sus regiones anterior y posterior. La secuencia de DNA está registrada en el NCBI con el número de acceso 148558876 (Gene ID: 5201548). Los codones de inicio y parada están resaltados en azul y verde, respectivamente. Los cebadores usados para la mutagénesis están resaltados en rojo y en negrita. Los caracteres tachados representan aminoácidos y nucleótidos eliminados en el mutante *BoΔwadB*.

5' wadC F1 →

atggaaaagtccctatgaccctcgcggttttgaaaagctcaaggaagagctgcg **ctgg**

3'

cgtcagcaatcagagcgccctcggatcattgaggcaatcgccgaagcgcgcgccatggt
gatctgtcggaaaacgccgaatatcacgccccaaggaagcccagagcctcaatgaaggg
cgcatcaacgaattggaagacctggttgacgcgcgaggtgatcgatggttccaagttg
acgggacagagatccaattcgggtgcgaccgttacgatgatcgatgaagacaccgaaga
gaaaaaatctaccagatcgtcggcgatcaggaagcgcgatgtgaaggaaggcgtatttcg
atctctctccgatcgcgcgcgccttatcggcaagggcgaaggcgacacaattgaggtc

FIN BOV_1454

aacgcaccgggcggtcgcgttctctacgaaatcatcgctttgaaattcgtctga **ttttcc**

← wadC R2

INICIO BOV_1453 3' **ccttcaactccagcaacgtg** 5'

1 gtgactttatcagggcaagttccggttcgggaagttgaggtcgttgcaceaaetteaag
V T L S G Q V P V R E V E V V A P N F K

61 egecegtttccggcggtgacctegacgattgttcageteattccattgacgagcgeaatg
R R L S G V T S T I V Q L I P L Q R A M

121 gggctgaaaattgccaactatggggcgggctgectgacaactctcccgcatcttggatgg
C L K I A T M C P C L P D T L P H L C W

181 agecgtttgcectccttctggtegcgacetaaaaccagacggtttctgcatctggcatgag
S A L P S F W S R P K T R R F R I W H A

241 egececaaeattgaaatgcttgcgggaatttctaatgaggatgctctgagatgaaactg
R R N I E M L A C I F M R D V L R M K L

301 eggetegtttttaaccteggegececcagegeceatecaaaaecttttaccaaaatggeteate
R L V F T S A A Q R H H K P F T K W L I

361 egecegatgaatgagggtgategcgacaagtgtgcttggggaagttttctegaagteceg
R R M N A V I A T S V R S G S F L E V P

421 eatcaggteateatgcatggtgtgcatctggaacgggttttcaeccectcttggaggagae
H Q V I M H C V D L E R F H P P L A E D

481 gatgatttttccgcttccggcctgcccgggtaaatatgcegtgggggtgttttggacgggtt
D D F S A S G L P G K Y A V G C F G R V

541 eggecttcaaaaggaacggacetttttctgattgatgagatgateggegeteectgcegaatat
R P S K C T D L F V D A M I A L L P K Y

601 eetgactggaecggcattgtcaecggggegecaaaccegecaatatacaggectttgaagee
P D W T G A I V T C R T T A E Y Q A F E A

661 gagetgegeaccaggattgaggeagecgggtttgacggacagctattcttattctgggagaa
E L R T R I A A A G L Q D R I L I L G E

721 gtgceggacgtgcegtctggtategceggctcaecgttttaegtegececttccgeaat
V P D V R V W Y R R L T L Y V A P S R N

781 gaaggttttggcctgacgecgttgaagccatggcctcgaaaaacagccgtctgttgcagt
E G F G L T P L E A M A S K T A V V A S

841 gatgcegggtcttatgaggaaatggctggttggagatacgggcegttttgtgceagecgggt
D A G A Y A E M V V E D T G R F V P A G

wadCF3 →

5' **ggaagttgaggtcgttgac** 3'

901 gaecgggegecattgacga **acgcatcgaaccttatctg**gccgatccggccatgacaaaa
D C R A L T N A I E P Y L A D P A M T K

961 cgctgcggcgaaaatgctctggcgcgatggttcgcgaagcctttccgctccaaaaggaagcg
R C G E N A L A H V R E A F P L Q K E A

FIN BOV_1453 FIN BOV_1452

1021 gctgctatcagcagcgtttatgagcaggttttcgcaggaagata **taacccgggtca**gaggat
A A I S S V Y E Q V F A G R *

catcaacggttcgtccttgacgggacgaatggtgagggctgtgctgacccaatccacggtt
tgagcggcggtcagttctcgcgatcacgaaagtctggaacgtgttgagatcgcgcgcaac
gcaatggagcaggaagtcggattcaccgaaacctatcgcggcgcaacgagcggcca
ttgcttggctcttttcggcgaaagccttgagatccgcacatcggcctgacgggtgacgcccaac

← wadC R4

3' **ccttagcgtgctatcgg** 5'

cgagcagaatgccacaaggtcctgccccagcgtattgcccgttgagaatcgcacgatagcc
cgggatgacgcgctttctccagcttgcgcacacggcgcagggaggagccgatat

Figura S7. BOV_1453 (wadC) y sus regiones anterior y posterior. La secuencia de DNA está registrada en el NCBI con el número de acceso 148560735 (Gene ID: 5203447). Los codones de inicio y parada están resaltados en azul y verde, respectivamente. Los

cebadores usados para la mutagénesis están resaltados en rojo y en negrita. Los caracteres tachados representan aminoácidos y nucleótidos eliminados en el mutante *BoΔwadC*.

Tabla S1. Cebadores empleados en este trabajo (1/3)

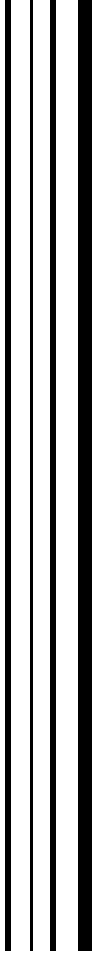
Nombre del gen	Nombre del cebador	Secuencia 5'-->3'	Diseñado en	Uso en esta Tesis	Referencia	
<i>wadA</i>	BMEI1326 F1*	CCCACGCTGCTTAGTACGTT	<i>B. melitensis</i> 16M	Mutagénesis	(Gonzalez et al. 2008)	
	BMEI1326 R2	CATCAAAAACGTGCATCGTCAA	<i>B. melitensis</i> 16M	Mutagénesis	(Gonzalez et al. 2008)	
	BMEI1326 F3	ATTGACGATGCACGTTTTGATGCATTCGGCTTGGCCCTTTAT	<i>B. melitensis</i> 16M	Mutagénesis	(Gonzalez et al. 2008)	
	BMEI1326 R4*	GAGTTTATCGCCCAATTGTC	<i>B. melitensis</i> 16M	Mutagénesis	(Gonzalez et al. 2008)	
	BOV_0614 R8	CGAAATCAGGCAGGCTTTTA	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
	BOV_0614 F9	CTACGGCCTCATTTCTGGAAG	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
	BOV_0614 R10	TGTAGGCGTCCGTCTCTACC	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
	BOV_0614 F11	CATCAGCTTGCTGGTTTTCA	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
	BOV_0614 R12	TATCTGTCAGCGCAACAAGG	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
	BOV_0614 F13	AATTGCATTTCCGACTTTCG	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
	BOV_0614 R14	GCGCTGATTGAGGAAAAGAC	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
	<i>wadB</i>	BAB_0351 F1*	GCATGATTACCCCGCTGAT	<i>B. abortus</i> 2308	Mutagénesis	(Gil-Ramirez, Y. 2011)
		BAB_0351 R2	CGCAATCTCGTCTTTGTTGAG	<i>B. abortus</i> 2308	Mutagénesis	(Gil-Ramirez, Y. 2011)
		BAB_0351 F3	CTCAACAAAGACGAGATTGCGGGTGGCGTGAAGGAAATCT	<i>B. abortus</i> 2308	Mutagénesis	(Gil-Ramirez, Y. 2011)
BAB_0351 R4*		TGATAGCCGAGCCTCTTCAG	<i>B. abortus</i> 2308	Mutagénesis	(Gil-Ramirez, Y. 2011)	
WadB F10		CCATGATTACCCCGCTGAT	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
WadB R11		CTTCGTCCCGGAAAAACCT	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
WadB F12		GGAAACTTCATGGGTGCAT	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	

Tabla S1. Cebadores empleados en este trabajo (2/3)

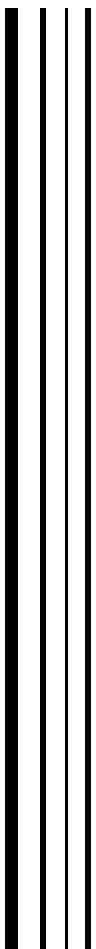
Nombre del gen	Nombre del cebador	Secuencia 5'-->3'	Diseñado en	Uso en esta Tesis	Referencia
<i>wadC</i>	WadC F1*	CTGGCGTCAGCAATCAGAG	<i>B. abortus</i> 2308	Mutagénesis	(Conde-Alvarez, R 2012)
	WadC R2	GTGCAACGACCTCAACTTCC	<i>B. abortus</i> 2308	Mutagénesis	(Conde-Alvarez, R 2012)
	WadC F3	GGAAAGTTGAGGTCGTTGCACACGCCATCGAACCTTATCTG	<i>B. abortus</i> 2308	Mutagénesis	(Conde-Alvarez, R 2012)
	WadC R4*	CGGCTATCGTGGATTCT	<i>B. abortus</i> 2308	Mutagénesis	(Conde-Alvarez, R 2012)
	WadC F10	CGACACAATTGAGGTCAACG	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo
	WadC R11	ATCGCATCAACGAAAAGGTC	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo
	WadC F12	AACGGACCTTTTCGTTGATG	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo
	WadC R13	CACGTTCCAGACTTTCGTGA	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo
BOV_0400	BOV_0400 F1*	TGAATGCAGGCAGCTCTTC	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo
	BOV_0400 R4	CCTATGCCGAAAACCCCTAT	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo
	BOV_0400 F5	CTCTGCCTGATGGATGACTG	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo
	BOV_0400 R6	ATTTCCAAGCCTGCCTTCTT	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo
	BOV_0400 F7	ATTGGGTGCTTTTCCTGAAG	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo
	BOV_0400 R8*	GCGGCAATACCGACTATACG	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo
BOV_1547	BAB_1620 F1*	GTACGGGTGCTAGCTCAGT	<i>B. abortus</i> 2308	Secuenciación	(Gil-Ramirez, Y. 2011)
	BAB_1620 R4*	CTCTGCAATTCTTGGGATCA	<i>B. abortus</i> 2308	Secuenciación	(Gil-Ramirez, Y. 2011)
	BOV_1547 F5	CGCGCACACTTTATACTGCT	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo
	BOV_1547 R6	GCTGAGGCTTTTCCATCAA	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo
	BOV_1547 F7	GATACCCAAGCAAGCGGATA	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo
	BOV_1547 R8	CAGGGGGGAAAACCTAATC	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo

Tabla S1. Cebadores empleados en este trabajo (3/3)

Nombre del gen	Nombre del cebador	Secuencia 5'-->3'	Diseñado en	Uso en esta Tesis	Referencia	
BOV_A0124	BAB2_0133 F1*	GCGTTGGACAAGTTGAGGTT	<i>B. abortus</i> 2308	Secuenciación	Este trabajo	
	BAB2_0133 R4*	TATCGCCGGAAAAACAATGAC	<i>B. abortus</i> 2308	Secuenciación	Este trabajo	
	BOV_A0124 F5	TCTTCGTGCTGCGATGTTAC	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
	BOV_A0124 R6	TCACGATTGATGACCCAGAA	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
	BOV_A0124 F7	TCTGGCAAGAGGAAGATGCT	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
	BOV_A0124 R8	GCGATGTCTTCAGGGTTCAT	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
	<i>manB_{core}</i>	BABII0899 F1*	AATCGTCGTAGGCGCTATTC	<i>B. melitensis</i> 16M	Secuenciación	Este trabajo
		BOV_A0316 F5	TTGGTGACCGTTTCTTTTTG	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo
BOV_A0316 R6		GATGGCCCGGAATAATTTCTA	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
BOV_A0316 F7		AAGCGTAAATTTCCAGGCAGA	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
BOV_A0316 R8		TGTCGTGAGCAGGTACATCAG	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
BOV_A0316 F11		GTCGAGAGGAATGGACGAAG	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
BOV_A0316 R12*		AAGAAAAATCGCGGTTTCGTAA	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
<i>manB_{Co-Ag}</i>		BOV_0540 F1*	AACAAGATGGCCTCCAGAAA	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Mutagénesis	Este trabajo
	BOV_0540 R2	GTCGGCTCCAACGTAAACTG	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Mutagénesis	Este trabajo	
	BOV_0540 F3	CAGTTTACGTTGGAGCCGACAATGGGATACGGTTCATTT	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Mutagénesis	Este trabajo	
	BOV_0540 R4*	TCCGACAATCGTTTCAAAGTC	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Mutagénesis	Este trabajo	
	BOV_0540 R6	CGATTTTTCATTCAGCCAGT	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
	BOV_0540 F7	CTTGGCTGATGTTGCAGAAG	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
	BOV_0540 R8	CAATCGCATACCCTGGTCTT	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	
	BOV_0540 R9	TGGCGTTGAAGACTGGTTTA	<i>B. ovis</i> ATCC 25840	Secuenciación	Este trabajo	



Anexo II



De: Veterinary Research <veterinary.research@jouy.inra.fr>

Fecha: 12 de mayo de 2014 14:22:47 GMT+2

Para: ilgoni@unav.es

Asunto: Your manuscript acceptable for publication MS: 4884962711194249

MS: 4884962711194249

Research

Mutants in the lipopolysaccharide of *Brucella ovis* are attenuated and protect against *B. ovis* infection in mice

Pedro Soler-LLoréns, Yolanda Gil-Ramírez, Ana Zabalza-Baranguá, Maite Iriarte, Amaia Zuñiga-Ripa, Beatriz San Román, Michel S Zygmunt, Nieves Vizcaíno, Axel Cloeckaert, María-Jesús Grilló, Ignacio Moriyón and Ignacio López-Goñi

Dear Prof López-Goñi,

I am pleased to inform you that your revised manuscript is now acceptable for publication in *Veterinary Research*. It is now sent to our editorial assistant Elodie Coulamy for final acceptance.

We hope that we will have the pleasure of working with you again in the future.

Thank you very much for submitting your manuscript to *Veterinary Research*.

Sincerely Yours,
Freddy Haesebrouck

Mutants in the lipopolysaccharide of *Brucella ovis* are attenuated and protect against *B. ovis* infection in mice

Pedro Soler-Lloréns¹

Email: psllorens@alumni.unav.es

Yolanda Gil-Ramírez¹

Email: ygilrami@alumni.unav.es

Ana Zabalza-Baranguá²

Email: ana.zabalzab@unavarra.es

Maite Iriarte¹

Email: miriart@unav.es

Amaia Zúñiga-Ripa¹

Email: azuniga@unav.es

Beatriz San Román²

Email: beatriz.sanroman@unavarra.es

Michel S Zygmunt^{3,4}

Email: michel.zygmunt@tours.inra.fr

Nieves Vizcaíno⁵

Email: vizcaino@usal.es

Axel Cloeckaert^{3,4}

Email: Axel.cloeckaert@tours.inra.fr

María-Jesús Grillo²

Email: mariajesus.grillo@unavarra.es

Ignacio Moriyón¹

Email: imoriyon@unav.es

Ignacio López-Goñi^{1*}

* Corresponding author

Email: ilgoni@unav.es

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología and Instituto de Salud Tropical, Universidad de Navarra, 31008 Pamplona, Spain

² Instituto de Agrobiotecnología (CSIC-Universidad Pública de Navarra-Gobierno de Navarra), 31006 Pamplona, Spain

³ INRA, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37380 Nouzilly, France

⁴ Université François Rabelais de Tours, UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, F-37000 Tours, France

⁵ Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, and Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain

Abstract

Brucella spp. are Gram-negative bacteria that behave as facultative intracellular parasites of a variety of mammals. This genus includes smooth (S) and rough (R) species that carry S and R lipopolysaccharides (LPS), respectively. S-LPS is a virulence factor, and mutants affected in the S-LPS O-polysaccharide (R mutants), core oligosaccharide or both show attenuation. However, *B. ovis* is naturally R and is virulent in sheep. We studied the role of *B. ovis* LPS in virulence by mutating the orthologues of *wadA*, *wadB* and *wadC*, three genes known to encode LPS core glycosyltransferases in S brucellae. When mapped with antibodies to outer membrane proteins (Omps) and R-LPS, *wadB* and *wadC* mutants displayed defects in LPS structure and outer membrane topology but inactivation of *wadA* had little or no effect. Consistent with these observations, the *wadB* and *wadC* but not the *wadA* mutants were attenuated in mice. When tested as vaccines, the *wadB* and *wadC* mutants protected mice against *B. ovis* challenge. The results demonstrate that the LPS core is a structure essential for survival in vivo not only of S brucellae but also of a naturally R *Brucella* pathogenic species, and confirm our previous hypothesis that the *Brucella* LPS core is a target for vaccine development. Since vaccine *B. melitensis* Rev 1 is S and thus interferes in serological testing for S brucellae, *wadB* mutant represents a candidate vaccine to be evaluated against *B. ovis* infection of sheep suitable for areas free of *B. melitensis*.

Introduction

Brucellosis is a worldwide extended infectious disease caused by the Gram-negative bacteria of the genus *Brucella*. This genus includes several species among which *B. abortus* preferentially infects cattle, *B. suis* swine and wild-life and *B. melitensis* goats and sheep. These three species are zoonotic and cause a grave and debilitating disease in humans. Sheep can also be infected by *B. ovis*, a non-zoonotic species. *B. ovis* brucellosis is characterized by a decreased fertility in rams, occasional abortions and a rise in perinatal mortality [1,2]. These four *Brucella* species differ not only in host range and pathogenicity but also in surface characteristics. Whereas *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis* carry a smooth (S) type lipopolysaccharide (LPS) in the outer membrane, *B. ovis* LPS lacks the O-polysaccharide typical of S-LPS and thus resembles in this feature the rough (R) LPS mutants of S brucellae [3].

S-LPS is a major virulence factor of S *Brucella* species [4]. In this molecule, the O-polysaccharide is linked to a core oligosaccharide, which in turn is linked to the lipid A. It has been known for decades that the O-polysaccharide is essential in the virulence of *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*, and that the lipid A is poorly recognized by innate immunity [4]. In addition, the core oligosaccharide section has been shown recently to hamper recognition

by innate immunity systems, including complement, bactericidal peptides and the TLR4-MD2 complex [5]. It has been postulated that the *Brucella* S-LPS core carries a lateral branch that hinders access of innate immunity effector proteins and receptors to the inner sections of the core and lipid A [5-7], and the existence of a branched structure has been confirmed by structural analysis (Figure 1) [8]. These findings have opened the way for an analysis of the role of the LPS of R *Brucella* species in virulence. Moreover, as delayed recognition by innate immunity plays a major role in *Brucella* virulence, core mutants represent candidates for the development of vaccines triggering an early and thus protective immunoresponse [6].

Sheep brucellosis caused by either *B. melitensis* or *B. ovis* can be controlled by vaccination with the attenuated strain *B. melitensis* Rev 1 and, in fact, this is the only effective way to control sheep brucellosis in areas with a high or moderate prevalence of the disease [9]. However, Rev 1 has several drawbacks: it causes an antibody response interfering with the serological diagnosis of *B. melitensis*, is virulent in humans and resistant to streptomycin, an antibiotic of choice for brucellosis treatment [9]. Therefore, Rev 1 is forbidden in countries where *B. melitensis* has been eradicated [9], which leads to the increase of *B. ovis* infections in sheep. Thus, research on *B. ovis*-specific vaccines is an area of intense research [10-12]. Acellular vaccines can be an alternative, and attempts have been carried out with whole cell and subcellular extracts [13], recombinant proteins [14] or DNA vaccines [15]. However, these strategies usually require boosters and adjuvants or immune modulators to reach an adequate Th1 response [10,16], with the ensuing increase in costs and difficulties of implementation in extensively bred sheep.

The purpose of the research reported here was twofold: to study the involvement of LPS in *B. ovis* virulence and to develop *B. ovis*-specific vaccine candidates that could overcome the above-summarized drawbacks. To this end, we have built on previous genetic analyses that have shown that at least three glycosyltransferases (*wadA*, *wadB* and *wadC*) are necessary for the complete assembly of the core oligosaccharide of *B. abortus* and *B. melitensis* [5,7,17,18].

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

The bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. The parental strain *B. ovis* PA is a virulent strain isolated from a naturally infected ram that has been extensively used as a challenge for the evaluation of *B. ovis* vaccines in rams and mice. *B. ovis* strains were cultured on tryptic soy agar (TSA, Pronadisa, Madrid, Spain) or in tryptic soy broth (TSB, Biomerieux, Madrid, Spain) supplemented with 0.5% yeast extract (YE, Merck, Madrid, Spain) or on Blood Agar Base No. 2 (BAB; Pronadisa), all supplemented with 5% porcine or calf serum (TSA-YE-S, TSB-YE-S or BAB-S, respectively). Incubations were performed at 37 °C in a 10% CO₂ atmosphere, and liquid cultures were shaken at low intensity. *E. coli* was grown in Luria-Bertani broth (LB: Becton Dickinson, Madrid, Spain). Nalidixic acid (Nal; 25 µg/mL), Kanamycin (Km; 50 µg/mL), Gentamicin (Gm; 15 µg/mL) or sucrose (5% w/v) (all from Sigma-Aldrich Ltd., Haverhill, United Kingdom) were used when required.

DNA manipulations and sequence analyses

Plasmid and genomic DNA were isolated with Qiaprep Miniprep (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and Ultraclean Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA), respectively. When needed, DNA was also purified from agarose gels using a Qiack Gel extraction kit (Qiagen). DNA sequencing was performed by the dideoxy method at the Sequencing Unit of Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA, Universidad de Navarra, Spain), and primers were synthesized by Sigma-Aldrich Ltd. Searches for DNA and protein homologies were carried out using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes [19], EMBL-European Bioinformatics Institute server [20] and National Center for Biotechnology Information (NCBI) database [21].

Construction of LPS mutants

In-frame deletion mutants on selected genes were constructed by PCR overlap using genomic DNA of *B. ovis* PA as DNA template. Primers were designed based on the sequence of *B. ovis* ATCC 25840 (also known as 63/290 or NCTC10512; accession numbers NC_009505.1 and NC_009504.1). They are listed in Table 2. For inactivation of *wadC* (BOV_1453), we first generated two PCR fragments: the 5' end of the gene BOV_1453 was amplified with primers *wadC*-F1 and *wadC*-R2 obtaining a 473-bp fragment including codons 1 to 16 of the *wadC* ORF, as well as 424-bp upstream of the *wadC* start codon; whereas the 3' end was amplified with primers *wadC*-F3 and *wadC*-R4 obtaining a 481-bp fragment including codons 307 to 355 of the *wadC* ORF and 315-bp downstream of the *wadC* stop codon. Both fragments were ligated by overlapping PCR using primers *wadC*-F1 and *wadC*-R4. The resulting fragments containing the *wadC* deletion allele, was cloned into pCR2.1 vector to generate plasmids pYRI-14 (Table 1), sequenced to ensure the maintenance of the reading frame, and subsequently subcloned into the *Bam*HI and the *Xba*I sites of the suicide plasmid pJQK. The resulting mutator plasmid (pYRI-15, Table 1) was introduced in *B. ovis* PA by conjugation using *E. coli* S17- λ pir. The first recombination event (integration of the suicide vector in the chromosome) was selected by Nal and Km resistance, and the second (excision of the mutator plasmid leading to the deletion mutant strain by allelic exchange) by Nal and sucrose resistance and Km sensitivity. The resulting colonies were screened by PCR with primers *wadC*-F1 and *wadC*-R4, which amplify a fragment of 934-bp in the mutant strain and a fragment of 1804-bp in the parental strain. An additional PCR was carried out to exclude the presence of the complete gene. The amplification was done with primers *wadC*-F1 and *wadC*-R5, which include a fragment from the deleted region of the gene. While strains carrying the complete gene amplified a 533-bp fragment, the mutant strain was unable to amplify the fragment (see Additional file 1). The deletion was confirmed by sequencing. As a result of the mutation 82% of the *wadC* ORF was lost, and the mutant strain was called Bo Δ *wadC* (Table 1).

The Δ *wadA* mutant (BOV_0614) was obtained in a similar way. Briefly, primers *wadA*-F1 and *wadA*-R2 were used to amplify a 453-bp fragment including codon 1 to 57 of the 5' end of *wadA* (BOV_0614), as well as 284-bp upstream of the *wadA* start codon; and primers *wadA*-F3 and *wadA*-R4 were used to amplify a 460-bp fragment including codons 680 to 704 of the *wadA* ORF and 386-bp downstream of the *wadA* stop codon. Both fragments were ligated by overlapping PCR using primers *wadA*-F1 and *wadA*-R4, the resulting fragment was cloned into pCR2.1, sequenced and subcloned into pJQK. The resulting mutator plasmid (pYRI-13, Table 1) was introduced in *B. ovis* PA by electroporation with a micropulser (Bio-Rad,

Hercules, CA, USA) as described before [22]. The first recombination event was selected by Km resistance, and the second by sucrose resistance and Km sensitivity. The resulting colonies were screened by PCR with primers *wadA*-F1 and *wadA*-R4, which amplify a fragment of 913-bp in the mutant strain and a fragment of 2782-bp in the parental strain. An additional PCR was carried out to exclude the presence of the complete gene. The amplification was done with primers *wadA*-F1 and *wadA*-R5, which include a fragment from the deleted region of the gene. While strains carrying the complete gene amplified a 565-bp fragment, no amplification was obtained with the mutant strain (see Additional file 1). The deletion was confirmed by sequencing. As a result of the mutation 82% of the *wadA* ORF was lost and the mutant strain was called Bo Δ *wadA* (Table 1).

Taking into account that *wadB* sequence of *B. abortus* 2308 and *B. ovis* PA are almost identical (99.86% homology with only one base pair change in the deleted section of the gene), we used the mutator plasmid pYRI-2 (Table 1) that was previously constructed to generate Δ *wadB* (BAB1_0351) mutants in *B. abortus* 2308 for the construction of the *B. ovis* Δ *wadB* mutant [7]. The mutator plasmid pYRI-2 was introduced in *B. ovis* PA by conjugation. The resulting colonies were screened by PCR with primers *wadB*-F1 and *wadB*-R4, which amplify a fragment of 570-bp in the mutant strain and a fragment of 1011-bp in the parental strain. An additional PCR was carried out to exclude the presence of the complete gene. The amplification was done with primers *wadB*-F1 and *wadB*-R5, which include a fragment from the deleted region of the gene. While strains carrying the complete gene amplified a 471-bp fragment, the mutant strain was unable to amplify the fragment (Additional file 1). The deletion was confirmed by sequencing. As a result of the mutation 60% of the *wadB* ORF was lost, and the mutant strain was called Bo Δ *wadB* (Table 1).

In all mutagenesis experiments, after the second recombination, two type of colonies Nal and sucrose resistant and Km sensitive could be isolated: the deletion mutant strain and the strain that had reverted to the wild-type genotype (hereafter “sibling revertant strain”). The latter was also selected as control for additional mutations elsewhere in the chromosome that may have been acquired during the manipulations described above, and the genotypes of all the strains were confirmed by PCR amplification and sequencing of the target locus in the genome. Moreover, both mutant and sibling revertant strains were characterized following standard *Brucella* typing procedures [23], and purity checked by inhibition of growth on BAB-S supplemented with Km.

LPS extraction and characterization

Extraction of whole-cell LPS by SDS-proteinase K protocol was performed as described by Dubray and Limet [24] with modifications. Briefly, heat inactivated cells were suspended in 0.0625 M Tris-HCl buffer (pH 6.8) containing 2% SDS (wt/wt). Samples were heated at 100 °C for 10 min, and the lysates were tempered to 55 °C and digested twice with proteinase K (10 mg/mL, one hour at 55 °C). After that, samples were kept overnight at 20 °C and then stored at -20 °C. LPS were analysed in Tris-Tricine-HCl-glycine polyacrilamide gel electrophoresis (Tricine SDS-PAGE) as described by Lesse [25]. Briefly, a 16 × 20 cm two-phase gel (18% acrylamide-bisacrylamide for the running gel and 4% for the stacking gel) was prepared in 1M Tris 0.1% SDS, pH 8.45. The gel was placed between anode and cathode buffers (0.2M Tris-HCl pH 8.9 and 0.2M Tris-HCl, 0.1M Tricine, 0.1% SDS pH 8.45,

respectively) and the electrophoresis was carried out at constant voltage for one h at 30V following by 20 h at 70V. LPS was stained by the periodate-alkaline silver method [26]. For Western blots, LPS was electrotransferred onto nitrocellulose membranes, blocked with 1% skimmed milk in PBS for 45 min and incubated with specific monoclonal antibodies (MAbs, see below) overnight. After washing, bound immunoglobulins were detected by chemiluminescence (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) with goat anti mouse IgG (H+L) chain specific *B. ovis* conjugate secondary antibodies (Merk4Biosciencies, Damstadt, Germany).

Surface topology mapping

Outer membrane proteins (Omp) and LPS exposure on the cell surface was assessed by ELISA with the following MAbs: A76/08C03/G03 for Omp16, A76/05C10/A08 for Omp19, A68/25G05/A05, A68/15B06/C08 and A63/04D11/G01 for Omp2b, A59/05F01/C09 for Omp25, A59/10F09/G10 for Omp31, and A68/24G12/A08, A68/24D08/G09 and A68/10A06/B11 for R-LPS [27-30]. ELISAs using whole bacteria as the antigen were performed as described previously [30,31] with some modifications. Briefly, lyophilized bacteria were resuspended up to OD₆₀₀ 1 in phosphate-buffered saline pH 7.4 (PBS). For coating, this suspension was distributed (100 µL/well) in 96 flat bottom plates (Thermo Scientific) and incubated overnight at room temperature. 100 µL of MAbs (hybridoma supernatant diluted 1:3 in 0.05% Tween PBS) were incubated 37 °C for 1 h. Bound MAbs were then detected with an affinity-purified goat anti-mouse immunoglobulin G (H+L chains) – horseradish peroxidase conjugate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (diluted 1:6000 in 0.05% Tween PBS) incubated for 1 h at room temperature. Between all the previous steps five washes with 250 µL 0.05% Tween PBS were performed in order to eliminate the excess of MAbs and conjugate. Enzyme activity was revealed by the addition of TMB ELISA peroxidase substrate (Interchim, Montlucon, France) and stopped after 20 min at room temperature with 1M HCl based stop solution (Interchim). Plates were read at 450 nm with a microplate reader (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Physico-chemical surface properties

Autoagglutination capacity was evaluated by measuring the OD₆₀₀ evolution of a bacterial suspension in TSB-YE-S, over 48 h of static incubation at room temperature, starting from initial readings of 0.8 (100% OD₆₀₀) in TSB-YE-S [22]. The results were represented as the mean ± SD of the values obtained for three assays at each time point, in three independent assays. The surface charge density was measured as the electrophoretically effective potential (Zeta potential) [18]. For this, bacteria were inactivated with 0.5% phenol, washed and resuspended in 0.1 M KCl, 10 mM HEPES 10 mM (pH 7.2) at an OD₆₀₀ of 0.1. Measurements were performed at 25 °C in a Zetamaster instrument using the PCS 1.27 software (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) and the settings of aqueous solutions (viscosity = 1.002 cP; dielectric constant = 80.4), in plain buffer.

Susceptibility to nonimmune serum and polymyxin B

Sensitivity to the bactericidal action of nonimmune serum was determined as follows: exponentially growing bacteria were adjusted to 2×10^4 CFU/mL in PBS and dispensed in

microtiter plates (50 μ L/well) containing fresh normal calf serum or serum previously heated at 56 °C for 60 min to remove complement (150 μ L/well). After incubation for 3 h at 37 °C, 50 μ L of each sample was plated TSA-YE-S by triplicate, and results were expressed as the proportion between the organism cultivable after exposure to normal nonimmune serum and those cultivable after the exposure to serum in which complement had been heat inactivated. Sensitivity to polymyxin B (Sigma-Aldrich Ltd.) was determined as described before [22].

Virulence and vaccine efficacy studies in mice

Female BALB/c mice 8-10 week-old (Charles River International, France) were used. They were randomly distributed and accommodated in the animal facilities of Universidad Pública de Navarra (registration code ES/31-2016-000002 CR-SU-US) for 1-2 weeks before starting and during the assays, with water and food *ad libitum*. The procedures performed with mice were designed according to national (RD 53/2013) and European (EU directive 2010/63) legislations regarding the use of animals in research. Mice inoculations were carried out with 0.1 mL of bacterial suspensions previously adjusted to an OD₆₀₀ of 0.170 (around 1×10^9 CFU/mL) and then diluted to the appropriate dose (see below) in sterile PBS [32]. Exact inoculation doses were determined retrospectively by plating tenfold dilutions prepared in PBS on BAB-S or TSA-YE-S.

For virulence, BALB/c mice ($n = 10$) were inoculated intraperitoneally (IP) with $5-7 \times 10^5$ CFU/mouse of the corresponding *B. ovis* PA mutant strain, and viable spleen counts were determined ($n = 5$) at 3 and 10 weeks post-inoculation as previously detailed [32]. As a control, additional groups of mice ($n = 10$) were inoculated similarly with the virulent *B. ovis* PA reference or the sibling reverting strains, to control for the potential for incidental attenuation during the manipulation required for mutagenesis. The identity of the spleen isolates was confirmed throughout the experiment by both PCR and *B. ovis* phenotypic features [23]. Spleen infections were expressed as mean \pm SD ($n = 5$) of individual log₁₀ CFU/spleen at the indicated times [32].

Efficacy of the Bo Δ wadB and Bo Δ wadC mutants as vaccines was evaluated in BALB/c mice ($n = 10$) vaccinated intraperitoneally with 1×10^8 CFU/mouse of the corresponding *B. ovis* mutant strain, or subcutaneously (SC) with 1×10^5 CFU/mouse of *B. melitensis* Rev 1 (as standard vaccinated control), or with 0.1 mL of PBS (pH 6.8) as unvaccinated control. Four weeks after vaccination, all mice were challenged intraperitoneally with 5×10^5 CFU/mouse of the virulent *B. ovis* PA-Gm^R (Table 1), and the number of challenge bacteria in spleens was determined 3 weeks afterwards [33]. Differentiation between challenge and residual vaccine bacteria was performed by duplicate plating on BAB-S and BAB-S supplemented with Gm. Results were expressed as the mean and SD ($n = 10$) of the individual log₁₀ CFU/spleen of *B. ovis* PA-Gm^R challenge strain. Statistical comparisons of mean log₁₀ CFU/spleen were performed by a one-way ANOVA followed by the Fisher's Protected Least Significant Differences tests [32]. The virulence of the *B. ovis* PA-Gm^R challenge strain used in this work was proved in a previous experiment in BALB/c mice ($n = 5$) by intraperitoneal infection (5×10^5 CFU/mouse) and bacterial spleen counting at 3 weeks later. This strain showed identical bacterial counts in BAB-S and BAB-S supplemented with Gm, and identical multiplication to that of *B. ovis* PA in mice (not shown).

Results

Construction of *B. ovis* LPS mutants

Several ORFs encoding putative glycosyltransferases have been shown to be involved in the biosynthesis of the core of *B. abortus* LPS: *wadA* (formerly named *wa***, BAB1_0639, [17,18]), *wadB* (BAB1_0351, [6,7]) and *wadC* (BAB1_1522, [5,6]). We searched for orthologues of these glycosyltransferases in the *B. ovis* strain ATCC25840 genome sequence and we identified three ORFs: BOV_0614 for *wadA*, BOV_0337 for *wadB* and BOV_1453 for *wadC*, with 99.4%, 99.9% and 100% DNA sequence identity, respectively. Non-polar mutant and sibling revertant strains were obtained for each target gene from *B. ovis* PA strain as described in the Materials and methods section. PCR amplification and sequencing of the target loci in the genome of the mutants confirmed inactivation of the respective genes (data not shown). All mutants behaved like the parental strain in classical bacteriological typing for the genus *Brucella* [23] and showed no differences in growth patterns when compared to the parental strain *B. ovis* PA (data not shown).

B. ovis wadB and *wadC* are required for the synthesis of a complete LPS

For the analysis of possible LPS defects, we extracted *B. ovis* LPSs using a SDS-proteinase K protocol [24]. Tricine SDS-PAGE resolved the LPS of the parental strain *B. ovis* PA into at least three major components I, II and III (Figure 2A), and the same migration pattern was obtained with the Bo Δ *wadA* mutant and the sibling revertant strain (not shown). However, component I was absent from LPS of mutants Bo Δ *wadB* and Bo Δ *wadC*, which also showed increased relative proportions of component II, suggesting a deficiency in the LPS oligosaccharide structure. The corresponding blots were probed with anti-R-LPS MAbs A68/10A06/B11, A68/24G12/A08, and A68/24D08/G09 (Figure 2B). The lack of reactivity of these MAbs with the LPS of mutants Bo Δ *wadB* and Bo Δ *wadC* confirmed the absence of part of the oligosaccharide. In contrast, no defect could be detected in the LPS of mutant Bo Δ *wadA* by this method.

LPS gene mutants of *B. ovis* have altered key topological, physicochemical and biological surface properties

Several differences were found between two *B. ovis* LPS gene deletion mutants and the parental strain with regard to their reactivity with MAbs specific for R-LPS and Omps. When probed with anti-R-LPS antibodies, differences in reactivity suggestive of changes in epitopic structure and/or exposure were found: mutants Bo Δ *wadB* and Bo Δ *wadC* showed decreased reactivity while mutant Bo Δ *wadA* had levels of reactivity similar to those of the parental strain (Figure 3A). In addition, the binding of anti-Omp MAbs to both Bo Δ *wadB* and Bo Δ *wadC* mutants revealed significant differences compared to the parental strain: while Bo Δ *wadB* reacted more strongly with MAbs against the major Omps Omp25, Omp31 and also the lipoproteins Omp16 and Omp19, Bo Δ *wadC* had decreased reactivity with all the anti-Omp MAbs (Figure 3B). Similarly, the anti-Omp2b MAbs A68/25G05/A05 and A68/15B06/C08 bound more strongly to Bo Δ *wadB* than parental *B. ovis* PA, and very low levels of reactivity with Bo Δ *wadC*; however, the anti-Omp2b MAb A63/04D11/G01 displayed increased binding to Bo Δ *wadC* and a low binding to Bo Δ *wadB*. These results suggest that the

defects in the LPS oligosaccharide of both mutants are different and affect the exposure and/or conformation of the major Omps also in a different way. The MAbs reactivity of the major Omps in the Bo Δ wadA mutant was similar to that of the parental strain in all the MAbs tested except the antibody directed against Omp31 A59/10F09/G10 which showed an increased reactivity (Figure 3B).

Autoagglutination is a property characteristic of some *Brucella* R mutants. Parental *B. ovis* PA, Bo Δ wadA and all the sibling revertant strains showed autoagglutination, with a 90% reduction of the initial OD₆₀₀ value in a few hours. On the contrary, mutants Bo Δ wadB and Bo Δ wadC remained in suspension for at least 48 h (Figure 4). This effect correlated with an increase in negative surface charge (Zeta potential, Figure 5). We also studied whether the resistance to complement-mediated killing in normal serum typical of brucellae was affected by the mutations [34]. We found that, whereas the parental strain *B. ovis* PA, Bo Δ wadA and the sibling revertant strain were resistant to non-immune serum (survival percentages of 93.0 ± 5.5 , 92.0 ± 4.8 , 101 ± 6.9 , respectively), Bo Δ wadB and Bo Δ wadC mutants were significantly ($p < 0.05$) affected (survival percentages of 74.0 ± 3.9 and 68.0 ± 3.2 , respectively). On the other hand, polymyxin B resistance, another important envelope property of brucellae, was not significantly affected (not shown).

Both Bo Δ wadB and Bo Δ wadC mutants are attenuated and protect against *B. ovis* PA infection in mice

The colonization and persistence of *B. ovis* LPS gene deletion mutants in the spleens of mice was evaluated at 3 and 10 weeks after intraperitoneal infection with of $5-7 \times 10^5$ CFU/mouse. While the infection produced by Bo Δ wadA reached the levels of infection of *B. ovis* PA, mutants Bo Δ wadB and Bo Δ wadC showed significant ($p < 0.001$) attenuation (Table 3). In fact, the splenic concentrations reached by the latter mutants at 3 weeks post-infection (i.e. the time-point at which peak splenic concentrations are reached by virulent strains) were significantly ($p < 0.005$) lower than that reached by the parental strain. Thereafter, at 10 weeks post-infection, Bo Δ wadA persisted at the levels of the parental strain while Bo Δ wadB and Bo Δ wadC mutants showed significantly ($p < 0.005$) reduced persistence, being practically cleared from the spleens in most of the inoculated mice (Table 3). Such significant attenuation was not attributable to the mutagenesis procedure, since both sibling revertant strains reached and maintained levels of splenic infections similar to those reached by the parental strain (Table 3).

The efficacy of Bo Δ wadB and Bo Δ wadC as vaccines was studied in mice challenged with *B. ovis* PA. As shown in Table 4, these two mutants conferred significant protection with respect to the unvaccinated controls. However, the protection conferred by Bo Δ wadB was the most effective one, improving significantly ($p < 0.05$) that conferred by others at standard conditions, and even preventing the virulent infection in 7 out 10 mice (Table 4).

Discussion

Several differences have been shown in the structure of the LPS among the different species of the genus *Brucella* [35-38]. Wild-type *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis* and *B. microti* produce a S-LPS where the O-polysaccharide is linked to

the core oligosaccharide. However, *B. ovis* and *B. canis* lack this O-polysaccharide thus producing a R-LPS. The genetic bases of this R phenotype have been partially described [39]. In *B. ovis*, the genome shows a 15 Kb deletion which includes genes *wboA* and *wboB* [39,40], both involved in the synthesis of the O-polysaccharide, and several point mutations generating nonfunctional proteins, *wbkF* and *wzt* among others [41], involved in bactoprenol priming (see also below) and export of the O-polysaccharide to the periplasm, respectively.

The structures of the core and repeated O-polysaccharide fragments of *B. abortus* biovar 4, *B. melitensis* biovar 3 and *B. suis* biovar 4 obtained after acid hydrolysis of S-LPS have been recently published [8]. The structure available for the core oligosaccharide (Figure 1) shows the existence of a side oligosaccharide chain composed of four residues of glucosamine, plus glucose and mannose, the latter linked to Kdo I, with Kdo II linked to another glucose from which the O-polysaccharide stems. Although the precise structure of LPS of *B. ovis* remains to be determined, a previous immunochemical assay carried out with R-LPS extracted from *B. ovis* REO198 found fragments that were estimated to contain 2, 4, 6 and 7 sugars, including glucose, mannose, glucosamine, Kdo and an unidentified sugar [42]. Up to now only three glycosyltransferases have been shown to be involved in the synthesis of the LPS core in *B. abortus* and *B. melitensis* (*wadA*, *wadB* and *wadC*), and *B. ovis* carries the corresponding orthologous ORFs. Although the homology of these glycosyltransferases suggests that the composition of *B. ovis* core LPS is similar to other *Brucella* species, antigenic and immunochemical analyses of LPS extracts have showed differences [3,43].

In *B. abortus* and *B. melitensis*, the deletion of *wadA* results in an R phenotype and an altered LPS core [17,18]. In *B. melitensis*, *wadA* mutant carries a defective LPS core but also synthesizes a free cytoplasmic O-polysaccharide, which strongly suggests that *wadA* codes for a glycosyltransferase involved in the synthesis of the core section linked to the O-polysaccharide [18]. Taking into account previous electrophoretic analysis of the R-LPS, *wadA* is likely to encode the enzyme involved in transferring the glucose linked to quinovosamine [18] (Figure 1). In the case of *B. ovis*, the reactivity with MAbs, the cell surface properties, the electrophoretic analyses of the LPS and the virulence assays all showed a similar behavior for mutant *BoΔwadA* and the parental strain. Quinovosamine, absent in *B. ovis* REO 198 LPS [43], is in all likelihood the sugar priming bactoprenol for O-polysaccharide synthesis [18], and *B. ovis* carries mutations in *wbkF*, involved in bactoprenol priming, so LPS oligosaccharide lacks a terminal glucose in the *wadA* mutants. Such a small defect would be consistent with fact that the *B. ovis* $\Delta wadA$ mutant was practically indistinguishable from the parental strain.

Although the LPS core of *B. abortus* and *B. melitensis* mutants is altered, the O-polysaccharide remains in place [5-7 and Conde R., Arce-Gorvel V., Iriarte M., Gorvel J.P. and Moriyón I., unpublished results]. This evidence shows that glycosyltransferases WadB and WadC are responsible for the synthesis of the glucosamine rich oligosaccharide stemming from Kdo II (Figure 1). Specifically, it has been proposed that WadC could be implicated in the transfer of the first mannose to the lateral chain, while WadB would transfer other sugar [6,7]. In *B. abortus*, both mutants induce a pro-inflammatory response higher than that of wild-type bacteria and are thus attenuated in dendritic cells and mice [5-7]. Moreover, they are more sensitive to the bactericidal action of the nonimmune serum and cationic peptides [5,7]. It has also been proved that the core defect enhances recognition by the TLR4-MD2

receptor/co-receptor system and, accordingly, a glucosamine-rich branch of the LPS core of the *B. abortus* and *B. melitensis* acts as a shield against recognition by several innate immune systems, thus representing a virulence mechanism of these *Brucella* spp. [5]. In *B. ovis*, the LPS of the mutants $\Delta wadB$ and $\Delta wadC$ lacks a part of the core oligosaccharide (component I in Figure 2) and the defects generate a marked increase in the negative value of zeta potential that can be explained by the loss of all or part of the positively charged glucosamine residues (Figure 1). The attenuation observed for mutants Bo $\Delta wadB$ and Bo $\Delta wadC$ show for the first time that the LPS of a naturally R *Brucella* pathogenic species (i.e. *B. ovis*) is essential for survival in the mouse model. Even though the exact mechanism remains to be elucidated, the proposed core defect is likely to facilitate the recognition of *B. ovis* LPS by innate immunity. Indeed, this hypothesis is supported by the above-summarized results obtained with the homologous *B. abortus* and *B. melitensis* mutants and with the fact that, rather than the O-polysaccharide, it is the lipid A-core overall structure that is recognized by multiple innate immunity systems [5-7,17,18]. Nevertheless, other effects cannot be disregarded because the mutants Bo $\Delta wadB$ and Bo $\Delta wadC$ were affected not only the LPS but also in the topology of the outer membrane as detected with anti-Omp MAbs. Little is known about how these changes may affect the virulence of brucellae but it has been shown that not all the *B. melitensis* R mutants are equivalent in their surface properties and outer membrane topology, and that they have different level of interaction with host cells, virulence and vaccination power [12,18].

Recently, Conde-Álvarez et al. [6] proposed a new strategy to develop vaccines against brucellosis based on the concept that the surface molecules of *Brucella* effectively evade a prompt detection by innate immunity [44], and that surface changes such as those introduced by mutations affecting the glucosamine branch of the core would overcome hampered recognition thus producing a protective Th1 response. This concept was based on a comparison of a *B. abortus* *wadC* mutant and the current vaccine *B. abortus* S19 in the mouse model [6]. Although we have not evaluated the immune response in this work, our results add further weight to the value of this strategy and show the possibility of obtaining vaccines against brucellosis caused by *B. ovis* that could be used in areas free of *B. melitensis*. However, a potential defect of these vaccines would be their interference in the diagnosis of *B. ovis*, which is carried out using tests that detect antibodies to both Omp and R-LPS [45]. These problems, however, could be circumvented by the use of antigenically-tagged brucellosis vaccines, a strategy recently shown to be effective for vaccine *B. abortus* S19 in the mouse model [46]. Research is in progress to evaluate all these possibilities in sheep.

Competing interests

MI and IM are co-owners of patent “Modified Gram-negative bacteria for use as vaccines” (N°PCT/EP2010/063921 [WO2011/033129]) that covers the use of *Brucella* LPS core genes.

Authors' contributions

PS-L carried out the experiments and participated in the design of the study and draft of the manuscript. YG-R, AZ, MI and NV collaborated with the design and construction of the mutants. MZ and AC helped with the immunochemical studies and the characterization of

the LPS. M-JG, AZ-B and BSR participated in mice in vivo studies. IL-G and IM conceived of the study, participated in its design, coordinate the work and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was funded by Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (reference project AGL2011-30453-C04) and Fundación para la Investigación Médica Aplicada (FIMA). Financial support to PS-L from Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (reference BES-2009-015656), AZ-B from Universidad Pública de Navarra, and BSR from CSIC and European Social Fund (Programa JAE-Doc) are also gratefully acknowledged.

References

1. Burgess GW: **Ovine contagious epididymitis: a review.** *Vet Microbiol* 1982, **7**:551–575.
2. Garin-Bastuji B, Blasco JM: **Ovine epididymitis.** In *Manual of diagnostic tests and vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees)*. Edited by OIE. World Organization for Animal Health; 2013.
3. Diaz R, Bosseray N: **Identificación d'un composé antigénique spécifique de la phase rugueuse (R) des *Brucella*.** *Ann Vet Res* 1973, **4**:283–292.
4. Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel J-P: ***Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor.** *Curr Opin Microbiol* 2005, **8**:60–66.
5. Conde-Álvarez R, Arce-Gorvel V, Iriarte M, Manček-Keber M, Barquero-Calvo E, Palacios-Chaves L, Chacón-Díaz C, Chaves-Olarte E, Martirosyan A, von Bargen K, Grilló M-J, Jerala R, Brandenburg K, Llobet E, Bengoechea J a, Moreno E, Moriyón I, Gorvel J-P: **The lipopolysaccharide core of *Brucella abortus* acts as a shield against innate immunity recognition.** *PLoS Pathog* 2012, **8**:e1002675.
6. Conde-Álvarez R, Arce-Gorvel V, Gil-Ramírez Y, Iriarte M, Grilló M-J, Gorvel JP, Moriyón I: **Lipopolysaccharide as a target for brucellosis vaccine design.** *Microb Pathog* 2013, **58**:29–34.
7. Gil-Ramírez Y: **Papel de una etanolamina-fosfato transferasa y una glicosil transferasa en la síntesis del lipopolisacárido de *Brucella* y utilización de una acetil transferasa para la modificación epitópica de la cadena O.** University of Navarra; 2011.
8. Kubler-Kielb J, Vinogradov E: **The study of the core part and non-repeating elements of the O-antigen of *Brucella* lipopolysaccharide.** *Carbohydr Res* 2013, **366**:33–37.
9. Blasco JM: **A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats.** *Prev Vet Med* 1997, **31**:275–283.

10. Da Martins RC, Irache JM, Gamazo C: **Acellular vaccines for ovine brucellosis: a safer alternative against a worldwide disease.** *Expert Rev Vaccines* 2012, **11**:87–95.
11. Silva AP, Macêdo AA, Costa LF, Turchetti AP, Bull V, Pessoa MS, Araújo MS, Nascimento EF, Martins-Filho OA, Paixão TA, Santos RL: ***Brucella ovis* lacking a species-specific putative ATP-binding cassette transporter is attenuated but immunogenic in rams.** *Vet Microbiol* 2013, **167**:546–553.
12. Moriyón I, Grilló MJ, Monreal D, González D, Marín C, López-Goñi I, Mainar-Jaime RC, Moreno E, Blasco JM: **Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status.** *Vet Res* 2004, **35**:1–38.
13. Blasco JM, Gamazo C, Winter AJ, Jiménez de Bagüés MP, Marín C, Barberán M, Moriyón I, Alonso-Urmeneta B, Díaz R: **Evaluation of whole cell and subcellular vaccines against *Brucella ovis* in rams.** *Vet Immunol Immunopathol* 1993, **37**:257–270.
14. Cassataro J, Pasquevich KA, Estein SM, Laplagne DA, Velikovskiy CA, de la Barrera S, Bowden R, Fossati CA, Giambartolomei GH, Goldbaum FA: **A recombinant subunit vaccine based on the insertion of 27 amino acids from Omp31 to the N-terminus of BLS induced a similar degree of protection against *B. ovis* than Rev.1 vaccination.** *Vaccine* 2007, **25**:4437–4446.
15. Cassataro J, Pasquevich KA, Estein SM, Laplagne DA, Zwerdling A, de la Barrera S, Bowden R, Fossati CA, Giambartolomei GH, Goldbaum FA: **A DNA vaccine coding for the chimera BLSOmp31 induced a better degree of protection against *B. ovis* and a similar degree of protection against *B. melitensis* than Rev.1 vaccination.** *Vaccine* 2007, **25**:5958–5967.
16. Da Costa Martins R, Irache JM, Blasco JM, Muñoz MP, Marín CM, Jesús Grilló M, Jesús De Miguel M, Barberán M, Gamazo C: **Evaluation of particulate acellular vaccines against *Brucella ovis* infection in rams.** *Vaccine* 2010, **28**:3038–3046.
17. Monreal D, Grilló MJ, González D, Marín CM, De Miguel MJ, López-Goñi I, Blasco JM, Cloeckeaert A, Moriyón I: **Characterization of *Brucella abortus* O-polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model.** *Infect Immun* 2003, **71**:3261–3271.
18. González D, Grilló M-J, De Miguel M-J, Ali T, Arce-Gorvel V, Delrue R-M, Conde-Alvarez R, Muñoz P, López-Goñi I, Iriarte M, Marín C-M, Weintraub A, Widmalm G, Zygmunt M, Letesson J-J, Gorvel J-P, Blasco J-M, Moriyón I: **Brucellosis vaccines: assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export.** *PLoS One* 2008, **3**:e2760.
19. **Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes** [<http://www.genome.jp/kegg/>]
20. **EMBL-European Bioinformatics Institute** [<http://www.ebi.ac.uk>]

21. National Center for Biotechnology Information [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]
22. Caro-Hernández P, Fernández-Lago L, de Miguel M-J, Martín-Martín AI, Cloeckaert A, Grilló M-J, Vizcaíno N: **Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis***. *Infect Immun* 2007, **75**:4050–4061.
23. Alton GG: *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Paris, France: Institut National de la Recherche Agronomique (INRA); 1987.
24. Dubray G, Limet J: **Evidence of heterogeneity of lipopolysaccharides among *Brucella* biovars in relation to A and M specificities**. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1987, **138**:27–37.
25. Lesse AJ, Campagnari AA, Bittner WE, Apicella MA: **Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis**. *J Immunol Methods* 1990, **126**:109–117.
26. Tsai CM, Frasch CE: **A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels**. *Anal Biochem* 1982, **119**:115–119.
27. Bowden RA, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Bernard S, Dubray G: **Surface exposure of outer membrane protein and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry**. *Infect Immun* 1995, **63**:3945–3952.
28. Cloeckaert A, de Wergifosse P, Dubray G, Limet JN: **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* 1990, **58**:3980–3987.
29. Bowden RA, Cloeckaert A, Zygmunt MS, Dubray G: **Outer-membrane protein- and rough lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies protect mice against *Brucella ovis***. *J Med Microbiol* 1995, **43**:344–347.
30. Cloeckaert A, Zygmunt MS, Dubray G, Limet JN: **Characterization of O-polysaccharide specific monoclonal antibodies derived from mice infected with the rough *Brucella melitensis* strain B115**. *J Gen Microbiol* 1993, **139**:1551–1556.
31. Cloeckaert A, Jacques I, Bowden RA, Dubray GI, Limet JN: **Monoclonal antibodies to *Brucella* rough lipopolysaccharide: characterization and evaluation of their protective effect against *B. abortus***. *Res Microbiol* 1993, **144**:475–484.
32. Grilló MJ, Manterola L, de Miguel MJ, Muñoz PM, Blasco JM, Moriyón I, López-Goñi I: **Increases of efficacy as vaccine against *Brucella abortus* infection in mice by simultaneous inoculation with avirulent smooth *bvrS/bvrR* and rough *wbkA* mutants**. *Vaccine* 2006, **24**:2910–2916.
33. Cloeckaert A, Jacques I, Grilló MJ, Marín CM, Grayon M, Blasco J-M, Verger J-M: **Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single and**

double deletion mutants of the *bp26* and *omp31* genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. *Vaccine* 2004, **22**:2827–2835.

34. Martín-Martín AI, Sancho P, Tejedor C, Fernández-Lago L, Vizcaíno N: **Differences in the outer membrane-related properties of the six classical *Brucella* species.** *Vet J* 2011, **189**:103–105.

35. Zygmunt MS, Jacques I, Bernardet N, Cloeckert A: **Lipopolysaccharide heterogeneity in the atypical group of novel emerging *Brucella* species.** *Clin Vaccine Immunol* 2012, **19**:1370–1373.

36. Vizcaíno N, Cloeckert A: **Biology and Genetics of the *Brucella* Outer Membrane.** In *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*. Edited by López-Goñi I, O’Callaghan D. Norfolk, UK: Horizon Press; 2012:133–161.

37. Zaccheus MV, Ali T, Cloeckert A, Zygmunt MS, Weintraub A, Iriarte M, Moriyón I, Widmalm G: **The epitopic and structural characterization of *Brucella suis* biovar 2 O-polysaccharide demonstrates the existence of a new M-negative C-negative smooth *Brucella* serovar.** *PLoS One* 2013, **8**:e53941.

38. Wattam AR, Inzana TJ, Williams KP, Mane SP, Shukla M, Almeida NF, Dickerman AW, Mason S, Moriyón I, O’Callaghan D, Whatmore AM, Sobral BW, Tiller R V, Hoffmaster AR, Frace MA, De Castro C, Molinaro A, Boyle SM, De BK, Setubal JC: **Comparative genomics of early-diverging *Brucella* strains reveals a novel lipopolysaccharide biosynthesis pathway.** *MBio* 2012, **3**:e00246–e00512.

39. Tsolis RM, Seshadri R, Santos RL, Sangari FJ, Lobo JMG, de Jong MF, Ren Q, Myers G, Brinkac LM, Nelson WC, Deboy RT, Angiuoli S, Khouri H, Dimitrov G, Robinson JR, Mulligan S, Walker RL, Elzer PE, Hassan KA, Paulsen IT: **Genome degradation in *Brucella ovis* corresponds with narrowing of its host range and tissue tropism.** *PLoS One* 2009, **4**:e5519.

40. Vizcaíno N, Caro-Hernández P, Cloeckert A, Fernández-Lago L: **DNA polymorphism in the *omp25/omp31* family of *Brucella spp.*: identification of a 1.7-kb inversion in *Brucella cetaceae* and of a 15.1-kb genomic island, absent from *Brucella ovis*, related to the synthesis of smooth lipopolysaccharide.** *Microbes Infect* 2004, **6**:821–834.

41. Zygmunt MS, Blasco JM, Letesson J-J, Cloeckert A, Moriyón I: **DNA polymorphism analysis of *Brucella* lipopolysaccharide genes reveals marked differences in O-polysaccharide biosynthetic genes between smooth and rough *Brucella* species and novel species-specific markers.** *BMC Microbiol* 2009, **9**:92.

42. Suarez CE, Pacheco GA, Vigliocco AM: **Immunochemical studies of oligosaccharides obtained from the lipopolysaccharide of *Brucella ovis*.** *Vet Microbiol* 1990, **22**:329–334.

43. Moreno E, Jones LM, Berman DT: **Immunochemical characterization of rough *Brucella* lipopolysaccharides.** *Infect Immun* 1984, **43**:779–782.

44. Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Weiss DS, Guzmán-Verri C, Chacón-Díaz C, Rucavado A, Moriyón I, Moreno E: ***Brucella abortus* uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection.** *PLoS One* 2007, **2**:e631.
45. Riezu-Boj JI, Moriyón I, Blasco JM, Marín CM, Diaz R: **Comparison of lipopolysaccharide and outer membrane protein-lipopolysaccharide extracts in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Brucella ovis* infection.** *J Clin Microbiol* 1986, **23**:938–942.
46. Chacón-Díaz C, Muñoz-Rodríguez M, Barquero-Calvo E, Guzmán-Verri C, Chaves-Olarte E, Grilló MJ, Moreno E: **The use of green fluorescent protein as a marker for *Brucella* vaccines.** *Vaccine* 2011, **29**:577–582.
47. Simon R, Prierer U, Pühler A: **A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria.** *Nat Biotechnol* 1983, **1**:784–791.
48. Scupham AJ, Triplett EW: **Isolation and characterization of the UDP-glucose 4'-epimerase-encoding gene, *galE*, from *Brucella abortus* 2308.** *Gene* 1997, **202**:53–59.

Figure 1 Proposed structure of the *Brucella* core LPS as described by Kubler-Kielb [8]. The core oligosaccharide is composed of a side oligosaccharide chain composed of four residues of glucosamine (GlcN), plus glucose (Glc) and mannose (Man), the latter linked to Kdo I, with Kdo II linked to another glucose from which the O-polysaccharide stems. Quin: quinovosamine; Per: perosamine.

Figure 2 LPS characterization. Tricine SDS-PAGE (A) and Western-blot (B) analysis of the LPS of *B. ovis* PA (1) and the LPS mutants *BoΔwadA* (2), *BoΔwadB* (3) and *BoΔwadC* (4). Arrows point the components I, II and III found by migration in the gel. The antibody used in the blot shown (B) is anti R-LPS A68/10A06/B11. Western blot probed with A68/24G12/A08, and A68/24D08/G09 gave similar results (data not shown).

Figure 3 Outer membrane epitopes in *B. ovis* PA and the LPS mutants. Reactivity with MAbs anti R-LPS (A) and anti Omps (B) was measured by ELISA.

Figure 4 Autoagglutination properties of *B. ovis* PA and the LPS mutants. Results are the mean \pm SD of three independent experiments. Sibling revertant strains behaved as the parental strain (data not shown).

Figure 5 Surface charge (Z potential) of *B. ovis* and the LPS mutants. Results are the mean \pm SD of ten independent experiments. *BoΔwadC-rev* is the sibling revertant strain of the *BoΔwadC* mutant, and same results were obtained with *BoΔwadB-rev* (not shown).

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this work.

Bacterial strains / Plasmids	Characteristic	Source / Reference
<i>Brucella ovis</i>		
PA	virulent strain, natural NaI ^R	CITA collection
Bo Δ wadA	PA in frame deletion mutant in <i>wadA</i> Δ 58-679	This work
Bo Δ wadB	PA in frame deletion mutant in <i>wadB</i> Δ 49-195	This work
Bo Δ wadC	PA in frame deletion mutant in <i>wadC</i> Δ 17-306	This work
BoPA-Gm	challenge strain, PA Gm ^R	UN collection
<i>Brucella melitensis</i>		
Rev 1	reference vaccine	CITA collection
<i>E. coli</i>		
S17-1 λ pir	mating strain with plasmid RP4 inserted into the chromosome	Simon et al. [47]
TOP10 F'	F' <i>lacIq</i> Tn 10 (Tet ^R) <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1alaD139 endA1 nupG</i>	Invitrogen
Plasmids		
pCR2.1	cloning vector	Invitrogen
pJQK	derivated of pJQ200KS+; Km ^R , Gm ^S	Scupham and Triplett EW [48]
pYRI-12	913-bp of <i>B. abortus</i> parental chromosomal DNA containing the <i>wadA</i> deletion allele, generated by PCR and cloned into pCR2.1	This work
pYRI-13	<i>Bam</i> HI- <i>Xba</i> I fragment from pYRI-12 cloned into the corresponding sites of pJQK	This work
pYRI-1	570-bp of <i>B. abortus</i> parental chromosomal DNA containing the <i>wadB</i> deletion allele, generated by PCR and cloned into pCR2.1	Gil Ramirez [7]
pYRI-2	<i>Bam</i> HI- <i>Xba</i> I fragment from pYRI-1 cloned into the corresponding sites of pJQK	Gil Ramirez [7]
pYRI-14	934-bp of <i>B. ovis</i> parental chromosomal DNA containing the <i>wadC</i> deletion allele, generated by PCR and cloned into pCR2.1	This work
pYRI-15	<i>Bam</i> HI- <i>Xba</i> I fragment from pYRI-14 cloned into the corresponding sites of pJQK	This work

CITA: Centro de investigación y tecnología agroalimentaria; UN: Universidad de Navarra.

Table 2 Primers used in the study.

Gene		Sequence (5'-->3')
<i>wadA</i>	F1	CCC ACG CTG CTT AGT ACG TT
	R2	CAT CAA AAC GTG CAT CGT CAA
	F3	ATT GAC GAT GCA CGT TTT GAT GCA TTC GGC TTT GCC TTT TAT
	R4	GAG TTT ATC GCC CAA TTT GC
	R5	TCT TCC AGA ATG AGG CCG TA
<i>wadB</i>	F1	GCA TGA TTA CCC CGC TGAT
	R2	CGC AAT CTC GTC TTT GTT GAG
	F3	CTC AAC AAA GAC GAG ATT GCG GGT GGC GTG AAG GAA ATCT
	R4	TGA TAG CCG AGC CTC TTC AG
	R5	ATG CAC CCA TGA AGT TTT CC
<i>wadC</i>	F1	CTG GCG TCA GCA ATC AGA G
	R2	GTG CAA CGA CCT CAA CTT CC
	F3	GGA AGT TGA GGT CGT TGC ACA CGC CAT CGA ACC TTA TCT G
	R4	CGG CTA TCG TGC GAT TCT
	R5	GCA ATG GAA TGA GCT GAA CA

Table 3 Colonization of *B. ovis* PA and the LPS mutant strains in mouse spleens.

<i>B. ovis</i> strain	log ₁₀ CFU in spleen		
	3 weeks post infection	10 weeks post infection	Cleared/Totals
<i>B. ovis</i> PA	6.56 ± 0.52	4.67 ± 0.86	0/5
BoΔ <i>wadA</i>	6.78 ± 0.40	4.41 ± 2.01	0/5
BoΔ <i>wadB</i>	2.31 ± 1.91 ^a	0.80 ± 0.42 ^a	5/5 ^a
BoΔ <i>wadC</i>	3.82 ± 0.72 ^a	1.11 ± 0.77 ^a	4/5 ^a
BoΔ <i>wadB</i> -rev ^b	5.89 ± 0.77	4.90 ± 0.45	0/5
BoΔ <i>wadC</i> -rev ^b	6.49 ± 0.23	4.71 ± 1.68	0/5

Statistical comparison ($n = 5$) of mean log CFU/spleen or percentage of mice found free from infection in spleens by totals, respectively: ^a $P < 0.005$ vs. *B. ovis* PA; ^b Sibling revertant mutants.

Table 4 Efficacy of *B. ovis* LPS mutants in BALB/c mice against a virulent *B. ovis* infection.

Vaccine (dose/route)	Log ₁₀ CFU in spleen (mean ± SD)	No. of non-infected/ total mice studied
BoΔ <i>wadB</i> (10 ⁸ /IP)	1.08 ± 1.22 ^{a, c}	7/10 ^{a, c}
BoΔ <i>wadC</i> (10 ⁸ /IP)	2.18 ± 1.59 ^a	5/10 ^b
<i>B. melitensis</i> Rev 1 (10 ⁵ /SC)	2.75 ± 1.26 ^b	2/10
PBS (unvaccinated control)	6.24 ± 0.48 ^c	0/10

^a $p < 0.005$ and ^b $p < 0.05$ vs. unvaccinated control; ^c $p < 0.05$ vs. Rev 1 control.

Additional file

Additional file 1 Confirmation of the construction of the mutants. A: schematic representation of the ORFs indicating in grey colour the deleted region and the primers used to check the strains. B: For each gene, two confirmation PCR assays were carried out with specific primers. Primers F1-R4 flank the ORF and show different sizes between the mutant and the wild type gene; and primers F1-R5 cover from upstream of the ORF to the deleted region, so that only strains carrying the complete ORF will be amplified and the specific amplicon will be shown. (1) 1kb plus ladder marker; (2) *B. ovis* PA; (3) *B. ovis* deleted mutant; (4) *B. ovis* sibling revertant strain.

Figure 1

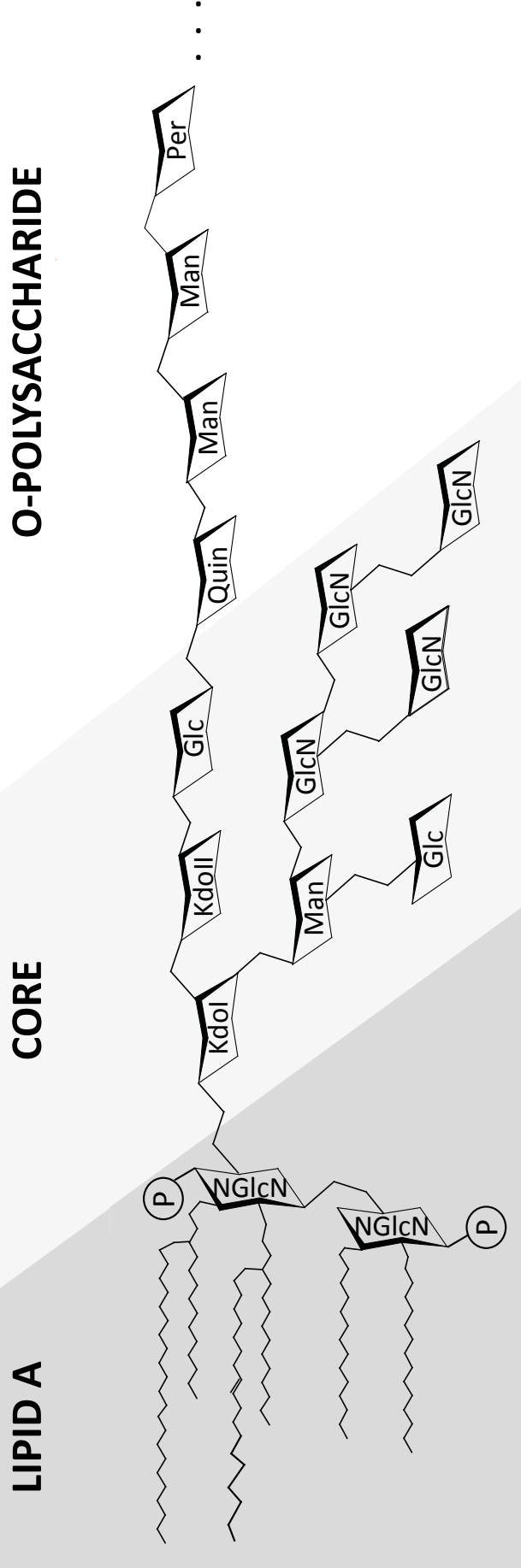


Figure 2

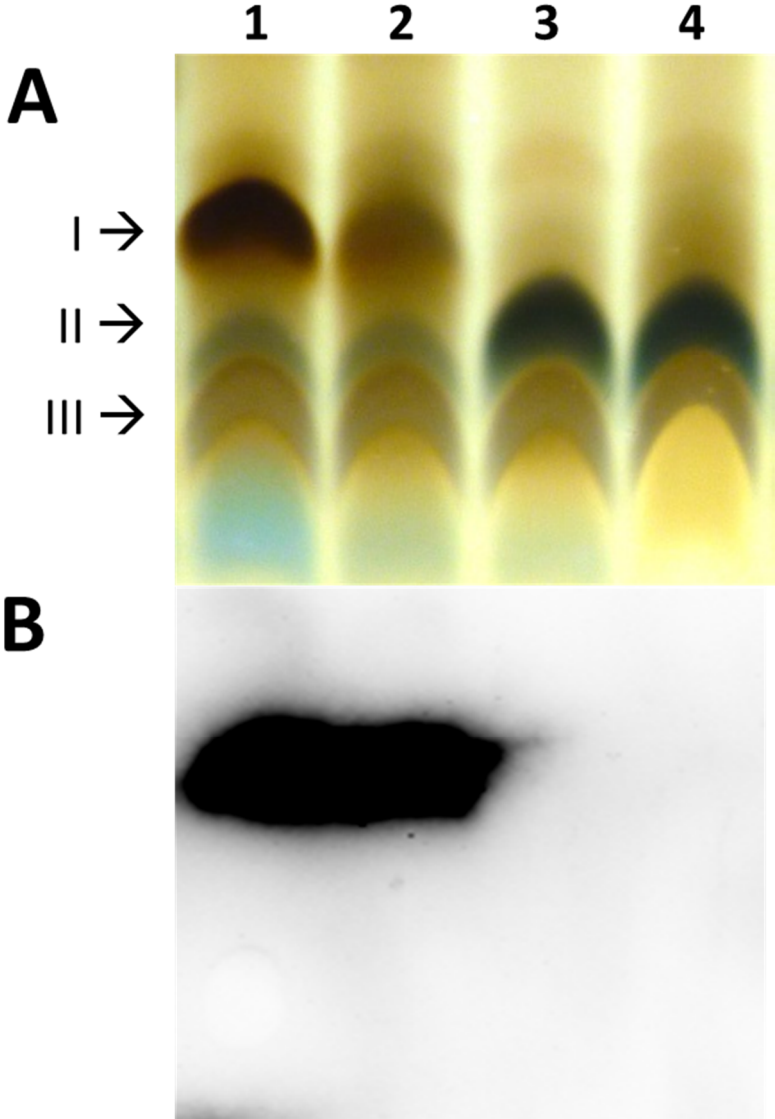
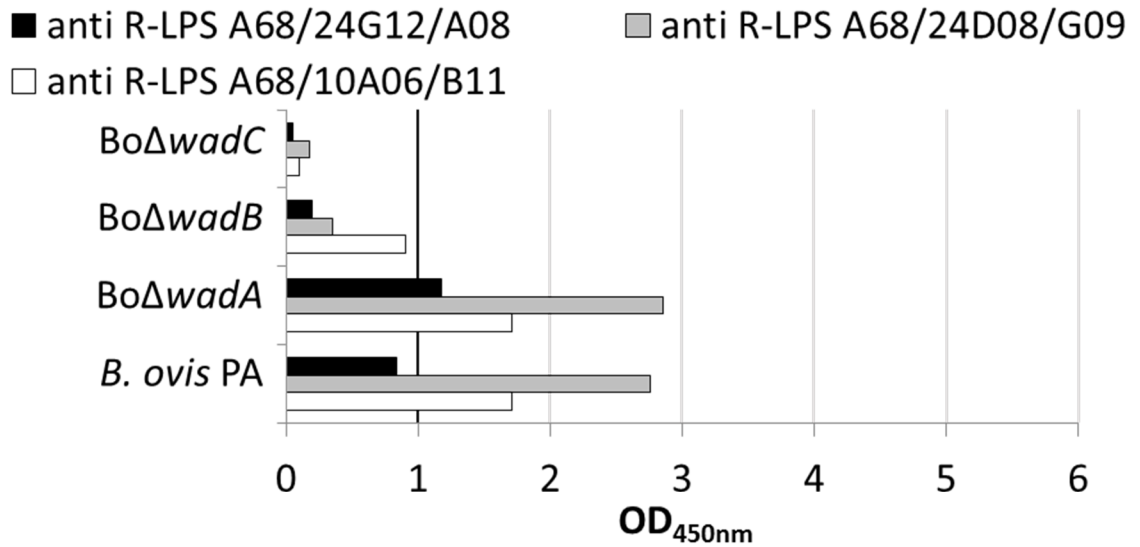


Figure 3

A



B

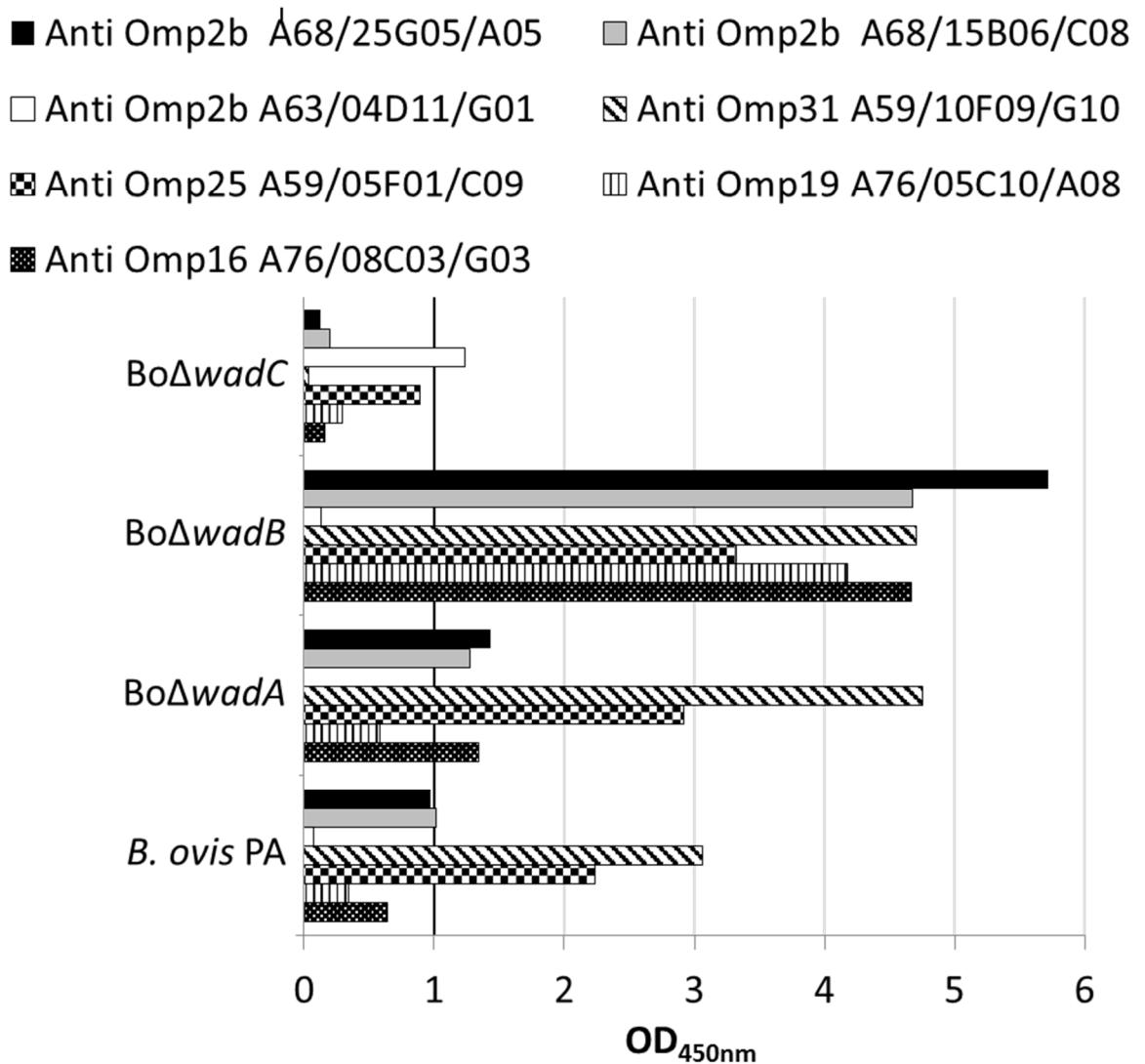


Figure 4

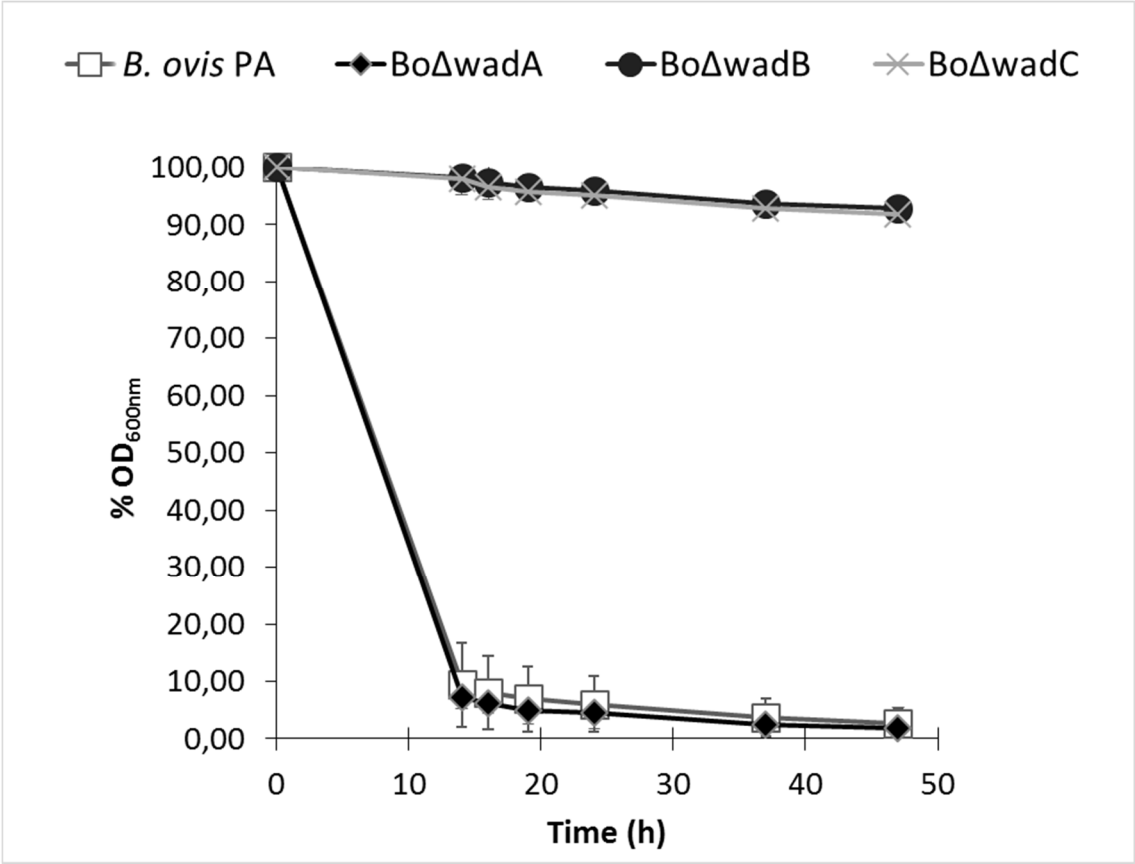
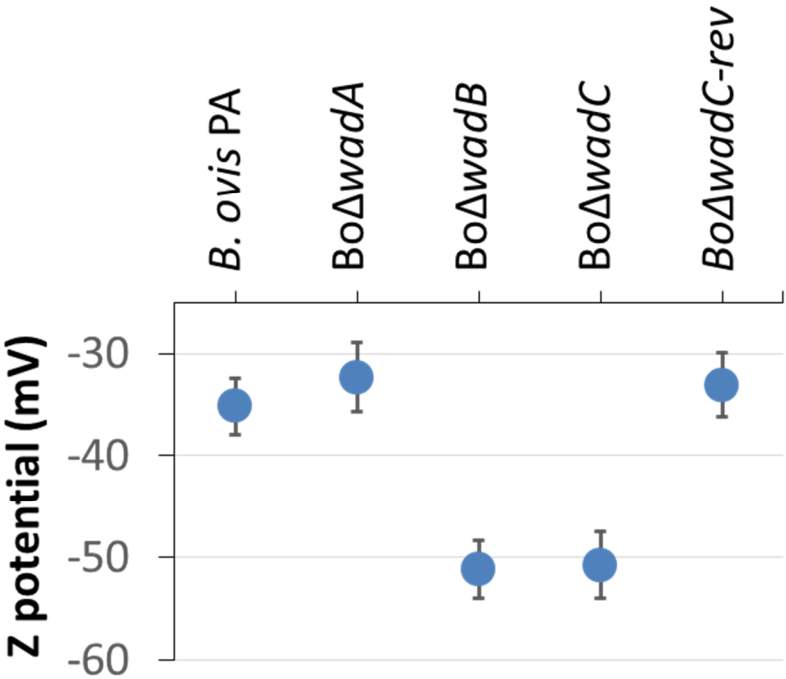
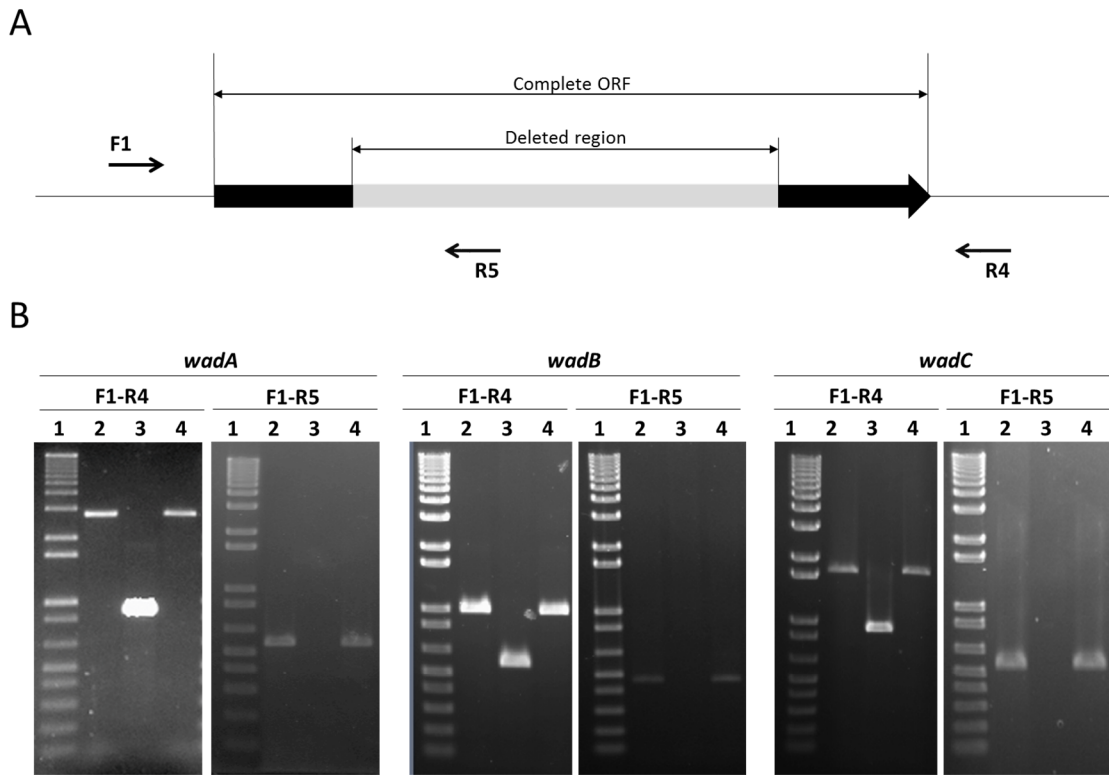
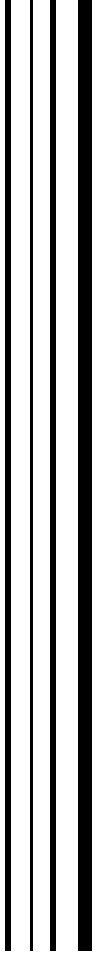


Figure 5

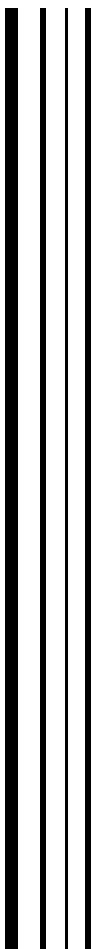




Confirmation of the strains. A: Schematic representation of the ORFs indicating in grey colour the deleted region and the primers used to check the strains. B: For each gene two confirmation PCR assays were carried out with the specific gene primers: F1-R4, which flank the ORF and show different sizes between the mutant and the wild type gene; and F1-R5, which covers from upstream of the ORF to the deleted region, so that only strains carrying the complete ORF will be amplified and the specific band will be shown. 1.- 1kb plus ladder, 2.- *B. ovis* PA 3.-*B. ovis* mutant. 4.- *B. ovis* sibling revertant.



Anexo III



Distribution of genes involved in sialic acid utilization in strains of *Haemophilus parasuis*

Verónica Martínez-Moliner,¹ Pedro Soler-Llorens,² Javier Moleres,³ Junkal Garmendia^{3†} and Virginia Aragon^{1,4†}

Correspondence

Virginia Aragon
virginia.aragon@cresa.uab.es

¹Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

²Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Navarra, Pamplona, Spain

³Instituto de Agrobiotecnología UPNA-CSIC-Gobierno Navarra, Mutilva, Spain

⁴Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Barcelona, Spain

Haemophilus parasuis is a porcine respiratory pathogen, well known as the aetiological agent of Glässer's disease. *H. parasuis* comprises strains of different virulence, but the virulence factors of this bacterium are not well defined. A neuraminidase activity has been previously detected in *H. parasuis*, but the role of sialylation in the virulence of this bacterium has not been studied. To explore the relationship between sialic acid (Neu5Ac) and virulence, we assessed the distribution of genes involved in sialic acid metabolism in 21 *H. parasuis* strains from different clinical origins (including nasal and systemic isolates). The neuraminidase gene *nanH*, together with CMP-Neu5Ac synthetase and sialyltransferase genes *neuA*, *siaB* and *lsgB*, were included in the study. Neuraminidase activity was found to be common in *H. parasuis* isolates, and the *nanH* gene from 12 isolates was expressed in *Escherichia coli* and further characterized. Sequence analysis showed that the NanH predicted protein contained the motifs characteristic of the catalytic site of sialidases. While an association between the presence of *nanH* and the different origins of the strains was not detected, the *lsgB* gene was predominantly present in the systemic isolates, and was not amplified from any of the nasal isolates tested. Analysis of the lipooligosaccharide (LOS) from reference strains Nagasaki (virulent, *lsgB*⁺) and SW114 (non-virulent, *lsgB*⁻) showed the presence of sialic acid in the LOS from the Nagasaki strain, supporting the role of sialylation in the virulence of this bacterial pathogen. Further studies are needed to clarify the role of sialic acid in the pathogenicity of *H. parasuis*.

Received 13 November 2011

Revised 4 May 2012

Accepted 16 May 2012

INTRODUCTION

Haemophilus parasuis is an NAD-dependent bacterium belonging to the family *Pasteurellaceae*. It is an early colonizer of the upper respiratory tract of healthy pigs and also the aetiological agent of Glässer's disease, a systemic disease characterized by polyarthritis, polyserositis and meningitis (Rapp-Gabrielson *et al.*, 2006). Strains of *H. parasuis* diverge in various aspects, including their virulence. *H. parasuis* is an important swine pathogen, but its virulence factors are poorly characterized.

Lichtensteiger & Vimr (1997, 2003) described a neuraminidase activity located in the outer membrane of *H. parasuis*. This location indicates a possible role of the protein as an antigen, but the specific role of the enzyme

has not been determined. Sialic acid has been described as a virulence determinant in several bacterial species, including *Streptococcus intermedius*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* (Almagro-Moreno & Boyd, 2009; Jenkins *et al.*, 2010; Marion *et al.*, 2011; Takao *et al.*, 2010). Mechanistically, bacterial neuraminidases scavenge sialic acid (*N*-acetylneuraminic acid or Neu5Ac) from host glycoconjugates, which after internalization by specific transporters, can be used as a carbon and/or nitrogen source, or can be activated in a reaction catalysed by a CMP-Neu5Ac synthetase and used to sialylate surface molecules, commonly the lipooligosaccharide (LOS) (Steenbergen *et al.*, 2005). LOS sialylation is carried out by sialyltransferases. LOS sialylation is a molecular mimicking mechanism extensively used by bacteria to evade the host immune system. This molecular mimicry has been associated with an enhancement of bacterial resistance to serum-mediated killing in members of the family *Pasteurellaceae* (Hood *et al.*, 1999; Inzana *et al.*, 2002). Besides a neuraminidase

†These authors contributed equally to this work.

Abbreviations: LOS, lipooligosaccharide; MUNAA, 2-(4-methylumbelliferyl)- α -D-*N*-acetyl neuraminic acid.

(or NanH), bacteria need a group of other enzymes to use sialic acid in catabolism or in LOS modification (Steenbergen *et al.*, 2005). A repertoire of genes encoding proteins involved in sialic acid utilization has been identified and characterized in several members of the family *Pasteurellaceae*. For example, *H. influenzae* is endowed with genes encoding enzymes necessary to modify LOS, including the CMP-Neu5Ac synthetase SiaB, and lipopolysaccharide sialyltransferases such as LsgB, Lic3A, Lic3B and SiaA (Fox *et al.*, 2006; Hood *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2002).

Little information is currently available regarding sialic acid utilization by *H. parasuis* and the distribution of genes encoding sialic acid-related functions. Based on gene sequence homology, a number of genes encoding putative sialic acid-related enzymes have been annotated in the genome of *H. parasuis* strain SH0165 (Xu *et al.*, 2011). In addition, Jin *et al.* (2008) reported the transcription of a *siaB/neuA* homologue during infection, suggesting a role for sialic acid in the pathogenesis of this bacterium. In this study, we analysed the presence of the genes *nanH*, *siaB*, *neuA* and *lsgB* in strains from different clinical origins and studied their association with virulence mechanisms already described for *H. parasuis*.

METHODS

Bacterial strains and plasmids. Two *H. parasuis* reference strains, SW114 (non-virulent) and Nagasaki (virulent), and 19 field strains, including both clinical and nasal isolates, were used. The main

characteristics of the strains are presented in Table 1. It may be noted that strains isolated from the nasal cavities of healthy animals from farms free of disease have been associated with being susceptible to serum and to macrophage phagocytosis, while strains from systemic lesions have been associated with resistance to serum and to macrophage phagocytosis (Cerdà-Cuellar & Aragon, 2008; Olvera *et al.*, 2009). In addition, by MLST, nasal strains cluster in a group different from systemic strains (Olvera *et al.*, 2006). All strains were stored in 20% glycerol/brain heart infusion (BHI; Oxoid) at -80°C , and were cultured on chocolate agar plates (bioMérieux) at 37°C with 5% CO_2 , or in PPLO or BHI broth supplemented with $10\ \mu\text{g}\ \text{NAD}\ \text{ml}^{-1}$ at 37°C with shaking.

Escherichia coli BL21 was grown at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium, supplemented with $30\ \mu\text{g}$ chloramphenicol ml^{-1} when appropriate.

Neuraminidase activity. For preliminary determination of neuraminidase activity, a microtitre assay was performed, based on a published method (Potier *et al.*, 1979; Lichtensteiger & Vimr, 1997). Briefly, one to two colonies of each bacterial culture were resuspended in $25\ \mu\text{l}$ of $110\ \mu\text{M}$ 2-(4-methylumbelliferyl)- α -D-N-acetyl neuraminic acid (MUNAA) in $100\ \text{mM}$ acetate buffer (pH 4.6) in 96-well plates. After 10 min of incubation at 37°C in the dark, release of methylumbelliferone was observed under a UV transilluminator.

To quantify the neuraminidase activity using the above microtitre assay, $25\ \mu\text{l}$ of broth cultures of each *H. parasuis* strain (OD_{660} 0.8) was mixed with $25\ \mu\text{l}$ of $110\ \mu\text{M}$ MUNAA in $100\ \text{mM}$ acetate buffer (pH 4.6) in a 96-well plate. The reaction was incubated at 37°C and the release of fluorescent methylumbelliferone was quantified (excitation 355 nm, emission 460 nm) after incubation at different times. Culture medium was used as a negative control.

PCR amplification, cloning and sequencing. Primers to amplify genes *nanH* (neuraminidase), *neuA* and *siaB* (CMP-NeuNAc synthetases),

Table 1. *H. parasuis* strains used in this study and their main characteristics

Strain	Isolation site	Disease status	Serovar	Reference or source
IQ1N-6	Nose	Healthy	9	Cerdà-Cuellar & Aragon (2008)
SL3-2	Nose	Healthy	10	Cerdà-Cuellar & Aragon (2008)
VS6-2	Nose	Healthy	15	Olvera <i>et al.</i> (2006)
ND14-1	Nose	Healthy	7	Cerdà-Cuellar & Aragon (2008)
SC14-1	Nose	Healthy	15	Olvera <i>et al.</i> (2006)
9904108*	Systemic	Glässer's disease	4	Aragon <i>et al.</i> (2010)
MU21-2	Nose	Healthy	7	Olvera <i>et al.</i> (2006)
CA38-4	Nose	Glässer's disease	12	Aragon <i>et al.</i> (2010)
FL1-3	Nose	Healthy	10	Olvera <i>et al.</i> (2006)
F9	Nose	Healthy	6	Olvera <i>et al.</i> (2006)
SW114	Nose	Healthy	3	Reference strain
Nagasaki	Systemic	Glässer's disease	5	Reference strain
373/03A	Systemic	Glässer's disease	7	Aragon <i>et al.</i> (2010)
PV1-12	Systemic	Glässer's disease	15	Aragon <i>et al.</i> (2010)
264/99	Systemic	Glässer's disease	10	Aragon <i>et al.</i> (2010)
228/04	Lung	Glässer's disease	5	Olvera <i>et al.</i> (2006)
P015/96	Lung	Pneumonia	5	Olvera <i>et al.</i> (2006)
ER-6P	Systemic	Glässer's disease	15	Cerdà-Cuellar & Aragon (2008)
PC4-6P	Systemic	Glässer's disease	12	Cerdà-Cuellar & Aragon (2008)
IT29205	Systemic	Glässer's disease	4	Aragon <i>et al.</i> (2010)
2725	Systemic	Glässer's disease	10	Aragon <i>et al.</i> (2010)

*Did not reproduce disease when inoculated intranasally in colostrum-deprived piglets (Aragon *et al.*, 2010).

and *lsgB* (lipopolysaccharide sialyltransferase), from *H. parasuis* were designed using the genome sequence of strain SH0165 (GenBank accession no. NC_011852) (Table 2). PCRs were performed using 100 ng genomic DNA of each *H. parasuis* strain and 10 pmol of each primer pair (Table 2) in a final reaction volume of 25 μ l. Amplification was performed with 35 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at 55 °C and 90 s at 72 °C, followed by 7 min at 72 °C for final elongation. PCR results were analysed by electrophoresis on 1% agarose gels and ethidium bromide staining. For *lsgB*, a second pair of primers, located outside the ORF (77 bp upstream and 70 bp downstream) was used, with an annealing temperature of 50 °C.

For *nanH*, six amplicons from each group of strains (nasal and systemic) were purified and cloned into the *SalI* site of pACYC184. *E. coli* BL21 was used as a host for heterologous expression of the recombinant clones. Clones were checked for neuraminidase activity, as described above for *H. parasuis*, and were used to sequence the corresponding *nanH* genes (accession nos JN860075–JN860085). Sequencing reactions were performed with a BigDye Terminator v.3.1 kit and an ABI 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems). Sequence editing and analysis were carried out using Fingerprinting II v3.0 software (Bio-Rad) and BLAST.

Serum and phagocytosis susceptibility assays. Bacterial resistance to serum-mediated killing and phagocytosis by porcine alveolar macrophages were determined as described previously (Cerdà-Cuellar & Aragon, 2008; Olvera *et al.*, 2009). Data already available were completed by assaying strains IT29205, 9904108 and PV1-12 for serum resistance, and strains IQ1N-6, VS6-2, 9904108, FL1-3, 373/03A, PV1-12, 228/04 and IT29205 for phagocytosis resistance.

LOS purification and analysis. For LOS purification, Nagasaki and SW114 strains were grown in BHI medium supplemented with 10 μ g NAD ml^{-1} and 25 μ g sialic acid ml^{-1} . Proteinase K-digested whole-cell lysates were prepared as described earlier (Dubray & Limet, 1987; Garin-Bastuji *et al.*, 1990), with some modifications. Briefly, bacterial pellets from 300 ml of cultures were suspended in 0.0625 M Tris/HCl buffer (pH 6.8) containing 2% SDS [1 g (wet weight) of cells per 20 ml]. Samples were heated at 100 °C for 10 min, and the lysates were tempered to 55 °C. Proteinase K was added at 0.15 mg ml^{-1} , and the samples were incubated at 55 °C for 3 h and then kept overnight at 20 °C. LOS was then precipitated by addition of four vols 2-propanol at 4 °C. The samples were stored at –20 °C for 1 h, and the precipitate was harvested by centrifugation at 5000 g for 30 min at 4 °C. Pellets

were treated with RNase and DNase I (Boehringer), both at 0.01 mg ml^{-1} in 0.0625 M Tris/HCl buffer (pH 6.8), at 37 °C for 1 h. In order to eliminate both nucleases from the sample, an additional treatment with proteinase K was carried out at 12.5 μ g ml^{-1} . After a second 2-propanol precipitation and centrifugation, the pellets were dried and stored. LOS samples were analysed by the Tris/HCl-glycine buffer system described by Laemmli (1970) using 16 \times 20 cm gels with polyacrylamide concentrations of 4 and 18% for the casting and running gels, respectively, and stained by the periodate-alkaline silver method (Tsai & Frasch, 1982). LOS was also analysed after treatment with neuraminidase from *Clostridium perfringens* (Sigma-Aldrich) by using a concentration of 0.05 U per microgram of LOS in PBS at 37 °C for 4 h. These samples were treated with proteinase K, and after a final 2-propanol precipitation and centrifugation, pellets were dried and stored for analysis as described above.

RESULTS AND DISCUSSION

Detection of neuraminidase activity in *H. parasuis* strains

Twenty-one *H. parasuis* isolates including 10 nasal strains and 11 strains from lesions were tested for neuraminidase activity by measuring the level of reaction with the fluorescent substrate MUNAA. For clarity, Fig. 1(a) shows the results obtained for 11 of the *H. parasuis* strains. Five strains showed no neuraminidase activity (results for strains IT29205, FL1-3 and PV1-12 are not shown but were comparable with those of strains 2725 and F9; Fig. 1a). The remaining 16 *H. parasuis* strains showed neuraminidase activity, with some diversity in terms of activity level among strains. The results for strains MU21-2, ER-6P, IQ1N-6, P015/96, 264/99, PC4-6P and SC14-1 (not shown) were similar to those obtained for strains Nagasaki, ND14-1, SW114 and 373/03A (Fig. 1a). The low activity produced by strains SL3-2 and VS6-2 is noteworthy. Thus, different strains produced different quantities of enzyme, as observed by the diverse levels of reaction

Table 2. Primers used to amplify the *nanH*, *neuA*, *siaB* and *lsgB* genes from *H. parasuis* isolates

Bold type indicates restriction sites.

Primer	Sequence (5'→3')
<i>nanH</i>	
nanH- <i>SalI</i> -Fw	GCGCGT CGAC CACAGCTAATTTTCATATATTGCTATG
nanH- <i>SalI</i> -Rev	GCGCGT CGACA ATTTGGGATAGGGTCTAGTTAC
<i>neuA</i>	
neuA-F1	ATGTTTGACTTAATCGTTGTCACTTCA
neuA-R1	TCATTGCATCTCTTCTCAATCAAGCT
<i>siaB</i>	
siaB-F1	ATGAAAAAGTAGCCATTATCCCAGCA
siaB-R1	TTAATAACTTTCATTGTTTACCAAAC
<i>lsgB</i>	
lsgB-F1	ATGAATTTGATTATTGTATGACTCCATTT
lsgB-R1	CTATTGGCATGTGTAGTCAATTACTTC
lsgB-F2	ATATTCCTTGGGCGAGTG
lsgB-R2	GAAAATATAGAAAGCAACAATG

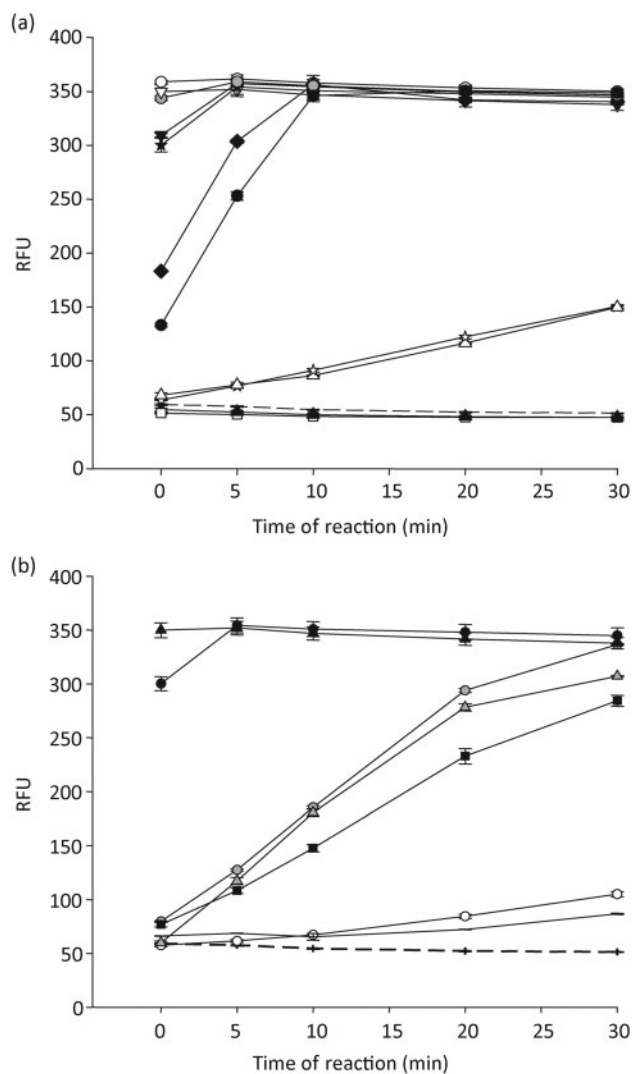


Fig. 1. Analysis of *H. parasuis* neuraminidase activity. Neuraminidase activity of different strains of *H. parasuis* was assayed with the fluorescent substrate MUNAA and is expressed as relative fluorescence units (RFU). (a) Bacterial cultures were grown in PPLO broth supplemented with NAD and were analysed at OD_{660} 0.8. Strains: Nagasaki (filled star), SW114 (∇), 373/03A (\blacktriangledown), 9904108 (\blacklozenge), 228/04 (\bullet), 2725 (\blacktriangle), F9 (\square), ND14-1 (\circ), VS6-2 (open star), SL3-2 (\triangle) and CA38-4 (grey circle). The figure shows the results obtained in one representative experiment. (b) Neuraminidase activity in cultures of *H. parasuis* Nagasaki (circles) and SW114 (triangles) after growth to OD_{660} 0.8 in PPLO broth supplemented with NAD. The cultures were also assayed after diluting 1:10 (grey symbols) or 1:100 (open symbols) with fresh PPLO. As a positive control, neuraminidase from *C. perfringens* (*Clostridium welchii*) was included (1 mU, \blacksquare ; 0.1 mU, solid line with no symbol). PPLO served as a negative control (dashed line).

at the beginning of the incubation with MUNAA ($t=0$). However, most strains displayed high fluorescence levels from the beginning of the reaction, which did not vary greatly through the experiment, suggesting that the reac-

tion was saturated from the start of the assay. To confirm this observation, the assay was performed with bacterial cultures that were previously diluted. Fig. 1(b) shows the results obtained for strains Nagasaki and SW114, showing an exponential increase of neuraminidase activity, which indicates that the reaction with plain cultures was saturated. The same results were obtained when diluted cultures of strains ND14-1, CA38-4 and SC14-1 were used in the assay (not shown). The group of strains with the highest level of neuraminidase activity included strains of both nasal and systemic origin. No correlation between production of neuraminidase activity and the clinical origin of the strains was found, since 80% of nasal strains and 73% of systemic strains showed this activity. Together, these data suggest that the neuraminidase activity of *H. parasuis* detected with MUNAA is extensively distributed (76.1% of screened isolates). Also, this activity may not be essential for virulence or nasal colonization, since we detected both nasal and clinical isolates that lacked this enzymic activity.

Amplification, sequencing and heterologous expression of *nanH*

Neuraminidase activity in *H. parasuis* is expected to be encoded by *nanH* (Xu *et al.*, 2011). To further study the differences observed in neuraminidase activity level among strains, the *nanH* gene was PCR-amplified from the 21 *H. parasuis* strains under study. The amplicon obtained, with

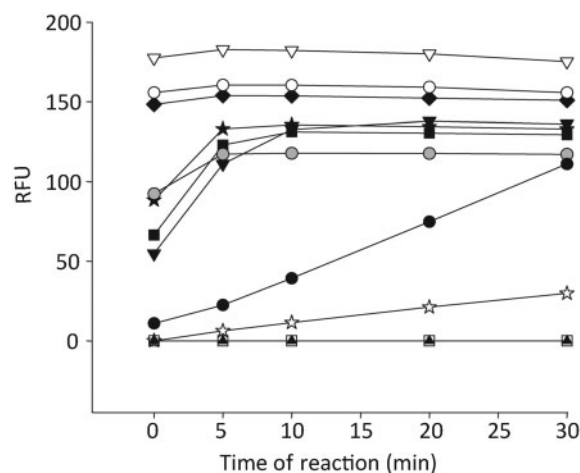


Fig. 2. Neuraminidase activity in cultures of *E. coli* BL21 harbouring *nanH* from different strains of *H. parasuis* cloned into pACYC184. Bacteria were grown in LB and analysed at OD_{660} 0.8 with the fluorescent substrate MUNAA. The reaction was measured at different time points as relative fluorescence units (RFU). *H. parasuis* strain origin of the *nanH* genes: Nagasaki (filled star), SW114 (∇), 373/03A (\blacktriangledown), IQ1N-6 (\blacklozenge), 228/04 (\bullet), 2725 (\blacktriangle), F9 (\square), ND14-1 (\circ), VS6-2 (open star), 264/99 (\blacksquare) and CA38-4 (grey circle). The figure shows the results of one representative experiment.

homology to transposases found in a variety of bacterial species, including *Gallibacterium anatis* (YP_004419118.1), *E. coli* (EFZ58425.1), *Erwinia pyrifoliae* (YP_002650187.1) and *Enterobacter cloacae* (YP_003940625.1). When the putative protein sequences were analysed, some amino acid changes were detected (Fig. 3). The residue R303, included in the catalytic site of the Nagasaki strain NanH (Fig. 3), was identified at position R298 in strain 228/04. Interestingly, we detected a change at this position in strain VS6-2 (R298G), which could explain the poor activity of the enzyme from this particular isolate (Fig. 1). The amino acid substitutions R298G and M235I (conserved change, outside the catalytic site) were the only differences found between the putative NanH from strain ND14-1 (strain with high neuraminidase activity) and that from strain VS6-2 (poor neuraminidase activity). This observation highlights the potential importance of residue R298 for *H. parasuis* NanH activity.

Distribution of *neuA*, *siaB* and *lsgB* genes and correlation with bacterial virulence mechanisms

We further proceeded to evaluate the distribution of other genes involved in sialic acid metabolism among the *H.*

parasuis strains under study. A search of the available complete sequence of *H. parasuis* SH0165 was performed, and genes encoding enzymes with homology to NeuA or SiaB (72 and 77 % identities) and LsgB (34 % identity and a high expect value of $2e-93$ in PSI-BLAST) were detected. While no correlation could be observed between the presence of *neuA* or *siaB* and the virulence of the strains, a clear correlation between the presence of *lsgB* (responsible for sialylation of LOS) and the virulence of the strains was observed; indeed, *lsgB* was only amplified from the clinical isolates and all nasal isolates tested were *lsgB*-negative (Table 3). A second primer pair for *lsgB* amplification (*lsgB*-F2 and *lsgB*-R2), annealing outside the ORF, was used. Specific amplification with this second pair of primers was only detected in the strains giving positive amplification with primers *lsgB*-F1 and *lsgB*-R1 (not shown). Although these results infer a role for *lsgB* in the pathogenicity of *H. parasuis*, the gene may not be essential, since it was not detected in three clinical isolates. Alternatively, those strains could contain other sialyltransferase-encoding genes which would compensate the lack of *lsgB* in terms of LOS sialylation. These results also suggest that LOS sialylation may be an important factor in *H. parasuis* virulence. Next, we

Table 3. Summary of neuraminidase results obtained, together with gene amplification results and assays of sensitivity to normal sera and to phagocytosis by alveolar macrophages

Strain	Neuraminidase activity	Presence of gene				Susceptibility* to:	
		<i>nanH</i>	<i>neuA</i>	<i>siaB</i>	<i>lsgB</i>	Serum	Phagocytosis
Nasal strains							
SW114	+	+	+/-†	+/-	-	S	S
IQ1N-6	+	+	+/-	+	-	S	S
ND14-1	+	+	+/-	+	-	S	S
SC14-1	+	+	+/-	+	-	S	S
MU21-2	+	+	+/-	+	-	S	S
CA38/4	+	+	+	+	-	R	R
SL3-2	+‡	+	+/-	+	-	S	S
VS6-2	+‡	+	+/-	+	-	I	S
FL1-3	-	+	+/-	+	-	S	I
F9	-	+§	+/-	+	-	S	S
Strains from lesions							
Nagasaki	+	+	+	+	+	R	R
9904108	+	+	+/-	+	-	S	R
373/03A	+	+	+	+/-	-	I	R
P015/96	+	+	+	+	+	R	R
ER-6P	+	+	+	+	+	R	R
PC4-6P	+	+	+/-	+	+	R	R
264/99	+	+	+	+/-	+	R	R
228/04	+‡	+	+	+	+	R	R
PV1-12	-	+	+/-	+/-	-	S	R
IT29205	-	+§	+	+	+	R	R
2725	-	+§	+	+	+	S	R

*S, Sensitive; I, intermediate; R, resistant.

†+/-, Weak PCR result for this gene.

‡Neuraminidase activity in these strains was weak.

§An insertion was detected in these *nanH* genes.

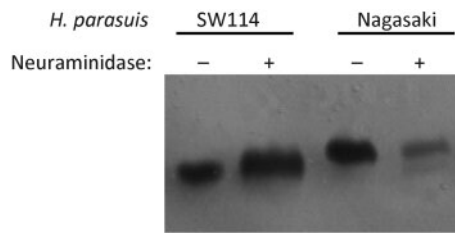


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of LOS purified from reference strains SW114 (lanes 1 and 2) and Nagasaki (lanes 3 and 4) grown in BHI supplemented with sialic acid. LOS preparations were treated with neuraminidase from *C. perfringens* (*C. welchii*) before electrophoresis (lanes 2 and 4). The separating gel consisted of 18% polyacrylamide and samples were stained with periodate-alkaline silver.

explored the correlation between the presence of *lsgB* and described virulence mechanisms such as resistance to phagocytosis by professional phagocytes and resistance to serum-mediated killing. It is known that most nasal strains of *H. parasuis* are sensitive to phagocytosis and to the bactericidal effect of normal sera, while systemic strains are commonly resistant to both mechanisms (Cerdà-Cuellar & Aragon, 2008; Olvera *et al.*, 2009). Table 3 summarizes the results of *nanH*, *neuA*, *siaB* and *lsgB* PCR amplification, and of serum and phagocytosis susceptibility. A good association between the presence of the necessary genes to sialylate LOS (*nanH*, *siaB* or *neuA* and *lsgB*) and serum resistance was observed ($\kappa=0.788$), while the association with phagocytosis resistance was weaker ($\kappa=0.462$). These results give strength to the hypothesis that LOS sialylation could confer an increased resistance to the bactericidal effect of sera and could be involved in modulating *H. parasuis* resistance to complement, as has been observed for *H. influenzae* (Hood *et al.*, 1999; Martí-Lliteras *et al.*, 2011; Nakamura *et al.*, 2011).

Analysis of LOS in *H. parasuis*

The structure of the *H. parasuis* LOS is currently unknown. LOS from the reference strains Nagasaki and SW114, grown in BHI medium supplemented with sialic acid, was examined by SDS-PAGE and periodate-alkaline silver staining, with and without neuraminidase treatment. LOS from the SW114 strain showed one band (Fig. 4, lane 1), which was not affected by neuraminidase treatment (Fig. 4, lane 2). Conversely, LOS purified from the Nagasaki strain showed one band (Fig. 4, lane 3), and neuraminidase treatment generated a second band with a slightly lower molecular mass (Fig. 4, lane 4), suggesting the elimination of sialic acid from a fraction of the neuraminidase-treated LOS. These results suggest that, under the conditions tested, the virulent strain Nagasaki does sialylate its LOS molecule.

In conclusion, neuraminidase activity could be detected, quantified and correlated with the *nanH* gene sequence in the set of *H. parasuis* strains under analysis, although this

activity did not display an apparent correlation with virulence. In contrast, the putative sialyltransferase-encoding gene *lsgB* was only detected in virulent strains, which also displayed a higher resistance to serum-mediated killing and phagocytosis by alveolar macrophages than nasal *lsgB*⁻ strains. In addition, a correlation between the presence of *lsgB* and LOS sialylation could be established using two reference strains. These results warrant further study on the role of sialic acid in this bacterial pathogen.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (grant AGL2010-15232) awarded to V. A., and the Gobierno de Navarra, Spain (grant IIQ14064) awarded to J. G.

REFERENCES

- Almagro-Moreno, S. & Boyd, E. F. (2009). Sialic acid catabolism confers a competitive advantage to pathogenic *Vibrio cholerae* in the mouse intestine. *Infect Immun* **77**, 3807–3816.
- Aragon, V., Cerdà-Cuellar, M., Fraile, L., Mombarg, M., Nofrarias, M., Olvera, A., Sibila, M., Solanes, D. & Segalés, J. (2010). Correlation between clinico-pathological outcome and typing of *Haemophilus parasuis* field strains. *Vet Microbiol* **142**, 387–393.
- Cerdà-Cuellar, M. & Aragon, V. (2008). Serum-resistance in *Haemophilus parasuis* is associated with systemic disease in swine. *Vet J* **175**, 384–389.
- Dubray, G. & Limet, J. (1987). Evidence of heterogeneity of lipopolysaccharides among *Brucella* biovars in relation to A and M specificities. *Ann Inst Pasteur Microbiol* **138**, 27–37.
- Fox, K. L., Cox, A. D., Gilbert, M., Wakarchuk, W. W., Li, J., Makepeace, K., Richards, J. C., Moxon, E. R. & Hood, D. W. (2006). Identification of a bifunctional lipopolysaccharide sialyltransferase in *Haemophilus influenzae*: incorporation of disialic acid. *J Biol Chem* **281**, 40024–40032.
- Garin-Bastuji, B., Bowden, R. A., Dubray, G. & Limet, J. N. (1990). Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting analysis of smooth-lipopolysaccharide heterogeneity among *Brucella* biovars related to A and M specificities. *J Clin Microbiol* **28**, 2169–2174.
- Hood, D. W., Makepeace, K., Deadman, M. E., Rest, R. F., Thibault, P., Martin, A., Richards, J. C. & Moxon, E. R. (1999). Sialic acid in the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*: strain distribution, influence on serum resistance and structural characterization. *Mol Microbiol* **33**, 679–692.
- Hood, D. W., Cox, A. D., Gilbert, M., Makepeace, K., Walsh, S., Deadman, M. E., Cody, A., Martin, A., Månsson, M. & other authors (2001). Identification of a lipopolysaccharide α -2,3-sialyltransferase from *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol* **39**, 341–351.
- Inzana, T. J., Glindemann, G., Cox, A. D., Wakarchuk, W. & Howard, M. D. (2002). Incorporation of *N*-acetylneuraminic acid into *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide (LOS): enhancement of resistance to serum and reduction of LOS antibody binding. *Infect Immun* **70**, 4870–4879.
- Jenkins, G. A., Figueira, M., Kumar, G. A., Sweetman, W. A., Makepeace, K., Pelton, S. I., Moxon, R. & Hood, D. W. (2010). Sialic acid mediated transcriptional modulation of a highly conserved sialometabolism gene cluster in *Haemophilus influenzae* and its effect on virulence. *BMC Microbiol* **10**, 48.

- Jin, H., Wan, Y., Zhou, R., Li, L., Luo, R., Zhang, S., Hu, J., Langford, P. R. & Chen, H. (2008). Identification of genes transcribed by *Haemophilus parasuis* in necrotic porcine lung through the selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Environ Microbiol* **10**, 3326–3336.
- Jones, P. A., Samuels, N. M., Phillips, N. J., Munson, R. S., Jr, Bozue, J. A., Arseneau, J. A., Nichols, W. A., Zaleski, A., Gibson, B. W. & Apicella, M. A. (2002). *Haemophilus influenzae* type b strain A2 has multiple sialyltransferases involved in lipooligosaccharide sialylation. *J Biol Chem* **277**, 14598–14611.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lichtensteiger, C. A. & Vimr, E. R. (1997). Neuraminidase (sialidase) activity of *Haemophilus parasuis*. *FEMS Microbiol Lett* **152**, 269–274.
- Lichtensteiger, C. A. & Vimr, E. R. (2003). Purification and renaturation of membrane neuraminidase from *Haemophilus parasuis*. *Vet Microbiol* **93**, 79–87.
- Marion, C., Burnaugh, A. M., Woodiga, S. A. & King, S. J. (2011). Sialic acid transport contributes to pneumococcal colonization. *Infect Immun* **79**, 1262–1269.
- Marti-Llitas, P., López-Gómez, A., Mauro, S., Hood, D. W., Viadas, C., Calatayud, L., Morey, P., Servin, A., Liñares, J. & other authors (2011). Nontypable *Haemophilus influenzae* displays a prevalent surface structure molecular pattern in clinical isolates. *PLoS ONE* **6**, e21133.
- Nakamura, S., Shchepetov, M., Dalia, A. B., Clark, S. E., Murphy, T. F., Sethi, S., Gilsdorf, J. R., Smith, A. L. & Weiser, J. N. (2011). Molecular basis of increased serum resistance among pulmonary isolates of non-typeable *Haemophilus influenzae*. *PLoS Pathog* **7**, e1001247.
- Olvera, A., Cerdà-Cuéllar, M. & Aragon, V. (2006). Study of the population structure of *Haemophilus parasuis* by multilocus sequence typing. *Microbiology* **152**, 3683–3690.
- Olvera, A., Ballester, M., Nofrarias, M., Sibila, M. & Aragon, V. (2009). Differences in phagocytosis susceptibility in *Haemophilus parasuis* strains. *Vet Res* **40**, 24.
- Potier, M., Mameli, L., Bélisle, M., Dallaire, L. & Melançon, S. B. (1979). Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminate) substrate. *Anal Biochem* **94**, 287–296.
- Rapp-Gabrielson, V., Oliveira, S. & Pijoan, C. (2006). *Haemophilus parasuis*. In *Diseases of Swine*, pp. 681–690. Edited by B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire & D. J. Taylor. Ames, IA: Iowa State University Press.
- Steenbergen, S. M., Lichtensteiger, C. A., Caughlan, R., Garfinkle, J., Fuller, T. E. & Vimr, E. R. (2005). Sialic acid metabolism and systemic pasteurellosis. *Infect Immun* **73**, 1284–1294.
- Takao, A., Nagamune, H. & Maeda, N. (2010). Sialidase of *Streptococcus intermedius*: a putative virulence factor modifying sugar chains. *Microbiol Immunol* **54**, 584–595.
- Tsai, C. M. & Frasch, C. E. (1982). A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **119**, 115–119.
- Xu, Z., Yue, M., Zhou, R., Jin, Q., Fan, Y., Bei, W. & Chen, H. (2011). Genomic characterization of *Haemophilus parasuis* SH0165, a highly virulent strain of serovar 5 prevalent in China. *PLoS ONE* **6**, e19631.

Edited by: D. W. Hood