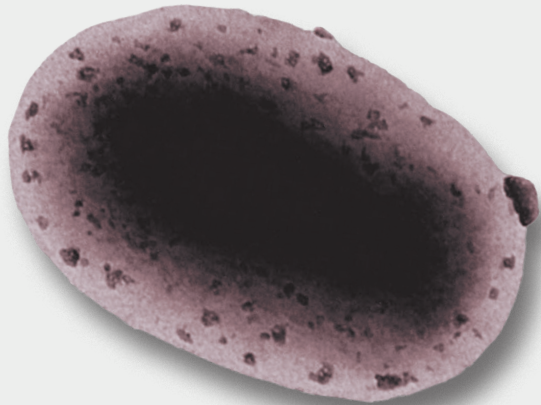


TESIS DOCTORAL

Estudio del sistema Wzm/Wzt en
Brucella y evaluación del candidato
vacunal Rev1 Δ wzm frente a la
brucelosis ovina

SARA MENA BUENO



Dirigida por
Dra. María Jesús Grilló Dolset

Pamplona, 2022

Departamento de Agronomía, Biotecnología y Alimentación
Universidad Pública de Navarra (UPNA)

Instituto de Agrobiotecnología
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y Gobierno de Navarra

Tesis doctoral

Estudio del sistema *Wzm/Wzt* en *Brucella* y evaluación del candidato vacunal *Rev1Δwzm* frente a la brucelosis ovina

Directora de tesis

Dra. María Jesús Grilló Dolset, científica titular del CSIC

Tutora y directora de la ayuda de tesis

Dra. Inmaculada Farrán Blanch, profesora contratada doctora UPNA

Tesis doctoral para optar al grado de doctora presentada por

Sara Mena Bueno

Pamplona, diciembre de 2022

La Dra. María Jesús Grilló Dolset, científica titular del CSIC,

INFORMA:

Que la presente memoria de tesis doctoral titulada «Estudio del sistema Wzm/Wzt en *Brucella* y evaluación del candidato vacunal Rev1 Δ wzm frente a la brucelosis ovina», elaborada por Sara Mena Bueno, ha sido realizada bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para optar al grado de doctora.

Y, para que así conste, lo firma en Pamplona a 1 de diciembre de 2022

Fdo.: María Jesús Grilló Dolset

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Presidenta

Dra. Miren Itziar Alcorta Calvo

Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)

Suplente

Dr. Ramsés Reina Arias

Instituto de Agrobiotecnología (IdAB), CSIC-Gobierno de Navarra

Vocal

Dra. Núria Clusella Piqué

Universitat de Barcelona (UB)

Suplente

Dr. Lorenzo José Fraile Sauce

Universitat de Lleida (UdL)

Secretario

Dr. Julio Benavides Silván

Instituto de Ganadería de Montaña (IGM), CSIC-Universidad de León (ULE)

Suplente

Dra. Lourdes Migura García

Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)

REVISORES EXTERNOS

Dra. Núria Clusella Piqué | UB

Suplente

Dra. Lourdes Migura García | CReSA, IRTA

Dra. Miren Itziar Alcorta Calvo | UPV/EHU

Suplente

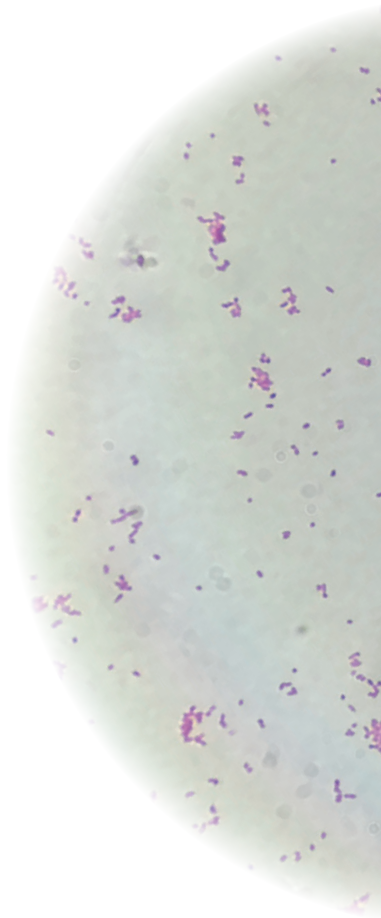
Dr. Julio Benavides Silván | IGM, CSIC-ULE

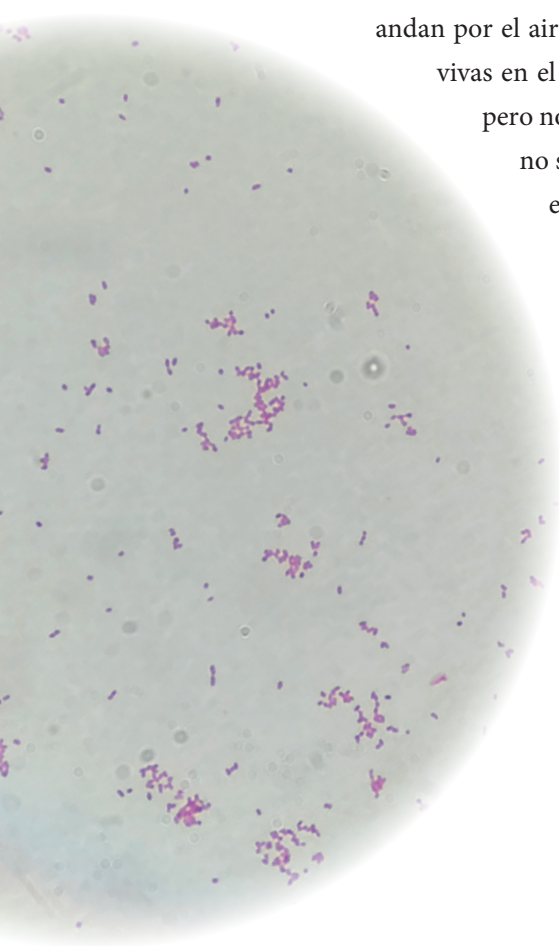
La realización de la presente tesis doctoral ha sido posible gracias a la obtención de un contrato del Programa de Ayudas para la Formación de Personal Investigador Predoctoral de la UPNA 2018-2022, disfrutada en el Instituto de Agrobiotecnología (IdAB; CSIC-Gobierno de Navarra).

Los trabajos realizados han sido financiados por los proyectos de investigación del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (AGL2014-58795-C4-2-R y RTI2018-098658-B-C21) y del Gobierno de Navarra (PT040-2018 y PT007-2019).



*A mi padre y mis abuelos,
porque sé que estarían orgullosos*



A circular inset showing a microscopic view of numerous small, purple-stained bacteria, likely bacilli, scattered across a light-colored background.

«—¿Por qué cierra usted el cuarto? —le preguntó una vez—. Yo quiero que esté abierto. ¿Oye usted? La criada apenas sabía castellano, y después de una charla confusa le contestó que cerraba el cuarto para que no entrara el sol. —Si es que yo quiero precisamente eso —le dijo Andrés—. ¿Usted ha oído hablar de los microbios? —Yo, no, señor. —¿No ha oído usted decir que hay unos gérmenes..., una especie de cosas vivas que andan por el aire y que producen las enfermedades? —¿Unas cosas vivas en el aire? Serán las moscas. —Sí; son como las moscas, pero no son las moscas. —No; pues no las he visto. —No, si no se ven; pero existen. Esas cosas vivas están en el aire, en el polvo, sobre los muebles..., y esas cosas vivas, que son malas, mueren con la luz... ¿Ha comprendido usted? —Sí, sí, señor. —Por eso hay que dejar las ventanas abiertas... para que entre el sol. Efectivamente; al día siguiente las ventanas estaban cerradas, y la criada vieja contaba a las otras que el señorito estaba loco, porque decía que había unas moscas en el aire que no se veían y que las mataba el sol.»

Pío Baroja, El árbol de la ciencia

Me gustaría comenzar transmitiendo mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido, de un modo u otro, a hacer posible este trabajo. En primer lugar, a mi directora María Jesús Grilló, gracias por querer que formara parte de tu equipo y darme así la oportunidad de disfrutar de esta bonita línea de investigación, es mucho lo que he aprendido en estos años y no solamente de *Brucella*, y gracias por dar valor a mis propuestas y transmitirme el poder de la perseverancia. Y a mi tutora de la universidad Inmaculada Farran, por su disposición, prontitud y ayuda en los asuntos burocráticos.

A los profesionales que han ofrecido su saber a lo largo de este camino. A todo el equipo de VISAVET y MAEVA que ha intervenido en los estudios en ovino; es muy amplia la lista de nombres, pero, en especial, agradecer a Marta, María, Teresa, Arancha y Álvaro todo su trabajo y amable acogida, y a Lucas Domínguez por embarcarnos en esta colaboración. A Manuel Barrón, del Laboratorio de Calidad Alimentaria de Navarra, por facilitarnos la realización de pruebas serológicas. A Itziar Alcorta, Loli Martín y Ricardo Andrade de la UPV/EHU, por sugerir ideas, facilitar el acceso a diversos recursos y asistirnos en su empleo. A Felipe Cava y Oihane Irazoki, de la Universidad de Umeå, por su rápida disposición, gran experiencia y cuidada labor en el análisis de pared celular. A Daniel Asensio y demás contactos de RPD, por compartir incansablemente su bagaje en el campo de los medios de cultivo y su fascinación por la microbiología. Y a John, por sus revisiones del inglés y sus palabras de ánimo.

A mis compañeros. A Irati, tantos años mano a mano hicieron que hasta nos vistiéramos igual y no sólo con el buzo blanco, gracias por hacer fácil el trabajo y ser un punto de apoyo; las excursiones a la granja cobraron otra dimensión contigo. A Iñaki, Edurne, Vicky, Ana, Ainara y las distintas personas con las que he coincidido en el laboratorio durante este tiempo, por los consejos, las charlas de motivación y todo lo vivido con cada uno de vosotros. A Leyre, por acogerme, enseñarme y acompañarme en mis primeros pasos en el laboratorio, y prestarme tu ayuda y experiencia en *Brucella*. Y a todas las personas que dan vida al Instituto, por los ratos de café y tortillas, calderetes, Goldaratz, *validab* y otras actividades que han animado el día a día y *fiestas de guardar*.

Al grupo de cámara de la UPNA, a Héctor, por dirigirlo con enorme ilusión y competencia, por devolverme a la música y hacer que terminara las *miniprep* con una sonrisa.

II

A mi familia: a mi abuelo, mi abuela, mis tíos, mi tía, mi madrina y, en especial, a mi madre y a mi padre. Por inculcarme desde pequeña la importancia del conocimiento, de la cultura, de la curiosidad y del espíritu crítico. Por darme el privilegio de tener acceso a una buena educación y respaldarme en todas mis elecciones. Y por desarrollar un genuino entusiasmo por la biología.

A Pedro, porque eres *casa* allá donde estemos. No hay palabras para describir todo lo que significas, gracias por tu apoyo y comprensión constantes; hacemos un equipazo.

A mis amigos, porque «se hace camino al andar», pero sólo se puede llegar lejos si lo allana buena gente. A mis 7F de Valladolid: Yara, Sheila, Paula, Silvia, Carolina y Ester, por todas las historias compartidas desde que tengo uso de razón, y a *los chicos*, por escuchar las mismas anécdotas una y otra vez; gracias por tantos buenos ratos. A Alba y Andrea, porque crecer juntas entre chopos, pinos y niscalos seguro que contribuyó a despertar una manera de ver el mundo, que aún seguimos arreglando largo y tendido. A Richi, por nuestras charlas aprendiendo sobre ciencia y nosotros mismos, y a Marisa, Gabri y toda la Panda de Biólogos, gracias a vosotros nuestra carrera fue aún más bonita y nos inspiró a querer conocer y enseñar. A mis Marinas, porque decís ser «normales» pero sois excepcionales, y a Raquel, Pablo y el resto de mis compañeros del Fray, porque aquella época en Salamanca marcó un punto de inflexión que seguimos recordando. A las *Mistas* del Máster, Santiago no habría sido lo mismo sin vosotras. A mi otra familia y amigos *políticos*, por ser los cimientos de mi equipo. A Diego, mi reciente gran descubrimiento; se puede encontrar mucho buscando cerca. Y, como cabeza de cartel, a los miembros del Almuerco: a Marta, por esa conexión y compañía desde el primer día, a Javi, Leticia, Lara, Marta y Pedro, por hacer que estos años en Pamplona hayan estado repletos de buenos recuerdos, planes y risas; me llevo grandes personas.

Y, finalmente, a toda la comunidad científica que *habita* internet y comparte desinteresadamente sus dudas, soluciones, información y herramientas. Por proporcionar un acceso a la ciencia más libre e igualitario.

Gracias a todos,

Sara

Siglas y abreviaturas utilizadas en esta tesis

A	Adenina
aa	Aminoácido
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AHL	<i>N</i> -Acil homoserina lactonas
Ala	Alanina
AM	Antimicrobianos del suplemento BSM
AnfoB	Anfotericina B
ANOVA	Análisis de la varianza
APC	Células presentadoras de antígeno
APS	Persulfato de amonio
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARRIVE	Animal Research: Reporting of In vivo Experiments
Asp	Aspartato
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosín trifosfato
BAB	Blood Agar Base n.º 2
BAB-S	BAB con NBCS al 5 %
Baci	Bacitracina
BCV	Vacuola contenedora de <i>Brucella</i>
BHI	Brain Heart Infusion Broth
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BM	<i>Brucella</i> Medium
BruSIC	Medio <i>Brucella</i> Selective Improved Culture
BSL	Nivel de bioseguridad
BSM	<i>Brucella</i> Selective Medium
bv	Biovar
C	Citosina
CBM	Módulo de unión a carbohidratos
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CFT	Test de fijación del complemento

VI

Ciclo	Cicloheximida
CIOMG	Consejo Interministerial de Organismos Modificados Genéticamente
CM	Medio CITA desarrollado por el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón
Cm	Cloranfenicol
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
Col	Colistina
Ct	Ciclo umbral
Dcho.	Derecho
DIVA	Diferenciación entre animales infectados y vacunados
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato
DO	Densidad óptica
Dx	Doxiciclina
E	Eficiencia
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
ELISA-R/LPS	ELISA indirecto anti-R-LPS INgezim <i>Brucella ovis</i> , Ingenasa
EPI	Equipo de protección individual
EPS	Sustancias poliméricas extracelulares
<i>F</i>	Cebador <i>forward</i>
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FB	Ficogenic Broth®
FELASA	Federación de Asociaciones Europeas de las Ciencias del Animal de Laboratorio
FEMS	Federation of European Microbiological Societies
FIC	Índice de concentración inhibitoria fraccional
Fig.	Figura
FM	Medio de Farrell
G	Guanina
GALVmed	Alianza Mundial para los Medicamentos Veterinarios del Ganado
Glu	Glutamato

Gly	Glicina
Gm	Gentamicina
HN	Hapteno nativo
HRP	Peroxidasa del rábano
HS	Extracto salino caliente
ICSP	Comité Internacional de Sistemática Procariota
IdAB	Instituto de Agrobiotecnología de Navarra
<i>i. e.</i>	<i>Id est</i>
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina 6
IP	Intraperitoneal
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
IS	Secuencia de inserción
Izdo.	Izquierdo
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KDO	Ácido 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosónico
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
Km	Kanamicina
<i>lac</i>	Operón lactosa
LB	Luria Bertani Broth
LCA	Laboratorio de Calidad Agroalimentaria de Navarra
LCSA	Laboratorio Central de Sanidad Animal de Santa Fe, Granada
Ldt	Enzimas L,D-transpeptidasas
Leu	Leucina
Log	Logaritmo decimal
LPS	Lipopolisacárido
LSD	Prueba de las mínimas diferencias significativas
mAb	Anticuerpo monoclonal
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz con detección de masas por tiempo de vuelo
mCITA	Medio Modified CITA
mDAP	Acido meso-diaminopimélico
MBS	Medio Modified <i>Brucella</i> Selective
MH	Caldo Müller-Hinton

VIII

MS	Espectrometría de masas
MW	Marcador de peso molecular
n.º	Número
NA	No aplica
NAcMur	Ácido <i>N</i> -acetilmurámico
NAcGlc	<i>N</i> -Acetilglucosamina
Nal	Ácido nalidíxico
NBCS	Newborn Calf Serum
NBD	Dominio de unión a nucleótido
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ND	No determinado
Neu5Ac	Ácido <i>N</i> -acetilneuramínico
Nista	Nistatina
Nitro	Nitrofurantoína
NM	No mutada
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OM	Membrana externa
OMG	Organismo modificado genéticamente
OMPI	Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
OMS	Organización Mundial de la Salud
OMV	Vesículas de membrana externa
O-PS	Polisacárido O
ORF	Secuencia del marco abierto de lectura
P	Penicilina G
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
pb	Par de bases
PBP	Proteína de unión a penicilinas
PBS	Tampón fosfato salino
Pc	Plásmido de complementación
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCT	Tratado de cooperación en materia de patentes
PG	Peptidoglicano
PI	Post-inoculación
Pro	Prolina
PxB	Polimixina B

qPCR	PCR cuantitativa
R	Cebador <i>reverse</i>
R	Rugoso
RBT	Técnica de Rosa de Bengala
RBTm	RBT modificado
RD	Real Decreto
Ref.	Referencia
Rf	Rifampicina
RFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción
RFU	Unidades de fluorescencia relativa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPD	Reactivos para Diagnóstico, S.L.
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción inversa
S	Liso
SC	Subcutánea
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Error estándar de la media
SOP	Standard Operating Procedure
Str	Estreptomicina
Subsp.	Subespecie
T	Timidina
Ta	Temperatura de anillamiento
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
T _{amb}	Temperatura ambiente
TEM	Microscopio electrónico de transmisión
TEMED	Tetrametiletilendiamina
tg	Tiempo de generación
TLR	Receptores Toll- <i>like</i>
TM	Medio de Thayer-Martin
Tm	Temperatura de desnaturalización
TMD	Dominios transmembrana
TMm	Medio de Thayer-Martin modificado
TSA	Trypticase Soy Agar
TSB	Trypticase Soy Broth

X

TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
U	Unidad de actividad enzimática
UCM	Universidad Complutense de Madrid
UFC	Unidad formadora de colonias
UI	Unidad internacional
UIFC	Unidades internacionales del CFT
Und-P	Undecaprenil-fosfato
UniProt	Universal Protein Knowledgebase
V	Vancomicina
VISAVET	Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria, UCM
vs.	Versus
WAHIS	Sistema Mundial de Información Zoonosológica
WB	Western Blot
<i>WT</i>	Fenotipo <i>wild type</i>
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
X-Neu5Ac	5-Bromo-4-cloro-3-indolil-N-acetil- α -D-Neu5Ac

Resumen

La brucelosis es una enfermedad zoonótica causada por bacterias del género *Brucella* que, además, conlleva grandes pérdidas económicas. La principal fuente de infección para el ser humano son los rumiantes, en los que la enfermedad cursa con aborto y otras alteraciones reproductivas. En la mayoría de las regiones afectadas, la vacunación de los animales es la única estrategia realista para controlar la infección. La cepa atenuada *B. melitensis* Rev1 es la única vacuna recomendada frente a la brucelosis ovina y caprina, pero posee ciertos inconvenientes, entre los que destacan la virulencia en ovejas gestantes, la interferencia serológica que generan, la posibilidad de infectar al ser humano y la resistencia a los tratamientos con estreptomycin, que instan la búsqueda de nuevas vacunas.

El lipopolisacárido liso (S-LPS) de *Brucella* es un conocido factor de virulencia y también el antígeno inmunodominante en las pruebas de diagnóstico, por lo que sus distintas modificaciones representan una interesante aproximación en la búsqueda de una vacuna segura. Entre las rutas de biosíntesis del S-LPS, el sistema de dos componentes Wzm/Wzt es el responsable de transportar el O-PS sintetizado en la cara citoplasmática de la membrana interna hasta el espacio periplasmático, para su posterior ensamblaje al *core*-lípid A para formar el S-LPS. El bloqueo de esta ruta conlleva la creación de mutantes con LPS rugoso (R-LPS) capaces de acumular un O-PS dentro de las bacterias que puede ser decisivo para generar una respuesta inmune efectiva frente a la infección. Sin embargo, aún se desconocen las implicaciones biológicas de cada proteína del transportador. En particular, el bloqueo del O-PS podría acarrear modificaciones en la envuelta bacteriana, ya que su transporte requiere la participación del bactoprenol como molécula portadora, el cual también está involucrado en la biosíntesis de otras estructuras celulares.

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de este sistema transportador de *Brucella* y su potencial aplicación en el desarrollo de vacunas, en el **capítulo 1** de esta tesis se presenta la construcción y caracterización de mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ simples y doble derivados de Rev1. Además, con fines comparativos, se construyeron mutantes Δwzm derivados de *B. abortus* 2308 y S19, y se utilizó un mutante 16M Δwzm derivado de la cepa virulenta *B. melitensis* 16M previamente desarrollado en el grupo de Sanidad Animal del Instituto de Agrobiotecnología (IdAB). Como resultado, los mutantes carentes de O-PS externo exhibieron cambios de expresión génica, propiedades antigénicas del O-PS interno y cambios fenotípicos asociados a modificaciones de la membrana externa y/o de la pared celular. Además, los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ fueron muy susceptibles

tanto a polimixinas como a los antibióticos utilizados para el tratamiento de la brucelosis humana, en particular, a la estreptomina; y mostraron una gran atenuación en ratón. Entre ellos, Rev1 Δ wzm destacó por inducir un pico de esplenomegalia transitoria, ser altamente inmunogénico y generar una protección eficaz frente a la infección virulenta por *B. melitensis* y por *B. ovis* en el modelo murino.

En el **capítulo 2**, antes de estudiar la seguridad de Rev1 Δ wzm en su hospedador natural, se determinó la capacidad de este candidato vacunal para crecer en los medios de cultivo selectivos Farrell (FM) y CITA (CM), actualmente recomendados para el aislamiento primario de *Brucella*. La fuerte susceptibilidad del mutante a las polimixinas y la sinergia observada entre colistina y vancomicina conllevaron una severa inhibición de este candidato vacunal en ambos medios selectivos. Para resolverlo, se reformuló y evaluó el denominado *Brucella* Selective Medium (BSM) que, tras su evaluación con más de 1.700 muestras ovinas de campo, demostró ser capaz de mejorar el rendimiento de los medios anteriores. Además, profundizando en la productividad de BSM para otras brucellae, se observó que tanto BSM como CM inhibían el crecimiento de una colección de cepas *B. abortus* bv1. El análisis de las posibles causas llevó al desarrollo un segundo medio selectivo denominado *Brucella* Selective Improved Culture (*BruSIC*) que resultó permisivo para todas las cepas de *Brucella* analizadas y tan inhibitorio como CM para las bacterias contaminantes habituales en muestras veterinarias. *BruSIC* ofrece la ventaja adicional de no precisar suero bovino para el aislamiento de cepas de *Brucella* suero-dependientes, lo que simplifica la preparación del medio, abarata costes y evita el uso de compuestos de origen animal.

En el **capítulo 3**, se analizó la seguridad y respuesta inmune inducidas en corderos inoculados con Rev1 Δ wzm, demostrando que se activa la formación de anticuerpos sin interferir en las pruebas serológicas estándar para el diagnóstico de la brucelosis. Estos resultados, más otros logrados por el grupo de investigación en ganado adulto y en ovejas gestantes, hacen de este mutante un prometedor candidato vacunal para el control de la infección por *B. melitensis* y *B. ovis* en pequeños rumiantes.

El contenido de estos tres capítulos de tesis ha sido publicado en las revistas científicas *Frontiers in Microbiology* (grupo Frontiers) y *Microbiology Spectrum* (ASM).

Abstract

Brucellosis is a zoonotic disease caused by bacteria of the genus *Brucella*, that also entails large economic losses. The main infection source for humans are ruminants, in which the disease induces abortion and other reproductive disorders. In most affected regions, vaccinating animals is the only realistic strategy to control the infection. The attenuated strain *B. melitensis* Rev1 is the only recommended vaccine against ovine and caprine brucellosis, but it has several drawbacks, such as virulence when administered in pregnant animals, serological interference, possibility of infecting humans, and resistance to treatments including streptomycin, that urge the search for new vaccines.

The smooth lipopolysaccharide (S-LPS) is a well-known virulence factor and the immunodominant antigen in diagnostic tests, thus, its modifications represent an interesting approach in the research for a safe vaccine. Among S-LPS biosynthesis pathways, the Wzm/Wzt two-component system is the responsible of transporting the O-PS synthesised onto the cytoplasmic side of the inner membrane to the periplasm, for its subsequent assembly to the core-lipid A to form the S-LPS. Blocking this pathway leads to the generation of rough LPS (R-LPS) mutants capable of accumulating O-PS within the bacteria, that may be decisive for an effective immune response against the infection. However, the biological implications of each transporter protein are still unknown. In particular, the O-PS blockage could lead to modifications in bacterial envelope, since the O-PS transport requires the participation of bactoprenol as a carrier molecule, that is also involved in the biosynthesis of other cellular structures.

Aiming to deepen the knowledge about this system and its potential application in vaccines development, in **Chapter 1** of this thesis, it is presented the construction and characterisation of single and double $\Delta wzm/\Delta wzt$ mutants derived from Rev1. In addition, for comparative purposes, Δwzm mutants were constructed from *B. abortus* 2308 and S19 and studied together with a $16M\Delta wzm$ mutant, derived from the *B. melitensis* 16M virulent strain previously developed in the Animal Health Group of the Institute of Agrobiotechnology (IdAB). As a result, the mutants lacking outer O-PS exhibited changes in gene expression, antigenic properties of inner O-PS, and phenotypic changes associated with outer membrane and/or cell wall modifications. In addition, Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ mutants were highly susceptible to polymyxins and other antibiotics used in human brucellosis treatment, particularly, to streptomycin; and they showed a large attenuation in mouse. Among them, Rev1 Δwzm stood out for inducing a transient peak of splenomegaly,

being highly immunogenic, and generating effective protection against *B. melitensis* and *B. ovis* virulent infections in murine model.

In **Chapter 2**, prior to studying the safety of Rev1 Δ wzm in the natural host, it was determined the ability of this vaccine candidate to grow in Farrell (FM) and CITA (CM) selective culture media, currently recommended for *Brucella* primary isolation. The mutant strong susceptibility to polymyxins and the synergy between colistin and vancomycin observed led to the severe inhibition of the vaccine candidate in both selective media. To solve this, the named *Brucella* Selective Medium (BSM) was reformulated and evaluated with more than 1,700 ovine field samples, being able to improve the previous media performance. Furthermore, by exploring the productivity of BSM for other brucellae, it was observed that both BSM and CM inhibited the growth of a *B. abortus* bv1 strains collection. The analysis of the possible causes led to the development of a second selective medium called *Brucella* Selective Improved Culture (*BruSIC*), which was permissive for all the *Brucella* strains analysed, and as inhibitory as CM for the usual contaminant bacteria in veterinary samples. In addition, *BruSIC* offers the advantage of not requiring bovine serum to isolate serum-dependent *Brucella* strains, simplifying medium preparation, lowering costs and avoiding the use of compounds from animal sources.

In **Chapter 3**, it was analysed the safety and immune response induced in lambs inoculated with Rev1 Δ wzm, demonstrating the activation of antibodies development without interfering in the standard serological tests for brucellosis diagnosis. These results, as well as others achieved by the research group in adult cattle and pregnant sheep, make this mutant a promising vaccine candidate to control *B. melitensis* and *B. ovis* infections in small ruminants.

The content of these three thesis chapters has been published in the scientific journals *Frontiers in Microbiology* (Frontiers group) and *Microbiology Spectrum* (ASM).

Introducción general

La brucelosis	3
Una pincelada histórica	5
Clasificación taxonómica	6
Interacción patógeno-hospedador	7
Prevención de la infección por <i>B. melitensis</i>	9
Importancia del lipopolisacárido	12
Ruta de biosíntesis del O-PS	14
Genes implicados en la polimerización y transporte del O-PS	17
Conformación molecular del O-PS	19
Cepas rugosas de <i>B. melitensis</i> como candidatos vacunales	21
Desarrollo de medios de cultivo	23
Modelos animales en la experimentación con <i>Brucella</i>	24
Bibliografía	29

Hipótesis de trabajo y objetivos

Hipótesis	49
Objetivo general	49
Objetivos específicos	49

Capítulo 1

«Estudio del sistema transportador Wzm/Wzt en *Brucella* y desarrollo del candidato vacunal Rev1 Δ wzm»

Introducción 53

Materiales y métodos 55

1. Generalidades: cepas, condiciones de cultivo y preparación de inóculos 55

2. Construcción de mutantes Δ wzm/ Δ wzt 58

2.1. Generalidades: análisis genético *in silico*, extracción y purificación de ADN, diseño de cebadores, condiciones de PCR y preparación de células quimiocompetentes 58

2.3. Conjugación y doble recombinación homóloga 64

3. Estudios de caracterización fenotípica *in vitro* 67

3.1. Tipificación convencional 67

3.3. Análisis de R-LPS y O-PS en los mutantes Δ wzm/ Δ wzt 68

3.5. Análisis transcripcional 72

3.6. Susceptibilidad a los antibióticos de elección para el tratamiento de la brucelosis humana	74
3.7. Susceptibilidad a factores ambientales	76
3.8. Propiedades de OM: autoaglutinación, carga de superficie, hidrofobicidad y estudios de <i>biofilm</i>	77
3.9. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	78
3.10. Estudios de pared celular: estrés osmótico y susceptibilidad a penicilina y vancomicina	79
3.11. Cromatografía líquida de ultra-alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS)	80
3.12. Susceptibilidad a factores solubles del sistema inmune	81
3.12.1. Modelo de péptidos catiónicos de respuesta innata	81
3.12.3. Inhibición mediada por anticuerpos	82
4. Estudios <i>in vivo</i> en modelo murino	83
4.1. Bioseguridad y ética en la experimentación animal	83
4.2. Procedimientos generales de experimentación con ratones	83
4.3. Curvas de multiplicación bacteriana en bazo y perfil de citoquinas	84
Resultados	87
1. Los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ muestran la delección esperada	87
2. En los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ se aumenta la transcripción de <i>wbkB</i> y <i>wbKC</i> , y en Δwzm se sobrexpresas <i>wzt</i>	89
3. Los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ poseen el fenotipo esperado, con un R-LPS y O-PS en el citoplasma	92
4. Los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ presentan una susceptibilidad incrementada a ciertos antibióticos	97
5. La envuelta celular sufre cambios pleiotrópicos debido al bloqueo del transporte de O-PS	99
5.1. Indicadores de configuración de OM: susceptibilidad a safranina O, autoaglutinación, carga de superficie, hidrofobicidad, formación de <i>biofilm</i> y producción de EPS	100
5.2. Remodelación de pared celular: susceptibilidad al estrés osmótico, respuesta a antibióticos β - y no β -lactámicos y análisis del PG	103
6. Actividad de los factores solubles de la respuesta inmune frente a los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$	108

6.1. Los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ son altamente susceptibles a los péptidos catiónicos y al sistema del complemento	108
6.2. Los anticuerpos anti-Rev1 Δwzm presentes en suero ovino tienen actividad antimicrobiana <i>in vitro</i>	110
7. Rev1 Δwzm posee excelentes propiedades vacunales en el modelo murino preclínico	112
7.1. Multiplicación esplénica de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$	112
7.2. Perfil de citoquinas asociado a la esplenomegalia por Rev1 Δwzm	112
7.3. Rev1 Δwzm es más eficaz que Rev1 Δwzt frente a la infección virulenta por <i>B. melitensis</i> y protege mejor que Rev1 frente a <i>B. ovis</i> en ratones BALB/c	114
8. Rev1 Δwzm es estable y mantiene la respuesta de Rev1 ante el estrés ambiental	117
8.1. Estabilidad tras pases <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	117
8.2. Susceptibilidad a factores ambientales	118
9. Depósito de la cepa <i>B. melitensis</i> Rev1 Δwzm y transferencia de conocimiento	120
Discusión	122
Bibliografía	134

Capítulo 2

«Desarrollo de un nuevo medio de cultivo selectivo para el aislamiento de brucellae en muestras de campo»

Introducción	153
Materiales y métodos	156
1. Cepas de <i>Brucella</i> utilizadas, conservación, condiciones de cultivo y preparación de inóculos	156
2. Preparación de los medios de cultivo selectivos para <i>Brucella</i>	157
3. Estudios de susceptibilidad antibiótica	159
3.1. Estudios de actividad bacteriostática (CMI) y bactericida (CMB) de distintos agentes antimicrobianos	159
3.2. Estudios de actividad sinérgica entre vancomicina y colistina	159
3.3. Efecto de distintas concentraciones de vancomicina y colistina en CM y necesidad de NBSC para el crecimiento de Rev1 Δwzm en medios selectivos	160
3.4. Estudio del efecto inhibitorio de la colistina en medio sólido y del tiempo de almacenamiento de las placas sobre el crecimiento de <i>B. abortus</i> bv1	160
4. Evaluación de la productividad de los medios selectivos para el aislamiento de <i>Brucella</i> en condiciones de laboratorio	160

5. Monitorización de las propiedades fisicoquímicas de los medios CM y BSM, durante su almacenaje a 4 °C	161
6. Análisis de propiedades bioquímicas de <i>Brucella</i> para el desarrollo de un medio de cultivo diferencial	162
7. Estudio de suplementos para favorecer el crecimiento de <i>B. abortus</i> bv1 y otras brucellae en BSM recién preparado	164
8. Estudios de selectividad de CM, BSM y <i>BruSIC</i>	165
9. Validación de BSM y CM para el aislamiento primario de <i>B. melitensis</i> y <i>B. ovis</i> , a partir de muestras ovinas obtenidas en campo	166
10. Representación gráfica y tratamiento estadístico de los datos	167
Resultados	168
1. Crecimiento de <i>B. melitensis</i> en los medios de cultivo selectivos FM y CM	168
1.1. Los medios FM y CM son inhibitorios para <i>B. melitensis</i> y sus derivados sensibles a polimixina	168
1.2. La inhibición de Rev1 Δ wzm en CM se debe al efecto sinérgico entre vancomicina y colistina sobre esta cepa	168
2. Formulación y validación del nuevo medio BSM	169
2.1. Ajuste de las concentraciones de vancomicina y colistina para la formulación de BSM	169
2.2. BSM soluciona totalmente la inhibición de <i>B. melitensis</i> observada en FM y CM	170
2.3. BSM inhibe el desarrollo de bacterias contaminantes a los niveles de CM	171
3. Validación de BSM con muestras animales obtenidas en campo	172
3.1. BSM mejora la productividad de CM para el aislamiento primario de Rev1 Δ wzm, 16M Δ wzm y <i>B. ovis</i> PA en muestras ovinas obtenidas en campo	172
3.2. BSM conserva la selectividad de CM en muestras ovinas reales	174
4. Estudio de características bioquímicas de <i>Brucella</i> de aplicación para el desarrollo de un medio de cultivo diferencial	175
4.1. Marcaje con indicadores de pH	175
4.2. Identificación de reacciones bioquímicas diferenciales de <i>Brucella</i> para marcaje cromogénico basado en hidrolasas	175
5. BSM permite el crecimiento de otras brucellae como en BAB, pero inhibe el de <i>B. abortus</i> bv1	180
5.1. BSM y CM inhiben el crecimiento <i>B. abortus</i> bv1	180
5.2. La inhibición de <i>B. abortus</i> bv1 en CM y BSM sólo se produce en	

medio recién preparado	180
5.3. La inhibición de <i>B. abortus</i> bv1 en CM y BSM se debe a su susceptibilidad a la colistina y desaparece progresivamente con el tiempo de almacenaje de las placas previo a su uso	181
5.4. El normal crecimiento de <i>B. abortus</i> bv1 en placas almacenadas de CM y BSM no se debe a la inactivación antibiótica por pérdida de agua ni a variaciones en el pH en el medio	183
6. Formulación del nuevo medio <i>BruSIC</i> para el aislamiento selectivo de <i>Brucella</i> , incluyendo <i>B. abortus</i> bv1 en placas recién preparadas	183
6.1. El suplemento Ficogenic Broth® (FB) inhibe el crecimiento de <i>B. abortus</i> bv1	183
6.2. El carbón activado favorece el crecimiento de <i>B. abortus</i> bv1 y otras brucellae en BSM y permite reemplazar el uso de suero	184
6.3. BSM suplementado con 1 g/L de carbón activado, pero no concentraciones superiores, inhibe el desarrollo de bacterias contaminantes a los niveles de BSM	185
7.1. <i>BruSIC</i> permite el crecimiento de <i>B. abortus</i> bv1 y otras brucellae como en BAB, tanto en tamaño colonial como en número de UFC	187
7.2. <i>BruSIC</i> inhibe los microorganismos contaminantes de muestras reales de ganado ovino y bovino	187
Discusión	188
Bibliografía	194

Capítulo 3

«Seguridad del candidato vacunal Rev1 Δ wzm y respuesta serológica en corderos»

Introducción	207
Materiales y métodos	209
1. Cepas, cultivos bacterianos y preparación de inóculos de <i>Brucella</i>	209
2. Estudios en ganado ovino	210
2.1. Animales utilizados y consideraciones éticas y de bioseguridad	210
2.2. Diseño experimental	211
2.2.1. Inoculaciones	211
2.2.2. Seguimiento clínico y toma de muestras	212
3. Técnicas de diagnóstico	214
3.1. Detección de <i>Brucella</i> por qPCR	214
3.2. Bacteriología	214

3.2.1. Procesado de muestras de tejidos ovinos	214
3.2.2. Cultivo en los medios selectivos	215
3.2.3. Identificación molecular y bioquímica	215
3.3. Respuesta serológica	216
3.3.1. Pruebas frente a S-LPS	216
3.3.2. Pruebas frente a R-LPS	217
4. Representación gráfica y análisis estadístico de los resultados	217
Resultados	218
1. La inoculación con Rev1 Δ wzm o 16M Δ wzm no causa reacciones adversas en animales jóvenes ni excreción al medio ambiente	218
2. 16M Δ wzm se distribuye por el organismo más que Rev1 Δ wzm, sin infectar ninguno de ellos al aparato reproductor	219
3. Rev1 Δ wzm y 16M Δ wzm persisten en el organismo de los corderos durante menos de 8 semanas	220
4. Rev1 Δ wzm y 16M Δ wzm generan una sólida respuesta serológica frente al R-LPS con mínima interferencia frente al S-LPS	221
Discusión	223
Bibliografía	227

Discusión general, conclusiones y publicaciones

Discusión general y trabajos futuros	235
Bibliografía	240
Conclusiones	245
Publicaciones	249
<i>Brucella melitensis</i> Wzm/Wzt system: Changes in the bacterial envelope lead to improved Rev1 Δ wzm vaccine properties	253
BruSIC: A novel selective medium for the primary isolation of <i>Brucella</i> in veterinary samples	275
Vaccine properties of <i>Brucella melitensis</i> 16M Δ wzm and reactivation of placental infection in pregnant sheep	289

Índice de figuras

Capítulo 1

Fig. 1. Incidencia de la brucelosis	3
Fig. 2. Filogenia de <i>Brucella</i> spp.	6
Fig. 3. Representación de la envuelta celular de <i>Brucella</i>	13
Fig. 4. Disposición de las proteínas del sistema transportador Wzm/Wzt	16
Fig. 5. Esquema del transporte de O-PS a través de la membrana interna	17
Fig. 6. Estructura del O-PS de <i>B. melitensis</i> 16M	19
Fig. 7. Representación esquemática de las organización genética y cebadores diseñados para la construcción de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$	60
Fig. 8. Esquema de mutagénesis por solapamiento	61
Fig. 9. Mapa del vector pCR2.1	61
Fig. 10. Esquema del proceso de subclonaje para construir el plásmido pJQKm Δwzt	63
Fig. 11. Esquema de reemplazo genético mediante doble recombinación homóloga	65
Fig. 12. Vector de complementación	66
Fig. 13. Representación esquemática de los procesos de reorganización genética descritos en Rev1.	71
Fig. 14. Conformación de las proteínas del sistema Wzm/Wzt en Rev1	87
Fig. 15. Caracterización genotípica de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$	88
Fig. 16. Determinación de la eficiencia de cebadores de qPCR	89
Fig. 17. Expresión relativa de genes relacionados con la biosíntesis de O-PS	92
Fig. 18. Morfología colonial de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$	93
Fig. 19. Crecimiento <i>in vitro</i> de distintos mutantes Δwzm	94
Fig. 20. Perfil de R-LPS con <i>core</i> completo y O-PS citoplasmático en los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$	95
Fig. 21. Reconocimiento antigénico por sueros anti- <i>Brucella</i> .	96
Fig. 22. Susceptibilidad de Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ a los antibióticos de elección para el tratamiento de la brucelosis humana	99
Fig. 23. Propiedades de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ asociadas a la OM	101
Fig. 24. Morfología de los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ en TEM	102
Fig. 25. Características de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ relacionadas con propiedades de su pared celular	104

Fig. 26. Análisis de PG en UPLC-MS	107
Fig. 27. Susceptibilidad de distintos mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ a los péptidos catiónicos y complemento de la respuesta inmune innata	109
Fig. 28. Efecto bactericida (<i>bacterial killing</i>) del suero de ovinos inmunizados con 16M Δwzm o Rev1 Δwzm	111
Fig. 29. Estudios de multiplicación esplénica de mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ en ratones BALB/c	113
Fig. 30. Perfil de citoquinas en suero y bazos de ratones BALB/c inoculados con mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$	115
Fig. 31. Estudio de estabilidad de Rev1 Δwzm tras pases seriados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	118
Fig. 32. Susceptibilidad a factores ambientales	119
Fig. 33. Liófilo del candidato vacunal <i>B. melitensis</i> Rev1 Δwzm	121

Capítulo 2

Fig. 34. Suplemento liofilizado de antimicrobianos para la preparación de los medios de cultivo selectivo BSM y <i>BruSIC</i> desarrollados en esta tesis	157
Fig. 35. Inhibición de <i>B. melitensis</i> en los medios selectivos FM y CM	168
Fig. 36. Crecimiento de Rev1 Δwzm en CM con distintas concentraciones de vancomicina y colistina y en el nuevo medio BSM vs. CM	170
Fig. 37. Supervivencia de <i>B. melitensis</i> en el nuevo medio BSM	170
Fig. 38. Validación de la productividad de BSM con muestras veterinarias	173
Fig. 39. Inhibición de microorganismos contaminantes de muestras ovinas reales obtenidas en campo y sembradas en los medios selectivos BSM y CM	174
Fig. 40. Crecimiento bacteriano en distintos medios de cultivo con indicadores de pH	175
Fig. 41. Actividad neuraminidasa en <i>B. melitensis</i> Rev1 y Rev1 Δwzm	178
Fig. 42. Patrón bioquímico de <i>Brucella</i> spp. y bacterias ambientales	179
Fig. 43. Crecimiento de <i>B. abortus</i> , <i>B. ovis</i> , <i>B. suis</i> o <i>B. canis</i> en medios selectivos	180
Fig. 44. Inhibición de <i>B. abortus</i> en medios selectivos recién preparados o almacenados	181
Fig. 45. Crecimiento de <i>B. abortus</i> en medio sólido suplementado con colistina, tras distintos periodos de almacenaje	182
Fig. 46. Productividad y selectividad del nuevo medio <i>BruSIC</i> con carbón activado	186

Capítulo 3

Fig. 47. Representación esquemática de la preparación de grandes volúmenes de inóculos con alta concentración bacteriana para la vacunación de corderos	209
---	-----

Fig. 48. Grupo experimental de corderos de raza Churra inoculados en esta tesis	211
Fig. 49. Diseño experimental para la evaluación de la seguridad y respuesta inmune en corderos vacunados con Rev1 Δ wzm o 16M Δ wzm	212
Fig. 50. Muestras de corderos recogidas para estudios bacteriológicos	213
Fig. 51. Identificación molecular de los mutantes <i>B. melitensis</i> Δ wzm en Rev1 o 16M	215
Fig 52. Temperatura rectal en corderos inoculados con Rev1 Δ wzm, 16M Δ wzm o PBS (control)	218
Fig. 53. Determinación del límite de detección de Rev1 Δ wzm o 16M Δ wzm por qPCR de la IS711	218
Fig. 54. Cinética de la infección en corderos inoculados con Rev1 Δ wzm o 16M Δ wzm	220
Fig.55. Cinética de la respuesta serológica en corderos inoculados con Rev1 Δ wzm o 16M Δ wzm	221
Fig. 56. Autoaglutinación en RBT estándar	222
Fig. 57. Comparativa de la arquitectura entre parental y mutantes en el sistema Wzm/Wzt	237

Índice de tablas

Capítulo 1

Tabla 1. Genes de <i>B. melitensis</i> que codifican por proteínas de función secuencial en la biosíntesis de O-PS	18
Tabla 2. Epítomos identificados en el O-PS de <i>Brucella</i>	21
Tabla 3. Cepas de <i>Brucella</i> de la colección del IdAB empleadas y construidas en el capítulo 1	56
Tabla 4. Cepas de <i>E. coli</i> de la colección del IdAB empleadas y construidas en el capítulo 1	57
Tabla 5. Cebadores utilizados en el capítulo 1	60
Tabla 6. Productos amplificados por los distintos cebadores diseñados para distinguir los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$	62
Tabla 7. Anticuerpos y sueros utilizados en los WB	70
Tabla 8. Cebadores utilizados para comprobar la integridad genética de las regiones GI-2 y <i>wbk</i> (Mancilla et al., 2013)	71
Tabla 9. Cebadores para el análisis de expresión genética mediante qPCR	74
Tabla 10. Secuenciación y alineamiento de los genes consecutivos <i>wzm-wzt</i> en la cepa Rev1 parental y sus mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ simples y doble	90
Tabla 11. Resultado de las pruebas para la tipificación de <i>Brucella</i>	93
Tabla 12. Recuentos de los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ en presencia de antibióticos a los que Rev1 es resistente	97
Tabla 13. Acción individual o combinada sobre los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ de los antibióticos de elección para tratamiento de la brucelosis humana	98
Tabla 14. Cantidad y composición relativas de PG en <i>B. melitensis</i> Rev1, 16M y sus derivados $\Delta wzm/\Delta wzt$	106
Tabla 15. Valores de CMI y CMB a la PxB para <i>B. melitensis</i> Rev1 y 16M, <i>B. abortus</i> 2308 y S19, y sus mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$	108
Tabla 16. Eficacia vacunal de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ frente a la infección virulenta por <i>B. melitensis</i> , <i>B. ovis</i> y/o <i>B. abortus</i> en ratones BALB/c	116
Tabla S1. Resumen de las propiedades vacunales de distintos mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ de <i>Brucella</i> spp. en modelos murinos	134

Capítulo 2

Tabla 17. Cepas de <i>Brucella</i> utilizadas en el capítulo 2	156
Tabla 18. Composición de los medios de cultivo selectivos para <i>Brucella</i> utilizados en el capítulo 2	158

XXXIV

Tabla 19. Actividad individual y combinada de los antimicrobianos del medio CM frente a Rev1 Δ wzm y su parental Rev1	169
Tabla 20. Inhibición en BSM y CM de bacterias contaminantes habituales en muestras veterinarias	171
Tabla 21. Selección de enzimas con actividad hidrolasa anotadas en UniProt para <i>B. melitensis</i> consideradas de interés para el desarrollo de un medio cromogénico	176
Tabla 22. Patrón de utilización de sustratos y susceptibilidad química de <i>Brucella</i>	177
Tabla 23. Susceptibilidad de distintas cepas de <i>B. melitensis</i> y <i>B. abortus</i> a la colistina	182
Tabla 24. Estudio de crecimiento de <i>Brucella</i> con el extracto Ficogenic Broth® (FB)	184
Tabla 25. Inhibición de microorganismos contaminantes en muestras veterinarias reales sembradas en los medios selectivos BSM y BruSIC	187

Capítulo 3

Tabla 26. Distribución de Rev1 Δ wzm y 16M Δ wzm en corderos	219
--	-----

Introducción general

La brucelosis

La brucelosis es una enfermedad bacteriana ampliamente extendida por todo el mundo (Fig. 1) con especial incidencia en países de Latinoamérica, Oriente Medio, Asia Central, África y la región Mediterránea (Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2018a; Pappas et al., 2006). Afecta a un gran abanico de animales, tanto salvajes como domésticos, entre los que destacan el ganado ovino, caprino, bovino y porcino como principales reservorios. Dada su preferencia por el sistema reproductor de mamíferos, en los animales se caracteriza por provocar esterilidad y abortos, acompañados de la excreción de la bacteria en semen, descargas uterinas y leche. El contagio entre animales sucede por contacto a través de las mucosas con estas secreciones contaminadas, en las que las bacterias pueden sobrevivir hasta varios meses (FAO, 2009; OIE, 2022).

La aparición de un brote de brucelosis implica una considerable disminución de la producción con consiguientes enormes pérdidas económicas. Tanto es así, que la Organización Mundial de la Salud (OMS) actualmente considera a la brucelosis como una *enfermedad olvidada* que contribuye a la perpetuación de la pobreza en poblaciones que cuentan con pocos recursos (Franc et al., 2018; Moreno, 2014; World Health Organization, 2020).

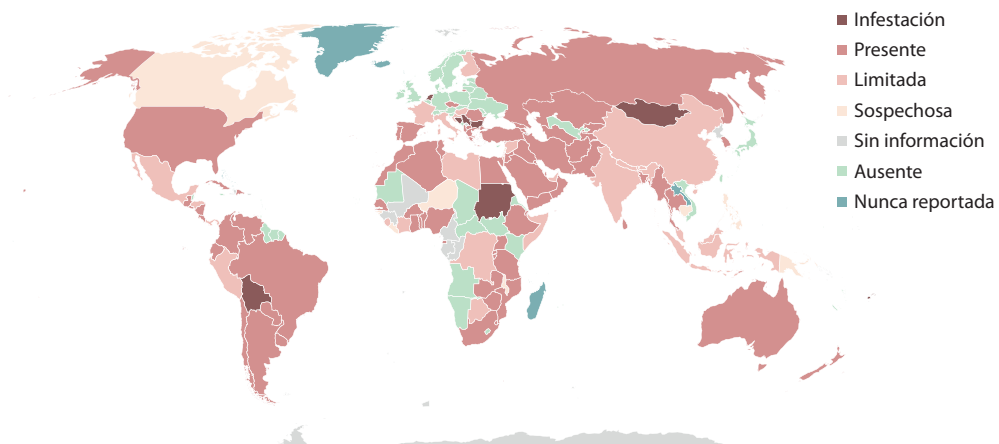


Fig. 1. Incidencia de la brucelosis. Situación de la enfermedad en los distintos tipos de animales domésticos y silvestres susceptibles, organizada a partir de los datos del periodo 2018-2022 publicados en el Sistema Mundial de Información Zoonosaria (WAHIS) de la OIE (<https://wahis.oie.int>), que recoge notificaciones e informes oficiales enviados por los servicios veterinarios pertinentes.

Esta enfermedad es considerada una zoonosis, ya que es posible su transmisión desde los animales al ser humano. De hecho, se estima que cada año se infectan de brucelosis en todo el mundo más de 5 millones de personas —incluyendo los numerosos casos que se presumen sin reportar (Laine et al., 2022)— como consecuencia del contacto directo con animales enfermos y el consumo de productos alimentarios contaminados (Dadar et al., 2020; Hull y Schumaker, 2018; O’Callaghan, 2020), entre los que se incluyen la leche e incluso la carne (Higgins et al., 2017). La implantación de campañas de educación en salud pública y políticas enfocadas a evitar el consumo de productos lácteos no pasteurizados resulta, por tanto, fundamental para prevenir contagios. Además, la brucelosis es considerada una enfermedad ocupacional frecuente en veterinarios, granjeros, matarifes, cazadores y personal de laboratorio por ser altamente infecciosa: menos de 100 bacterias son suficientes para infectar al ser humano (Pappas et al., 2006). Por ello, la manipulación de material infeccioso precisa de los adecuados equipos de protección individual (EPI) (Real Decreto (RD) 773/1997) y de un nivel de bioseguridad (BSL) tipo 3 (RD 664/1997). No existe requerimiento de un BSL superior dado que el ser humano no supone una fuente de contagio en sí misma; si bien sí se han descrito casos de transmisión entre personas o por vía congénita, estos son esporádicos (Tian et al., 2019).

En las personas la enfermedad comienza con un periodo de incubación prolongado que puede durar desde 9 hasta 60 días, tras el cual típicamente aparecen intensos episodios de fiebre junto a una gran variedad de síntomas debilitantes inespecíficos, como pueden ser dolor de cabeza o muscular, malestar general y astenia. A pesar de que la afección del sistema reproductor humano ha sido históricamente subestimada, hoy en día se considera que la brucelosis también puede suponer una amenaza para las mujeres embarazadas (García-Méndez et al., 2019). Su tratamiento requiere del empleo de antibióticos, y generalmente consiste en una combinación de doxiciclina y estreptomina, rifampicina o gentamicina (Corbel, 2006); sin embargo, la aparición de resistencias antibióticas (Wareth et al., 2022) supone que el proceso resulte arduo y no siempre eficaz (Bosilkovski et al., 2021). De este modo, la enfermedad puede llegar a cronificarse y mantenerse en estado latente de manera asintomática hasta reaparecer y provocar serias complicaciones, como espondilitis, neurobrucelosis o endocarditis (García-Méndez et al., 2019; J. Godfroid et al., 2013; Willems et al., 2022; Young, 1995).

Una pincelada histórica

Aunque no encontramos las primeras descripciones compatibles con esta enfermedad hasta los siglos XVIII y XIX, es altamente probable que la brucelosis ya estuviera presente en los animales mucho antes de que la humanidad los domesticara. En el año 1860, el cirujano británico Jeffery A. Marston detalló sus propios síntomas tras contraer la infección, que denominó *fiebre gástrica remitente del Mediterráneo*, durante la guerra de Crimea. Este conflicto bélico exigió una estrecha convivencia entre las tropas y los animales de ganado destinados a su alimentación en la base militar localizada en la isla de Malta —motivo por el que la enfermedad se ganó el sobrenombre de fiebres de Malta—. El agente etiológico responsable no sería descubierto hasta casi tres décadas después, cuando el ejército británico destinó a la isla al médico David Bruce para que averiguara qué podría estar causando la muerte de los soldados entre fuertes fiebres. En 1887, Bruce logró aislar del bazo de un soldado fallecido por la enfermedad unas bacterias a las que denominó *Micrococcus melitensis*, en alusión al nombre romano de la isla *Melita*. De manera paralela, en 1896 el veterinario danés Bernhard L. F. Bang aisló unas bacterias —que más tarde adoptarían el nombre de *Bacillus abortus*— a partir de exudado uterino de una vaca adolecida de una enfermedad contagiosa que provocaba abortos y baja producción de leche; como resultado, esta afección recibió el apelativo de enfermedad de Bang. Asimismo, el médico Themistokles Zammit documentó en 1905 el papel de la leche cruda de cabra como la fuente del agente infeccioso, descubrimiento que permitió reducir drásticamente la mortalidad mediante el impulso del consumo de leche pasteurizada. Finalmente, la bacterióloga norteamericana Alice C. Evans verificó en 1917 la similitud entre los microorganismos aislados por Bruce y Bang, además de corroborar que el consumo de leche fresca de vacas infectadas podía transmitir *Bacillus abortus* al ser humano y provocar las fiebres de Malta o fiebre ondulante. Sería la primera muestra de que la transmisión entre especies es posible y de que una misma bacteria puede producir una sintomatología diferente en animales y humanos. No obstante, esta afirmación fue recibida con mucho escepticismo hasta encontrar más evidencias que la apoyaran. La primera confirmación de muchas llegaría tres años después de la mano de los científicos Karl F. Meyer y Eduard B. Shaw, quienes además propusieron renombrar al patógeno como *Brucella*, en honor a su primer descubridor (Akpınar, 2016; Colwell, 2000; Misra et al., 2003; Moreno, 2014, 2021; Wyatt, 2005).

Clasificación taxonómica

Los patógenos causantes de la brucelosis son bacterias gramnegativas de forma cocobacilar que pertenecen al género *Brucella* (familia *Brucellaceae*, orden Rhizobiales, clase Alphaproteobacteria, filo Proteobacteria). Este género tiene un estrecho parentesco filogenético con otros géneros que incluyen patógenos y simbiontes de plantas como *Agrobacterium* y *Rhizobium*, patógenos animales como *Bartonella* y bacterias oportunistas del suelo como *Ochrobactrum* (OIE, 2022). Los distintos miembros que conforman el género están a su vez íntimamente relacionados; tanto es así, que en 1985 Verger et al. plantearon su clasificación dentro de una única especie. Esta propuesta ha sido apoyada recientemente por los resultados de análisis filogenético de Leclercq et al. en 2020; sin embargo, el Comité Internacional de Sistemática de Procariotas (ICSP) mantiene desde el

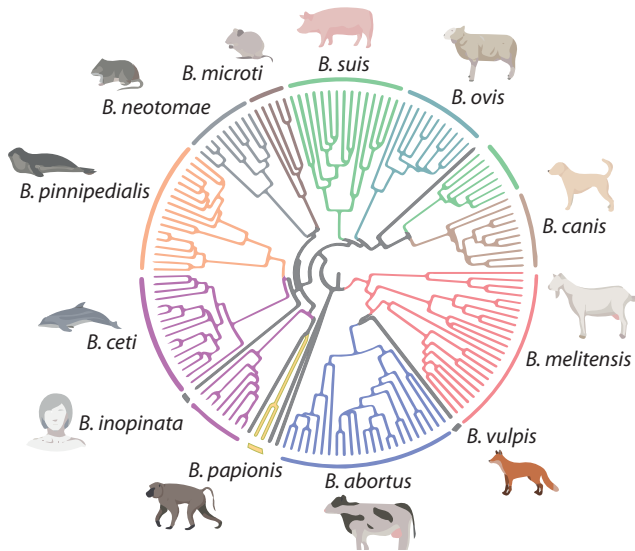


Fig. 2. Filogenia de *Brucella* spp. Dendrograma con la relación filogenética entre las especies actualmente reconocidas dentro del género y su hospedador preferente. Modificado a partir de Guzmán-Verri et al., 2019.

año 2005 su determinación de conservar la ordenación clásica de especies en base a la preferencia de hospedador (OIE, 2022). Tal resolución permanece aún en continua revisión y no libre de controversia (Al Dahouk et al., 2017; Brenner et al., 2005; Cloeckart et al., 2021; Occhialini et al., 2022).

En cualquier caso, la descripción de las relaciones filogenéticas entre las distintas especies (Fig. 2) (Guzmán-Verri et al., 2019) ha permitido una mejor comprensión de su dispersión y evolución (Whatmore y Foster, 2021). Curiosamente, los genomas de las especies típicas de los animales de ganado contienen menor variabilidad que las de los salvajes, lo que evidencia el papel de la domesticación sobre la diversidad genética (Suárez-Esquivel et al., 2020).

Actualmente están reconocidas 12 especies de *Brucella* (Hull y Schumaker, 2018; OIE, 2022; Rajendhran, 2021). De ellas, 6 se conocen como clásicas: *B. abortus* (vacas y bisontes), *B. melitensis* (cabras y ovejas), *B. suis* (cerdos, renos y roedores), *B. ovis* (cabras y ovejas), *B. canis* (perros) y *B. neotomae* (rata del desierto) —cada una de ellas con sus correspondientes biovares (bv)—. En las últimas décadas se han identificado e incorporado al género 6 nuevas especies: *B. ceti* y *B. pinnipedialis* (mamíferos marinos), *B. microti* (topillo común), *B. vulpis* (zorros), *B. papionis* (babuínos) y *B. inopinata* (aislada de un implante de pecho humano). Aunque recientemente se ha aislado *Brucella* a partir de anfibios y otros animales acuáticos, su inclusión en el género permanece a la espera de aprobación (Al Dahouk et al., 2017; Mühldorfer et al., 2017; OIE, 2022). De entre todas las especies reconocidas, la más virulenta y frecuentemente asociada a la brucelosis humana en las zonas afectadas es *B. melitensis* (Corbel, 2006).

Interacción patógeno-hospedador

Como resultado de la continua adaptación de *Brucella* al hospedador mamífero, las especies más virulentas han desarrollado una gran habilidad para evadir y modular el sistema inmune (Mirzaei et al., 2021; Roset et al., 2014), del cual puede permanecer oculta durante largos periodos de tiempo. El curso de la infección se divide en tres fases: periodo de incubación, fase aguda y fase crónica. El primero comprende el tiempo desde la invasión del hospedador hasta la aparición de los primeros síntomas, y se caracteriza por una activación del sistema inmune inusualmente baja que proporciona a *Brucella* la oportunidad de diseminarse por el sistema fagocítico mononuclear —anteriormente llamado sistema reticuloendotelial—. A continuación, la multiplicación activa de la bacteria en células fagocíticas tales como neutrófilos, macrófagos y células dendríticas constituye la fase aguda. Una vez dentro de estos tipos celulares, *Brucella* establece su nicho replicativo en un compartimento seguro del retículo endoplasmático denominado brucelosoma o vacuola contadora de *Brucella* (BCV). En vista de que esta bacteria puede sobrevivir tanto fuera como dentro de la célula eucariota, debe considerarse a *Brucella* como un parásito intracelular extracelular facultativo, aunque con preferencia por la localización intracelular (Gorvel y Moreno, 2002). Como consecuencia, aunque sí puede desencadenar la formación de anticuerpos durante la fase aguda, la inmunidad humoral queda relegada a un segundo plano en favor de la celular. Finalmente, la duración y la sintomatología de la fase crónica varían en función del animal. En el hospedador natural, *Brucella* coloniza los ganglios próximos al sitio de infección y a conti-

nuación se distribuye a lo largo del sistema linfático alcanzando bazo e hígado, así como el sistema reproductor (Baldi y Giambartolomei, 2013; Martirosyan et al., 2011).

La virulencia de *Brucella* y su capacidad para pasar inadvertida al sistema inmune se deben a la aplicación de varias estrategias. Por un lado, esta bacteria ha evolucionado hasta exponer modificaciones antigénicas en los llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), de manera que logra evadir su reconocimiento en las primeras fases de la respuesta innata del hospedador. Asimismo, carece de los factores de virulencia clásicos, como son exotoxinas, cápsula, plásmidos, fimbrias o flagelos, además de presentar un fenotipo altamente resistente al sistema del complemento y a péptidos antimicrobianos. Por otro lado, una vez que logra entrar en la célula a través de zonas de la membrana de menor fluidez conocidas como balsas lipídicas, es capaz de modular el tráfico intracelular eucariota y adaptarse a su microambiente mediante modificaciones reversibles de su envuelta celular y metabolismo. Para ello, *Brucella*, en respuesta al pH ácido que encuentra en el BCV dado el bombeo de iones oxidantes del fagocito, activa el operón *virB* del sistema de secreción tipo IV. Esta maquinaria es esencial para impedir la fusión lisosomal que provocaría su digestión y, además, activaría la función de los fagocitos como células presentadoras de antígeno (APC), que expondría los péptidos exógenos bacterianos en el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II (Baldi y Giambartolomei, 2013; Baldwin y Goenka, 2006; Martirosyan et al., 2011; Masjedian Jezi et al., 2019; Stranahan y Arenas-Gamboa, 2021).

La supervivencia de *Brucella* dentro de la célula hospedadora es dependiente de un sistema de comunicación denominado *quorum sensing*. Este mecanismo representa una gran adaptación al medio, ya que modifica la expresión de numerosos genes involucrados en el metabolismo central en función de la densidad de población bacteriana como respuesta al estrés ácido, oxidativo y nutricional. Su activación en gramnegativas sucede tras la síntesis y liberación de pequeñas moléculas autoinductoras llamadas *N*-acil homoserina lactonas (AHL), en cuyo reconocimiento se ven involucrados los reguladores transcripcionales LuxR, BlxR, MucR y VjbR que, además de afectar al operón *virB*, están relacionados con la generación de biofilms. La formación de estas películas bacterianas organizadas y especializadas proporciona una protección añadida frente al sistema inmune y tratamiento antibiótico, facilitando la persistencia de la infección (Brambila-Tapia y Pérez-Rueda, 2014; Delrue et al., 2005; Dong et al., 2013; Godefroid et al., 2010; Rambow-Larsen et al., 2008; Taminiou et al., 2002; Terwagne et al., 2013; Uzureau et al., 2007, 2010).

Como consecuencia de la multiplicación intracelular, se generan productos derivados del daño celular, que son detectados por el sistema inmune del hospedador y desencadenan el reclutamiento de más fagocitos al foco de infección, lo cual ocasiona un aumento de su tamaño. Entre estos tipos celulares, los macrófagos y células dendríticas finalmente logran reconocer como extraños los PAMPS de *Brucella* mediante sus receptores Toll-like (TLR), y se los presentan a linfocitos específicos. Dicha interacción origina una intrincada cascada de señalización mediada por citoquinas, que entabla un estrecho vínculo entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. Sin embargo, la infección por *Brucella* se caracteriza por presentar cierto nivel de inflamación mantenida en el tiempo, pero lo suficientemente baja como para impedir que el organismo la controle. A tal efecto, restringe la secreción de las interleuquinas (IL) IL-12 e IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y el interferón gamma (IFN- γ). La liberación de estas citoquinas proinflamatorias resulta crucial para controlar la infección, generando una respuesta inmune protectora de tipo Th1 mediante el reclutamiento celular de linfocitos T CD4⁺ colaboradores o *helper* y CD8⁺ citotóxicos. Esta activación de la respuesta adaptativa provocaría un bucle de estimulación local de macrófagos para producir en última instancia linfocitos de memoria (Baldwin y Goenka, 2006; Corsetti et al., 2013; Dorneles et al., 2015; Guimarães et al., 2020; Martirosyan et al., 2011; Rahmanpour et al., 2019; Stranahan y Arenas-Gamboa, 2021; Vitry et al., 2014).

Cuando el sistema inmune no logra frenar la multiplicación de *Brucella* y esta persiste dentro de los fagocitos, la infección se cronifica. En este momento, el sistema inmune opta por su última barrera de defensa: aislar a las bacterias dentro de granulomas (Grilló et al., 2012; McCamish y Elberg, 1962). Estos nódulos son agregados de macrófagos infectados que son rodeados por linfocitos de respuesta Th1, los cuales prosiguen con el vertido de citoquinas para así mantener el reclutamiento celular. Dado que el organismo limita el aporte de oxígeno a estos focos, resulta habitual la aparición de zonas de necrosis, especialmente frecuentes en hígado y bazo, reportadas tanto en el hospedador natural como en ratones y humanos (Albayrak y Albayrak, 2011; Copin et al., 2012; Corsetti et al., 2013).

Prevención de la infección por *B. melitensis*

La vacunación representa la piedra angular del control y erradicación de enfermedades infecciosas (Excler et al., 2021; Iwasaki y Omer, 2020). Ya en la antigüedad era una práctica habitual en China y Oriente Medio vestir a personas sanas con las ropas de

enfermos contagiados de viruela. Este método de infección por contacto derivó en una técnica más refinada de inoculación directa con secreciones infectadas, llamada variolización, ampliamente adoptada por la humanidad durante el siglo XVIII. La prevención de la viruela se introdujo en Europa en el año 1721, gracias a los informes de Emanuele Timoni, médico del embajador británico en Constantinopla, y a los esfuerzos de su mujer, la aristócrata Mary W. Montagu, quien además practicó la variolización a sus hijos. La demostración clínica de que era posible adquirir inmunidad por contacto con una versión atenuada del virus llegó a Occidente en 1796, junto al término *vacuna*, de la mano del médico Edward Jenner. En vista de que las lecheras eran conscientes de que contraer la viruela bovina —de carácter leve— les podía conferir protección frente a la viruela humana, Jenner utilizó la secreción de una llaga de una lechera infectada para vacunar a un niño, que permaneció sano tras exponerle deliberadamente a la enfermedad. Finalmente, gracias a la implementación de campañas de vacunación masiva se logró la erradicación de la viruela en 1977. El siguiente gran avance en la historia de las vacunas se lo debemos a Louis Pasteur por el desarrollo de vacunas frente al cólera aviar y la rabia en el siglo XIX, además de por sentar las bases de la aplicación de técnicas de laboratorio para la elaboración y mejora de vacunas, hasta alcanzar en el siglo XXI un gran apogeo de nuevas estrategias (Almond et al., 2020; Plotkin y Plotkin, 2011; Vishweshwaraiah y Dokholyan, 2022; Weiss y Esparza, 2015).

Las vacunas, debido a su bajo riesgo y excelente coste-beneficio, han contribuido a consolidar el concepto de *One Health*, por lo que su implementación debe entenderse de una manera multidisciplinar y colaborativa (Almond et al., 2020). El planteamiento de una sola salud global ha de aplicarse también en el desarrollo de las vacunas veterinarias, fundamentales para garantizar no sólo la salud animal, sino también la salud pública y medioambiental. Ciertamente, las vacunas de uso veterinario reducen la incidencia de enfermedades zoonóticas y de transmisión alimentaria, mejoran y promueven una producción sostenible y disminuyen la necesidad del uso de antibióticos, evitando el problema añadido de resistencias bacterianas (Roth, 2011).

En particular, el control de la brucelosis también debe basarse en la puesta en práctica de programas globales. En aquellas áreas en las que la enfermedad es endémica, la estrategia preferible para prevenir que la infección alcance al ser humano consiste en su control en los animales. Para prevenir la infección en pequeños rumiantes, la cepa Rev1 es la única vacuna recomendada (Dadar et al., 2021). El origen de esta vacuna se remonta al año 1953, cuando los científicos Mendel Herzberg y Sanford S. Elberg se dieron cuenta, tras realizar

pases seriados con la cepa 6056 bv1 de *B. melitensis* en presencia de estreptomycin, de que los clones inicialmente dependientes del antibiótico que revertían su dependencia estaban atenuados, y los que seguían siendo estreptomycin-dependientes perdían totalmente la capacidad de multiplicarse *in vivo*. Dentro de los primeros se encontraba un clon al que llamaron originalmente Rev. 1, capaz de conferir protección frente a la infección virulenta en ratones, cobayas (Herzberg y Elberg, 1955) y cabras (Elberg y Faunce, 1957), así como de mantenerse estable y atenuado, a diferencia de otras cepas que pueden recuperar cierta virulencia mediante pases *in vivo* (Alton et al., 1967).

Actualmente, la cepa vacunal de referencia Rev1 corresponde al pase n.º 101 liofilizado por Elberg en 1970 (Salmon-Divon, Banai, et al., 2018) y el estudio de los factores genéticos relacionados con su particular atenuación representa desde hace varias décadas un importante campo de investigación. En 2002, Cloeckaert et al. identificaron que su fenotipo de resistencia a estreptomycin era consecuencia de una mutación en el gen *rpsL*, que provocaba una sustitución aminoacídica crítica en la subunidad ribosomal S12. La progresiva secuenciación de Rev1 y los múltiples análisis *in silico* realizados en comparación con otras cepas de *B. melitensis* han permitido identificar 32 alteraciones genéticas, así como un considerable número de mutaciones que podrían estar afectando severamente a funciones metabólicas (Issa y Ashhab, 2016). Con respecto a la cepa virulenta de referencia 16M, la secuencia completa del genoma del clon Rev1 original —disponible en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI; Sayers et al., 2022) con los números de acceso CP024715 y CP024716— presentó un 99,9 % de similitud, evidenciando mutaciones en genes relacionados con rutas esenciales, como el metabolismo de lípidos y aminoácidos, respuesta al estrés y síntesis de pared celular (Salmon-Divon, Yeheskel, et al., 2018). Además, estudios de transcriptómica comparativa han hallado diferencias de regulación genética en condiciones de estrés ácido, que sugieren variaciones en el transporte de sustancias para tratar de compensar la acumulación o el déficit de metabolitos intermedios y explicarían, en última instancia, la atenuación de Rev1 (Salmon-Divon et al., 2019).

La vacuna Rev1 ha demostrado ser eficaz para el control de la brucelosis causada por *B. melitensis*, brindando además protección cruzada frente a la epididimitis ovina provocada tras la infección por *B. ovis* (OIE, 2018, 2022). Tanto es así que la prohibición del uso de Rev1 en zonas en las que se ha logrado la erradicación de la primera gracias a la vacunación ha derivado en una reaparición de *B. ovis* (Picard-Hagen et al., 2015). Esta limitación del uso de Rev1 está motivada por el hecho de que presenta una serie de incon-

venientes importantes: i) puede causar abortos y ser excretada al medio ambiente a través de secreciones vaginales y leche cuando se utiliza en animales gestantes (Blasco, 1997); ii) es infecciosa para el ser humano (Spink et al., 1962); iii) resiste a la estreptomycin, antibiótico de elección para el tratamiento de la brucelosis humana (Ariza et al., 1986; Meng et al., 2018) e iv) interfiere en el diagnóstico serológico utilizado para identificar a los animales infectados (Garin-Bastuji et al., 1998).

Por consiguiente, el desarrollo de una nueva vacuna para la prevención de *B. melitensis* en ovino y caprino desprovista de las limitaciones de Rev1 es, desde hace décadas, el objetivo de numerosas investigaciones a lo largo del mundo. Tanto es así que en noviembre del año 2016 se impulsó la competición global Brucellosis Vaccine Prize, desarrollada por AgResults —iniciativa de colaboración entre los Gobiernos de Australia, Canadá, Reino Unido y Estados Unidos y la Fundación Bill & Melinda Gates— e implementada por la Alianza Mundial para los Medicamentos Veterinarios del Ganado (GALVmed), que premia con 30 millones de dólares la creación y puesta en práctica de una vacuna más segura.

Importancia del lipopolisacárido

Brucella, como bacteria gramnegativa, se caracteriza por tener una envuelta celular que consta de una membrana interna o citoplasmática y otra externa, separadas por un espacio denominado periplasma, que incluye proteínas de anclaje y una fina capa de peptidoglicano (PG) conformando la pared celular (Brenner et al., 2005) (Fig. 3). La membrana externa (OM, del inglés, *outer membrane*) presenta asimetría lipídica y juega un papel esencial como barrera para preservar la hidrofiliidad de superficie (Nikaido y Vaara, 1985) gracias a su principal componente: el lipopolisacárido (LPS). La importancia del LPS radica en que contribuye a mantener la estabilidad e impermeabilidad de la OM impidiendo el acceso de sustancias hidrofóbicas como detergentes, colorantes o antibióticos y, además, es el principal factor de virulencia en *Brucella* (Godfroid et al., 2000).

Estructuralmente, el LPS consiste en una molécula glicolipídica de naturaleza anfifílica que está compuesta por tres regiones claramente diferenciadas: lípido A, núcleo oligosacárido o *core* y O polisacárido (O-PS) o cadena O (Aranda et al., 2020; Haag et al., 2010; Zhao et al., 2018) (Fig. 3). El lípido A está muy conservado y presenta propiedades endotóxicas; dada su naturaleza hidrofóbica, se localiza embebido en la bicapa lipídica y

está formado por disacáridos en β -1,6 de glucosamina fosforilados y acetilados con un número variable de cadenas de ácidos grasos (Westphal y Lüderitz, 1954). Unido a él se encuentra el *core*, compuesto por unos pocos residuos de glucosamina, glucosa, manosa y ácido 2-ceto-3-desoxi-D-mano-octulosónico (KDO) (Soler-Lloréns et al., 2014; Valvano, 2003). Generalmente, el *core* está cubierto en su parte distal por el O-PS, cadena polisacáridica de longitud variable que aporta una superficie hidrofílica capaz de enmascarar los receptores subyacentes (Valvano, 2003).

La nomenclatura del O-PS procede de la expresión alemana *ohne Hauch*, que significa ‘sin película’, utilizada para describir colonias inmóviles de *Escherichia coli* y *Salmonella* que, por carecer de flagelo, no exhibían el característico halo derivado del movimiento y exponían directamente el antígeno situado debajo (Schaechter, 2004). En *Brucella* el O-PS está constituido por subunidades repetidas de GDP-4-NH₂-4,6-dideoxi-4-formamido- α -D-manosa, también llamadas *N*-formil-perosaminas (Haag et al., 2010), que enlazan con una de las dos ramas del *core* por medio de dos de sus moléculas de manosa y una de quinovosamina (Fontana et al., 2016; Kubler-Kielb y Vinogradov, 2013; Soler-Lloréns et al., 2014).

De acuerdo con la presencia o ausencia de O-PS en el LPS, a este se le clasifica como liso (S, del inglés, *smooth*) o rugoso (R, de *rough*), respectivamente. Esta terminología la acuñó por primera vez el bacteriólogo Joseph A. Arkwright, quien describió en profundidad los dos tipos de morfología colonial que observó al sembrar en placas de agar bacterias de *Bacillus dysenteriae*. Denominó formas S a aquellas colonias con «superficie lisa y reluciente, elevadas, en forma de cúpula y redondeadas, con borde liso, regular y bien definido», y formas R a aquellas de «margen mellado o irregular, ondulado o dentado, con una superficie toscamente granular que recuerda al cuero marroquí de grano muy fino» (Arkwright, 1921). Todas las especies clásicas de *Brucella*, a excepción de *B. ovis* y *B. canis*, portan un S-LPS (Ducrottoy et al., 2016; Stranahan y Arenas-Gamboa, 2021).

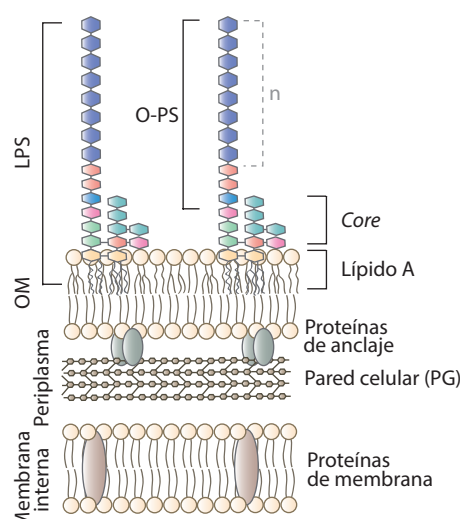


Fig. 3. Representación de la envuelta celular de *Brucella*. Esquema gráfico de las membranas interna y externa, pared celular de PG en el espacio periplasmático y LPS completo. Modificado a partir de Haag et al., 2010.

Dado que el O-PS es el principal y más expuesto factor de virulencia, el reconocimiento de este antígeno por el sistema inmune es capaz de desencadenar una fuerte respuesta (Spink y Anderson, 1954). Tanto es así que ciertas bacterias gramnegativas con S-LPS han adquirido la ventaja evolutiva de poder adoptar un fenotipo con R-LPS de manera temporal durante la infección del hospedador (Stranahan y Arenas-Gamboa, 2021). Esta disociación de la fase lisa a la rugosa está propiciada por el ambiente del nicho intracelular (Mancilla, 2015).

Además del O-PS, se han descrito otras estructuras más o menos similares a él, pero que no aparecen ligadas al complejo lípido *A-core* (Ducrotoy et al., 2016). En 1963, Milner et al. identificaron unos polisacáridos libres desprovistos de inmunogenicidad, es decir, que no eran capaces de despertar una respuesta inmune por sí mismos, pero que sí reaccionaban con anticuerpos anti-LPS. Debido a que estos cumplían rigurosamente la definición clásica de hapteno (Anacker et al., 1964), se les nombró como hapteno nativo (NH). Inicialmente, se propuso que el NH podía responder a productos de hidrólisis del S-LPS que permanecían asociados a él por enlaces no covalentes; no obstante, investigaciones posteriores sugirieron que son moléculas independientes (Aragón et al., 1996). Asimismo, se ha identificado también otro polisacárido análogo a la cadena O que se localiza tanto en el citoplasma como en el periplasma, conocido como poli B, el cual sí parece tratarse de un precursor de la síntesis del S-LPS (Bundle et al., 1988; A. Cloeckert et al., 1992; Moreno et al., 1984).

De todo ello se desprende que el LPS, y en particular el O-PS, posee un gran potencial como principal antígeno responsable de la virulencia de *Brucella* para el desarrollo de nuevas vacunas atenuadas mediante el estudio de las rutas metabólicas involucradas en su biosíntesis (Whitfield, 1995).

Ruta de biosíntesis del O-PS

En las bacterias gramnegativas, el S-LPS se sintetiza a través de un complejo e intrincado proceso que parte de dos rutas citoplasmáticas independientes: una para el motivo lípido *A-core* y otra para el O-PS, que eventualmente convergen en el periplasma. En esta localización se ensamblan ambas estructuras mediante un paso de ligación para, a continuación, ser transferida como un todo hasta la cara externa de la bacteria. Para llevar a cabo la polimerización del O-PS se han descrito dos mecanismos distintos, que comparten los pasos de iniciación, pero difieren en cómo se polimeriza y transporta la cadena deno-

minados como dependiente o independiente de Wzy (Caffalette et al., 2020). Dado que el O-PS de *Brucella* es un homopolímero, parece que este género se decanta por el mecanismo independiente de Wzy (Dabral et al., 2019; F. Godfroid et al., 2000; González et al., 2008; Haag et al., 2010; Monreal et al., 2003; Moriyón y López-Goñi, 1998).

En ambos modelos, la biosíntesis del O-PS se inicia en la cara citoplasmática de la membrana interna, ya que es aquí donde se encuentran disponibles los azúcares-nucleótidos precursores, que son formas activas de monosacáridos capaces de actuar como donadores en reacciones de glicosilación. La polimerización da comienzo cuando una molécula de monosacárido-1-fosfato se une al portador lipídico universal undecaprenil-fosfato (Und-P) —también conocido como bactoprenol— por medio de un enlace fosfodiéster para generar un intermediario de azúcar ligado a Und-PP (Pérez-Burgos et al., 2019). Cada cadena de O-PS requiere la participación de una molécula de bactoprenol, el cual además interviene en el ensamblaje de otros carbohidratos complejos, tales como ácidos teitoicos, cápsulas polisacáridicas y el PG (Valvano, 2003).

A continuación, en el mecanismo independiente de Wzy la polimerización sucede en su totalidad en la cara citoplasmática de la membrana interna. En esta ruta, las enzimas manosiltransferasas dictan la estructura específica del O-PS incorporando residuos de *N*-formil-perosamina (Whitfield et al., 1997). Finalmente, el O-PS es transferido junto al bactoprenol a través de la membrana interna mediante un proceso dependiente de energía o adenosín trifosfato (ATP) por un transportador de tipo ABC (del inglés, *ATP-binding cassette*) (Valvano, 2003). Por el contrario, en otras gramnegativas, la síntesis de heteropolímeros se realiza mediante el mecanismo dependiente de Wzy (Godfroid et al., 2000). En este mecanismo sucede la incorporación secuencial de azúcares en el extremo no reductor de la molécula en formación, que es transferida por la proteína Wzx a través de la membrana interna hacia el periplasma, donde continúa su polimerización por la proteína Wzy; y el tamaño final del O-PS lo modula la proteína Wzz incorporando residuos terminales que concluyen la actividad glicosiltransferasa (Clarke et al., 2004; Valvano, 2003).

Dada la naturaleza secuencial de la polimerización se han sugerido varios modelos que describen un acoplamiento íntimo y competitivo entre los procesos de extensión, terminación y transporte dependiente de proteínas ABC (Clarke et al., 2004; Kido et al., 1995; Mann et al., 2019). Por un lado, la denominada estrategia de ensamblaje-terminación propone que la polimerasa sea capaz de interactuar físicamente con una enzima que añade un grupo metilo en el extremo no reductor, dando así por concluida la síntesis de

la cadena (Williams et al., 2017). De este modo, el residuo terminal actúa como una señal bioquímica esencial para predefinir y controlar la longitud del O-PS, impidiendo una mayor extensión (Valvano, 2015) y promoviendo el inicio del transporte (Cuthbertson et al., 2005; Valvano, 2003) sin necesidad de proximidad entre sendas maquinarias (Bi y Zimmer, 2020). Por otro lado, también se ha propuesto que la distancia entre la polimerasa y el sitio de terminación pueda actuar como una regla molecular capaz de determinar la longitud del O-PS (Hagelueken et al., 2015; Williams et al., 2017) que, en vista de que el sustrato excede las dimensiones del transportador en sí mismo, sería empujado de manera progresiva a través del canal (Bi et al., 2018). Una vez en el periplasma, el O-PS completo sería transferido desde el donador Und-PP al lípido *A-core* por la ligasa Waal, resultando en la liberación del bactoprenol. Al tratarse de una molécula con limitada biodisponibilidad dado que se sintetiza en cantidades reducidas y se requiere para la polimerización de otros carbohidratos, es necesario que el bactoprenol sea reciclado de vuelta a la cara citoplasmática de la membrana interna (Valvano, 2015).

El transportador ABC responsable de exportar el O-PS consta de dos componentes esenciales: una proteína integral de membrana Wzm, a su vez formada por dos dominios transmembrana (TMD), y una proteína hidrofílica Wzt con dos dominios de unión a nucleótido (NBD) y actividad ATPasa (Cuthbertson et al., 2007). Estas dos proteínas están codificadas, respectivamente, por los genes *wzm* y *wzt* —que también aparecen referidos en la literatura como *rfaA* o *rfaD* y *rfaB* o *rfaE* (Bronner et al., 1994; Kanehisa y Goto, 2000; M. Tian et al., 2014)—. Dado que el sistema Wzm/Wzt está ampliamente conservado en gramnegativas, *a priori* parece plausible extrapolar a *Brucella* los resultados obtenidos en otras bacterias (Greenfield y Whitfield, 2012; Mann et al., 2019). En lo que respecta a la posición celular de las proteínas Wzm y Wzt, se ha estudiado su localización conjunta o aislada en modelos de células eucariotas (Singh et al., 2013) y liposomas

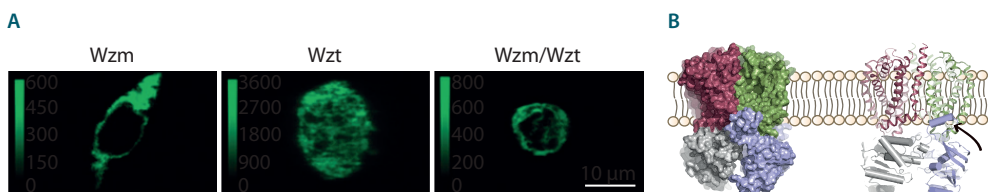


Fig. 4. Disposición de las proteínas del sistema transportador Wzm/Wzt. A) Localización celular de las proteínas marcadas mediante fluorescencia (nm) en una sección de células eucariotas. **B)** Estructura cuaternaria de Wzm (dominios en color granate y verde) y Wzt (dominios en gris y morado) en la membrana interna; la flecha muestra la interfaz de acoplamiento entre ambas proteínas. Modificado a partir de Singh et al., 2013 y Bi et al., 2018.

(Mohammad et al., 2016). De manera conjunta, las dos proteínas se orientan hacia la membrana, pero no logran interactuar en ausencia de esta; mientras que individualmente, Wzm se dirige a la membrana y Wzt se mantiene en el citoplasma (Fig. 4A). En cuanto a su conformación, la proteína Wzm presenta una estructura anular (Mohammad et al., 2016) a la que se acopla Wzt a través de una única interfaz (Bi et al., 2018) (Fig. 4B).

El reconocimiento del O-PS por la proteína Wzt conlleva un cambio conformacional en ella capaz de modular la conductancia del canal formado por Wzm (Singh et al., 2013; Mohammad et al., 2016; Bi et al., 2018). De hecho, así como Wzm es funcionalmente intercambiable entre bacterias gramnegativas, Wzt presenta una alta especificidad (Cuthbertson et al., 2005; Izquierdo et al., 2003). Tanto es así que Wzt porta un módulo de unión a carbohidratos (CBM) en uno de sus dominios NBD que reconoce modificaciones terminales concretas para asegurar que sólo puedan alcanzar la superficie aquellas cadenas completamente formadas (Hug y Feldman, 2011; Mann et al., 2016; Williams et al., 2017). La unión del polisacárido a esta región promueve un cambio conformacional en Wzt que desencadena la hidrólisis de ATP y la interacción con Wzm para abrir el canal y exportar el conjunto O-PS-Und-PP (Fig. 5) (Bi et al., 2018; Caffalette y Zimmer, 2021).

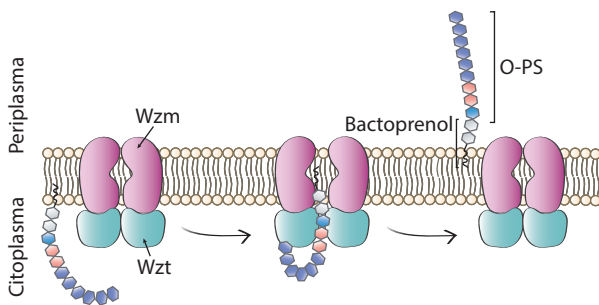


Fig. 5. Esquema del transporte de O-PS a través de la membrana interna. La interacción entre la proteína Wzt y el residuo terminal del O-PS, polimerizado sobre el bactoprenol, induce la apertura dependiente de ATP del canal transmembrana formado por la proteína Wzm y provoca una reorientación espontánea y el transporte del complejo polisacárido-bactoprenol desde el citoplasma hacia el periplasma. Modificado a partir de Bi et al., 2018.

Genes implicados en la polimerización y transporte del O-PS

La mayoría de las cepas de *Brucella* presentan su material genético dentro de dos cromosomas circulares que codifican por aproximadamente 3,2 kb. A lo largo de ambos aparecen distribuidos numerosos genes conservados implicados en la replicación, transcripción y traducción del ADN y en el metabolismo síntesis de pared celular. En particular, en el genoma de la cepa de referencia de *B. melitensis* 16M se han identi-

cado 3.197 secuencias de marco abierto de lectura (ORF, del inglés, *open reading frame*) con potencial para ser traducidos a proteínas (DelVecchio et al., 2002). Dado que no se han identificado plásmidos en *Brucella*, la posibilidad de que pueda intercambiar material genético permanece cuestionable (Olsen y Palmer, 2014).

En la polimerización, ensamblaje y transporte del O-PS están implicadas un vasto número de enzimas. Los genes que codifican para estas proteínas —cuya nomenclatura corresponde a la propuesta unificadora de Reeves et al. de 1996— no están localizados de manera contigua a lo largo del genoma; sin embargo, la mayoría se encuentran en las regiones *wbo* y *wbk* (Tabla 1) del cromosoma I (Haag et al., 2010). La región *wbo* está contenida en la isla genómica GI-2 (Rajashékara et al., 2008) y codifica por manosiltransferasas

Tabla 1. Genes de *B. melitensis* que codifican por proteínas de función secuencial en la biosíntesis de O-PS

Gen	16M	Rev1 ¹	Función	Referencia
<i>wbkD</i>	BMEI1427	CUC12_10015	Síntesis de <i>N</i> -acetil-quinovosamina	González et al., 2008
<i>wbkF</i>	BMEI1426	CUC12_10020	Unión de <i>N</i> -acetil-quinovosamina al bactoprenol	
<i>gmd</i>	BMEI1413	CUC12_10080	Conversión de GDP-manosa en GDP-4-ceto-6-desoximanosa	Godfroid et al., 2000
<i>per</i>	BMEI1414	CUC12_10075	Síntesis de perosamina a partir de GDP-4-ceto-6-desoximanosa	
<i>wbkC</i>	BMEI1418	CUC12_10055	Transferencia de un grupo formilo para formar <i>N</i> -formil-perosamina	
<i>wbkA</i>	BMEI1404	CUC12_10105	Manosiltransferasa	González et al., 2008
<i>wbkB</i>	BMEI1417	CUC12_10060	Presunta proteína de membrana interna sin función asignada	
<i>wbkE</i>	BMEI1393	CUC12_10155	Manosiltransferasa	
<i>wboA</i>	BMEI0998	CUC12_01375	Manosiltransferasa	McQuiston et al., 1999
<i>wboB</i> ²	BMEI0997	CUC12_01380	Manosiltransferasa	González et al., 2008
<i>wzm</i>	BMEI1415	CUC12_10070	Proteína integral de membrana del transportador ABC	Godfroid et al., 2000
<i>wzt</i>	BMEI1416	CUC12_10065	Proteína de unión a ATP del transportador ABC	

¹ Nótese que la secuencia del cromosoma I de Rev1 (n.º de acceso CP024715) está anotada en sentido inverso a la del de 16M (n.º AE008917) en NCBI (Sayers et al., 2022); ² también referido como *wbdA* (Awwad et al., 2015; Hur et al., 2011).

adicionales que están ausentes en *B. ovis* (Zygmunt et al., 2009). La secuenciación de la región *wbk* de 16M, conservada en todas las especies de *Brucella*, identificó siete ORF y cuatro secuencias de inserción (IS) (Cloekaert et al., 2000; Godfroid et al., 2000). La existencia de elementos genéticos móviles alrededor de las secuencias codificantes posibilita que tengan lugar escisiones espontáneas en el cromosoma de *Brucella*, que conllevan una disociación fenotípica por pérdida del O-PS. En la cepa vacunal Rev1 se ha descrito una reorganización genética mediada por una integrasa e IS transposasa que afecta a glicosiltransferasas de las regiones *wbo* y *wbk*, respectivamente, con el consecuente perjuicio sobre la inmunogenicidad de la vacuna (Mancilla et al., 2013).

Conformación molecular del O-PS

Estructuralmente, el O-PS de *Brucella* consta de entre 96 y 100 residuos de *N*-formil-perosamina (Caroff et al., 1984) unidos por dos tipos de enlaces en α -1,2 o α -1,3 (Fig. 6). La distribución de estos enlaces, además de explicar la implicación de varias manosiltransferasas en el proceso de biosíntesis (Godfroid et al., 2000), aporta una variabilidad a la cadena de la que dependerá su antigenicidad, a saber, la respuesta inmunológica capaz de inducir. El O-PS estimula la liberación de una colección policlonal de anticuerpos con reactividad solapada que reconocen diversas regiones del polímero (Alonso-Urmeneta et al., 1998). Cada uno de estos anticuerpos diferentes o monoclonales (mAb) se une específicamente a un determinante antigénico único, denominado epítipo. Teniendo en cuenta que cada epítipo abarca una porción del antígeno completo, la cantidad de mAb distintos generados dependerá de la longitud del O-PS (Kuby et al., 2006).

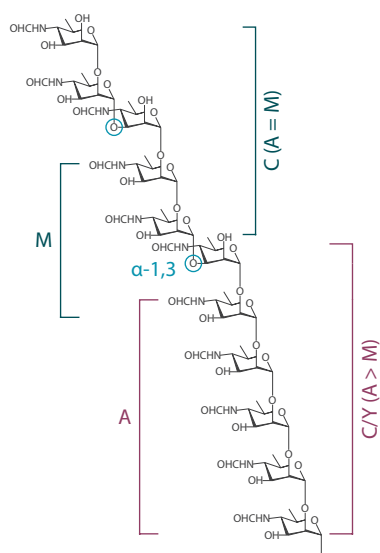


Fig. 6. Estructura del O-PS de *B. melitensis* 16M. Esquema de las subunidades de *N*-formil-perosaminas unidas por enlaces en α -1,2 y, en menor proporción (21%), en α -1,3 (círculo azul) en el cual se representan los epítipos descritos conformados por los distintos enlaces. Modificado a partir de Zygmunt et al., 2015.

Los epítipos A y M del O-PS de *Brucella* fueron los primeros en ser identificados, y se nombraron así en base a su presencia mayoritaria en cepas de *B. abortus* o *B. melitensis*, respectivamente. Tradicionalmente, se ha utilizado su cuantía para realizar una distinción entre cepas (Wilson y Miles, 1932). Por medio de aglutinación con sueros policlonales

monoespecíficos anti-A o anti-M —producidos por adsorción con el suero heterólogo— se puede clasificar a las distintas brucellae dentro de tres serotipos: A⁺M⁻ (cepas A dominantes), A⁻M⁺ (cepas M dominantes) o A⁺M⁺ (Godfroid et al., 2000).

La estructura química de los epítomos A y M ha sido extensamente estudiada y discutida en las últimas décadas y aún continúa hoy en día siendo un candente tema de investigación. Hasta el momento, el epítomo A parece consistir en cinco residuos contiguos con enlace α -1,2, mientras que el epítomo M se describe como un tetrasacárido unido por la secuencia α -1,2 : α -1,3 : α -1,2 (Bundle y McGiven, 2017; Kubler-Kielb y Vinogradov, 2013). Por lo tanto, ambos pueden aparecer expresados de manera simultánea dentro de una misma molécula (Bundle et al., 1989), encontrándose el epítomo A no sólo en cepas que carecen de enlaces α -1,3 sino también en aquellas que lo incluyen en una proporción α -1,2 : α -1,3 mayor a 4 : 1 (Muñoz et al., 2005). Esto, unido al hecho de que ciertos mAb anti-A son capaces de unirse al O-PS de cepas A⁻M⁺, implicaría que los enlaces α -1,3 no se distribuyen de manera regular a lo largo de la cadena (Clockaert et al., 1998). De hecho, las cepas A dominantes parecen portar al menos un 2 % de enlaces α -1,3 (Kubler-Kielb y Vinogradov, 2013), a excepción de *B. suis* bv2 (Zaccheus et al., 2013). Además, *Brucella* spp. presenta generalmente uno o dos epítomos M rematando el extremo distal del O-PS. En particular, la cepa 16M de *B. melitensis* (A⁻M⁺) contiene un 21 % de enlaces α -1,3 (Bundle y McGiven, 2017) dentro de largas concatenaciones tras un polímero más corto exclusivamente en α -1,2 (Zygmunt et al., 2015). Por otro lado, ciertos mAb que se presumían de unión al tetrasacárido M descrito no son capaces de reconocer tal secuencia en glicoconjugados sintéticos (Zygmunt et al., 2015). Con todo ello, la asignación de los epítomos A y M aún permanece cuestionable.

Además, se ha identificado un tercer epítomo común o C compartido por cepas tanto A como M dominantes (Clockaert et al., 1993; Douglas y Palmer, 1988). Aunque inicialmente se describió al epítomo C como un subtipo de epítomo A (Bundle et al., 1989; Meikle et al., 1989), más adelante se definió como un epítomo superpuesto que porta un número variable de residuos con enlace α -1,2 y uno en α -1,3 (Zaccheus et al., 2013). No obstante, sigue habiendo discrepancias sobre su nomenclatura dependiendo de si se considera su estructura química o su reactividad (Ducrotoy et al., 2016). Recientemente, se ha determinado que la estructura polimérica mínima que los mAb anti-C son capaces de reconocer consiste en un pentasacárido con enlaces α -1,2 : α -1,2 : α -1,3 : α -1,2, aunque el papel del enlace α -1,3 en dicho reconocimiento sigue siendo discutible (Zygmunt et al., 2015).

Adicionalmente, se ha encontrado un epítipo común entre *Brucella* y *Yersinia enterocolitica* O:9 al que se ha llamado C/Y (Mittal et al., 1985). El hecho de que esta cepa carezca de residuos en α -1,3 supone que tal epítipo no pueda contener este enlace (Zaccheus et al., 2013) y que la especificidad de los mAb anti C/Y esté dirigida a polisacáridos en α -1,2 (Bundle et al., 1989). Los epítipos C y C/Y se subdividen a su vez en varios grupos (Tabla 2) según su reconocimiento relativo por distintos mAb y su unión a cepas A o M dominantes (Weynants et al., 1996).

Tabla 2. Epítipos identificados en el O-PS de *Brucella*

Epítipo	Estructura propuesta	Referencias
M	Tetrasacárido en α -1,2 : α -1,3 : α -1,2	Cloekaert et al., 1998, Kubler-Kielb y Vinogradov, 2013, Zygmunt et al., 2015, Bundle y McGiven, 2017
A	Pentasacárido con $(\alpha$ -1,2) ₄	Cloekaert et al., 1998
C (A = M)	Pentasacárido terminal en α -1,2 : α -1,2 : α -1,3 : α -1,2	
C (M > A)	Permanece incierta	Zygmunt et al., 2015
C/Y (A = M)	Permanece incierta, > $(\alpha$ -1,2) ₆	
C/Y (A > M)	$\geq (\alpha$ -1,2) ₅	

Cepas rugosas de *B. melitensis* como candidatos vacunales

El componente bacteriano principal responsable de la evasión de la respuesta inmune innata es el S-LPS (Olsen y Palmer, 2014), concretamente, el O-PS juega un papel esencial en la virulencia de *Brucella* (Spink y Anderson, 1954). Como consecuencia, las cepas con R-LPS derivadas de otras con S-LPS están más atenuadas que sus parentales y son consideradas desde hace varias décadas interesantes candidatos para sustituir la actual vacuna Rev1 (González et al., 2008; Moriyón et al., 2004; Schurig et al., 2002). Estas cepas carentes de O-PS pueden subsanar, además, uno de los principales inconvenientes de Rev1: los anticuerpos que se generan frente a su O-PS no permiten distinguir si el animal está infectado o vacunado —circunstancia denominada como problema DIVA— (Jones et al., 1973), lo cual entorpece y dificulta seriamente las campañas de erradicación (Blasco, 2010).

Una de las primeras cepas de *B. melitensis* con R-LPS estudiadas fue B115, obtenida por aislamiento directo a partir de una cabra infectada en la isla de Malta (Díaz et al.,

1967). Esta cepa exhibe precursores del O-PS en citoplasma (Cloeckert et al., 1992), sin embargo, el hecho de que presente múltiples mutaciones (Adone et al., 2011) implica que B115 proporcione unos resultados de protección frente a la infección virulenta muy discutibles (Blasco et al., 2016).

Tras diversas aproximaciones empíricas apoyadas en modificaciones fortuitas, se procedió al desarrollo de mutantes rugosos mediante mutagénesis por transposición (Allen et al., 1998; Godfroid et al., 1998; Monreal et al., 2003; Winter et al., 1996). Esta técnica molecular se basa en la inserción aleatoria dentro del genoma de transposones, esto es, elementos móviles con secuencias invertidas cortas, de entre 15 y 30 pares de bases (pb) repetidas, así como un gen para la transposasa responsable del proceso de recombinación (Schaechter, 2004). Además, este método incluye la incorporación de genes de resistencia antibiótica que, aunque reducen la frecuencia de obtención de mutantes viables, previenen el crecimiento de bacterias con mutaciones polares y la expresión de los genes posteriores interrumpida (De Lorenzo et al., 1990). En concreto, el transposón Tn5 ha demostrado su utilidad en bacterias gramnegativas (Merrick et al., 1978), y ha sido perfeccionado como mini-Tn5 al recolocar la transposasa en un plásmido para asegurar una inserción estable (Way et al., 1984). De este modo, además, se facilita la identificación de los mutantes generados mediante secuenciación de los nucleótidos colindantes (Schaechter, 2004).

Las cepas virulentas de *B. melitensis* 16M y H38 han sido ampliamente utilizadas como parentales sobre las que construir mutantes con R-LPS por transposición (Winter et al., 1996; Godfroid et al., 1998; Godfroid et al., 2000; González et al., 2008). De entre todos ellos, solamente el mutante Bm16MR wzm , que presentaba el gen wzm alterado, fue capaz de igualar el patrón de atenuación y la protección obtenidos por Rev1 (Barrio et al., 2009; González et al., 2008). En este mutante se demostró la localización citoplasmática del O-PS, probablemente anclado al bactoprenol (González et al., 2008). De hecho, la presencia de epítomos de O-PS es necesaria no sólo para sortear la respuesta innata en la primera fase de la infección, sino también para poder desencadenar la respuesta inmune adaptativa (Grilló et al., 2006; Montaraz et al., 1986); no obstante, la generación de anticuerpos anti-O-PS representa un arma de doble filo, ya que no permite resolver el problema DIVA (Blasco et al., 2016).

A pesar de que la técnica por transposición supuso un gran avance en el desarrollo de la bioingeniería, esta presenta un considerable inconveniente: la inserción aleatoria del transposón dentro de regiones codificantes del cromosoma puede ocasionar múltiples

mutaciones desconocidas. Gracias al avance de la ingeniería genética (Green y Sambrook, 2012; Rothstein, 1991), se diseñó el método de mutagénesis mediante delección en fase. Esta técnica se basa en el clonaje del gen de interés, desprovisto de una buena parte de su secuencia, dentro de un vector suicida que integra el gen mutado en el genoma de *Brucella* mediante recombinación homóloga, reemplazando al gen original (Conde-Alvarez et al., 2006). De este modo, se construyó el mutante 16M Δ wzm (Zabalza Baranguá, 2017) para garantizar una mutación única, dirigida y absolutamente irreversible. La vacunación con este mutante resultó eficaz en modelo de ratón, aunque no desencadenó la característica esplenomegalia de Rev1, asociada a un control eficaz de la infección en el hospedador final (Grilló et al., 2012).

El hecho de que las construcciones de mutantes se hayan realizado típicamente sobre la cepa de referencia 16M se debe a que esta cepa está completamente secuenciada desde principios de siglo (DelVecchio et al., 2002; Godfroid et al., 2000). Sin embargo, se ha demostrado que la cepa parental elegida puede condicionar las propiedades de los mutantes derivados de ella (Barrio et al., 2009; González et al., 2008; ver [Tabla S1](#)), por lo que el desarrollo de candidatos rugosos no debe basarse únicamente en el gen diana, sino que también se debe prestar atención a las propiedades intrínsecas a la cepa empleada.

Desarrollo de medios de cultivo

A comienzos del siglo XIX, la proliferación de bacterias en el laboratorio se realizaba típicamente utilizando fuentes nutritivas líquidas, como la clara de huevo o leche, y sólidas, como patata o carne, permitiendo estas últimas un mejor aislamiento de colonias bacterianas que, sin embargo, podían llegar a presentar un aspecto y pigmentación erráticos o incluso ser indistinguibles de la matriz. Para solucionarlo, a finales de este siglo, el equipo del laboratorio de microbiología del Premio Nobel de Medicina alemán Robert Koch emprendió varias mejoras clave para el cultivo bacteriano. En el año 1881, Koch y Walther Hesse, en busca de una técnica más estable, innovaron la incorporación de gelatina como agente solidificante de la formulación; no obstante, su uso presentaba la limitación de que la gelatina se licuaba a 37 °C, temperatura de incubación utilizada para favorecer el crecimiento de microorganismos y, además, podía ser degradada por algunos de ellos. Gracias al consejo de la ilustradora científica Angelina Hesse, en 1882, la gelatina se reemplazó por agar-agar, un extracto de algas transparente empleado en Indonesia como compuesto gelificante alimentario en climas cálidos; lográndose así un medio muy

estable que sentaría la base para el desarrollo de los futuros medios de cultivo utilizados en bacteriología (Hesse, 1992; Hitchens y Leikind, 1939; Mortimer, 2001). En el mismo grupo de investigación tuvo lugar el siguiente gran avance al verter agar fundido en un soporte ideado por Julius R. Petri, formado por dos discos de vidrio transparente enfrentados a modo de caja que permitía la aireación de su contenido. Actualmente, las placas de Petri, en su versión plástica, son un artilugio imprescindible en todos los laboratorios de microbiología del mundo (Shama, 2019).

La primera evidencia del empleo de placas con agar para el crecimiento de *Brucella* de la que se tiene constancia data del año 1920 (Huddleson, 1920). Desde entonces, se ha avanzado profundamente en la mejora de medios en los que propagar este género —con especial requerimiento nutricional— mediante el aporte de fuentes de nutrientes tales como extracto de levaduras, suero, sangre, peptonas, triptonas y otros compuestos de origen animal o vegetal; y además poder aislarlo en cultivos polimicrobianos mediante la incorporación de antibióticos (Brinley Morgan, 1960; Brodie y Sinton, 1975; de Miguel et al., 2011; Ewalt et al., 1983; Farrell y Robertson, 1972; Karagül, 2019; Renoux, 1954; Ryan, 1967; Thayer y Martin, 1966).

En el siglo XXI, los medios de cultivo han experimentado una revolución gracias a la adición de compuestos que permiten la identificación precisa de la especie o género bacteriano. Entre ellos se encuentran los medios diferenciales clásicos y los cromogénicos, en los cuales es posible distinguir un cambio de coloración en las colonias de interés. No obstante, así como el empleo de estos medios está muy extendido para la detección de bacterias en microbiología clínica y en la industria alimentaria (Perry, 2017), no existen medios de cultivo sólidos para el aislamiento diferencial de *Brucella*.

Modelos animales en la experimentación con *Brucella*

La utilización de animales de laboratorio en modelos experimentales sigue siendo hoy en día una práctica fundamental para el avance de la investigación. Sin embargo, su uso sólo es admisible cuando está respaldado por una justificación social y científica, así como por un correcto diseño metodológico y responsabilidad de autorregulación en base al riesgo-beneficio (Percie du Sert et al., 2020). Para ello, ha de responderse a tres preguntas: ¿es posible su reemplazo por otras técnicas?, ¿puede reducirse el número de animales a incluir en el estudio? y, por último, ¿los procedimientos diseñados están correcta-

mente refinados para minimizar su sufrimiento? (Tannenbaum y Bennett, 2015). Una vez resuelta la necesidad de uso es indispensable garantizar el bienestar de los animales (Directiva 2010/63/UE), proporcionándoles unas condiciones de transporte y mantenimiento adecuadas, junto a un trato digno por parte de personal formado y autorizado con lo dispuesto en la Orden ECC/566/2015. Además, es requisito imprescindible la aprobación de los procedimientos a realizar por parte del comité de ética de la autoridad competente (RD 53/2013; RD 1386/2018; RD 118/2021).

Existen numerosos modelos de experimentación animal, cuya elección dependerá directamente del objetivo del estudio. De entre todos ellos, los roedores constituyen uno de los modelos más utilizados dado su pequeño tamaño, facilidad de manejo, alta tasa reproductiva y su relativa cercanía filogenética con el ser humano y otras especies animales (Zúñiga y Orellana, 2016).

En la investigación con *Brucella*, el manejo de pequeños rumiantes no está exento de limitaciones prácticas y económicas, por lo que, a pesar de que el ratón (*Mus musculus*) no representa un hospedador natural de la misma, es frecuente el uso preliminar del modelo murino. En este, el curso de la infección es altamente dependiente tanto de la raza, edad, sexo, estado fisiológico y genética del animal como de la cepa, dosis y vía de inoculación de la bacteria. Por ello, se recomienda unificar los ensayos mediante el empleo de ratones hembra de la línea consanguínea BALB/c —de Bagg albinos, en referencia al investigador Halsey Bagg (Potter, 1985)— de entre 8 y 10 semanas de vida, en los cuales la inoculación se realiza principalmente por las vías intraperitoneal (IP) o subcutánea (SC). Igualmente, resulta esencial incluir grupos control infectados con cepas de referencia para estandarizar los estudios de virulencia, patogenicidad e inmunología. Dichos estudios suelen estar centrados en el análisis del bazo, dado que es en este órgano donde *Brucella* persiste durante más tiempo y puede incrementar notablemente su tamaño en respuesta a la infección hasta alcanzar niveles saturantes de bacterias (Grilló et al., 2012).

Una vez realizados los estudios pertinentes de *Brucella* y garantizada su seguridad en modelo murino, es preciso avanzar en la escala filogenética hasta el modelo ovino (*Ovis orientalis aries*). Aunque la obtención y el manejo de estos animales son más costosos, ostentan las condiciones biológicas óptimas para el estudio de *B. melitensis* como hospedadores definitivos (Garin-Bastuji et al., 1998). Al igual que otros modelos animales, el ovino también está sujeto a unas consideraciones específicas, entre las que destacan la adquisición de animales libres de enfermedades e infecciones, selección de

un adecuado tamaño muestral, transporte, manejo y monitorización clínica por personal entrenado, aclimatación previa al estudio, correcta higiene y acomodación con separación física de grupos experimentales, y registro de todo el seguimiento y procesos realizados (Berset et al., 2021; Rehbinder et al., 2000).

Además, se ha de tener en consideración que los animales jóvenes son menos susceptibles que los adultos a sufrir signos de enfermedad tras la infección con *Brucella*, de hecho, se ha observado que las crías lactantes de cabras y ovejas infectadas son capaces de superar la brucelosis (Fensterbank, 1978; Grilló et al., 1997). Esto es consecuencia del marcado tropismo de la bacteria hacia el sistema reproductor (Coelho et al., 2015), probablemente debido a que los órganos sexuales de machos y hembras de estos animales comparten un metabolismo particular —caracterizado por una alta producción de fructosa, glicerol, lactato y glutamato— que proporciona un nicho que favorece el crecimiento de *Brucella* y cubre sus requerimientos nutricionales específicos (Letesson et al., 2017). Por lo tanto, para no comprometer el bienestar de animales adultos, se deben emplear corderos de entre 3 y 6 meses de edad como punto de partida para estudiar la seguridad de candidatos vacunales de *B. melitensis* en modelo ovino (European Pharmacopoeia, 2016).

Bibliografía

- Adone, R., Muscillo, M., la Rosa, G., Francia, M. y Tarantino, M. (2011). Antigenic, immunologic and genetic characterization of rough strains *B. abortus* RB51, *B. melitensis* B115 and *B. melitensis* B18. *PLoS ONE*, 6(10), e24073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024073>
- AgResults y GALVmed. (2016). *Brucellosis Vaccine Prize*. <https://brucellosisvaccine.org/>
- Akpınar, O. (2016). Historical perspective of brucellosis: A microbiological and epidemiological overview. *Le Infezioni in Medicina*, 24(1), 77-86.
- Al Dahouk, S., Köhler, S., Occhialini, A., De Bagüés, M. P. J., Hammerl, J. A., Eisenberg, T., Vergnaud, G., Cloeckaert, A., Zygmunt, M. S., Whatmore, A. M., Melzer, F., Drees, K. P., Foster, J. T., Wattam, A. R. y Scholz, H. C. (2017). *Brucella* spp. of amphibians comprise genomically diverse motile strains competent for replication in macrophages and survival in mammalian hosts. *Scientific Reports*, 7(1), 1-17. <https://doi.org/10.1038/srep44420>
- Albayrak, A. y Albayrak, F. (2011). Hepatic granulomas associated with brucellosis. *Hepatitis Monthly*, 11(1), 1-2.
- Allen, C. A., Adams, L. G. y Ficht, T. A. (1998). Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infection and Immunity*, 66(3), 1008-1016. <https://doi.org/10.1128/iai.66.3.1008-1016.1998>
- Almond, J., Hacker, J., Harwood, C., Pizza, M., Rappuoli, R., Ron, E. Z., Sansonetti, P., Vanderslott, S. y Wieler, L. H. (2020). Development of vaccines at the time of COVID-19. *microLife*, 1(1), 3. <https://doi.org/10.1093/femsm/luqaa003>
- Alonso-Urmeneta, B., Marín, C., Aragón, V., Blasco, J. M., Díaz, R. y Moriyón, I. (1998). Evaluation of lipopolysaccharides and polysaccharides of different epitopic structures in the indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of brucellosis in small ruminants and cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(6), 749-754. <https://doi.org/10.1128/CDLI.5.6.749-754.1998>
- Alton, G. G., Elberg, S. S. y Crouch, D. (1967). Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. The stability of the degree of attenuation. *Journal of Comparative Pathology*, 77(3), 293-300. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(67\)90038-2](https://doi.org/10.1016/0021-9975(67)90038-2)
- Anacker, R. L., Finkelstein, R. A., Haskins, W. T., Landy, M., Milner, K. C., Ribi, E. y Stashak, P. W. (1964). Origin and properties of naturally occurring haptens from *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 88(6), 1705-1720. <https://doi.org/10.1128/jb.88.6.1705-1720.1964>
- Aragón, V., Díaz, R., Moreno, E. y Moriyón, I. (1996). Characterization of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* native haptens as outer membrane O-type polysaccharides independent from the smooth lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*, 178(4), 1070-1079. <https://doi.org/10.1128/jb.178.4.1070-1079.1996>
- Aranda, B. A., De Miguel, M. J., Antón, L. L., Bescós, M. S., Ripa, A. Z., Moriyón, I., Iriarte, M., Muñoz,

- P. M. y Álvarez, R. C. (2020). Development of attenuated live vaccine candidates against swine brucellosis in a non-zoonotic *B. suis* biovar 2 background. *Veterinary Research*, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00815-8>
- Ariza, J., Bosch, J., Gudiol, F., Liñares, J., Viladrich, P. F. y Martín, R. (1986). Relevance of *in vitro* antimicrobial susceptibility of *Brucella melitensis* to relapse rate in human brucellosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 30(6), 958-960. <https://doi.org/10.1128/AAC.30.6.958>
- Arkwright, J. A. (1921). Variation in bacteria in relation to agglutination both by salts and by specific serum. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 24(1), 36-60. <https://doi.org/10.1002/path.1700240104>
- Awad, E., Adwan, K., Farraj, M., Essawi, T. y Rumi, I. (2015). Cell envelope virulence genes among field strains of *Brucella melitensis* isolated in west bank part of Palestine. *Italian Oral Surgery*, 6, 281-286. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.08.073>
- Baldi, P. C. y Giambartolomei, G. H. (2013). Immunopathology of *Brucella* infection. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 8(1), 18-26. <https://doi.org/10.2174/157489113805290737>
- Baldwin, C. L. y Goenka, R. (2006). Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: Does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? *Critical reviews in immunology*, 26(5), 407-442. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v26.i5.30>
- Barrio, M. B., Grilló, M. J., Muñoz, P. M., Jacques, I., González, D., De Miguel, M. J., Marín, C. M., Barberán, M., Letesson, J. J., Gorvel, J. P., Moriyón, I., Blasco, J. M. y Zygmunt, M. S. (2009). Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less effective than Rev 1 vaccine against *Brucella melitensis* infection of sheep. *Vaccine*, 27(11), 1741-1749. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.025>
- Berset Convenor, F. W. G. O. F. A. C. M., Caristo, M. E., Ferrara, F., Hardy, P., Oropeza-Moe, M., y Waters, R. (2021). FELASA recommendations of best practices for the health management of ruminants and pigs used for scientific and educational purposes. *Laboratory animals*, 55(2), 117-128. <https://doi.org/10.1177/0023677220944461>
- Bi, Y., Mann, E., Whitfield, C. y Zimmer, J. (2018). Architecture of a channel-forming O-antigen polysaccharide ABC transporter. *Nature*, 553(7688), 361-365. <https://doi.org/10.1038/nature25190>
- Bi, Y. y Zimmer, J. (2020). Structure and ligand-binding properties of the O antigen ABC transporter carbohydrate-binding domain. *Structure*, 28(2), 252-258.e2. <https://doi.org/10.1016/j.str.2019.11.020>
- Blasco, J. M. (1997). A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Preventive Veterinary Medicine*, 31, 275-283. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(96\)01110-5](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(96)01110-5)
- Blasco, J. M. (2010). Control and eradication strategies for *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Prilozi*, 31(1), 145-165.

- Blasco, J. M., Moreno, E. y Moriyón, I. (2016). Brucellosis vaccines and vaccine candidates. En *Veterinary vaccines for developing countries*. Roma: FAO (pp. 1-33).
- Bosilkovski, M., Keramat, F. y Arapović, J. (2021). The current therapeutical strategies in human brucellosis. *Infection*, 49(5), 823-832. <https://doi.org/10.1007/s15010-021-01586-w>
- Brambila-Tapia, A. J. L. y Pérez-Rueda, E. (2014). A functional and phylogenetic comparison of quorum sensing related genes in *Brucella melitensis* 16M. *Journal of Microbiology*, 52(8), 709-715. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3570-x>
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., Garrity, G. M. y Staley, J. T. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - Volume 2: The Proteobacteria* (2nd ed., Vol. 2). New York: Springer. <https://doi.org/10.1177/001872086000200109>
- Brinley Morgan, W. J. (1960). Comparison of various media for the growth and isolation of *Brucella*. *Research in Veterinary Science*, 1(1), 47-52. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)35028-8](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)35028-8)
- Brodie, J., y Sinton, G. P. (1975). Fluid and solid media for isolation of *Brucella abortus*. *Journal of Hygiene*, 74(3), 359-367. <https://doi.org/10.1017/S0022172400046878>
- Bronner, D., Clarke, B. R. y Whitfield, C. (1994). Identification of an ATP-binding cassette transport system required for translocation of lipopolysaccharide O-antigen side-chains across the cytoplasmic membrane of *Klebsiella pneumoniae* serotype O1. *Molecular Microbiology*, 14(3), 505-519. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb02185.x>
- Bundle, D. R., Cherwonogrodzky, J. W., Gidney, M. A. J., Meikle, P. J., Perry, M. B. y Peters, T. (1989). Definition of *Brucella* A and M epitopes by monoclonal typing reagents and synthetic oligosaccharides. *Infection and Immunity*, 57(9), 2829-2836. <https://doi.org/10.1128/iai.57.9.2829-2836.1989>
- Bundle, D. R., Cherwonogrodzky, J. W. y Perry, M. B. (1988). Characterization of *Brucella* polysaccharide B. *Infection and Immunity*, 56(5), 1101-1106. <https://doi.org/10.1128/iai.56.5.1101-1106.1988>
- Bundle, D. R. y McGiven, J. (2017). Brucellosis: Improved diagnostics and vaccine insights from synthetic glycans. *Accounts of Chemical Research*, 50(12), 2958-2967. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00445>
- Caffalette, C. A., Kuklewicz, J., Spellmon, N. y Zimmer, J. (2020). Biosynthesis and export of bacterial glycolipids. *Annual Review of Biochemistry*, 89, 741-768. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-011520-104707>
- Caffalette, C. A. y Zimmer, J. (2021). Cryo-EM structure of the full-length WzmWzt ABC transporter required for lipid-linked O antigen transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(1), 1-10. <https://doi.org/10.1073/pnas.2016144118>
- Caroff, M., Bundle, D. R., Perry, M. B., Cherwonogrodzky, J. W. y Robert Duncan, J. (1984). Antigenic S-type lipopolysaccharide of *Brucella abortus* 1119-3. *Infection and Immunity*, 46(2), 384-388. <https://doi.org/10.1128/iai.46.2.384-388.1984>

- Clarke, B. R., Cuthbertson, L. y Whitfield, C. (2004). Nonreducing terminal modifications determine the chain length of polymannose O antigens of *Escherichia coli* and couple chain termination to polymer export via an ATP-binding cassette transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35709-35718. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404738200>
- Cloekaert, A., Grayon, M. y Grépinet, O. (2002). Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP based on a mutation in the *rpsL* gene. *Vaccine*, 20(19-20), 2546-2550. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00159-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00159-7)
- Cloekaert, A., Grayon, M., Verger, J. M., Letesson, J. J. y Godfroid, F. (2000). Conservation of seven genes involved in the biosynthesis of the lipopolysaccharide O-side chain in *Brucella* spp. *Research in Microbiology*, 151(3), 209-216. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)00141-8](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)00141-8)
- Cloekaert, A., Weynants, V., Godfroid, J., Verger, J. M., Grayon, M. y Zygmunt, M. S. (1998). O-polysaccharide epitopic heterogeneity at the surface of *Brucella* spp. studied by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(6), 862-870. <https://doi.org/10.1128/CDLI.5.6.862-870.1998>
- Cloekaert, A., Zygmunt, M. S., Dubray, G. y Limet, J. N. (1993). Characterization of O-polysaccharide specific monoclonal antibodies derived from mice infected with the rough *Brucella melitensis* strain B115. *Journal of General Microbiology*, 139(7), 1551-1556. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-7-1551>
- Cloekaert, A., Zygmunt, M. S., Nicolle, J. C., Dubray, G. y Limet, J. N. (1992). O-chain expression in the rough *Brucella melitensis* strain B115: Induction of O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies and intracellular localization demonstrated by immunoelectron microscopy. *Journal of General Microbiology*, 138(6), 1211-1219. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-6-1211>
- Cloekaert, A., Zygmunt, M. S., Scholz, H. C., Vizcaino, N. y Whatmore, A. M. (2021). Editorial: Pathogenomics of the genus *Brucella* and beyond. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1-5. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.700734>
- Coelho, A. C., García Díez, J. y Coelho, A. M. (2015). Risk factors for *Brucella* spp. in domestic and wild animals. *Updates on Brucellosis. IntechOpen*. <https://doi.org/https://doi.org/10.5772/61325>
- Colwell, R. R. (2000). Alice C. Evans: Breaking barriers. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 72(5), 349-356.
- Conde-Alvarez, R., Grilló, M. J., Salcedo, S. P., De Miguel, M. J., Fugier, E., Gorvel, J. P., Moriyón, I. y Iriarte, M. (2006). Synthesis of phosphatidylcholine, a typical eukaryotic phospholipid, is necessary for full virulence of the intracellular bacterial parasite *Brucella abortus*. *Cellular Microbiology*, 8(8), 1322-1335. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00712.x>
- Copin, R., Vitry, M. A., Hanot Mambres, D., Machelart, A., De Trez, C., Vanderwinden, J. M., Magez, S., Akira, S., Ryffel, B., Carlier, Y., Letesson, J. J. y Muraille, E. (2012). *In situ* microscopy analysis reveals local innate immune response developed around *Brucella* infected cells in resistant and susceptible mice. *PLoS Pathogens*, 8(3), e1002575. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002575>

- Corbel, M. J. (2006). Brucellosis in humans and animals. En *World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Organisation for Animal Health* (p. 102).
- Corsetti, P. P., De Almeida, L. A., Carvalho, N. B., Azevedo, V., Silva, T. M. A., Teixeira, H. C., Faria, A. C. y Oliveira, S. C. (2013). Lack of endogenous IL-10 enhances production of proinflammatory cytokines and leads to *Brucella abortus* clearance in mice. *PLoS ONE*, 8(9), 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074729>
- Cuthbertson, L., Kimber, M. S. y Whitfield, C. (2007). Substrate binding by a bacterial ABC transporter involved in polysaccharide export. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19529-19534. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705709104>
- Cuthbertson, L., Powers, J. y Whitfield, C. (2005). The C-terminal domain of the nucleotide-binding domain protein Wzt determines substrate specificity in the ATP-binding cassette transporter for the lipopolysaccharide O-antigens in *Escherichia coli* serotypes O8 and O9a. *Journal of Biological Chemistry*, 280(34), 30310-30319. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504371200>
- Dabral, N., Burcham, G. N., Jain-Gupta, N., Sriranganathan, N. y Vemulapalli, R. (2019). Overexpression of *wbkF* gene in *Brucella abortus* RB51WboA leads to increased O-polysaccharide expression and enhanced vaccine efficacy against *B. abortus* 2308, *B. melitensis* 16M, and *B. suis* 1330 in a murine brucellosis model. *PLoS ONE*, 14(3), 1-21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213587>
- Dadar, M., Fakhri, Y., Shahali, Y. y Mousavi Khaneghah, A. (2020). Contamination of milk and dairy products by *Brucella* species: A global systematic review and meta-analysis. *Food Research International*, 128, 108775. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108775>
- Dadar, M., Tiwari, R., Sharun, K. y Dhama, K. (2021). Importance of brucellosis control programs of livestock on the improvement of one health. En *Veterinary Quarterly* (Vol. 41, Número 1, pp. 137-151). *Vet Q*. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1894501>
- De Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. y Timmis, K. N. (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria. *Journal of Bacteriology*, 172(11), 6568-6572. <https://doi.org/10.1128/jb.172.11.6568-6572.1990>
- De Miguel, M. J., Marín, C. M., Muñoz, P. M., Dieste, L., Grilló, M. J., y Blasco, J. M. (2011). Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(4), 1458-1463. <https://doi.org/10.1128/JCM.02301-10>
- Delrue, R. M., Deschamps, C., Léonard, S., Nijskens, C., Danese, I., Schaus, J. M., Bonnot, S., Ferooz, J., Tibor, A., De Bolle, X. y Letesson, J. J. (2005). A quorum-sensing regulator controls expression of both the type IV secretion system and the flagellar apparatus of *Brucella melitensis*. *Cellular Microbiology*, 7(8), 1151-1161. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00543.x>
- DelVecchio, V. G., Kapratl, V., Redkar, R. J., Patra, G., Mujer, C., Los, T., Ivanova, N., Anderson, I.,

- Bhattacharyya, A., Lykidis, A., Reznik, G., Jablonski, L., Larsen, N., D'Souza, M., Bernal, A., Mazur, M., Goltsman, E., Selkov, E., Elzer, P. H., ... Overbeek, R. (2002). The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(1), 443-448. <https://doi.org/10.1073/pnas.221575398>
- Díaz, R., Jones, L. M. y Wilson, J. B. (1967). Antigenic relationship of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. *Journal of Bacteriology*, 93(4), 1262-1268. <https://doi.org/10.1128/jb.93.4.1262-1268.1967>
- Dong, H., Liu, W., Peng, X., Jing, Z. y Wu, Q. (2013). The effects of MucR on expression of type IV secretion system, quorum sensing system and stress responses in *Brucella melitensis*. *Veterinary Microbiology*, 166(3-4), 535-542. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.023>
- Dorneles, E. M. S., Teixeira-Carvalho, A., Araújo, M. S. S., Sriranganathan, N. y Lage, A. P. (2015). Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination. *Vaccine*, 33(31), 3659-3666. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.05.057>
- Douglas, J. T. y Palmer, D. A. (1988). Use of monoclonal antibodies to identify the distribution of A and M epitopes on smooth *Brucella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(7), 1353-1356. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.7.1353-1356.1988>
- Ducrotoy, M. J., Conde-Álvarez, R., Blasco, J. M. y Moriyón, I. (2016). A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 171, 81-102. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.002>
- Elberg, S. S. y Faunce, K. (1957). Immunization against *Brucella* infection. VI. Immunity conferred on goats by a nondependent mutant from a streptomycin-dependent mutant strain of *Brucella melitensis*. *Journal of bacteriology*, 73(2), 211-217. <https://doi.org/10.1128/jb.73.2.211-217.1957>
- España, Ministerio de Economía y Competitividad. (2015). Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *Boletín Oficial del Estado*, 78 (pp. 27940-27973).
- España, Ministerio de la Presidencia. (1997a). Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. *Boletín Oficial del Estado*, 124 (pp. 16100-16111).
- España, Ministerio de la Presidencia. (1997b). Real Decreto 773/1997, de 30 de mayo, sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud relativas a la utilización por los trabajadores de equipos de protección individual. *Boletín Oficial del Estado*, 140 (pp. 1-17).
- España, Ministerio de la Presidencia. (2013). Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *Boletín Oficial del Estado*, 34 (pp. 11370-11421).
- España, Ministerio de la Presidencia. (2018). Real Decreto 1386/2018, de 19 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables

- para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, *Boletín Oficial del Estado*, 280 (pp. 112804-112806).
- España, Ministerio de la Presidencia. (2021). *Real Decreto 118/2021, de 23 de febrero, por el que se modifica el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos*, *Boletín Oficial del Estado*, 47 (pp. 22616-22618).
- European Pharmacopoeia. (2016). *Brucellosis Vaccine (Live) (Brucella melitensis Rev.1 strain) for Veterinary Use* (Ed. 9.0). 1024–1025.
- Ewalt, D. R., Packer, R. A., y Harris, S. K. (1983). An improved selective medium for isolating *Brucella* species from bovine milk. *Procedures of International Symposium on Veterinary Laboratory Diagnosis*, 3, 577–558.
- Excler, J. L., Saville, M., Berkley, S. y Kim, J. H. (2021). Vaccine development for emerging infectious diseases. En *Nature Medicine* (Vol. 27, Número 4, pp. 591-600). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01301-0>
- Farrell, I. D., y Robertson, L. (1972). A comparison of various selective media, including a new selective medium for the isolation of brucellae from milk. *Journal of Applied Bacteriology*, 35(4), 625–630. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1972.tb03744.x>
- FAO. (2009). *Brucella melitensis* in Eurasia and the Middle East. En *Animal Production and Health Proceedings*, Food and Agriculture Organization. Número 10, Roma.
- Fensterbank R. (1978). Congenital brucellosis in cattle associated with localisation in a hygroma. *The Veterinary record*, 103(13), 283–284. <https://doi.org/10.1136/vr.103.13.283>
- Fontana, C., Conde-Álvarez, R., Stähle, J., Holst, O., Iriarte, M., Zhao, Y., Arce-Gorvel, V., Hanniffy, S., Gorvel, J.-P., Moriyón, I. y Widmalm, G. (2016). Structural studies of lipopolysaccharide-defective mutants from *Brucella melitensis* identify a core oligosaccharide critical in virulence. *Journal of Biological Chemistry*, 291(14), 7727–7741. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.701540>
- Franc, K. A., Krecek, R. C., Häslér, B. N. y Arenas-Gamboa, A. M. (2018). Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action. *BMC Public Health*, 18(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12889-017-5016-y>
- García-Méndez, K. B., Hielpos, S. M., Soler-Lloréns, P. F., Arce-Gorvel, V., Hale, C., Gorvel, J. P., O'Callaghan, D. y Keriél, A. (2019). Infection by *Brucella melitensis* or *Brucella papionis* modifies essential physiological functions of human trophoblasts. *Cellular Microbiology*, 21(7), e13019. <https://doi.org/10.1111/cmi.13019>
- Garin-Bastuji, B., Blasco, J. M., Grayon, M. y Verger, J. M. (1998). *Brucella melitensis* infection in sheep: Present and future. *Veterinary Research*, 29(3-4), 255-274. [https://doi.org/10.1016/S0928-4249\(98\)80027-8](https://doi.org/10.1016/S0928-4249(98)80027-8)
- Godefroid, M., Svensson, M. V., Cambier, P., Uzureau, S., Mirabella, A., De Bolle, X., Van Cutsem, P.,

- Widmalm, G. y Letesson, J. J. (2010). *Brucella melitensis* 16M produces a mannan and other extracellular matrix components typical of a biofilm. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59(3), 364-377. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00689.x>
- Godfroid, F., Cloeckaert, A., Taminiau, B., Danese, I., Tibor, A., De Bolle, X., Mertens, P. y Letesson, J. J. (2000). Genetic organisation of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of *Brucella melitensis* 16M (*wbk*). *Research in microbiology*, 151(8), 655-668. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(00\)90130-x](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(00)90130-x)
- Godfroid, F., Taminiau, B., Danese, I., Denoel, P., Tibor, A., Weynants, V., Cloeckaert, A., Godfroid, J. y Letesson, J. J. (1998). Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Infection and immunity*, 66(11), 5485-5493. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.11.5485-5493.1998>
- Godfroid, J., Garin-Bastuji, B., Saegerman, C. y Blasco, J. M. (2013). Brucellosis in terrestrial wildlife. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 32(1), 27-42. <https://doi.org/10.20506/rst.32.1.2180>
- González, D., Grilló, M. J., De Miguel, M. J., Ali, T., Arce-Gorvel, V., Delrue, R. M., Conde-Alvarez, R., Muñoz, P. M., López-Goñi, I., Iriarte, M., Marín, C. M., Weintraub, A., Widmalm, G., Zygmunt, M., Letesson, J. J., Gorvel, J. P., Blasco, J. M. y Moriyón, I. (2008). Brucellosis vaccines: Assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *PloS one*, 3(7), e2760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002760>
- Gorvel, J. P. y Moreno, E. (2002). *Brucella* intracellular life: From invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology*, 90(1-4), 281-297. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00214-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00214-6)
- Green, M. R. y Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.
- Greenfield, L. K. y Whitfield, C. (2012). Synthesis of lipopolysaccharide O-antigens by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydrate Research*, 356, 12-24. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.02.027>
- Grilló, M. J., Barberán, M., y Blasco, J. M. (1997). Transmission of *Brucella melitensis* from sheep to lambs. *Veterinary Record*, 140(23), 602-605. <https://doi.org/10.1136/vr.140.23.602>
- Grilló, M. J., Blasco, J. M., Gorvel, J., Moriyón, I. y Moreno, E. (2012). What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Veterinary Research*, 43(1), 1-35. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-29>
- Grilló, M. J., Manterola, L., De Miguel, M. J., Muñoz, P. M., Blasco, J. M., Moriyón, I. y 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(15), 2910-2916. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.12.038>
- Guimarães, E. S., Martins, J. M., Gomes, M. T. R., Cerqueira, D. M. y Oliveira, S. C. (2020). Lack of interleukin-6 affects IFN- γ and TNF- α production and early *in vivo* control of *Brucella abortus* infection. *Pathogens*, 9(12), 1-14. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121040>

- Guzmán-Verri, C., Suárez-Esquivel, M., Ruíz-Villalobos, N., Zygmunt, M. S., Gonnet, M., Campos, E., Viquez-Ruiz, E., Chacón-Díaz, C., Aragón-Aranda, B., Conde-Álvarez, R., Moriyón, I., Blasco, J. M., Muñoz, P. M., Baker, K. S., Thomson, N. R., Cloeckaert, A. y Moreno, E. (2019). Genetic and phenotypic characterization of the etiological agent of canine orchiepididymitis smooth *Brucella* sp. BCCN84.3. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(JUN), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00175>
- Haag, A. F., Myka, K. K., Arnold, M. F. F., Caro-Hernández, P. y Ferguson, G. P. (2010). Importance of lipopolysaccharide and cyclic β -1,2-glucans in *Brucella*-mammalian infections. *International Journal of Microbiology*, 2010(124509), 1-12. <https://doi.org/10.1155/2010/124509>
- Hagelueken, G., Clarke, B. R., Huang, H., Tuukkanen, A., Danciu, I., Svergun, D. I., Hussain, R., Liu, H., Whitfield, C. y Naismith, J. H. (2015). A coiled-coil domain acts as a molecular ruler to regulate O-antigen chain length in lipopolysaccharide. *Nature Structural and Molecular Biology*, 22(1), 50-56. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2935>
- Herzberg, M. y Elberg, S. S. (1953). Immunization against *Brucella* infection. I. Isolation and characterization of a streptomycin-dependent mutant. *Journal of bacteriology*, 66(5), 585-599. <https://doi.org/10.1128/jb.66.5.585-599.1953>
- Herzberg, M. y Elberg, S. S. (1955). Immunization against *Brucella* infection. III. Response of mice and guinea pigs to injection of viable and nonviable suspensions of a streptomycin-dependent mutant of *Brucella melitensis*. *Journal of bacteriology*, 69(4), 432-435. <https://doi.org/10.1128/jb.69.4.432-435.1955>
- Hesse, W. (1992). Walther and Angelina Hesse-Early contributors to bacteriology. *ASM News*, 58(8), 425-428. <https://www.asm.org/ccLibraryFiles/FILENAME/0000000227/580892p425.pdf>
- Higgins, J. L., Gonzalez-Juarrero, M. y Bowen, R. A. (2017). Evaluation of shedding, tissue burdens, and humoral immune response in goats after experimental challenge with the virulent *Brucella melitensis* strain 16M and the reduced virulence vaccine strain Rev. 1. *PLoS ONE*, 12(10), 1-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185823>
- Hitchens, A. P., y Leikind, M. C. (1939). The Introduction of agar-agar into Bacteriology. *Journal of Bacteriology*, 37(5), 485-493. <https://doi.org/10.1128/jb.37.5.485-493.1939>
- Hug, I. y Feldman, M. F. (2011). Analogies and homologies in lipopolysaccharide and glycoprotein biosynthesis in bacteria. *Glycobiology*, 21(2), 138-151. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq148>
- Huddleson, I. F. (1920). Studies in infectious abortions: IV: The isolation of *Bacterium abortus* from milk. *Mich. Agric. Exp. Htn Tec. Rep.*, 49, 25.
- Hull, N. C. y Schumaker, B. A. (2018). Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine. *Infection Ecology and Epidemiology*, 8(1). <https://doi.org/10.1080/20008686.2018.1500846>
- Hur, J., Xiang, Z., Feldman, E. L. y He, Y. (2011). Ontology-based *Brucella* vaccine literature indexing and systematic analysis of gene-vaccine association network. *BMC Immunology*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-12-49>

- Issa, M. N. y Ashhab, Y. (2016). Identification of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine-strain genetic markers: Towards understanding the molecular mechanism behind virulence attenuation. *Vaccine*, 34(41), 4884-4891. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.059>
- Iwasaki, A. y Omer, S. B. (2020). Why and how vaccines work. *Cell*, 183(2), 290-295. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.040>
- Izquierdo, L., Merino, S., Regué, M., Rodríguez, F. y Tomás, J. M. (2003). Synthesis of a *Klebsiella pneumoniae* O-antigen heteropolysaccharide (O12) requires an ABC 2 transporter. *Journal of Bacteriology*, 185(5), 1634-1641. <https://doi.org/10.1128/JB.185.5.1634-1641.2003>
- Jones, L. M., Díaz, R. y Taylor, A. G. (1973). Characterization of allergens prepared from smooth and rough strains of *Brucella melitensis*. *British Journal of Experimental Pathology*, 54(5), 492-508.
- Kanehisa, M. y Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Karagül, M. S. (2019). Evaluation of adding erythritol to Farrell medium for primary isolation of the *Brucella melitensis* strains. *Kocatepe Veterinary Journal*, 12(1), 1-1. <https://doi.org/10.30607/kvj.494891>
- Kido, N., Torgov, V. I., Sugiyama, T., Uchiya, K., Sugihara, H., Komatsu, T., Kato, N. y Jann, K. (1995). Expression of the O9 polysaccharide of *Escherichia coli*: sequencing of the *E. coli* O9 *rfb* gene cluster, characterization of mannosyl transferases, and evidence for an ATP-binding cassette transport system. *Journal of Bacteriology*, 177(8), 2178-2187. <https://doi.org/10.1128/jb.177.8.2178-2187.1995>
- Kubler-Kielb, J. y Vinogradov, E. (2013). Reinvestigation of the structure of *Brucella* O-antigens. *Carbohydrate Research*, 378, 144-147. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.03.021>
- Kuby, J., Goldsby, R. A., Kindt, T. J. y Osborne, B. A. (2006). *Immunology* (6th ed.). WH Freeman.
- Laine, C. G., Scott, H. M., y Arenas-Gamboa, A. M. (2022). Human brucellosis: Widespread information deficiency hinders an understanding of global disease frequency. *PLoS neglected tropical diseases*, 16(5), e0010404. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010404>
- Leclercq, S. O., Cloeckaert, A. y Zygmunt, M. S. (2020). Taxonomic organization of the family *Brucellaceae* based on a phylogenomic approach. *Frontiers in Microbiology*, 10(January), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03083>
- Letesson, J. J., Barbier, T., Zúñiga-Ripa, A., Godfroid, J., de Bolle, X., y Moriyón, I. (2017). *Brucella* genital tropism: What's on the menu. *Frontiers in Microbiology* 8(506). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00506>
- Mancilla, M. (2015). Smooth to rough dissociation in *Brucella*: The missing link to virulence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 5(January), 98. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00098>
- Mancilla, M., Grilló, M. J., De Miguel, M. J., López-Goñi, I., San-Román, B., Zabalza-Baranguá, A. y Moriyón, I. (2013). Deletion of the GI-2 integrase and the *wbkA* flanking transposase improves the stability of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine. *Veterinary Research*, 44(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-105>

- Mann, E., Kimber, M. S. y Whitfield, C. (2019). Bioinformatics analysis of diversity in bacterial glycan chain-termination chemistry and organization of carbohydrate-binding modules linked to ABC transporters. *Glycobiology*, 29(12), 822-838. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz066>
- Mann, E., Mallette, E., Clarke, B. R., Kimber, M. S. y Whitfield, C. (2016). The *Klebsiella pneumoniae* O12 ATP-binding cassette (ABC) transporter recognizes the terminal residue of its O-antigen polysaccharide substrate. *Journal of Biological Chemistry*, 291(18), 9748-9761.
- Martirosyan, A., Moreno, E. y Gorvel, J. P. (2011). An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunological Reviews*, 240(1), 211-234. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00982.x>
- Masjedian Jezi, F., Razavi, S., Mirnejad, R. y Zamani, K. (2019). Immunogenic and protective antigens of *Brucella* as vaccine candidates. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 65(November 2018), 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.03.015>
- McCamish, J. y Elberg, S. S. (1962). Immunization against *Brucella* infection: IX. The response of the guinea pig to the immunizing strain (Rev. 1) of *Brucella melitensis*. *The American journal of pathology*, 40(1), 77-93.
- McQuiston, J. R., Vemulapalli, R., Inzana, T. J., Schurig, G. G., Sriranganathan, N., Fritzinger, D., Hadfield, T. L., Warren, R. A., Lindler, L. E., Snellings, N., Hoover, D., Halling, S. M. y Boyle, S. M. (1999). Genetic characterization of a Tn5-disrupted glycosyltransferase gene homolog in *Brucella abortus* and its effect on lipopolysaccharide composition and virulence. *Infection and Immunity*, 68(9), 5471. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.5471-5471.2000>
- Meikle, P. J., Perry, M. B., Cherwonogrodzky, J. W. y Bundle, D. R. (1989). Fine structure of A and M antigens from *Brucella* biovars. *Infection and Immunity*, 57(9), 2820-2828. <https://doi.org/10.1128/iai.57.9.2820-2828.1989>
- Meng, F., Pan, X. y Tong, W. (2018). Rifampicin versus streptomycin for brucellosis treatment in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS ONE*, 13(2), 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191993>
- Merrick, M., Filser, M., Kennedy, C. y Dixon, R. (1978). Polarity of mutations induced by insertion of transposons Tn5, Tn7 and Tn10 into the nif gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *MGG Molecular & General Genetics*, 165(1), 103-111. <https://doi.org/10.1007/BF00270382>
- Milner, K. C., Anacker, R. L., Fukushi, K., Haskins, W. T., Landy, M., Malmgren, B. y Ribí, E. (1963). Symposium on relationship of structure of microorganisms to their immunological properties. III. Structure and biological properties of surface antigens from Gram-negative bacteria. *Bacteriological reviews*, 27, 352-35268. <https://doi.org/10.1128/br.27.4.352-368.1963>
- Mirzaei, R., Sholeh, M., Jalalifar, S., Zafari, E., Kazemi, S., Rasouli-Saravani, A., Karampoor, S. y Yousefimashouf, R. (2021). Immunometabolism in human brucellosis: An emerging field of investigation. *Microbial pathogenesis*, 158. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2021.105115>

- Misra, U. K., Kalita, J. y Shakir, R. A. (2003). *Brucellosis*. En *Tropical Neurology (Vademecum)* (pp. 75-76).
- Mittal, K. R., Tizard, I. R. y Barnum, D. A. (1985). Serological cross-reactions between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0:9. *International Journal of Zoonoses*, 12(3), 219-227. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(97\)00202-2](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(97)00202-2)
- Mohammad, M. M., Tomita, N., Ohta, M. y Movileanu, L. (2016). The transmembrane domain of a bicomponent ABC transporter exhibits channel-forming activity. *ACS Chemical Biology*, 11(9), 2506-2518. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00383>
- Monreal, D., Grilló, M. J., González, D., Marín, C. M., De Miguel, M. J., López-Goñi, I., Blasco, J. M., Cloeckaert, A. y Moriyón, I. (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. *Infection and immunity*, 71(6), 3261-3271. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3261-3271.2003>
- Montaraz, J. A., Winter, A. J., Hunter, D. M., Sowa, B. A., Wu, A. M. y Adams, L. G. (1986). Protection against *Brucella abortus* in mice with O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies. *Infection and Immunity*, 51(3), 961-963. <https://doi.org/10.1128/iai.51.3.961-963.1986>
- Moreno, E. (2014). Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Frontiers in Microbiology*, 5, 213. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00213>
- Moreno, E. (2021). The one hundred year journey of the genus *Brucella* (Meyer and Shaw 1920). *FEMS Microbiology Reviews*, 45(1).
- Moreno, E., Jones, L. M. y Berman, D. T. (1984). Immunochemical characterization of rough *Brucella* lipopolysaccharides. *Infection and Immunity*, 43(3), 779-782. <https://doi.org/10.1128/iai.43.3.779-782.1984>
- Moriyón, I., Grilló, M. J., Monreal, D., González, D., Marín, C., López-Goñi, I., Mainar-Jaime, R. C., Moreno, E. y Blasco, J. M. (2004). Rough vaccines in animal brucellosis: Structural and genetic basis and present status. *Veterinary research*, 35(1), 1-38. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003037>
- Moriyón, I. y López-Goñi, I. (1998). Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. *International microbiology: The official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 1(1), 19-26.
- Mortimer, P. (2001). Koch's colonies and the culinary contribution of Fanny Hesse. *Microbiology Today*, 28, 136-137.
- Mühldorfer, K., Wibbelt, G., Szentiks, C. A., Fischer, D., Scholz, H. C., Zschöck, M. y Eisenberg, T. (2017). The role of 'atypical' *Brucella* in amphibians: Are we facing novel emerging pathogens? *Journal of Applied Microbiology*, 122(1), 40-53. <https://doi.org/10.1111/jam.13326>
- Muñoz, P. M., Marín, C. M., Monreal, D., González, D., Garin-Bastuji, B., Díaz, R., Mainar-Jaime, R. C., Moriyón, I. y Blasco, J. M. (2005). Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results

- due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(1), 141-151. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.1.141-151.2005>
- Nikaido, H. and y Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *New York State Journal of Medicine*, 49(1), 1-32. <https://doi.org/10.1128/mr.49.1.1-32.1985>
- O'Callaghan, D. (2020). Human brucellosis: Recent advances and future challenges. En *Infectious Diseases of Poverty* (Vol. 9, Número 1, pp. 1-2). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s40249-020-00715-1>
- Occhialini, A., Hofreuter, D., Ufermann, C. M., Al Dahouk, S., y Köhler, S. (2022). The Retrospective on atypical *Brucella* species leads to novel definitions. *Microorganisms*, 10(4), 813. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040813>
- OIE. (2018). Chapter 3.8.7: Ovine epididymitis (*Brucella ovis*). En *Office International of Epizooties, World Organisation for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. (8th ed.). World Organisation for Animal Health.
- OIE. (2022). Chapter 3.1.4: Brucellosis (Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). En *Office International of Epizooties, World Organisation for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. (8th ed.). World Organisation for Animal Health.
- Olsen, S. C. y Palmer, M. V. (2014). Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50 years. *Veterinary Pathology*, 51(6), 1076-1089. <https://doi.org/10.1177/0300985814540545>
- Pappas, G., Panagopoulou, P., Christou, L. y Akritidis, N. (2006). *Brucella* as a biological weapon. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(19-20), 2229-2236. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6311-4>
- Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L. y Tsianos, E. V. (2006). The new global map of human brucellosis. *Lancet Infectious Diseases*, 6(2), 91-99. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70382-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70382-6)
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., ... Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*, 18(7), e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
- Pérez-Burgos, M., García-Romero, I., Jung, J., Valvano, M. A. y Søgaard-Andersen, L. (2019). Identification of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis priming enzyme and the O-antigen ligase in *Myxococcus xanthus*: critical role of LPS O-antigen in motility and development. *Molecular Microbiology*, 0, 1-21. <https://doi.org/10.1111/mmi.14354>
- Perry, J. D. (2017). A decade of development of chromogenic culture media for clinical microbiology in an era of molecular diagnostics. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(2), 449-479. <https://doi.org/10.1128/CMR.00097-16>
- Picard-Hagen, N., Berthelot, X., Champion, J. L., Eon, L., Lyazrhi, F., Marois, M., Peglion, M., Schuster, A., Trouche, C. y Garin-Bastuji, B. (2015). Contagious epididymitis due to *Brucella ovis*: relationship

- between sexual function, serology and bacterial shedding in semen. *BMC Veterinary Research*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0440-7>
- Plotkin, S. A. y Plotkin, S. L. (2011). The development of vaccines: How the past led to the future. En *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 9, Número 12, pp. 889-893). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2668>
- Potter, M. (1985). History of the BALB/c family. *Current topics in microbiology and immunology*, 122, 1-5. https://doi.org/10.1007/978-3-642-70740-7_1
- Rahmanpour, M., Keramat, F., Jourghasemi, S., Rashidi, G., Abdolmaleki, M., Solgi, G. y Hajilooi, M. (2019). Direct correlation between Th1 and Th17 responses in immunity to *Brucella* infection. *Microbes and Infection*, 21(10), 441-448. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2019.05.002>
- Rajashekara, G., Covert, J., Petersen, E., Eskra, L. y Splitter, G. (2008). Genomic island 2 of *Brucella melitensis* is a major virulence determinant: Functional analyses of genomic islands. *Journal of Bacteriology*, 190(18), 6243-6252. <https://doi.org/10.1128/JB.00520-08>
- Rajendhran, J. (2021). Genomic insights into *Brucella*. En *Infection, Genetics and Evolution* (Vol. 87). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104635>
- Rambow-Larsen, A. A., Rajashekara, G., Petersen, E. y Splitter, G. (2008). Putative quorum-sensing regulator BlxR of *Brucella melitensis* regulates virulence factors including the type IV secretion system and flagella. *Journal of Bacteriology*, 190(9), 3274-3282. <https://doi.org/10.1128/JB.01915-07>
- Reeves, P. (1993). Evolution of *Salmonella* O antigen variation by interspecific gene transfer on a large scale. *Trends in Genetics*, 9(1), 17-22. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(93\)90067-R](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90067-R)
- Rehbinder, C., Alenius, S., Bures, J., De las Heras, M., Greko, C., Kroon, P. S. y Gutzwille, A. (2000). FELASA recommendations for the health monitoring of experimental units of calves, sheep and goats - Report of the federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Animal Health. *Laboratory Animals*, 34(4), 329-350. <https://doi.org/10.1258/002367700780387723>
- Renoux, G. (1954). A selective medium for isolation of *Brucella melitensis*. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, 87(3), 325-333.
- Ryan, W. (1967). A selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from milk. *Monthly Bulletin of the Ministry of Health and the Public Health Laboratory Service*, 26, 33-38.
- Roset, M. S., Ibañez, A. E., De Souza Filho, J. A., Spera, J. M., Minatel, L., Oliveira, S. C., Giambartolomei, G. H., Cassataro, J. y Briones, G. (2014). *Brucella* cyclic B-1,2-glucan plays a critical role in the induction of splenomegaly in mice. *PLoS ONE*, 9(7), 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101279>
- Roth, J. A. (2011). Veterinary vaccines and their importance to animal health and public health. *Procedia in Vaccinology*, 5, 127-136. <https://doi.org/10.1016/j.provac.2011.10.009>
- Rothstein, R. (1991). Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods in Enzymology*, 194(C), 281-301. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)94022-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)94022-5)
- Salmon-Divon, M., Banai, M., Bardenstein, S., Blum, S. E. y Kornspan, D. (2018). Complete genome

- sequence of the live attenuated vaccine strain *Brucella melitensis* Rev.1. *Genome Announcements*, 6(12). <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.00175-18>
- Salmon-Divon, M., Yeheskel, A. y Kornspan, D. (2018). Genomic analysis of the original Elberg *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine strain reveals insights into virulence attenuation. *Laboratory Animals*, 9(1), 1436-1448. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1511677>
- Salmon-Divon, M., Zahavi, T. y Kornspan, D. (2019). Transcriptomic analysis of the *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine strain in an acidic environment: Insights into virulence attenuation. *Frontiers in Microbiology*, 10(February), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00250>
- Sayers, E. W., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D. C., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., Skripchenko, Y., ... Sherry, S. T. (2022). Database resources of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D20-D26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>
- Schaechter, M. (2004). *The Desk Encyclopedia of Microbiology* (1st ed.). Elsevier Academic Press.
- Schurig, G. G., Sriranganathan, N. y Corbel, M. J. (2002). Brucellosis vaccines: Past, present and future. *Veterinary Microbiology*, 90(1-4), 479-496. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00255-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00255-9)
- Shama, G. (2019). The “Petri” dish: A case of simultaneous invention in Bacteriology. *Endeavour*, 43(1-2), 11-16. <https://doi.org/10.1016/j.endeavour.2019.04.001>
- Singh, D. R., Mohammad, M. M., Patowary, S., Stoneman, M. R., Oliver, J. A., Movileanu, L. y Raicu, V. (2013). Determination of the quaternary structure of a bacterial ATP-binding cassette (ABC) transporter in living cells. *Integr. Biol.*, 5(2), 312-323. <https://doi.org/10.1039/C2IB20218B>
- Soler-Lloréns, P., Gil-Ramírez, Y., Zabalza-Baranguá, A., Iriarte, M., Conde-Álvarez, R., Zúñiga-Ripa, A., San Román, B., Zygmunt, M. S., Vizcaíno, N., Cloeckert, A., Grilló, M. J., Moriyón, I. y López-Goñi, I. (2014). Mutants in the lipopolysaccharide of *Brucella ovis* are attenuated and protect against *B. ovis* infection in mice. *Veterinary Research*, 45(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0072-0>
- Spink, W. W. y Anderson, D. (1954). Experimental studies on the significance of endotoxin in the pathogenesis of brucellosis. *The Journal of clinical investigation*, 33(4), 540-548. <https://doi.org/10.1172/JCI102924>
- Spink, W. W., Hall, J. W., Finstad, J. y Mallet, E. (1962). Immunization with viable *Brucella* organisms. Results of a safety test in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 26, 409-419.
- Stranahan, L. W. y Arenas-Gamboa, A. M. (2021). When the going gets rough: The significance of *Brucella* lipopolysaccharide phenotype in host-pathogen interactions. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.713157>
- Suárez-Esquivel, M., Chaves-Olarte, E., Moreno, E. y Guzmán-Verri, C. (2020). *Brucella* genomics: Macro and micro evolution. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7749. <https://doi.org/10.3390/ijms21207749>

- Taminiau, B., Daykin, M., Swift, S., Boschiroli, M. L., Tibor, A., Lestrade, P., De Bolle, X., O'Callaghan, D., Williams, P. y Letesson, J. J. (2002). Identification of a quorum-sensing signal molecule in the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Infection and Immunity*, 70(6), 3004-3011. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.6.3004-3011.2002>
- Tannenbaum, J. y Bennett, B. T. (2015). Russell and Burch's 3Rs then and now: The need for clarity in definition and purpose. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 54(2), 120-132.
- Terwagne, M., Mirabella, A., Lemaire, J., Deschamps, C., De Bolle, X. y Letesson, J. J. (2013). Quorum sensing and self-quorum quenching in the intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *PLoS ONE*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082514>
- Thayer, J. D., y Martin, J. E. (1966). Improved medium selective for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. *Public Health Reports*, 81(6), 559-562. <https://doi.org/10.2307/4592771>
- Tian, G., Zhan, Z., Zhang, A., Zhao, H., Xia, X., He, Z., Zhang, B., Zhao, M., Piao, D., Lu, D. y Jiang, H. (2019). A case report on mother-to-child transmission of *Brucella* in human, China. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 4-7. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4302-y>
- Tian, M., Qu, J., Han, X., Ding, C., Wang, S., Peng, D. y Yu, S. (2014). Mechanism of Asp24 upregulation in *Brucella abortus* rough mutant with a disrupted O-antigen export system and effect of Asp24 in bacterial intracellular survival. *Infection and Immunity*, 82(7), 2840-2850. <https://doi.org/10.1128/IAI.01765-14>
- Unión Europea. (2010). *Directiva 2010/63/UE de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos* (pp. 33-79).
- Uzureau, S., Godefroid, M., Deschamps, C., Lemaire, J., De Bolle, X. y Letesson, J. J. (2007). Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*. *Journal of Bacteriology*, 189(16), 6035-6047. <https://doi.org/10.1128/JB.00265-07>
- Uzureau, S., Lemaire, J., Delaive, E., Dieu, M., Gaigneaux, A., Raes, M., De Bolle, X. y Letesson, J. J. (2010). Global analysis of quorum sensing targets in the intracellular pathogen *Brucella melitensis* 16 M. *Journal of Proteome Research*, 9(6), 3200-3217. <https://doi.org/10.1021/pr100068p>
- Valvano, M. A. (2003). Export of O-specific lipopolysaccharide. *Frontiers in Bioscience*, 8, 452-471. <https://doi.org/10.2741/1079>
- Valvano, M. A. (2015). Chapter 4. Genetics and Biosynthesis of Lipopolysaccharide. En *Molecular Medical Microbiology: Second Edition* (pp. 55-89). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00004-4>
- Verger, J. M., Grimont, F., Grimont, P. A. D. y Grayon, M. (1985). *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35(3), 292-295. <https://doi.org/10.1099/00207713-35-3-292>

- Vishweshwaraiah, Y. L. y Dokholyan, N. V. (2022). Toward rational vaccine engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 183. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114142>
- Vitry, M. A., Hanot Mambres, D., De Trez, C., Akira, S., Ryffel, B., Letesson, J. J. y Muraille, E. (2014). Humoral immunity and CD4+ Th1 cells are both necessary for a fully protective immune response upon secondary infection with *Brucella melitensis*. *The Journal of Immunology*, 192(8), 3740-3752. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302561>
- Wareth, G., Dadar, M., Ali, H., Hamdy, M. E. R., Al-Talhy, A. M., Elkharsawi, A. R., Tawab, A. A. A. El y Neubauer, H. (2022). The perspective of antibiotic therapeutic challenges of brucellosis in the Middle East and North African (MENA) countries: Current situation and therapeutic management. *Transboundary and emerging diseases*. <https://doi.org/10.1111/TBED.14502>
- Way, J. C., Davis, M. A., Morisato, D., Roberts, D. E. y Kleckner, N. (1984). New Tn10 derivatives for transposon mutagenesis and for construction of *lacZ* operon fusions by transposition. *Gene*, 32(3), 369-379. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(84\)90012-X](https://doi.org/10.1016/0378-1119(84)90012-X)
- Weiss, R. A. y Esparza, J. (2015). The prevention and eradication of smallpox: A commentary on Sloane (1755) 'An account of inoculation'. En *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 370, Número 1666, p. 20140378). <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0378>
- Westphal, O. y Lüderitz, O. (1954). Chemische erforschung von lipopolysacchariden gramnegativer bakterien. *Angew Chem*, 66, 407-417. <https://doi.org/10.1002/ange.19540661312>
- Weynants, V., Gilson, D., Cloeckeaert, A., Denoel, P. a, Tibor, A., Thiange, P., Limet, J. N. y Letesson, J. J. (1996). Characterization of a monoclonal antibody specific for *Brucella* smooth lipopolysaccharide and development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay to improve the serological diagnosis of brucellosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 3(3), 309-314.
- Whatmore, A. M. y Foster, J. T. (2021). Emerging diversity and ongoing expansion of the genus *Brucella*. *Infection, Genetics and Evolution*, 92. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104865>
- Whitfield, C. (1995). Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends in microbiology*, 3(5), 178-185. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)88917-9](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)88917-9)
- Whitfield, C., Amor, P. A. y Köplin, R. (1997). Modulation of the surface architecture of Gram-negative bacteriabytheactionofsurfacepolymer:LipidA-coreligaseandbydeterminantsofpolymerchainlength. *Molecular Microbiology*, 23(4), 629-638. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.2571614.x>
- Willems, S. A., Brouwers, J. J. W. M. y Eefting, D. (2022). Aortic and iliac involvement in brucellosis – A rare but life threatening manifestation: A review of the literature. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2022.02.004>
- Williams, D. M., Ovchinnikova, O. G., Koizumi, A., Mainprize, I. L., Kimber, M. S., Lowary, T. L. y Whitfield, C. (2017). Single polysaccharide assembly protein that integrates polymerization, termination, and chain-length quality control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(7), E1215-E1223. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613609114>

- Wilson, A. A. y Miles, G. S. (1932). The serological differentiation of smooth strains of the *Brucella* group. *British journal of experimental pathology*, 13(1), 1.
- Winter, A. J., Schurig, G. G., Boyle, S. M., Sriranganathan, N., Bevins, J. S., Enright, F. M., Elzer, P. H. y Kopec, J. D. (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. *American Journal of Veterinary Research*, 57(5), 677-683.
- World Health Organization. (2020). *Neglected Zoonotic Diseases*. https://www.who.int/neglected_diseases/zoonoses/infections_more/en/
- Wyatt, H. V. (2005). How Themistocles Zammit found Malta fever (brucellosis) to be transmitted by the milk of goats. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 98(10), 451-454. <https://doi.org/10.1258/jrsm.98.10.451>
- Young, E. J. (1995). An overview of human brucellosis. *Mmwr. Morbidity And Mortality Weekly Report*, 21(2), 283-290. <https://doi.org/10.1093/clinids/21.2.283>
- Zabalza Baranguá, A. (2017). *Desarrollo de vacunas marcadas con GFP frente a la brucelosis ovina y tests diagnósticos asociados*. Tesis doctoral, Universidad Pública de Navarra, España.
- Zaccheus, M. V., Ali, T., Cloeckeaert, A., Zygmunt, M. S., Weintraub, A., Iriarte, M., Moriyón, I. y Widmalm, G. (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(1), 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053941>
- Zhao, Y., Arce-Gorvel, V., Conde-Álvarez, R., Moriyón, I. y Gorvel, J. P. (2018). Vaccine development targeting lipopolysaccharide structure modification. *Microbes and Infection*, 20(9-10), 455-460. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.11.006>
- Zúñiga, J. M. y Orellana, J. M. (2016). *Ciencia y tecnología en experimentación y protección animal*. Universidad de Alcalá (UAH) y Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL; ed.: 2ª).
- Zygmunt, M. S., Blasco, J. M., Letesson, J. J., Cloeckeaert, A. y 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 Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-92>
- Zygmunt, M. S., Bundle, D. R., Ganesh, N. V., Guiard, J. y Cloeckeaert, A. (2015). Monoclonal antibody-defined specific C epitope of *Brucella* O-polysaccharide revisited. *Clinical and Vaccine Immunology*, 22(8), 979-982. <https://doi.org/10.1128/CVI.00225-15>

Hipótesis de trabajo

El bloqueo del transporte del O-PS por inactivación del sistema Wzm/Wzt en *Brucella* conlleva modificaciones que repercuten directamente en sus características moleculares, estructurales e inmunológicas, confiriendo propiedades vacunales diferentes según el gen *wzm* o *wzt* delecionado y la cepa utilizada como parental.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo general de esta tesis fue analizar las implicaciones biológicas, *in vitro* e *in vivo*, derivadas de la mutación simple o doble de los genes *wzm/wzt* en la cepa atenuada *Brucella melitensis* Rev1 y su comparación con las derivadas de la deleción del gen *wzm* en otras cepas de *B. melitensis* y *B. abortus* para proseguir en la búsqueda de un candidato vacunal para pequeños rumiantes más seguro que Rev1.

Objetivos específicos

- I. Profundizar en el conocimiento del sistema transportador de O-PS en *Brucella* analizando las propiedades moleculares, estructurales, inmunogénicas y biológicas en modelos murinos preclínicos, utilizando mutantes derivados de *B. melitensis* Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ y su comparación con otros mutantes Δwzm obtenidos en la cepa virulenta *B. melitensis* 16M o en cepas *B. abortus* con distinta virulencia.
- II. Desarrollar un medio de cultivo selectivo que permita el aislamiento primario de Rev1 Δwzm y otras brucellae, a partir de muestras veterinarias del candidato vacunal.
- III. Determinar la seguridad y respuesta inmune generadas por Rev1 Δwzm en corderos.

Capítulo 1

Estudio del sistema transportador Wzm/Wzt en
Brucella y desarrollo del candidato
vacunal Rev1 Δ wzm

Introducción

En la carrera por proveer al mundo de una vacuna segura para el control de la brucelosis ovina y caprina (<https://brucellosisvaccine.org>), han sido varios los candidatos vacunales de *B. melitensis* con R-LPS que han demostrado atenuación en ratones y en ovino (Barrio et al., 2009; González et al., 2008; Hensel et al., 2020; Stranahan y Gamboa, 2021). Sin embargo, en brucelosis experimental está ampliamente asumido que una excesiva pérdida de virulencia puede resultar en una pérdida de efectividad frente a la infección virulenta, por generarse una deficiente respuesta inmune adaptativa (Grilló et al., 2000; OIE 2022). Además, la presencia de O-PS se considera importante para lograr una respuesta inmune adaptativa eficaz a largo plazo frente a la infección virulenta (Grilló et al., 2006; Zhao et al., 2018). Como consecuencia, los mutantes de la cepa virulenta de referencia 16M en los que se ha truncado el sistema Wzm/Wzt, responsable del transporte de O-PS desde la membrana citoplasmática, han sido capaces de igualar la persistencia bacteriana y protección proporcionada tras la vacunación con Rev1 en los modelos murinos de seguridad y eficacia (González et al., 2008). Sin embargo, recientemente, en el grupo de Sanidad Animal del Instituto de Agrobiotecnología (IdAB) hemos comprobado que algunas ovejas inoculadas con 16M Δ wzm sufren una reactivación de la infección en el momento del parto que desaconsejaría el uso vacunal de este mutante en rumiantes gestantes (Zabalza-Baranguá et al., 2023).

Puesto que los genes *wzm/wzt* se localizan secuencialmente en el cromosoma, se ha asumido que la inactivación del primer gen conllevaría la del siguiente y generaría mutantes con propiedades biológicas equivalentes (Godfroid et al., 2000). Sin embargo, este extremo no ha sido demostrado y, de no ser así, la localización y función bien diferenciadas de cada proteína (Caffalette y Zimmer, 2021; Cuthbertson et al., 2005; Izquierdo et al., 2003; Mohammad et al., 2016; Singh et al., 2013) podría conllevar diferencias en las propiedades biológicas entre mutantes Δ wzm y Δ wzt. En particular, la alteración del normal funcionamiento del transportador Wzm/Wzt, con el consecuente bloqueo de la actividad del bactoprenol y acumulación de metabolitos intermedios, podría conllevar una diferente polimerización del O-PS y/u organización de la envoltura celular (Vassen, 2018), confiriendo distinta composición y propiedades estructurales, metabólicas e inmunogénicas a los mutantes. Asimismo, la cepa parental utilizada para construir mutantes de *Brucella* puede condicionar las propiedades biológicas de los mutantes R-LPS generados (González et al., 2008). Por lo tanto, la hipótesis de partida fue que la construcción de mutantes Δ wzm y Δ wzt con el sistema transportador del O-PS truncado en la cepa

vacunal Rev1 (con determinados marcadores fenotípicos de interés, como la susceptibilidad a penicilina G relacionada con la composición del periplasma bacteriano) podía conllevar efectos biológicos diferentes a los observados en mutantes construidos a partir de cepas virulentas como 16M o H38 (Godfroid et al., 2000; González et al., 2008). A pesar del riesgo de obtener mutantes de Rev1 con una excesiva atenuación y baja inmunogenicidad, este abordaje permitiría estudiar en profundidad el papel de cada componente del sistema Wzm/Wzt de transporte del O-PS hasta el periplasma en diferentes especies y cepas de *Brucella*; por lo que en este capítulo se han construido mutantes simples y dobles en los genes *wzm/wzt* sobre la cepa atenuada Rev1, utilizando como referencia un mutante 16M Δ *wzm* previamente obtenido en el IdAB (Zabalza Baranguá, 2017) y dos mutantes Δ *wzm* construidos sobre las cepas de *B. abortus* 2308 (virulenta) y S19 (atenuada).

Materiales y métodos

1. Generalidades: cepas, condiciones de cultivo y preparación de inóculos

Las cepas bacterianas utilizadas en este capítulo se presentan en las [Tablas 3 y 4](#), incluyendo en la colección del IdAB-CSIC tres clones de cada nuevo organismo modificado genéticamente (OMG) generado en esta tesis. Todas las cepas se conservaron congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*Brucella*) o a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*E. coli*) en viales con leche lactosada estéril; para su preparación, la leche descremada en polvo (PanReac AppliChem) se reconstituyó al 10 % en agua y suplementó con un 3 % de lactosa (PanReac AppliChem). De manera rutinaria, los cultivos de *Brucella* se realizaron en Trypticase Soy Broth (TSB; Condalab) o Blood Agar Base n.º 2 (BAB; Oxoid); y los de *E. coli*, en Luria Bertani Broth (LB; Pronadisa) o TSB con 1,6 % de agar bacteriológico (TSA; Pronadisa). Las condiciones de incubación estándar fueron $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, en atmósfera normal, durante 5-7 días, para todas las cepas excepto *B. ovis* PA, que precisó suero de ternera (NBCS, ref. 16010159, Gibco) en el medio e incubación o con 10 % de CO_2 . Cuando fue necesario, el medio de cultivo se suplementó con 5 % de sacarosa (Suc₅; VWR Chemicals), 5 % de suero de ternera (BAB-S) y/o antibióticos (Sigma-Aldrich) a las concentraciones indicadas en cada experimento.

La preparación de suspensiones bacterianas se realizó mediante un precultivo, a partir de las bacterias congeladas sembradas en estría en placas de BAB o BAB-S e incubación estándar; seguido de un cultivo, a partir de 3-4 colonias del precultivo transferidas mediante siembra masiva en nuevas placas e incubación estándar, durante 1-2 días; o diluidas en 10 mL TSB e incubación estándar durante una noche, a 150 r.p.m. Los cultivos masivos de bacterias se recogieron en PBS estéril (pH 7,2; NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na_2HP_4 12,7 mM, KH_2PO_4 1,8 mM; todos de VWR Chemicals) y se ajustaron por espectrofotometría (SmartSpec Plus, BioRad) en la cantidad necesaria del mismo diluyente para obtener una suspensión con absorbancia de 0,170, midiendo la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}); en nuestras condiciones experimentales, estas suspensiones contenían $\approx 10^9$ UFC/mL. Cuando fue necesario, a partir de esta suspensión, se obtuvieron concentraciones inferiores mediante diluciones en PBS. En todos los casos, el número exacto de bacterias viables contenidas en cada inóculo (UFC/mL) se determinó retrospectivamente, mediante diluciones decimales seriadas en PBS y siembra (0,1 mL, por triplicado) de cada una de ellas. Todas las manipulaciones de bacterias vivas de *Brucella* se realizaron en las instalaciones BSL3 del IdAB (código A/ES/15/I-05), previa autorización de la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB-CIOMG) con código A/ES/16/39 y A/ES/17/38.

Tabla 3. Cepas de *Brucella* de la colección del IdAB empleadas y construidas en el capítulo 1

Especie	Cepa	Descripción	Referencia	
<i>B. melitensis</i>	16M	Cepa virulenta de referencia; S-LPS	Colección del IdAB	
	Rev1	Cepa vacunal de referencia para ovino y caprino; P ₅ ^s , Str _{2,5} ^r , S-LPS		
	16MΔwzm	Mutante por delección en fase del gen <i>wzm</i> (Δ27-241); Nal ₂₅ ^r , R-LPS		Zabalza Baranguá, 2017
	Rev1Δwzm	Mutante por delección en fase del gen <i>wzm</i> (Δ27-241); R-LPS		
	Rev1Δwzt	Mutante por delección en fase del gen <i>wzt</i> (Δ68-209); R-LPS		Esta tesis
	Rev1ΔwzmΔwzt	Mutante por delección Δwzt construido sobre Rev1Δwzm; R-LPS		
	Rev1-NM	Cepas Rev1 no mutadas tras el intercambio alélico de <i>wzm</i> o <i>wzt</i> , utilizadas como control; S-LPS		
	Rev1Δwzm-NM	Cepa Rev1Δwzm no mutada tras el intercambio alélico de <i>wzt</i> , utilizada como control; R-LPS		
	Rev1Δwzm-pSRKwzm	Mutante Rev1Δwzm complementado con el plásmido no integrativo pSRKwzm; Km ₅₀ ^r , S-LPS		
	Rev1Δwzt-pSRKwzt	Mutante Rev1Δwzt complementado con el plásmido no integrativo pSRKwzt; Km ₅₀ ^r , S-LPS	González et al., 2008	
Rev1ΔwzmΔwzt-pSRKwzm-wzt	Mutante Rev1ΔwzmΔwzt complementado con el plásmido no integrativo pSRKwzm-wzt; Km ₅₀ ^r , S-LPS			
	BmH38RmanB _{core}	Cepa H38 mutada con el mini-Tn5-Km en <i>manB_{core}</i> ; Nal ₂₅ ^r , Km ₅₀ ^r , R-LPS con núcleo incompleto	Zabalza-Baranguá et al., 2019	
	H38::Gm	Cepa virulenta de referencia <i>B. melitensis</i> H38 con el mini-Tn7- <i>gfp</i> -Gm integrado; Nal ₂₅ ^r , Gm ₁₅ ^r , S-LPS		
<i>B. abortus</i>	2308	Cepa virulenta de referencia; S-LPS	Colección del IdAB	
	S19	Cepa vacunal de referencia para bovino; S-LPS		
	2308::Gm	Cepa 2308 con el mini-Tn7- <i>gfp</i> -Gm integrado; Nal ₂₅ ^r , Gm ₁₅ ^r , S-LPS		
	2308Δwzm	Mutante por delección en fase del gen <i>wzm</i> (Δ27-241); R-LPS		
	2308-NM	Cepa 2308 no mutada tras el intercambio alélico de <i>wzm</i> , utilizada como control; S-LPS	Esta tesis	
	2308Δwzm-pBBRwzm	Mutante 2308Δwzm complementado con el plásmido no integrativo pBBRwzm; Km ₅₀ ^r , S-LPS		
	S19Δwzm	Mutante por delección en fase del gen <i>wzm</i> (Δ27-241); R-LPS		
	S19-NM	Cepa S19 no mutada tras el intercambio alélico de <i>wzm</i> , utilizada como control; S-LPS		
	S19Δwzm-pSRKwzm	Mutante S19Δwzm complementado con el plásmido no integrativo pSRKwzm; Km ₅₀ ^r , S-LPS		
<i>B. ovis</i>	BoPA	Cepa virulenta de referencia; R-LPS, 5 % suero-dependiente y 10 % CO ₂ -dependiente	Colección del IdAB	
	BoPA::Gm	Cepa BoPA con el mini-Tn7- <i>gfp</i> -Gm integrado; Nal ₂₅ ^r , Gm ₁₅ ^r , R-LPS	Soler-Lloréns et al., 2014	

Susceptibilidad a 5 UI/mL penicilina G (P₅^s) y 5 % sacarosa (Suc₅^s); resistencia a estreptomocina (Str_{2,5}^r), ácido nalidixico (Nal₂₅^r), kanamicina (Km₅₀^r) y gentamicina (Gm₁₅^r) a las concentraciones indicadas (μg/mL) en cada caso.

Tabla 4. Cepas de *E. coli* de la colección del IdAB empleadas y construidas en el capítulo 1

Cepa de <i>E. coli</i> -plásmido	Descripción de la cepa	Referencia
S17(λ pir)-pJQKm Δ wzm	Donadora para conjugación con el plásmido integrativo portador del gen Δ wzm; lac; Km ₅₀ ^r , Suc ₅ ^s	Zabalza Baranguá, 2017
S17(λ pir)-pSRKwzm	Donadora para conjugación con el plásmido no integrativo portador del gen WT wzm; lac; Km ₅₀ ^r	Vassen, 2018
S17(λ pir)-pBBRwzm	Donadora para conjugación con el plásmido no integrativo portador del gen WT wzm; lac; Cm ₂₀ ^r	
TOP10F ² -pCR2.1 Δ wzt	Transformada con el vector de clonación portador del gen Δ wzt; lac; Km ₅₀ ^r	
TOP10F ² -pJQKm Δ wzt	Transformada con el plásmido integrativo portador del gen Δ wzt; lac; Km ₅₀ ^r , Suc ₅ ^s	
S17(λ pir)-pJQKm Δ wzt	Donadora para conjugación con el plásmido integrativo portador del gen Δ wzt; lac; Km ₅₀ ^r , Suc ₅ ^s	
TOP10F ² -pCR2.1wzt	Transformada con el vector de clonación portador del gen wzt; lac; Km ₅₀ ^r	Esta tesis
TOP10F ² -pSRKwzt	Transformada con el plásmido no integrativo portador del gen wzt; lac; Km ₅₀ ^r	
S17(λ pir)-pSRKwzt	Donadora para conjugación con el plásmido no integrativo portador del gen wzt; lac; Km ₅₀ ^r	
TOP10F ² -pCR2.1wzm-wzt	Transformada con el vector de clonación portador de los genes wzm-wzt; lac; Km ₅₀ ^r	
TOP10F ² -pSRKwzm-wzt	Transformada con el plásmido no integrativo portador de los genes wzm-wzt; lac; Km ₅₀ ^r	
S17(λ pir)-pSRKwzm-wzt	Donadora para conjugación con el plásmido no integrativo portador de los genes wzm-wzt; lac; Km ₅₀ ^r	
<i>E. coli</i> K12	ATCC 10798 utilizada como control de susceptibilidad antibiótica	Sigma-Aldrich

Δ wzm o Δ wzt: delección en fase de los genes wzm o wzt; lac: presencia del operón de la lactosa; resistencia a 50 μ g/mL de kanamicina (Km₅₀^r) o 20 μ g/mL de cloranfenicol (Cm₂₀^r); Suc₅^s: susceptibilidad a sacarosa al 5 %.

2. Construcción de mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$

Los mutantes Rev1 Δwzm , Rev1 Δwzt , Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$, 2308 Δwzm y S19 Δwzm (Tabla 3) construidos en este estudio se obtuvieron mediante delección en fase del correspondiente gen o genes gen *wild type* (WT) y doble recombinación homóloga, mediante el método de PCR por solapamiento (Clarck y Pazdernik, 2009; Higuchi et al., 1988; Zabalza Baranguá, 2017).

2.1. Generalidades: análisis genético *in silico*, extracción y purificación de ADN, diseño de cebadores, condiciones de PCR y preparación de células quimiocompetentes

Antes de comenzar la construcción de los mutantes, se analizó *in silico* la homología de las secuencias nucleotídicas de *wzm* y *wzt* en distintas especies de *Brucella*. Para ello, se utilizó el programa informático Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1990), utilizando las bases de datos del NCBI (Sayers et al., 2022) y Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; Kanehisa and Goto, 2000). Además, se compararon las secuencias proteicas derivadas de cada gen, determinando su estructura tridimensional y peso molecular teórico con las herramientas del servidor ExpASy: SWISS-MODEL (Schwede et al., 2003) y Compute pI/Mw (Gasteiger et al., 2005), respectivamente.

La extracción de ADN genómico se realizó mediante el DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen). El ADN de colonia se extrajo por hervido (100 °C, 30 min) en 0,1 mL de agua estéril MilliQ seguido de centrifugación (1.000 × g, 3 min). Las secuencias de los plásmidos se obtuvieron de Addgene: The Nonprofit Global Plasmid Repository (Kamens, 2015), y se utilizó el kit E.Z.N.A. Plasmid Mini I (Omega Bio-tek) para su extracción mediante *miniprep*. La purificación de ADN se llevó a cabo con el ATP Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (ATP biotech Inc.). En los distintos casos, la cuantificación de ADN y determinación de su pureza se realizó por espectrofotometría a DO 260/280 nm en un equipo NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Cuando correspondió, se secuenció mediante el método de Sanger en la empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal).

El diseño de los cebadores de PCR se realizó con BLAST, en base a los siguientes criterios: i) tamaño del cebador de hasta 18 nucleótidos, ii) tamaño del amplicón de entre 100 y 200 pb, iii) contenido de GC de un 40-60 %, iv) temperatura de *melting* (Tm) de alrededor de 58 y 60 °C con una diferencia máxima de 2 °C entre ambos, y v) mínima autocomplementariedad. A continuación, los cebadores resultantes fueron sintetizados por Sigma-Aldrich Química S.L. (Madrid, Spain).

Las distintas reacciones de PCR se realizaron en un equipo SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems) mezclando 2 μL de ADN (≈ 50 ng de ADN genómico) con 2,5 μL de dNTP a 2 mM (Bioline), 2 μL de los cebadores *forward* (*F*) y *reverse* (*R*) (Sigma-Aldrich) y 2,5 μL de búfer 10X, 1 μL de MgCl_2 y 0,2 μL de polimerasa Amplitaq (del kit de Applied Biosystems) en un volumen final de 25 μL en agua MilliQ. El perfil térmico de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 5 s a 95 °C, seguida de 30 ciclos de desnaturalización durante 35 s a 95 °C, 45 s a la temperatura de anillamiento (T_a) correspondiente a cada pareja de cebadores (≈ 2 °C < T_m ; 58 °C si no se especifica de otra manera), extensión de 1 min y 42 s a 72 °C y un último paso de extensión final de 6 min a 72 °C. Los fragmentos de ADN amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Condalab) al 1 % en tampón Tris-acetato-EDTA (TAE; 50X: Tris base al 24,2 %, ácido acético glacial 5,7 % y ácido etilendiaminotetraacético 0,5 M al 10 %; VWR Chemicals) en una cubeta Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad) con 5X búfer de carga, compuesto por azul de bromofenol (Sigma-Aldrich) al 0,25 %, xileno cianol (ICN Biomedicals) al 0,25 % y glicerol (VWR Chemicals) al 40 %. La tinción del ADN se realizó con Midori Green Advance (NIPPON Genetics) al 0,01 % y se visualizó en un ChemiDoc (Syngene).

La preparación de células quimiocompetentes se llevó a cabo siguiendo los protocolos descritos (Green y Sambrook, 2012) con ciertas modificaciones. Brevemente, se dispensaron 100 mL de un cultivo en LB (37 °C, 3 h, 150 r.p.m; $\text{DO}_{600} \approx 0,4$) dispensados en dos tubos estériles de polipropileno, que se mantuvieron en hielo durante 10 min. Las células se recuperaron por centrifugación (4 °C, 2.700 $\times g$, 10 min) y el precipitado se resuspendió, primero, en 30 mL de una solución con CaCl_2 20 mM y MgCl_2 80 mM y, después en 2 mL de CaCl_2 100 mM, previo enfriamiento de ambas soluciones en hielo. Para conservar las células, se añadió dos veces un 7 % de dimetilsulfóxido (DMSO) manteniéndolas 15 min en hielo entre cada una y se dispensaron en alícuotas de 0,1 mL, que se congelaron de inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

2.2. Construcción del plásmido suicida pJQKm Δ wzt

Los genes *wzm* y *wzt* de Rev1 se secuenciaron a partir del producto de PCR amplificado con la pareja de cebadores *F7-wzm* y *R7-wzt* (Tabla 5 y Fig. 7); con la ayuda del programa BLAST, las secuencias obtenidas se alinearon *in silico* con las ORF BMEI1415 y BMEI1416 anotadas para 16M. Además, la secuencia nucleotídica de *wzt* se comparó con la de los genes ortólogos publicados en la base de datos KEGG para las cepas de

B. abortus 2308 (BAB1_0542) y S19 (BABS19_I05080), *B. ovis* ATCC 25840 (BOV_0523), *B. suis* 1330 (BR0519), *B. canis* ATCC 23365 (BCAN_A0531), *B. microti* CCM4915 (BMI_I521), *B. pinnipedialis* B2/94 (BPI_I550), *B. ceti* TE 10759-12 (V910_101441) y *B. vulpis* (BF3285c1_0238).

Tabla 5. Cebadores utilizados en el capítulo 1

Gen	Cebador	Región de hibridación	Secuencia de nucleótidos (5'→3')	Referencia
BMEI1415 (wzm)	F1-wzm	Región <i>upstream</i>	gcaaattgaaatggcagatg	Zabalza Baranguá, 2017
	R2-wzm	Región interna	agcgcccacgtaaatcag	
	F3-wzm	Complementaria a R2 y región interna	ctgatttacgtggcgctaacctgcgtggcagtagc	
	R4-wzm	Región <i>downstream</i>	atgaaactggcgtagtcc	
	R5-wzm	Región interna	gcgtgtaaattgcaagagga	
	F7-wzm	Incluye el codón <i>start</i>	gtgagacgatttcgtatgata	
	F9-wzm	Desde el codón <i>start</i>	atgatatcgtatatggctaag	
	R8-wzm	Desde el codón <i>stop</i>	tcataggtaaaaatggctctc	
BMEI1416 (wzt)	F1-wzt	Región <i>upstream</i>	gttcaggcagggtggattga	Este capítulo
	R2-wzt	Región interna	tgtgacctacagggaacg	
	F3-wzt	Complementaria a R2 y región interna	cgttgccctgataggtcacacaagccatgaccttgcgaac	
	R4-wzt	Región <i>downstream</i>	acagaagccggaatcgtcag	
	R5-wzt	Región interna	cgccctagtcatgaatgccg	
	F6-wzt	Desde el codón <i>start</i>	atgatccagccatcgattacc	
	R7-wzt	Desde el codón <i>stop</i>	tcatgctatgctccattccc	

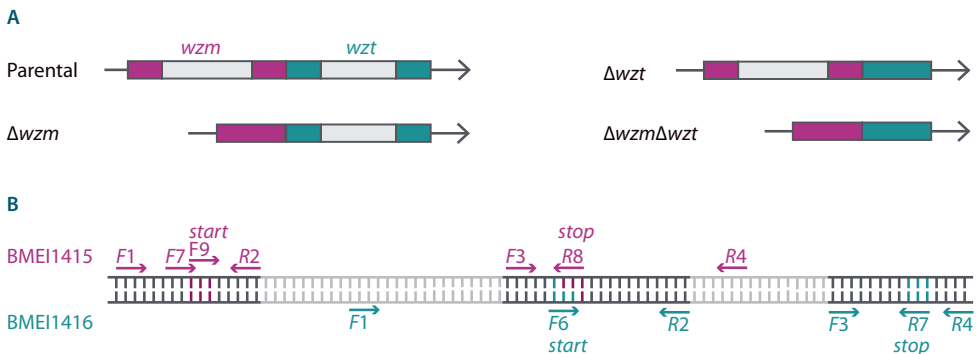


Fig. 7. Representación esquemática de las organización genética y cebadores diseñados para la construcción de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$. A) Fragmentos delecionados (en gris) en los genes *wzm* (en granate) o *wzt* (en verde) para construir los mutantes simples sobre la correspondiente cepa parental o el mutante doble a partir de Δwzm . B) Regiones de hibridación de los cebadores F y R en las ORF BMEI1415 (*wzm*) y BMEI1416 (*wzt*) de *B. melitensis*.

El ADN genómico de 16M se utilizó como molde sobre el que amplificar por PCR dos fragmentos: uno de 400 pb (198 pb *upstream* y los codones del 1 al 66 de *wzt*) con la pareja de cebadores *F1-wzt* y *R2-wzt*, y otro de 327 pb (codones 209-253 de *wzt* y 193 pb *downstream*) con *F3-wzt* y *R4-wzt*. La complementariedad existente entre *F3-wzt* y *R2-wzt* permitió el ensamblaje de ambos fragmentos amplificados mediante una PCR de solapamiento con los cebadores *F1-wzt* y *R4-wzt*, generando una delección de 141 tripletes dentro del gen (Fig. 8). Seguidamente, el producto de PCR se purificó y la secuencia del

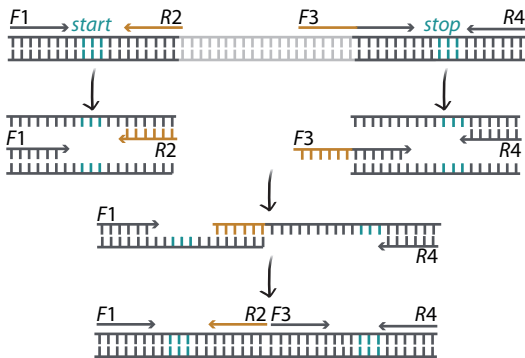


Fig. 8. Esquema de mutagénesis por solapamiento. Construcción de mutantes mediante dos PCR consecutivas, con las parejas de cebadores indicados, que tenían capacidad para hibridar en los extremos de las secuencias a insertar preservando el marco de lectura por tripletes. Las secuencias terminales amplificadas en cada PCR se incluyeron en una tercera PCR en la que se unieron los dos productos por el extremo 5' de *F3* complementario a *R2* (en amarillo), forzando la pérdida de los nucleótidos intermedios.

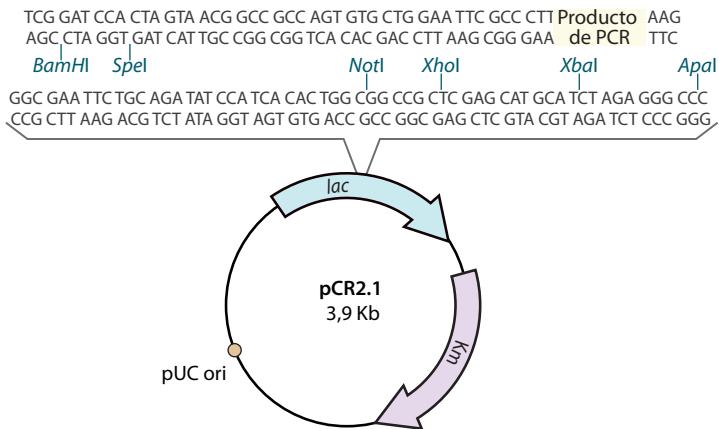


Fig. 9. Mapa del vector pCR2.1. Vector de clonación TOPO-TA (Thermo Fisher Scientific) en el que se indica la disposición de los genes de resistencia antibiótica (Km), el origen de replicación funcional en *E. coli* (pUC ori) y el operón lactosa (*lac*), incluyendo la secuencia nucleotídica que rodea el sitio de clonaje y los principales sitios de restricción de distintas enzimas. La inserción del producto de PCR mediante los residuos de adenosina añadidos por la Taq polimerasa impide la traducción de la β -galactosidasa codificada en el operón *lac*.

gen truncado Δwzt se insertó en el vector de clonación pCR2.1 (TOPO-TA Cloning, Thermo Fisher Scientific; Fig. 9), siguiendo las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones. Brevemente, se mezclaron 4 μL del producto de PCR purificado, 1 μL de solución salina y 1 μL del vector; y esta mezcla se incubó a 14 °C, *overnight*, hasta parar la reacción en hielo. El producto de ligación pCR2.1 Δwzt se secuenció para comprobar que se mantenía el marco de lectura.

Para introducir el vector de clonación pCR2.1 Δwzt , las células *E. coli* TOP10F' se transformaron mezclando, suavemente, 2 μL del plásmido del kit con 0,1 mL de células *E. coli* quimiocompetentes previamente atemperadas en hielo durante 10 min; esta mezcla se mantuvo en hielo picado durante 30 min y, luego, se sometió a choque térmico a 42 °C, durante exactamente 1 min, sin agitación. La muestra se depositó en hielo, durante 2 min, se añadieron 900 μL de LB y la mezcla se incubó a 37 °C y 200 r.p.m. durante 90 min; a continuación, el volumen total se sembró en placas de TSA suplementado con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina (TSA-Km₅₀) y 1,6 mg/placa de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal); y las placas se incubaron a 37 °C durante 24-48 h hasta obtener colonias visibles. Puesto que el plásmido pCR2.1 contiene el operón lactosa a lo largo de la región en la que se inserta el fragmento deleciónado (Fig. 9), la adición del indicador X-Gal permitió distinguir los transformantes positivos (colonias blancas) de aquellos negativos

Tabla 6. Productos amplificados por los cebadores diseñados para distinguir los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$

Pareja de cebadores	Cepas parentales	Tamaño del fragmento (pb)		
		Mutantes		
		Δwzm	Δwzt	$\Delta wzm\Delta wzt$
F1-wzm / R2-wzm	484	484	484	484
F3-wzm / R4-wzm	447	447	-	-
F1-wzm / R4-wzm	1573	931	-	-
F1-wzm / R5-wzm	724	-	724	-
F7-wzm / R8-wzm	798	156	798	156
F9-wzm / R8-wzm	783	141	783	141
F1-wzt / R2-wzt	400	-	400	-
F3-wzt / R4-wzt	327	327	327	327
F1-wzt / R4-wzt	1150	-	727	-
F1-wzt / R5-wzt	774	-	-	-
F6-wzt / R7-wzt	759	759	336	336
F7-wzm / R7-wzt	1553	911	1130	488

-: ausencia de amplificación.

(colonias azules) en los que el gen *lacZ* y su traducción a β -galactosidasa permanecían intactos, en ausencia de la inserción del fragmento clonado. La presencia de la secuencia del gen mutado en los transformantes se confirmó mediante PCR con los cebadores *F1-wzt* y *R4-wzt* (Tablas 5 y 6).

Una vez producido el vector pCR2.1 Δ wzt en las células TOP10F', este plásmido se extrajo y purificó mediante *miniprep*. La secuencia Δ wzt se subclonó en los sitios *Bam*HI y *Xba*I del plásmido suicida pJQKm (Quandt y Hynes, 1993; Scupham y Triplett, 1997), utilizando enzimas FastDigest (Thermo Fisher Scientific; Fig. 10). Para ello, se mezclaron 20 μ L de ADN del plásmido de origen o del receptor con 3 μ L de cada una de las dos enzimas, 4 μ L de búfer y 10 μ L de agua MilliQ, y la suspensión se incubó (37 °C, 1 h) para, a continuación, purificar los productos de digestión a partir de un gel de agarosa. Los fragmentos de interés se unieron con la ligasa T4 del CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) mediante incubación (14 °C, *overnight*) de una mezcla con 14 μ L de inserto Δ wzt, 2 μ L de vector, 2 μ L de búfer y 2 μ L de ligasa. El vector pJQKm Δ wzt obtenido tras la ligación se amplificó por transformación de *E. coli* TOP10F' y, posteriormente, se utilizó

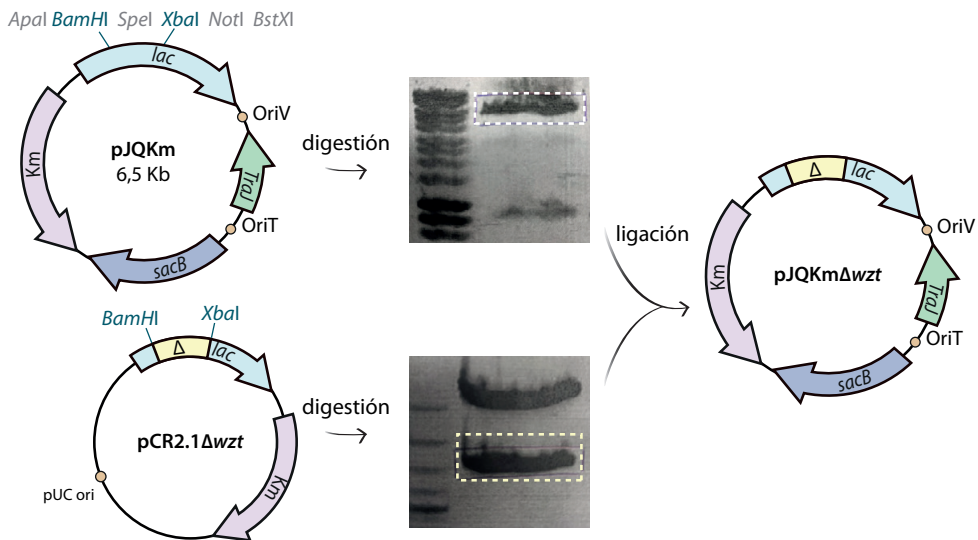


Fig. 10. Esquema del proceso de subclonaje para construir el plásmido pJQKm Δ wzt. La inserción de la secuencia Δ wzt a partir del vector de clonación pCR2.1 en el vector pJQKm requiere de dos pasos de digestión paralelos y uno de ligación tras la purificación del producto a partir del gel de agarosa (1 %). En ambas digestiones, la banda de mayor peso molecular (superior) correspondió al vector, y la de menor peso molecular, al inserto. En cada plásmido, se indica la posición de los genes de resistencia antibiótica (Km), susceptibilidad a sacarosa (*sacB*), el operón del uso de lactosa (*lac*), los sitios de restricción utilizados (*Bam*HI y *Xba*I) y otros colindantes, el origen de replicación limitado a enterobacterias (OriV), el origen de transferencia (OriT) y el gen que codifica una proteína de unión a OriT necesaria para movilizar el vector durante la conjugación (*TraJ*).

para transformar las células S17(λ pir) siguiendo los protocolos descritos anteriormente, a excepción de un choque térmico de 45 s para este plásmido dado su mayor tamaño.

2.3. Conjugación y doble recombinación homóloga

La cepa donadora de *E. coli* S17(λ pir) portadora de los plásmidos integrativos pJQKm Δ wzm (Zabalza Baranguá, 2017) o pJQKm Δ wzt (ver arriba) se utilizó para generar los distintos mutantes Δ wzm y/o Δ wzt en *Brucella* mediante conjugación bacteriana. Para ello, las cepas *E. coli* se cultivaron en TSB-Km₅₀ y las cepas parentales de *Brucella* en TSB suplementado con el antibiótico correspondiente según su resistencia antibiótica intrínseca (*i. e.*, esto es, NaI₂₅ para *B. abortus*, PxB_{1.5} para Rev1 y Col₄ para Rev1 Δ wzm) y se incubaron a 37 °C, 150 r.p.m., hasta alcanzar la fase exponencial. La conjugación se favoreció centrifugando (5.500 \times g, 5 min) conjuntamente 500 μ L de la cepa donadora y 1.000 μ L del cultivo de *Brucella* y, tras dos lavados con 1.500 μ L de MgSO₄ 10 mM estéril, depositando 30 μ L de la suspensión en una placa precalentada de BAB. Esta masa bacteriana se incubó a 37 °C durante 5 h para finalmente ser recogida en 750 μ L de PBS, volumen que se sembró en varias diluciones e incubó hasta la aparición de colonias en medio BAB con Km₅₀, para asegurar la integración del vector en el cromosoma, así como con el antibiótico correspondiente según la cepa parental para inhibir el crecimiento de *E. coli*.

Una vez transferido el plásmido a la cepa parental, por conjugación, la homología existente entre las secuencias terminales de los genes salvaje y mutado permitió su reemplazamiento mediante un proceso de doble recombinación homóloga (Madyagol et al., 2011; Nakashima y Miyazaki, 2014; Fig. 11). Aquellos clones resultantes de la primera recombinación, con el plásmido insertado en el cromosoma, fueron seleccionados por crecimiento en presencia de Km₅₀ y analizados por PCR con los cebadores F1-R4 correspondientes (Tabla 5 y Fig. 7). A continuación, uno de estos clones Km^r se sembró en TSB sin antibióticos (37 °C, 150 r.p.m., *overnight*) para forzar la escisión del pJQKm suicida en *Brucella* (*i. e.*, incapaz de replicarse autónomamente durante la división celular). El cultivo obtenido se diluyó en serie 1 : 10 en PBS, seis veces seriadas, y cada dilución se sembró (0,1 mL/placa) en BAB-Suc₅ con ayuda de un asa de Digralsky estéril, para obtener los clones que habían soltado el plásmido (ya que el gen *sacB* provoca letalidad en presencia de sacarosa, impidiendo su crecimiento en BAB-Suc₅) (Pelicic et al., 1996); pérdida que además se confirmó mediante susceptibilidad a Km₅₀ (Fig. 11).

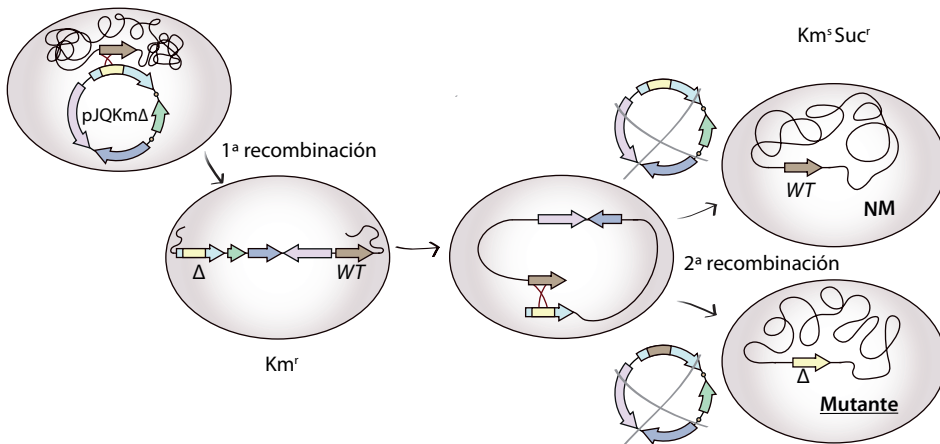


Fig. 11. Esquema de reemplazo genético mediante doble recombinación homóloga. El plásmido pJQKm portador del gen mutado se integra en el cromosoma de *Brucella* gracias a la homología de las regiones clonadas con las del gen parental, lo que permite la selección de bacterias recombinantes en BAB-Km₅₀ tras la 1ª recombinación. En la 2ª recombinación, la escisión del plásmido se produce en ausencia de presión antibiótica, generando clones mutados y no mutados (NM) Km^r y Suc^r.

Tras este intercambio alélico se generaron clones transconjugantes con Δwzm y/o Δwzt (cepas mutantes) y clones no mutados (NM) cuyo genotipo reversionó al original, que se seleccionaron por ser Km^s, Suc^r y se diferenciaron mediante PCR con los cebadores F9-*wzm* y R8-*wzm*, o F6-*wzt* y R7-*wzt* o F7-*wzm* y R7-*wzt* (Tablas 5 y 6). Asimismo, el fenotipo se confirmó por inundación con cristal violeta-oxalato (0,5 g/L de cristal violeta y 0,2 g/L de oxalato amónico en etanol al 20 % v/v; ambos PanReac AppliChem) durante 15-20 s y otras técnicas que se detallan en el apartado 3 de este capítulo.

2.4. Complementación genética de los mutantes

La ausencia de mutaciones adicionales en los mutantes se verificó mediante conjugación (siguiendo el protocolo del apartado anterior) con la cepa donadora S17(λ pir) portadora del correspondiente plásmido de complementación no integrativo pSRK*wzm* para Rev1 Δwzm y S19 Δwzm , o pBBR*wzm* para 2308 Δwzm y pSRK*wzt* y pSRK*wzm-wzt* para los mutantes Rev1 Δwzt y Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$, según se indica en la Tabla 4.

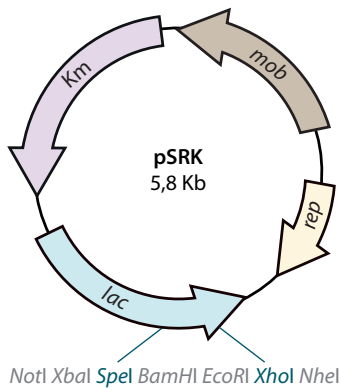


Fig. 12. Vector de complementación. Representación esquemática del plásmido pSRK (Khan et al., 2008) con sus principales características: resistencia a kanamicina (Km), operón *lactosa* (*lac*), gen para iniciar la replicación (*rep*), gen de movilización durante la conjugación (*mob*) y los sitios de enzimas de restricción más relevantes.

Los genes *wzt* o *wzm-wzt* se clonaron en el plásmido pSRK (Khan et al., 2008; Fig. 12) siguiendo los protocolos descritos arriba para la construcción del plásmido pJQKm Δ *wzt*, con las modificaciones detalladas entre corchetes. Así, las secuencias de los genes parentales se amplificaron a partir de ADN genómico de la cepa 16M, utilizando los cebadores *F1-wzt* y *R4-wzt* para el mutante simple o *F7-wzm* y *R7-wzt* para el doble mutante. Una vez purificados, los productos de PCR se introdujeron en el plásmido pCR2.1 [a 14 °C, *overnight* para *wzt*; o a 22 °C, 30 min para *wzm-wzt*]. A continuación, se transformaron las células competentes TOP10F' con el producto de ligación [para pCR2.1*wzt*: 2 μ L del vector y choque térmico a 42 °C durante 1 min; y para pCR2.1*wzm-wzt*: 5 μ L del vector y choque térmico a 42 °C durante 45 s], y los transformantes

se analizaron mediante PCR con los cebadores indicados. Después, las secuencias de la cepa parental se subclonaron en los sitios *SpeI* (isoesquímico: *BcuI*) y *XhoI* del plásmido pSRK utilizando enzimas FastDigest (Thermo Fisher Scientific) con condiciones de digestión dependientes del tamaño del vector [20 μ L de pCR2.1*wzt* o pCR2.1*wzm-wzt*, 3 μ L de cada enzima, 4 μ L de búfer y 10 μ L de agua MilliQ, e incubación a 37 °C durante 1 h; o 32 μ L de pSRK, 2 μ L de cada enzima y 4 μ L de búfer, e incubación a 37 °C durante 15 min]. Los fragmentos purificados a partir de gel de agarosa se ensamblaron con la ligasa T4 [22 °C, 10 min] para generar los plásmidos de conjugación que se utilizaron para, con ellos [2 μ L de pSRK*wzt* o 5 μ L de pSRK*wzm-wzt*], transformar las células TOP10F' primero y, a continuación, S17(λ pir) por choque térmico [a 42 °C durante 45 s].

Tras la conjugación, los transformantes se seleccionaron sembrando en BAB suplementadas con 20 μ g/mL de cloranfenicol (Cm₂₀) para las cepas complementadas con pBBR*wzm* o con Km₅₀ para las complementadas con los plásmidos pSRK*wzm*, pSRK*wzt* y pSRK*wzm-wzt*, así como con el antibiótico de la resistencia intrínseca de cada cepa (indicado arriba). Además, la complementación del doble mutante requirió la inducción con isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,1 mM, compuesto análogo a la lactosa que actúa sobre el represor del operón *lactosa* promoviendo la

expresión del plásmido (Cheung et al., 2009). La adquisición del plásmido de complementación se comprobó mediante PCR con los cebadores *F9-wzm* y *R8-wzm* o con *F6-wzt* y *R7-wzt*; y la restauración del fenotipo original, con las técnicas de cristal violeta-oxalato (Alton et al., 1988) y SDS-PAGE con tinción de plata modificada para LPS o WB, según se detalla en el apartado 3.

3. Estudios de caracterización fenotípica *in vitro*

3.1. Tipificación convencional

Se analizó el perfil fenotípico de los mutantes *Rev1Δwzm*, *Rev1Δwzt*, *Rev1ΔwzmΔwzt* y sus homólogos *2308Δwzm* y *S19Δwzm* desarrollados en este capítulo, en comparación con el de sus cepas parentales. Para ello, se realizaron las pruebas bioquímicas estándar para la tipificación de *Brucella* a nivel de género, especie, biovariedad y cepa (Alton et al., 1988), como son el requerimiento de 5 % de NBCS (Gibco) y de 10 % de CO₂, actividades catalasa con H₂O₂ (VWR Chemicals), oxidasa (BactiDrop; Remel), ureasa (BBL Urea Agar Base; BD), aglutinación con acriflavina (Sigma-Aldrich), inundación con cristal violeta-oxalato (PanReac AppliChem) y observación directa o en una lupa (Optika), y crecimiento en BAB-S en presencia de distintas concentraciones de los colorantes tionina (Sigma-Aldrich), fucsina básica y safranina O (ambos de PanReac AppliChem).

Además, de acuerdo con los resultados de la tipificación convencional, se analizó en más detalle la susceptibilidad de los tres mutantes *Rev1 Δwzm/Δwzt* vs. *Rev1* parental frente a 2,5 μg/mL de estreptomina (*Str*_{2,5}), 1,5 μg/mL de polimixina B (*PxB*_{1,5}), 4 μg/mL de colistina (*Col*₄) y 50 μg/mL del colorante catiónico básico safranina O (*Saf*₅₀). Para estos estudios, se sembraron suspensiones con 10⁴ UFC/mL (0,1 mL, por triplicado) en placas de BAB y de BAB-S suplementadas o no con los antibióticos o el colorante a las concentraciones mencionadas; las placas se incubaron (37 °C, 8 días) por duplicado en atmósfera normal o suplementada con un 10 % de CO₂ y se determinó el n.º de UFC. En el caso de *Saf*₅₀ en BAB-S, se realizó un estudio adicional sembrando todas las diluciones decimales desde 10⁷ a 10⁴ UFC/mL, en ambas condiciones de incubación, para calcular el porcentaje de supervivencia bacteriana (%) con respecto al cultivo estándar (BAB, atmósfera normal).

3.2. Curvas de multiplicación bacteriana *in vitro*

Para determinar si truncar el sistema Wzm/Wzt podía afectar a la multiplicación celular, se estudió la dinámica de multiplicación de los distintos mutantes en TSB (10 mL, por duplicado), a distintos intervalos de incubación (37 °C, 150 r.p.m). Para ello, a partir de una suspensión ajustada a una $DO_{600} = 1$, se determinó la absorbancia (DO_{600}) a esa misma longitud de onda, a intervalos regulares de 1 h, durante 24 h, así como el n.º de UFC/mL en placas de BAB tras incubación de los caldos durante 0, 3, 6, 12, 18 y 24 h. En ambos casos, se calculó la media \pm SD (n = 2) para cada intervalo analizado y los valores obtenidos se representaron gráficamente a lo largo del tiempo.

Además, se calculó el tiempo de generación (td, en horas) como en n.º de horas requeridas para duplicar la biomasa mediante la siguiente fórmula:

$$td = \frac{t}{\frac{\ln(x) - \ln(x_0)}{0,693}}$$

donde t es la duración de la fase exponencial (12 h para *Brucella*); y x_0 y x los recuentos bacterianos antes y después de este intervalo analizado (Maier y Pepper, 2015).

3.3. Análisis de R-LPS y O-PS en los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$

La estructura del R-LPS de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ se analizó mediante SDS-PAGE seguida de tinción de plata (kit de Bio-Rad) modificada para LPS (Tsai y Frasch, 1982); y la presencia y antigenicidad del O-PS en dichos mutantes, mediante WB con bacterias completas inactivadas con fenol o extractos de LPS purificado, siguiendo los procedimientos descritos a continuación.

- Las bacterias completas inactivadas con fenol se obtuvieron a partir de un cultivo en TSB (10 mL, 37 °C, 150 r.p.m., *overnight*) inactivado con un 0,5 % de fenol e incubación de la mezcla durante 72 h en idénticas condiciones. El crecimiento bacteriano obtenido se concentró mediante centrifugación (12.000 \times g, 3 min) y el pellet se diluyó hasta una DO_{600} final = 4, en 150 μ L de PBS y 50 μ L de búfer de muestra, formado por Tris-HCl al 1,5 % y pH 6,8, β -mercaptoetanol al 10 % y azul de bromofenol al 0,06 % (Sigma-Aldrich), SDS al 4 % (Merck) y glicerol al 20 % (VWR Chemicals).

- Las muestras de LPS purificado se prepararon mediante la purificación de OM con agua y fenol (Leong et al., 1969), utilizando el LPS Extraction Kit (Intron Biotechnology) con algunas modificaciones. En detalle, se preparó un cultivo de *Brucella* en TSB (37 °C, *overnight*) ajustado a $DO_{600} = 1,2$, del que se recogieron 5 mL mediante centrifugación ($12.000 \times g$, 30 s) y se añadió 1 mL de búfer de lisis; tras mezclar vigorosamente, se añadieron 200 μ L de cloroformo (Merck) y la mezcla se agitó durante 20 s y se incubó durante 5 min, a temperatura ambiente (T_{amb}). La solución obtenida se centrifugó (4 °C, $12.000 \times g$, 10 min), el sobrenadante se pasó a un nuevo tubo al que se agregaron 800 μ L de búfer de purificación y la mezcla se incubó a -20 °C, durante 10 min. Tras una última centrifugación (4 °C, $12.000 \times g$, 15 min), se descartó el sobrenadante y se lavó el LPS precipitado con 1 mL de etanol al 70 % (Merck) hasta su secado completo. Por último, el LPS se disolvió por hervido en 50 μ L de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 (Sigma-Aldrich) durante 2 min, seguido de una mezcla con 75 μ L de proteinasa K (Merck) mantenida a 50 °C, durante 30 min; para terminar, estas muestras de LPS purificado se mezclaron con el mismo volumen de búfer de muestra.

- La técnica de SDS-PAGE se llevó a cabo en geles de poliacrilamida cuya parte superior o acumuladora constó de 2,5 mL de agua MilliQ, 500 μ L de acrilamida/bisal 30 % (Bio-Rad), 1 mL de búfer superior 4X (Tris-HCl al 6 % y pH 6,8; Sigma-Aldrich), 40 μ L de SDS (Merck) al 10 %, 40 μ L de 10% persulfato de amonio (APS; Bio-Rad) y 7 μ L de tetrametiletilendiamina (TEMED; Sigma-Aldrich). Para la tinción de plata, la parte inferior del gel se preparó al 15 % mezclando 2,86 mL de agua, 3 mL de acrilamida al 30 %, 2 mL de búfer inferior 4X (Tris-HCl al 18,2 % y pH 8,8), 80 μ L de SDS al 10 %, 39,2 μ L de APS al 10 % y 4,34 μ L de TEMED. Para el WB, la parte inferior o separadora al 12 % se elaboró mezclando 3,46 mL de agua, 2,4 mL de acrilamida, 2 mL de búfer inferior 4X, 80 μ L de SDS al 10 %, 47 μ L de APS al 10 % y 4,34 μ L de TEMED. A continuación, en cada pocillo se cargaron 7 μ L del marcador de proteínas VI (PanReac AppliChem) y 20 μ L de las distintas muestras desnaturalizadas (95 °C, 10 min). Finalmente, la electroforesis (80 V, 30 min y 110 V, 90 min) se realizó en una cubeta Mini-PROTEAN (Bio-Rad) con búfer 5X: 1,5 % de Tris-HCl (Sigma-Aldrich), 7,2 % de glicina (AMRESCO) y 0,5 % de SDS (Merck).

- La tinción de plata alcalina modificada para LPS se realizó mediante fijación (4 °C, *overnight*) con 30 mL/gel de una solución con etanol al 40 % y ácido acético al 5 % en agua, seguida de una oxidación (T_{amb} , 10 min) con la misma solución suplementada con 0,7 % de ácido peryódico (Sigma-Aldrich). Después de tres lavados de 5 min con agua

MilliQ, el gel se incubó (T_{amb} , 20 min) con el reactivo de plata (Bio-Rad) al 10 % y se lavó nuevamente con agua MilliQ una vez durante 1 min. A continuación, se añadió el reactivo de revelado del kit al 3,2 %, se dejó en agitación oscilante suave durante 30 s y, finalmente, se reemplazó por reactivo nuevo y se mantuvo en agitación hasta la aparición de bandas visibles, momento en el que se detuvo la reacción con ácido acético al 5 %.

• Los WB se realizaron mediante transferencia semiseca del gel a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare™) utilizando el programa estándar de 30 min del equipo Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Para ello, el sándwich gel-membrana se preparó entre cuatro capas de papel Whatman (GE Healthcare) en búfer de transferencia, con 20 mL de etanol, 70 mL de agua y 10 mL de una solución 10X de Tris base (AMRESCO) al 5,8 % y glicina al 2,9 %. Cuando se requirió incluir un control de carga con un suero anti-BoPA, la membrana se cortó por la banda de 20 kDa del marcador. En todos los casos, la membrana se bloqueó dejándola a 4 °C, *overnight*, en agitación oscilante cubierta, con leche descremada al 5 % en PBS suplementado con Tween 20 (Merck) al 0,1 % (PBST), seguido de una incubación de 30 min, a T_{amb} . A continuación, se incorporaron los sueros o anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa HRP (Bio-Rad) que se muestran en la [Tabla 7](#), diluidos en PBST con un 1 % de leche; los sueros de ovinos infectados por mutantes Δwzm se utilizaron tanto completos como tras tratamiento térmico (56 °C, 1 h). La membrana con los anticuerpos primarios y secundarios se incubó a T_{amb} durante 1 h y se realizaron tres lavados intermedios con PBST, de 10 min cada uno. La imagen resultante se obtuvo con el ECL Kit (Bio-Rad) en un ChemiDoc de Syngene (con GeneSnap 7; Frederick, MD, USA) o de Bio-Rad (con Quantity One Software; Hercules, CA, USA).

Tabla 7. Anticuerpos y sueros utilizados en los WB

Primario	Epítipo	Dilución	Secundario (marca comercial; dilución) ¹	Origen
Sueros ovinos	anti-Rev1 Δwzm ²	1 : 400	Proteína G (Pierce; 1 : 1.000)	Colección del IdAB
	anti-16M Δwzm ²			
	anti-H38			
	anti-Rev1			
	anti-BoPA			
Suero monoespecíficos de conejo	anti-M anti-A	1 : 100	anti-IgG de conejo (BioRad; 1 : 2.500)	
mAb 33H8	C/Y (A = M)	1 : 2.000	anti-IgG de ratón (BioRad; 1 : 3.000)	Ingenasa
mAb 42D2	C/Y (A > M)			

¹ Conjugado anti-proteína G con peroxidasa HRP (Bio-Rad); ² pool de sueros de corderos inmunizados con Rev1 Δwzm o 16M Δwzm portadores de anticuerpos anti- R-LPS y anti- S-LPS (capítulo 3 de esta tesis).

3.4. Estabilidad genética y fenotípica de los mutantes

Se realizaron hasta 20 pases seriados, uno cada 24 h, en placas de BAB que se incubaron a 37 °C, en presencia o ausencia de CO₂ al 10 %, y el último pase de cada condición se analizó fenotípica y genéticamente. La estabilidad del fenotipo se evaluó por la técnica de tinción con cristal violeta-oxalato (R-LPS) y WB con un suero mono-específico anti-M (O-PS citoplasmático) como se ha descrito en los apartados 3.1. y 3.3. La estabilidad de la mutación Δwzm , así como la integridad de las regiones GI-2 y *wbk* que podrían afectar a la presencia/antigenicidad del O-PS citoplasmático (Mancilla et al., 2013) se determinó mediante PCR convencional (ver apartado 2.1.) utilizando las parejas de cebadores: i) F7-*wzm* y R8-*wzm* (Tablas 5 y 6), ii) P1 y P3, iii) P5 y P7, iv) P1 y P2, y v) P5 y P6 (Tabla 8; Ta de 56 °C). En estas condiciones de PCR, las regiones íntegras GI-2 y *wbk* deben ampli-

Tabla 8. Cebadores utilizados para comprobar la integridad genética de las regiones GI-2 y *wbk* (Mancilla et al., 2013)

Cebadores	Región de hibridación	ORF	Secuencia (5'→3')
P1 (F)	GI-2	BMEI0993	caacatcgcaaagcctgaaa
P2 (R)		BMEI1013	cgcaatccagccaataacctg
P3 (R)		BMEI0994	atcgtcggcattgtctctct
P5 (F)	<i>wbk</i>	BMEI1398	gatcttggtatcggcctgtc
P6 (R)		BMEI1413	tgcgactttcttcacgattg
P7 (R)		BMEI1400	cgcttaatatctcgcgttcc

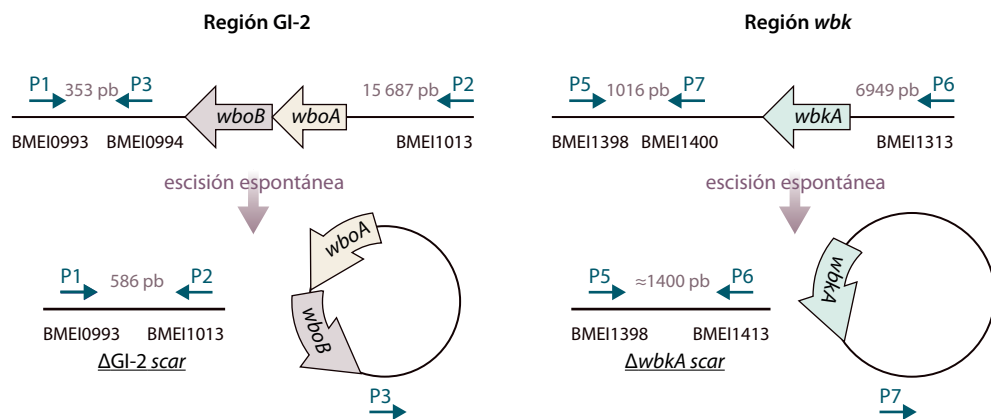


Fig. 13. Representación esquemática de los procesos de reorganización genética descritos en Rev1. Las PCR con los cebadores P1-P3 y P5-P7 deben generar, respectivamente, amplificaciones de 353 pb y 1.016 pb de las regiones GI-2 (izquierda) y *wbk* (derecha) íntegras, mientras que la escisión espontánea de las mismas (Δ GI-2 y Δ *wbk*) generaría bandas de 586 pb con P1-P2 y de ≈1.400 pb con P5-P6. Figura modificada a partir de Mancilla et al., 2013.

ficar fragmentos de 353 pb con los cebadores P1-P3, y 1.016 pb con P5-P7; y ausencia de amplificación con P1-P2, y con P5-P6 debido a la amplia distancia existente entre las regiones de hibridación (15.687 pb o 6.949 pb, respectivamente); en caso de escisión nucleotídica, se amplificarían fragmentos de 586 pb de GI-1 con P1-P2, y de ≈ 1.400 pb de *wbk* con P5-P6 (Fig. 13).

3.5. Análisis transcripcional

La expresión relativa de los genes involucrados en la biosíntesis de O-PS (*gmd*, *per*, *wbkA*, *wbkB*, *wbkC*, *wbkD*, *wbkE*, *wbkF*, *wboA*, *wboB*, *wzm* y *wzt*) y en la síntesis y transporte al periplasma de glucanos cíclicos (*cgs* y *cgt*) se estudió mediante PCR cuantitativa (qPCR), utilizando como control constitutivo el gen *IF-1*, que codifica un factor de iniciación a la traducción (Eskra et al., 2001). Para ello, la extracción del ARN total se realizó con el RNeasy Mini Kit (Qiagen) con ligeras modificaciones. Se ajustaron suspensiones con $DO_{600} = 0,1$ de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ y sus parentales en TSB, se incubaron hasta alcanzar la fase exponencial (37 °C, 150 r.p.m., 12 h), 4 mL de cultivo se centrifugaron ($1.400 \times g$, 10 min) y el precipitado resultante se resuspendió en 300 μ L de un preparado de lisozima (Sigma-Aldrich) a 10 mg/mL en un búfer TE compuesto por Tris-HCl 100 mM (Sigma-Aldrich) y EDTA 1 mM (VWR Chemicals) a pH 8. Tras dejar 5 min a T_{amb} , se añadieron 6 μ L de proteinasa K a 10 mg/mL y 15 μ L de Zwittergente al 10 % (ambos de Merck) y la mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C. A continuación, se añadieron 700 μ L de solución de lisis RLT con β -mercaptoetanol al 1 % y se centrifugó ($1.400 \times g$, 1 min), para transferir el sobrenadante a un nuevo tubo; dada la viscosidad de la muestra, esta se pasó repetidas veces a través de una aguja G21. Sobre esta muestra se indujo la precipitación con 250 μ L de alcohol libre de ribonucleasas y agitación por inversión, el volumen total del lisado se transfirió a una columna RNeasy spin colocada en un tubo de 2 mL para su centrifugación ($8.000 \times g$, 15 s). Tras descartar el sobrenadante se realizaron tres lavados consecutivos a través de la columna, el primero con 500 μ L de búfer RW1 ($8.000 \times g$, 15 s) y otros dos con 500 μ L de búfer RPE con etanol ($8.000 \times g$, 15 s y $8.000 \times g$, 2 min). Tras centrifugar la columna ($13.500 \times g$, 1 min), se vertieron 50 μ L de agua libre de ribonucleasas en un nuevo tubo que se mantuvo a T_{amb} , 2 min, y se centrifugó ($8.000 \times g$, 2 min) hasta obtener el eluido.

Para descartar contaminación del ARN eluido con ADN genómico, se realizó un tratamiento con el Turbo DNA-free Kit (Ambion), añadiendo 1,5 μ L de DNasa y 5 μ L de búfer (37 °C, 30 min) e incubando la mezcla con otros 1,5 μ L más de la enzima en las mismas

condiciones, hasta detener la reacción con 15 μL de una solución fenol : cloroformo 125 : 24 a pH 4,5 (Ambion) e incubación de 2 min a T_{amb} . Tras centrifugación ($8.000 \times g$, 3 min) se determinó la cantidad y calidad del ARN recogido en el sobrenadante mediante dilución de la muestra 1 : 50 en agua MilliQ y espectrofotometría ($\text{DO}_{260/280}$) en un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific); así como su integridad, por migración conjunta en gel de agarosa al 1 % con un mismo volumen (3 μL) de Gel Loading Buffer II (Ambion), verificando las dos bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 23S y 16S, en una ratio 2 : 1.

La reacción de retrotranscripción (RT) del ARN mensajero (ARNm) a ADN complementario (ADNc) se realizó mediante incubaciones a 37 °C, 15 min, y a 85 °C, 5 s, en un termociclador (Applied Biosystems) de una mezcla compuesta por 0,5 μg del ARN y los reactivos del kit PrimeScript RT (Takara) en los siguientes volúmenes: 2 μL de búfer 5X, 0,5 μL de enzima, 0,5 μL de cebador oligo dT, 0,5 μL de hexámeros aleatorios y agua hasta completar un volumen de 10 μL .

El diseño de los cebadores de qPCR (Tabla 9) se realizó mediante alineamiento de las secuencias anotadas en KEGG con el programa bioinformático BLAST y estableciendo los siguientes parámetros: tamaño del amplicón de 100-200 pb, tamaño de los cebadores de 20 nucleótidos, T_m óptima de 60 °C con una diferencia máxima de 2 °C entre cebadores, contenido GC = 50 %, autocomplementariedad <4 y complementariedad de las regiones terminales 3' <2 (preferiblemente, 0).

El rendimiento de los cebadores diseñados se determinó realizando una qPCR, con las condiciones descritas más abajo, utilizando diluciones seriadas de una muestra de ADN genómico de 16M. La pendiente de la recta de regresión lineal generada con los valores del ciclo umbral (Ct) y la correspondiente dilución en escala logarítmica permitió calcular la eficiencia de amplificación (E) con la fórmula $E = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$.

La reacción de qPCR se realizó con 2 μL de ADNc, previamente diluido 1 : 10 con agua MilliQ, con 10 μL de 2X SYBR Premix Ex Taq (Takara), 0,4 μL de cada cebador F y R a concentración 10 μM y 7,2 μL de agua MilliQ. Esta mezcla se desnaturalizó (95 °C, 10 min) y se sometió a 45 ciclos de 15 s a 95 °C más 1 min a 60 °C, seguidos de una curva estándar de *melting*, en un equipo AriaMx Real-Time PCR System (Agilent). Todas las reacciones, ejecutadas en dos réplicas técnicas, se analizaron individualmente para asegurar la amplificación única del fragmento correspondiente.

Tabla 9. Cebadores para el análisis de expresión genética mediante qPCR

Gen	ORF de 16M	Secuencia de nucleótidos (5'→3')		Referencia
		<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	
<i>IF-1</i>	BMEI1671	ttacggaactgctgcccaat	actagaacctgtaccggc	
<i>gmd</i>	BMEI1413	cagccgaggtggaaacttt	cagcaaattctcacgagcg	
<i>per</i>	BMEI1414	caagttagctggattgccgc	ggctctctgtgtccgagtt	
<i>wbkA</i>	BMEI1404	gttgaaggagcgattccga	gaagcgatctgcaagccaac	
<i>wbkB</i>	BMEI1417	agattcaggcgctccaagac	acagaagccggaatcgtag	
<i>wbkC</i>	BMEI1418	tcggttcgctgggtgattat	tgacttctctaagcgcgc	
<i>wbkD</i>	BMEI1427	gacgcatgaagacatgacgc	gccagatcgcgattttcac	Este capítulo de tesis
<i>wbkE</i>	BMEI1393	cacttggcttgacgagtct	cccatccccgacaatgacaa	
<i>wbkF</i>	BMEI1426	ctgccaaccttctgcccta	gccgagtaatcgataccca	
<i>wboA</i>	BMEI0998	ggaaattgttcgggtctcg	cgcagcaaaagttccgtgt	
<i>wboB</i>	BMEI0997	aatggcttcttgcgctcg	cgataagagcgtgaaggct	
<i>wzm</i>	BMEI1415	atgtctggaaggtacgccac	acgaaagacagtagcagct	
<i>wzt</i>	BMEI1416	cctgataggtcacaacgggg	tcaggctcaaacccaagacc	
<i>cgs</i>	BMEI1837	gccgatcagaacagggcg	ttcccactggtgccttgc	Mirabella et al., 2013
<i>cgt</i>	BMEI0984	caatgttccggtggtgcaga	tttcgaggttcttggcgtaatc	

Los niveles de transcripción relativa o expresión diferencial se normalizaron con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, en el que $\Delta\Delta Ct$ es igual al ΔCt de la cepa problema menos el ΔCt de la cepa control, siendo ΔCt igual al Ct del gen de interés menos el Ct del gen constitutivo (Livak y Schmittgen, 2001).

3.6. Susceptibilidad a los antibióticos de elección para el tratamiento de la brucelosis humana

El tratamiento de la brucelosis humana consiste en la administración combinada de doxiciclina (Dx) junto con rifampicina (Rf), gentamicina (Gm) o estreptomycin (Str) (Ariza et al., 1986; Grilló et al., 2006). La eficacia de estos tratamientos frente a los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ se determinó *in vitro* mediante métodos de microdilución en cultivo líquido y de siembra en medio sólido.

El método estándar de microdilución consistió en determinar los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI; *i. e.*, la concentración más baja a la cual el antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento visible por turbimetría) y la concentración mínima bactericida (CMB; *i. e.*, la concentración más baja a la cual el antibiótico provoca la

muerte bacteriana) frente a los antibióticos mencionados, mediante la técnica estándar de microdilución (Andrews, 2001; EUCAST, 2003). Para ello, se prepararon diluciones seriadas 1 : 2 de los antibióticos en medio Müller-Hinton (M-H; BD) en concentraciones finales de 3,2-0,006 µg/mL para Dx, 16-0,03 µg/mL para Rf, 4-0,01 µg/mL para Gm y 15-0,028 µg/mL para Str. Utilizando placas de 96 pocillos (Sarstedt), se dispensaron por duplicado 0,1 mL/pocillo de concentración antibiótica con 0,1 mL de una suspensión de *Brucella* ajustada a $DO_{750} = 0,109$ o de *E. coli* K12 (control) ajustada a $DO_{750} = 0,063$, ambas diluidas 1 : 100 en M-H. Tras incubar estas placas a 37 °C, durante 48-72 h (o 24 h para el control *E. coli*), la CMI se determinó como la menor concentración que mostró ausencia de turbidez y la CMB como aquella que mató al 50 % (CMB_{50}) o 90 % (CMB_{90}) de las bacterias en el inóculo inicial, determinado tras sembrar (0,1 mL, por triplicado) la dilución 10^{-3} en BAB e incubar las placas durante 7 días a 37 °C.

Además, se estudió el efecto combinado de la Dx con cada uno de los otros tres antibióticos, mediante el cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) por la técnica de *chequerboard titration* o tablero de ajedrez (Mateu-de-Antonio y Martín, 1995). Para ello, se determinaron las CMI con diluciones horizontales y verticales de distintas combinaciones antibióticas (Dx+Rf, Dx+Gm y Dx+Str), incluyendo hasta 5 concentraciones por debajo del valor de la CMI individual. El FIC se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$FIC = \frac{CMI \text{ del antibiótico A combinado}}{CMI \text{ del antibiótico A solo}} + \frac{CMI \text{ del antibiótico B combinado}}{CMI \text{ del antibiótico B solo}}$$

El resultado se interpretó como efecto sinérgico (<0,5), aditivo (0,5-1,0), indiferente (1,1-2,0) o antagonico (>2,0).

El estudio del crecimiento en medio sólido se realizó en placas de BAB suplementado con 0,5-0,02 µg/mL de Dx, 1-0,125 µg/mL de Rf, 0,5-0,03 µg/mL de Gm o 2,5 µg/mL de Str, bien individualmente o combinando Dx+Rf, Dx+Gm y Dx+Str. Para ello, se sembraron, por triplicado, 0,1 mL de 10^4 UFC/mL de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ en placas de BAB y BAB combinado con los antibióticos e incubación de las mismas (37 °C, atmósfera normal) durante 8 días. El resultado se expresó como porcentaje de supervivencia (%) en aquellas concentraciones que permitieron un recuento contable, respecto a los recuentos obtenidos en BAB

3.7. Susceptibilidad a factores ambientales

Dado que *Brucella* se topa con numerosos tipos de estrés tanto en el medio ambiente como dentro del hospedador, se analizó la respuesta de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ frente a diversas presiones como desecación, compuestos surfactantes, estrés oxidativo, pH ácido, fluctuaciones de temperatura y privación de nutrientes.

El efecto de la desecación y la luz UV se estudió tras evaporación de 200 μL de una suspensión con 10^9 UFC/mL en TSB, en placas de 12 pocillos (Sarstedt) abiertas dentro de la cabina de flujo laminar (BIO-II-A Telstar); y su posterior conservación a T_{amb} , durante 6 días, en presencia o ausencia de luz solar directa; cada muestra se analizó por triplicado. El precipitado se rehidrató en 2 mL de PBS para determinar el n.º de UFC/mL, mediante diluciones seriadas y siembra en placas de BAB, y calcular el porcentaje de supervivencia bacteriana (%) frente a la suspensión inicial.

La lisis celular mediada por surfactantes se evaluó incubando (37°C , 1 h) por triplicado 0,1 mL de 10^4 UFC/mL con 0,1 mL de SDS (Merck) a un rango de ocho diluciones 1 : 2 desde 8 % hasta 0,06 %. Además, se sembraron 0,1 mL, por triplicado, de seis suspensiones 1 : 10 con 10^9 - 10^4 UFC/mL en placas de BAB suplementadas con 0,1 % Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) para calcular la supervivencia bacteriana (%) respecto al control BAB.

La susceptibilidad al estrés oxidativo y al pH ácido se analizó incubando (37°C , 1 h) 0,1 mL de una suspensión con 10^4 UFC/mL en TSB con 0,1 mL de H_2O_2 a 1, 2, 3, 4 y 5 mM, o en TSB acidificado a un pH final de 7,3, 4,5, 4,2, 3,9, 3,7 o 2,3, respectivamente. Tras los pertinentes recuentos bacterianos, en cada caso, el resultado se expresó como el porcentaje de supervivencia bacteriana (%) vs. la suspensión inicial.

La tolerancia a la privación de nutrientes y resistencia a fluctuaciones de temperatura se estudió incubando estáticamente 0,1 mL de una suspensión con 10^4 UFC/mL en PBS a 40°C durante 4, 24, 48 y 72 h, o a T_{amb} durante 6 días. Como control del efecto aislado de la temperatura, se incluyeron muestras incubadas de manera similar en TSB. Los porcentajes de supervivencia bacteriana (%) se calcularon con respecto a la concentración inicial, mediante cultivo en BAB.

3.8. Propiedades de OM: autoaglutinación, carga de superficie, hidrofobicidad y estudios de *biofilm*

El estudio de propiedades de OM de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ se llevó a cabo mediante las pruebas de autoaglutinación, potencial Z, hidrofobicidad, adhesión a superficies, viabilidad de las células adheridas y caracterización de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) como componentes típicos de la matriz de *biofilms*.

La autoaglutinación se determinó realizando un seguimiento de la absorbancia de cultivos en TSB ajustados a una $DO_{600} = 0,5-0,8$ y mantenidos a T_{amb} durante 24 h, en estático, por duplicado. Como control de reproducibilidad, se realizaron al menos dos experimentos independientes; los datos se normalizaron con respecto a una DO_{600} inicial = 1.

La carga de superficie y el tamaño de partícula se midieron como variaciones de potencial Z en ausencia ($n = 4$) y presencia ($n = 2$) de poli-L-lisina (P6516; Sigma-Aldrich) a concentraciones de 2, 4, 6, 12 y 20 $\mu\text{g/mL}$. Para ello, se prepararon suspensiones bacterianas inactivadas con fenol (0,5 %, 37 °C) en CsCl 1 mM (Sigma-Aldrich) y HEPES 10 mM (VWR Chemicals). Las mediciones se realizaron en un Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical) a 25 °C con ayuda del programa ZS-XPLORER 2.01 Software (UK).

La hidrofobicidad se determinó mediante el método de adherencia a hidrocarburos (Rosenberg et al., 1980), modificado para evitar la citotoxicidad del xileno (Czerwonka et al., 2016). Para ello, se realizó la inactivación con fenol al 0,5 % de cultivos en TSB (37 °C, 150 r.p.m., *overnight*) durante 72 h en las mismas condiciones, y estos se centrifugaron ($6.000 \times g$, 4°C, 10 min) y lavaron dos veces con búfer acuoso (KH_2PO_4 53 mM, VWR Chemicals; urea 21 mM, PanReac AppliChem; K_2HPO_4 97 mM y MgSO_4 0,8 mM, ambos Sigma-Aldrich). Se ajustaron 2 mL a $DO_{470} = 1$ y mezclaron con 2 mL de xileno (PanReac AppliChem), por triplicado. La mezcla se agitó vigorosamente durante 5 s, se incubó a 37 °C durante 10 min, se agitó durante 30 s y se incubó a T_{amb} durante 2 h antes de medir la absorbancia de la fase inferior. El índice de hidrofobicidad se calculó como $= 1 - (DO_{470}/1)$.

La adherencia bacteriana a superficies se estudió incubando 5×10^8 UFC/mL, por triplicado, bien con 200 μL /pocillo en placas de poliestireno de 96 pocillos (Sarstedt) o con 5 mL de suspensión bacteriana en tubos de vidrio, sellados con parafilm (Bemis)

para evitar la evaporación. Después de 3 semanas de incubación (37 °C, TSB, estático), las bacterias no adheridas se retiraron mediante dos lavados con PBS y se añadió 0,2 o 5 mL, en cada caso, de solución cristal violeta (PanReac AppliChem) al 0,05 % en agua a T_{amb} . Tras dejar actuar la reacción durante 15 min, se lavó con agua destilada, se dejó secar y el colorante fijado se disolvió en 1 mL de etanol (Merck) para medir la DO_{600} . Se incluyó un control sin procesar, para determinar la viabilidad de las bacterias adheridas, mediante impregnación de un hisopo estéril y su sembrado en BAB.

La presencia y caracterización del EPS se evaluó sembrando 20 μ L de una suspensión con 10^9 UFC/mL en placas de BAB suplementado con un 0,1 % de blanco de calcoflúor (Sigma-Aldrich) o un 4 % de Rojo Congo (Merck). Tras incubación de las placas a 37 °C, durante 3 semanas, se visualizó la fluorescencia del calcoflúor en un UV transilluminator (UVP) y el cambio de color del Rojo Congo hacia un rojo oscuro intenso, en función de la afinidad diferencial de estos dos compuestos por los diferentes tipos de polisacáridos (Wood, 1980) que conforman la matriz extracelular. La intensidad de coloraciones se cuantificó en escala de grises sobre fondo negro, mediante el programa ImageJ/Fiji 2.1 (Schindelin et al., 2012).

3.9. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para la observación de las muestras mediante tinción negativa, las suspensiones bacterianas se prepararon recogiendo un cultivo masivo de *Brucella* crecido en 1 placa de BAB (37 °C, 24 h) en un microtubo (Eppendorf) con 1 mL de tampón fosfato de Sorenson a pH 7.4 (Kuo, 2007). Tras realizar dos lavados ($7.000 \times g$, 10 min) y una dilución 1 : 200 en el mismo tampón, la preparación obtenida se resuspendió en una solución fijadora preparada en Sorenson con 2,5 % de glutaraldehído (grado I, 70 %; Sigma-Aldrich) y 2 % de paraformaldehído (en polvo; Sigma-Aldrich), hasta completar el volumen total del microtubo para evitar la formación de burbujas. Las preparaciones se mantuvieron a 4 °C *overnight* (o hasta su uso). A continuación, se depositó una gota de 3 μ L de esta preparación sobre una rejilla de cobre recubierta con una película de carbono, previamente hidrofílicas mediante *glow discharge* (5 mA, 20 s) en un equipo Leica EM ACE200, dejándola actuar durante 1 min para permitir su adsorción. Tras retirar la gota, la rejilla se tiñó (10 s) dos veces seguidas con acetato de uranilo al 1 % y se dejó secar al aire para, seguidamente, adquirir la imagen de TEM en un equipo JEOL JEM 1400 Plus.

Para la observación de muestras fijadas mediante inclusión y ultramicrotomía, la masa bacteriana se recogió en 1 mL del tampón fosfato, se lavó ($7.000 \times g$, 10 min) con el mismo solvente y se añadió solución fijadora (500 μ L, 4 °C, 10 min) con cuidado de no alterar el precipitado. Para obtener una masa más compacta, se centrifugaron ($10.000 \times g$, 10 min) las muestras, se descartó el sobrenadante y se añadió nueva solución fijadora hasta completar el volumen del tubo. Las preparaciones se mantuvieron a 4 °C hasta su procesado. A continuación, las muestras se lavaron con tampón fosfato más sacarosa isoosmolar (4-8 %) con el fijador. La postfijación se realizó con OsO_4 al 1 % (4 °C, 1 h -2 h, en oscuridad) y se llevó a cabo un nuevo lavado (10 min, 3 veces) en tampón fosfato sin sacarosa. Las muestras se deshidrataron en una serie creciente de etanol (30-100 %, 15 min cada una) y se lavaron con óxido de propileno (30 min, 2 veces) para, a continuación, embeberlas en óxido de propileno con resina epoxi (EPON Polarbed 812) en proporciones 2 : 1, 1 : 1 y 1 : 2 durante 60 min cada una y finalmente en resina epoxi (100 %, *overnight* o hasta lograr la evaporación de restos de propileno). Esta muestra se pasó a una cápsula (BEEM) con resina nueva, se polimerizó (55 °C, 48 h) para realizar un piramidado inicial, seguido de cortes semifinos, tinción con azul de toluidina, retallado y cortes mediante ultramicrotomo. Finalmente, después de contrastar las rejillas con citrato de plomo y acetato de uranilo, las muestras se observaron TEM en el equipo JEOL JEM 1400 Plus.

3.10. Estudios de pared celular: estrés osmótico y susceptibilidad a penicilina y vancomicina

La adaptación de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ al estrés osmótico se estudió como indicador del estado de los componentes de envoltura celular, tanto hiposmótico como hiperosmótico iónico o no iónico (Cheung et al., 2009). Para ello, se utilizaron dos métodos basados en la resistencia, bien al NaCl (Dong et al., 2015), bien a la sacarosa (Roset et al., 2006). Las determinaciones se realizaron mediante incubación a 37 °C, durante 1, 24, 48 o 72 h, de una suspensión con 10^4 UFC/mL en TSB diluido 1 : 5 en agua MilliQ, o en NaCl 0,5 M o sacarosa 0,34 M (ambos de VWR Chemicals) y siembra (0,1 mL, por triplicado) en placas de BAB. Con los crecimientos obtenidos tras la incubación de las placas (37 °C, 5 días) se calculó el n.º de UFC/mL en cada condición y la supervivencia bacteriana (%) con respecto a la suspensión inicial.

La susceptibilidad a penicilina G y vancomicina se utilizó como modelo indirecto de evaluación de la integridad del PG, ya que se trata de antibióticos que actúan sobre

la síntesis de pared celular (Kohanski et al., 2010). La actividad de la penicilina G se determinó mediante el método estándar de microdilución en placa (ver apartado 3.6) utilizando un rango de concentración final de penicilina G de 27-0,05 UI/mL. Además, se analizó el crecimiento de los mutantes en placas de BAB y BAB-S suplementadas con P₅, P_{0,5} y P_{0,25}, sembrando 50 µL, por triplicado, de suspensiones con diluciones decimales entre 10⁹ y 10⁴ UFC/mL e incubando las placas a 37 °C durante 8 días, en presencia y ausencia de 10 % de CO₂ y suero). Se determinó el n.º de UFC/mL y la supervivencia bacteriana (%) en cada dosis respecto al BAB.

La actividad de la vancomicina se analizó mediante la incubación (37 °C, 1 h) en placas de 96 pocillos, por duplicado, de 0,1 mL con 10⁴ UFC/mL y 0,1 mL de diluciones seriadas 1 : 2 de vancomicina (Sigma-Aldrich) en PBS a concentración final de 50-3,1 mg/mL. Se determinó el n.º de UFC/mL y la supervivencia bacteriana (%) con respecto al pocillo control mediante la siembra en BAB.

3.11. Cromatografía líquida de ultra-alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS)

La obtención de muestras de PG a partir de cultivos bacterianos de *Brucella* se realizó siguiendo el protocolo descrito en Alvarez et al., 2020. Brevemente, 10 mL de un caldo *overnight* se ajustaron por espectrofotometría a DO₆₀₀ = 1, incluyendo tres réplicas biológicas, se centrifugó (3.000 × g, 15 min) y el precipitado se recogió en 1,5 mL de PBS vertiendo suavemente 1,5 mL de SDS al 5 %. Tras mantener este preparado en agitación magnética en agua hirviendo durante 2 h y, seguidamente, *overnight* a T_{amb}, se sembraron 0,1 mL de cada lisado celular en BAB para confirmar la inactivación de todas bacterias.

A continuación, se procedió a la purificación de los muropéptidos. El sáculo de mureína se lavó repetidamente con agua MilliQ por ultracentrifugación (150.000 × g, 20 °C, 10 min) y se trató (37 °C, 15 h) con muramidasa a 100 µg/mL hasta detener la digestión por ebullición. Las muestras se centrifugaron (20.000 × g, 10 min) para descartar las proteínas coaguladas y ajustar el sobrenadante a pH 8,5-9,0 con búfer de borato de sodio, al cual se añadió borohidruro de sodio, a una concentración final de 10 mg/mL. Después de una reacción de reducción (T_{amb}, 30 min) se ajustó a pH 3,5 con ácido ortofosfórico y se realizó el análisis en un sistema Waters UPLC (Waters Corporation, USA) equipado con una columna ACQUITY UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 µm, 2,1 mm × 150 mm (Waters, USA) y un detector de absorbancia de longitud de onda dual. Los muropéptidos eluidos se

detectaron a 204 nm y se separaron, a 45 °C, en un gradiente lineal (flujo de 0,25 mL/min, 18 min) de ácido fórmico al 0,1 % en agua y en acetonitrilo. Las cantidades totales relativas de PG se calcularon comparando el área total de los cromatogramas. La identidad de los muropéptidos se confirmó por análisis MS/MS en un sistema Xevo G2-XS QToF (Waters Corporation, USA) y su cantidad se determinó en base al área relativa del pico correspondiente normalizada según la cantidad total de PG, excluyendo aquellos con una abundancia inferior al 0,5 %.

3.12. Susceptibilidad a factores solubles del sistema inmune

3.12.1. Modelo de péptidos catiónicos de respuesta innata

Los péptidos antimicrobianos son factores solubles del sistema inmune innato que actúan de manera universal como la primera línea de defensa frente a patógenos (Pasupuleti et al., 2012). Para determinar la susceptibilidad de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ frente a estos factores, se realizó un estudio de supervivencia en presencia de polimixinas como modelo de estos péptidos catiónicos (Caro-Hernández et al., 2007; Martínez de Tejada et al., 1995). Para ello, se mezclaron 0,1 mL, por triplicado, de una suspensión con $2-4 \times 10^3$ UFC/mL con 0,1 mL de PxB o Col a dilución 1 : 2 (a concentración final de 3-0,19 mg/mL), en una solución de fosfato ácido (NaCl 0,133M; VWR Chemicals y NaH_2PO_4 0,1 M; PanReac AppliChem; pH 4,6) capaz de simular el ambiente de degranulación de neutrófilos en los fagosomas acidificados. Tras una incubación de 1 h a 37 °C, se cuantificó el n.º de bacterias viables (UFC/mL para cada concentración), mediante siembra en BAB e incubación de las placas a 37 °C, durante 7 días.

Además, la susceptibilidad a PxB se cuantificó por el método estándar de microdilución en placa (ver apartado 3.6.), utilizando concentraciones finales del antibiótico entre 750 $\mu\text{g/mL}$ y 0,1 $\mu\text{g/mL}$.

3.12.2. Susceptibilidad al sistema del complemento

El sistema del complemento juega un papel clave en la defensa frente a agentes infecciosos, tendiendo un puente entre la respuesta inmune innata y la adaptativa, al activarse mediante las vías clásica, alternativa y de las lectinas (Dunkelberger y Song, 2010). La inhibición bacteriana generada por dichas moléculas termolábiles se determinó con suero normal ovino y bovino, como se describe en González et al., 2008. Los sueros se obtu-

vieron a partir de animales libres de *Brucella*, que se dejaron desuerar durante 2 h, a T_{amb} , para luego retirar el coágulo, se centrifugó el suero restante ($600 \times g$, 10 min), se filtró el sobrenadante (0,20 μm ; Millipore) formado por la fracción sérica limpia de eritrocitos y estos sueros se almacenaron a $-80 \text{ }^\circ C$ hasta su uso. El estudio de susceptibilidad de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ a los componentes del suero convencional se realizó con una única descongelación de los sueros mencionados, mezclando en placas de 96 pocillos 45 μL de 10^4 UFC/mL con 90 μL de suero normal o descomplementado ($56 \text{ }^\circ C$, 1 h); cada determinación se realizó por duplicado, incubando las muestras a $37 \text{ }^\circ C$ durante 45 y 90 min, y 3 y 18 h, antes de añadir 65 μL /pocillo de Brain Heart Infusion Broth (BHI; Oxoid) para proceder al recuento de bacterias viables mediante la siembra del contenido de cada pocillo (50 μL , por triplicado) en BAB. Tras incubación convencional ($37 \text{ }^\circ C$, 7 días) de las placas, se determinó la supervivencia bacteriana (%) con respecto a un grupo control tratado con PBS.

3.12.3. Inhibición mediada por anticuerpos

Los anticuerpos son inmunoglobulinas (Ig) producidas por los linfocitos B en la respuesta adaptativa de tipo humoral, que actúan como agentes neutralizantes, activadores del sistema del complemento y facilitan la respuesta celular citotóxica tras la fagocitosis mediada por APC de la bacteria (Skendros y Boura, 2013).

Para estudiar estos aspectos, se midió el poder bactericida (*bacterial killing*) de los anticuerpos generados en ovinos inoculados con el candidato vacunal Rev1 Δwzm , utilizando un *pool* de sueros seleccionados de corderos infectados con Rev1 Δwzm o 16M Δwzm que mostraban anticuerpos frente al R-LPS y S-LPS (ver capítulo 3 de esta tesis); en comparación con suero convencional libre de anticuerpos anti-*Brucella*. Su actividad bactericida frente a distintas cepas de *Brucella* se determinó siguiendo el protocolo de susceptibilidad al suero convencional descrito en el apartado anterior y realizando incubaciones de 18 h con las cepas virulentas *B. melitensis* 16M o *B. ovis* PA; para analizar la existencia de una posible inmunidad cruzada, se incluyó un grupo de *B. abortus* 2308 incubado durante 3 h. Se realizaron dos experimentos independientes y los resultados se expresaron como la media \pm SD del porcentaje de supervivencia bacteriana con respecto al control PBS (o PBS-S e incubación con 10 % CO_2 para BoPA).

4. Estudios *in vivo* en modelo murino

El estudio de propiedades vacunales (*i. e.*, atenuación y eficacia) de los distintos mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ se realizó en modelos murinos preclínicos utilizados internacionalmente en brucelosis experimental (Grilló et al, 2012; OIE, 2022). Además, este estudio se completó con la determinación de los niveles de citoquinas séricas indicadoras de la respuesta inmune adaptativa generada por cada cepa.

4.1. Bioseguridad y ética en la experimentación animal

Se utilizaron ratones hembra raza BALB/c o hembra y macho raza CD1, todos ellos adquiridos en Charles River (Elbeuf, France) con 7 o 4 semanas de edad, respectivamente. El alojamiento se realizó en las instalaciones autorizadas del IdAB (código de registro ES/31-2016-000002-CR-SU-US/código actual ES312010000013), comenzando los procedimientos tras 2 semanas de aclimatación. Los animales se mantuvieron en jaulas de bioseguridad con agua y comida *ad libitum* y fueron manipulados por personal acreditado, siguiendo las directrices de la Federación de Asociaciones Europeas de las Ciencias del Animal de Laboratorio (FELASA; Rehbindler et al., 2000) y la guía Animal Research: Reporting of In vivo Experiments (ARRIVE; Percie du Sert et al., 2020). Los procedimientos de experimentación fueron autorizados por el Gobierno de Navarra (código PI-025-14) en cumplimiento de la legislación nacional y europea vigente (RD 53/2013; Orden ECC/566/2015; Directiva 2010/63/UE). La aplicación de punto final humanitario no fue necesaria dado que la inoculación y transcurso de la infección no indujo signos de sufrimiento en los animales.

4.2. Procedimientos generales de experimentación con ratones

En todos los casos, los animales fueron inoculados por las vías IP o SC con 0,1 mL de la suspensión bacteriana deseada, preparada como se explica arriba (apartado 1), cuya dosis real se confirmó por recuento retrospectivo. Los animales fueron sacrificados mediante elongación cervical, a los intervalos post-inoculación (PI) seleccionados en cada experimento, para la extracción aséptica de los bazo, su pesado individual, homogeneización 1 : 10 (peso : vol) en PBS estéril y siembra de hasta seis diluciones decimales seriadas en placas de BAB (0,1 mL/dilución, por triplicado). Tras incubación de las placas a 37 °C, durante 8 días, se cuantificó el n.º de UFC/bazo y los resultados se expresaron como la media \pm SD (n = 5) de los \log_{10} UFC/bazo o g/bazo individuales para cada grupo (Grilló et al., 2006).

4.3. Curvas de multiplicación bacteriana en bazo y perfil de citoquinas

En primer lugar, se estudió la capacidad de multiplicación y persistencia esplénicas de los mutantes *Rev1Δwzm*, *Rev1Δwzt* y *Rev1ΔwzmΔwzt* en las condiciones previamente estandarizadas para mutantes rugosos (González et al., 2008). Brevemente, grupos de 14 ratones BALB/c fueron inoculados IP con 10^8 UFC/ratón del correspondiente mutante y sacrificados ($n = 3$ a las 1 y 4 semanas PI, y $n = 4$ a las 2 y 3 semanas PI) para determinar la media \pm SD del peso de los bazos y del n.º de UFC/bazo, previa transformación logarítmica, en cada intervalo PI.

Para determinar si la esplenomegalia inducida por *Rev1Δwzm* en el estudio anterior era dosis-dependiente, un grupo de 15 ratones se inoculó IP con 10^6 UFC/ratón de este mutante y se sacrificaron ($n = 5$) a 1, 2 y 4 semanas PI; otro grupo de 10 ratones se inocularon IP con 10^8 UFC/ratón del mismo mutante (control de repetitividad del ensayo anterior) y se sacrificaron a 2 y 6 semanas PI; y otro grupo de 10 ratones se inocularon SC con 10^5 UFC/ratón de *Rev1* (dosis óptima para esta cepa de referencia; Grilló et al., 2006) y se sacrificaron a 1 y 6 semanas PI. En cada sacrificio se determinaron tanto los pesos como los niveles de infección esplénicos como se ha indicado anteriormente.

Con la información adquirida, se realizó un tercer estudio para determinar la capacidad de infección de *Rev1Δwzm* a dosis inferiores a la estándar. Para ello, grupos de 5 ratones BALB/c fueron inoculados IP con 10^5 , 10^6 , 10^7 o 10^8 UFC/ratón de *Rev1Δwzm* y los bazos se procesaron a las 2 semanas PI. Como control, se utilizó un grupo de 5 ratones inoculados SC con 10^5 UFC/ratón de *Rev1*, cuyos bazos se analizaron a las 2 semanas PI.

Para evaluar si las diferencias entre *Rev1* y *Rev1Δwzm* eran extrapolables a *B. abortus*, grupos de 15-20 ratones BALB/c se inocularon por vía IP con 10^8 UFC/ratón de *S19Δwzm* o *2308Δwzm* y se sacrificaron a las 2, 6 y 9 o 2, 4, 6 y 8 semanas PI, respectivamente, de acuerdo con la evolución de la infección esplénica esperada en base a sus respectivas cepas parentales. Además, se incluyeron 5 ratones control inmunizados con S19 en condiciones estándar (10^5 UFC/ratón, vía SC) y sacrificados a las 2 semanas PI. En todos los animales se realizaron los estudios esplénicos indicados anteriormente.

Además, se cuantificó la producción de citoquinas inducidas por mutantes *Rev1 Δwzm/Δwzt*. Brevemente, grupos de 14 ratones BALB/c se inocularon por vía IP con

10^8 UFC/animal y se tomaron muestras de sangre, a 2, 6 y 24 h PI (procesadas en *pool*) y justo antes de cada necropsia a 1, 2, 3 y 4 semanas PI (procesadas individualmente) para la extracción aséptica de los bazos. Como controles se incluyeron 10 ratones inoculados con Rev1 en condiciones estándar (10^5 UFC/ratón, vía SC) y otros 10, inoculados con 0,1 mL de PBS. Las extracciones de sangre se realizaron mediante punción del plexo retorbital, previa anestesia con isoflurano (ISOFLOR, Eucuphar) y, tras dejarlas desueringar a T_{amb} durante 2 h, se centrifugaron ($2.500 \times g$, 10 min) para la obtención de sueros y conservación a -80 °C hasta su uso. Los bazos de estos mismos ratones se homogeneizaron individualmente en Hanks Balanced Salt Solution (Gibco-Life Technologies) y se trataron (4 °C, 1 h) con un 1 % de CHAPS Solution (Sigma-Aldrich) y los sobrenadantes ($1.000 \times g$, 10 min) se filtraron por $0,20 \mu m$ (Millipore) para su conservación a -80 °C hasta su uso. Las distintas muestras de sueros y sobrenadantes esplénicos se utilizaron para cuantificar la producción de IL-12p40, IL-6, TNF- α e IFN- γ , mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) con kits comerciales (referencias 555165, 555240, 555268 y 555138; BD OptEIA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El resultado se expresó como la media \pm SEM del nivel de citoquinas (pg/mL o pg/bazo) en cada momento PI.

4.4. Estabilidad de Rev1 Δwzm tras pases *in vivo*

Se evaluó la estabilidad *in vivo* del candidato Rev1 Δwzm tras cinco pases seriados por ratón (Schurig et al., 1991). Para ello, grupos de 3 ratones CD1 se inocularon vía IP a una dosis teórica de 10^8 UFC/animal y sacrificaron 3 días más tarde para obtener las bacterias de sus bazos; las bacterias recuperadas en cada pase fueron subcultivadas para preparar el inóculo del siguiente pase. Además del mantenimiento de la capacidad infectiva, se comprobó la estabilidad genética y fenotípica del mutante recogido tras el último pase, siguiendo los procedimientos descritos para el análisis de la estabilidad *in vitro* (apartado 3.4.).

4.5. Estudios de eficacia

La protección conferida por los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ frente a la infección virulenta por *B. melitensis*, *B. ovis* o *B. abortus* se evaluó en ratones BALB/c, como se describe en González et al., 2008; Soler-Lloréns et al., 2014 o Monreal et al., 2003, respectivamente. Brevemente, grupos de 5 ratones se vacunaron por vía IP o SC con 10^8 UFC/animal del correspondiente mutante $\Delta wzm/\Delta wzt$, o por vía IP con 10^6 UFC/ratón de Rev1 Δwzm ; como controles se utilizaron grupos adicionales de ratones ($n = 5$) vacunados con las

cepas de referencia Rev1 o S19, en condiciones estándar (*i. e.*, 10^5 UFC/ratón, por vía SC) o con 0,1 mL de PBS estéril. Cuatro semanas más tarde, todos los animales fueron infectados experimentalmente por vía IP con la dosis óptima de las cepas virulentas *B. melitensis* H38::Gm (10^4 UFC/ratón), BoPA::Gm (5×10^5 UFC/ratón) o 2308::Gm (5×10^4 UFC/ratón). Dos (para H38::Gm y 2308::Gm) o tres (para BoPA::Gm) semanas post-infección, se sacrificaron todos los animales para determinar el \log_{10} UFC/bazo de la correspondiente cepa virulenta en cada animal, mediante siembra en BAB-S-Gm₁₅ (inhibe posibles colonias residuales de las vacunas) e incubación de las placas en condiciones estándar. Los resultados se expresaron como la media \pm SD ($n = 5$) de los \log_{10} UFC/bazo individuales.

5. Visualización de los datos y análisis estadístico

La representación gráfica de los resultados y su análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, USA). El valor p se determinó mediante la prueba t de Student para muestras pareadas o independientes, o mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de uno o dos factores, seguido de la prueba de las mínimas diferencias significativas (LSD) de Fisher, con un intervalo de confianza del 95 %, en base a la clasificación de los datos establecida en cada caso. En el análisis por UPLC-MS solamente se consideraron significativas aquellas diferencias entre muestras con una variación >10 % respecto al control.

Las figuras finales se editaron de manera uniforme con GNU Image Manipulation Program 2.10 (código abierto, www.gimp.org) y la maquetación se realizó con los programas Adobe Illustrator e InDesign 2020 (San José, CA, USA).

Resultados

1. Los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ muestran la delección esperada

Los mutantes $Rev1\Delta wzm$, $Rev1\Delta wzt$, $Rev1\Delta wzm\Delta wzt$, $2308\Delta wzm$ y $S19\Delta wzm$ se construyeron mediante recombinación homóloga aplicando, en su caso, los plásmidos $pJQKm\Delta wzm$ (Zabalza Baranguá, 2017) y $pJQKm\Delta wzt$ (este capítulo). Además de las homologías descritas para el gen *wzm* en distintas especies de *Brucella* (Zabalza Baranguá, 2017), la ORF BMEI1415 de 16M mostró una identidad del 100 % con el gen *wzm* secuenciado en la cepa parental Rev1. En lo que respecta a *wzt*, el alineamiento de BMEI1416 el indicó que el codón *start* de *wzt* (ATG) estaba solapado en dos nucleótidos por el codón *stop* de *wzm* (TGA), y un 100 % de homología nucleotídica con Rev1 y también con los genes ortólogos publicados en la base de datos KEEG para las cepas *B. canis* ATCC 23365, *B. microti* CCM4915, *B. pinnipedialis* B2/94 y *B. ceti* TE 10759-12. Además, se observó un 99,7 % de similitud a nivel de nucleótidos y aminoácidos con el gen *wzt* de las cepas *B. suis* 1330 (BR0519), *B. ovis* ATCC 25840 (BOV_0523), *B. vulpis* (BF3285c1_0238), *B. abortus* S19 (BAbs19_I05080) y 2308 (BAB1_0542). En esta última cepa se detectó un reemplazo puntual de aa de Asp71Ala que, al menos aparentemente, permitió conservar la estructura de las proteínas del sistema Wzm (260 aa, 29,3 kDa)/Wzt (253 aa, 27,1 kDa), sin diferencias apreciables con la de *B. melitensis* 16M o Rev1 (Fig. 14).



Fig. 14. Conformación de las proteínas del sistema Wzm/Wzt en Rev1. Modelos teóricos de la estructura proteica de los siguientes componentes: A) estructura terciaria de Wzm; B) estructura terciaria de Wzt; C) estructura cuaternaria de Wzm-Wzt, modelizadas y coloreadas según los residuos aminoácidos con la herramienta SWISS-MODEL del servidor ExPASy (Schwede et al., 2003).

El genotipo de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ construidos se corroboró mediante PCR con las parejas de cebadores F9-*wzm*/R8-*wzm* o F6-*wzt*/R7-*wzt* que amplificaron, según la cepa, 141 pb en Δwzm , 336 pb en Δwzt o 783 pb y 759 pb en los genes *wzm* y *wzt* completos, respectivamente (Fig. 15A y 15B). Además, para poder identificar cada muta-

ción simple o doble y chequear la pureza de las cepas obtenidas en distintos estudios con una única PCR, se combinaron los cebadores *F7-wzm* y *R7-wzt*, con los que se obtuvieron los siguientes amplicones con cada cepa: 1.553 pb con Rev1 (u otra cepa parental o NM), 911 pb con Rev1 Δ *wzm*, 1.130 pb con Rev1 Δ *wzt* y 488 pb Rev1 Δ *wzm* Δ *wzt* (Fig. 15C). Estos tamaños reflejaron la delección del 82 % (642 de 783 pb) en la secuencia de *wzm*, del 55,7 % (423 de 759 pb) en la de *wzt* o del 69,3 % (1.065 de 1.538 pb) en la secuencia consecutiva *wzm-wzt*. Mediante secuenciación de los fragmentos amplificados con estos mismos cebadores y posterior alineamiento con la secuencia de la cepa parental, se comprobó que los mutantes simples Rev1 Δ *wzm* y Rev1 Δ *wzt* presentaban la delección de un único

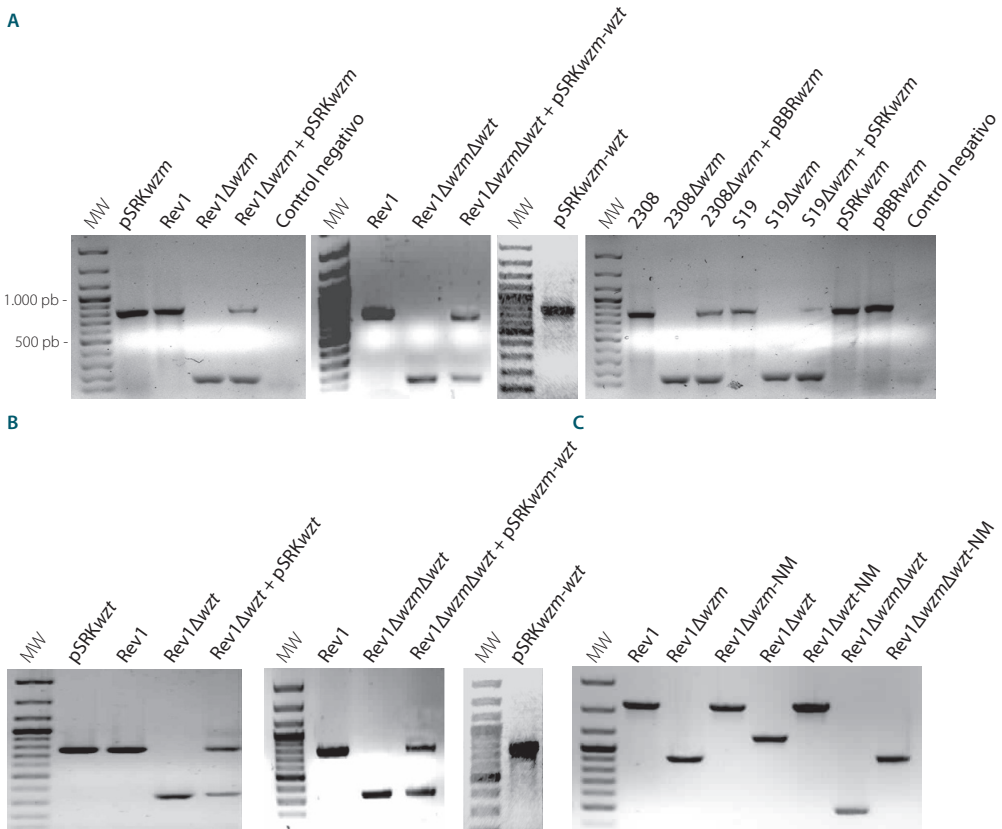


Fig. 15. Caracterización genotípica de los mutantes Δ wzm/ Δ wzt. SDS-PAGE en gel de agarosa al 1 % con los fragmentos de ADN amplificados por PCR con las parejas de cebadores siguientes: **A)** F9-*wzm*/R8-*wzm*; **B)** F6-*wzt*/R7-*wzt*; y **C)** F7-*wzm*/R7-*wzt*. En A y B, las bandas superiores corresponden a los genes *wzm* (783 pb) o *wzt* (759 pb) completos y las bandas inferiores, a los genes mutados Δ *wzm* (141 pb) o Δ *wzt* (336 pb). En C, las bandas corresponden a los genes *wzm-wzt* (1.553 pb), Δ *wzm-wzt* (911 pb), *wzm- Δ wzt* (1.130 pb) o Δ *wzm- Δ wzt* (488 pb). MW: marcador de pesos moleculares.

fragmento de nucleótidos dentro del gen mutado, mientras que el doble mutante reveló la delección de dos secuencias independientes, una en cada gen (Tabla 10).

2. En los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ se aumenta la transcripción de *wbkB* y *wbkC*, y en Δwzm se sobrexprea *wzt*

Los cebadores diseñados para analizar la regulación transcripcional de los distintos mutantes mostraron valores de eficiencia dentro del rango recomendado de $E = 0,9-1,1$, utilizando ADN de 16M como referencia (Fig. 16). Concretamente, los valores de E obtenidos para las distintas parejas de cebadores diseñadas para cada gen fueron: 0,92 para *wbkA* y *wbkC*; 0,93 para *wboB*; 0,94 para *wbkB*; 1,0 para *IF-1*, *gmd*, *per*, *wbkE*, *wbkF* y *wboA*; y 1,1 para *wzm*, *wzt* y *wbkD*.

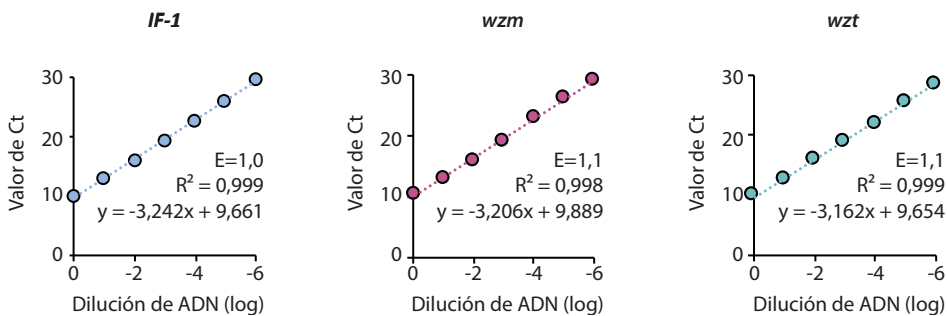


Fig. 16. Determinación de la eficiencia de cebadores de qPCR. Recta de regresión lineal de los valores de Ct obtenidos con diluciones decimales seriadas de ADN genómico (desde 5×10^{-2} hasta 5×10^{-8} μ g) de la cepa de referencia *B. melitensis* 16M, para el gen *IF-1* como control constitutivo y para los genes *wzm* y *wzt* representativos de otros implicados en la biosíntesis de O-PS y glucanos cíclicos. Dentro del área de cada gráfica se representa la fórmula de regresión, el coeficiente de correlación (R^2) y los valores de eficiencia de amplificación (E).

Cuando esta técnica se utilizó para estudiar la expresión relativa de los genes implicados en la síntesis de O-PS (i. e., *gmd*, *per*, *wbkA*, *wbkB*, *wbkC*, *wbkD*, *wbkE*, *wbkF*, *wboA* y *wboB*) y de los glucanos cíclicos (i. e., *cgs* y *cgt*), Rev1 mostró un incremento de la expresión de *gmd* y una disminución de *wbkA*, *wbkD*, *wbkE*, *wbkF*, *cgs* y *cgt*, con respecto a la cepa virulenta 16M (Fig. 17). Tomando como referencia Rev1, ninguno de sus derivados mostró reducción de la expresión de estos genes, pero sí se confirmó la ausencia de expresión del gen delecionado en cada mutante $\Delta wzm/\Delta wzt$, demostrando que la delección en uno de estos genes no impedía la expresión del otro. Además, los tres mutantes mostraron un incremento significativo ($p \leq 0,05$) de la expresión de *wbkB* y *wbkC*, que

Tabla 10. Secuenciación y alineamiento de los genes consecutivos *wzm-wzt* en la cepa Rev1 parental y sus mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ simples y doble

Cepa	Secuencia (5'→3')	N.º de pb
Rev1	GTGAGACGATTTCTGATGATATCGTATATGGCTAATGCTGGAAAGGTACGCCACTTCTGGTGGCACCTTTCAATGCTGATTTACGTGGGCGCTTCAGGCGGTCCCTCTTGGGAATATTA	120
Rev1 Δwzm	GTGAGACGATTTCTGATGATATCGTATATGGCTAATGCTGGAAAGGTACGCCACTTCTGGTGGCACCTTTCAATGCTGATTTACGTGGGCGCT-----	94
Rev1 Δwzt	GTGAGACGATTTCTGATGATATCGTATATGGCTAATGCTGGAAAGGTACGCCACTTCTGGTGGCACCTTTCAATGCTGATTTACGTGGGCGCTTCAGGCGGTCCCTCTTGGGAATATTA	120
Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$	GTGAGACGATTTCTGATGATATCGTATATGGCTAATGCTGGAAAGGTACGCCACTTCTGGTGGCACCTTTCAATGCTGATTTACGTGGGCGCT-----	94
Rev1	TGGGCAGTTATACAGCCACTAGCGCTCACGCTGCTACTGCTTTCTGGTTTTCTAAATGTTGAATCAAAGTATATCTGCATATGCCCCCTATATTCTATCTGGGATTATTATCTGGGAA	240
Rev1 Δwzm	TGGGCAGTTATACAGCCACTAGCGCTCACGCTGCTACTGCTTTCTGGTTTTCTAAATGTTGAATCAAAGTATATCTGCATATGCCCCCTATATTCTATCTGGGATTATTATCTGGGAA	95
Rev1 Δwzt	TGGGCAGTTATACAGCCACTAGCGCTCACGCTGCTACTGCTTTCTGGTTTTCTAAATGTTGAATCAAAGTATATCTGCATATGCCCCCTATATTCTATCTGGGATTATTATCTGGGAA	240
Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$	-----	95
Rev1	TACATATCATTACAGTGGTTGGTGGCTCAACAGCGCTTGTGCAAGCCGATGCATATATAAAGCAAACCGAAATCCTCTTGCAATTTACACGCTTAGGAACACTGTTTCTGGCTTGGTC	360
Rev1 Δwzm	TACATATCATTACAGTGGTTGGTGGCTCAACAGCGCTTGTGCAAGCCGATGCATATATAAAGCAAACCGAAATCCTCTTGCAATTTACACGCTTAGGAACACTGTTTCTGGCTTGGTC	95
Rev1 Δwzt	TACATATCATTACAGTGGTTGGTGGCTCAACAGCGCTTGTGCAAGCCGATGCATATATAAAGCAAACCGAAATCCTCTTGCAATTTACACGCTTAGGAACACTGTTTCTGGCTTGGTC	360
Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$	-----	95
Rev1	GTATTATCCGTAGCAAGTATCTCCCTATTCGGGTGGTACTTATCATGTTTCCTGAAAACCTTCTCGCTTTCATGTTAGCAATACCAACTTTGCTACCCATCCTTGCTTTGATAGTTTGG	480
Rev1 Δwzm	GTATTATCCGTAGCAAGTATCTCCCTATTCGGGTGGTACTTATCATGTTTCCTGAAAACCTTCTCGCTTTCATGTTAGCAATACCAACTTTGCTACCCATCCTTGCTTTGATAGTTTGG	95
Rev1 Δwzt	GTATTATCCGTAGCAAGTATCTCCCTATTCGGGTGGTACTTATCATGTTTCCTGAAAACCTTCTCGCTTTCATGTTAGCAATACCAACTTTGCTACCCATCCTTGCTTTGATAGTTTGG	480
Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$	-----	95
Rev1	CCGCTTGCCCAAACTCGTGGCTACATCGGCGCAAGATTTGAGACTGCCGAATGCTCTGGCGCTCGTGTACAGGCGAGCTTGGTTTGTTCGCCGGTCTATTTTAAAGAAATCGATGTTT	600
Rev1 Δwzm	CCGCTTGCCCAAACTCGTGGCTACATCGGCGCAAGATTTGAGACTGCCGAATGCTCTGGCGCTCGTGTACAGGCGAGCTTGGTTTGTTCGCCGGTCTATTTTAAAGAAATCGATGTTT	95
Rev1 Δwzt	CCGCTTGCCCAAACTCGTGGCTACATCGGCGCAAGATTTGAGACTGCCGAATGCTCTGGCGCTCGTGTACAGGCGAGCTTGGTTTGTTCGCCGGTCTATTTTAAAGAAATCGATGTTT	600
Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$	-----	95
Rev1	AGGCAGGGTGGATTGAATGCATTGTTGATTATAACCTATTTACCAGTGATGCAGATTCTAAGAGCCCTGTCTTTATGGGGAATGGCTACGGCTACCAATTACATTTGGTGCTTA	720
Rev1 Δwzm	AGGCAGGGTGGATTGAATGCATTGTTGATTATAACCTATTTACCAGTGATGCAGATTCTAAGAGCCCTGTCTTTATGGGGAATGGCTACGGCTACCAATTACATTTGGTGCTTA	95
Rev1 Δwzt	AGGCAGGGTGGATTGAATGCATTGTTGATTATAACCTATTTACCAGTGATGCAGATTCTAAGAGCCCTGTCTTTATGGGGAATGGCTACGGCTACCAATTACATTTGGTGCTTA	720
Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$	-----	95
Rev1	GGTGTGAGCCTCCTCTAACCTGCGTGGCAGTAGCTGTGGGGATGCGTGGGAGAAAGAGAGCCATTTTTTACCTATGATCCAGCCATCGATTACCTGTCAAATGTTTCATCTGCACCTACG	840
Rev1 Δwzm	-----TAACTGCGTGGCAGTAGCTGTGGGGATGCGTGGGAGAAAGAGAGCCATTTTTTACCTATGATCCAGCCATCGATTACCTGTCAAATGTTTCATCTGCACCTACG	198
Rev1 Δwzt	GGTGTGAGCCTCCTCTAACCTGCGTGGCAGTAGCTGTGGGGATGCGTGGGAGAAAGAGAGCCATTTTTTACCTATGATCCAGCCATCGATTACCTGTCAAATGTTTCATCTGCACCTACG	840
Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$	-----TAACTGCGTGGCAGTAGCTGTGGGGATGCGTGGGAGAAAGAGAGCCATTTTTTACCTATGATCCAGCCATCGATTACCTGTCAAATGTTTCATCTGCACCTACG	198
Rev1	CTGCATCAGCGTTCAAAGAAGCGCTCAGTCAAACCTTAGTAAACGCCCTTATTGAGTATGCGGCGCAGCGCAGGAGCAAACATTGAAGACATCCATGCCCTAAAGGGTATTTCTGTAGATA	960
Rev1 Δwzm	CTGCATCAGCGTTCAAAGAAGCGCTCAGTCAAACCTTAGTAAACGCCCTTATTGAGTATGCGGCGCAGCGCAGGAGCAAACATTGAAGACATCCATGCCCTAAAGGGTATTTCTGTAGATA	318
Rev1 Δwzt	CTGCATCAGCGTTCAAAGAAGCGCTCAGTCAAACCTTAGTAAACGCCCTTATTGAGTATGCGGCGCAGCGCAGGAGCAAACATTGAAGACATCCATGCCCTAAAGGGTATTTCTGTAGATA	960
Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$	CTGCATCAGCGTTCAAAGAAGCGCTCAGTCAAACCTTAGTAAACGCCCTTATTGAGTATGCGGCGCAGCGCAGGAGCAAACATTGAAGACATCCATGCCCTAAAGGGTATTTCTGTAGATA	318

Rev1	TAGCGCGGGGCGAACGCGTTGCCCTGATAGGTCACAACGGGGCTGGCAAAGTACGTTCTTGAAAACATAGCCGGTCTCTACCCATATCATCTGGGACATTAAGAGTGACGGGTACCG	1080
Rev1Δwzm	TAGCGCGGGGCGAACGCGTTGCCCTGATAGGTCACAACGGGGCTGGCAAAGTACGTTCTTGAAAACATAGCCGGTCTCTACCCATATCATCTGGGACATTAAGAGTGACGGGTACCG	438
Rev1Δwzt	TAGCGCGGGGCGAACGCGTTGCCCTGATAGGTCACA-----	997
Rev1ΔwzmΔwzt	TAGCGCGGGGCGAACGCGTTGCCCTGATAGGTCACA-----	355
Rev1	TAAGATCCCTGTTGATATTGGTCTTGGGTTTGAGCCTGATGCAACTGGCCGTGAGAATATTCCTTACCGTGGGTTGCTTCTCGGACTAACGCCACGTTTCATGCGAGAGATCGAGGATG	1200
Rev1Δwzm	TAAGATCCCTGTTGATATTGGTCTTGGGTTTGAGCCTGATGCAACTGGCCGTGAGAATATTCCTTACCGTGGGTTGCTTCTCGGACTAACGCCACGTTTCATGCGAGAGATCGAGGATG	558
Rev1Δwzt	-----	997
Rev1ΔwzmΔwzt	-----	355
Rev1	AGATCATCGAGTTCGCGGATCTCGGCGATTTATCGATTATCCAATCAAAACTTATTCTGCCGGCATGCAAGTTCGGCTCGCCTTCGCGATTTGACAGCAGTCGACGGCGACATACTCC	1320
Rev1Δwzm	AGATCATCGAGTTCGCGGATCTCGGCGATTTATCGATTATCCAATCAAAACTTATTCTGCCGGCATGCAAGTTCGGCTCGCCTTCGCGATTTGACAGCAGTCGACGGCGACATACTCC	678
Rev1Δwzt	-----	997
Rev1ΔwzmΔwzt	-----	355
Rev1	TTCTAGACGAAGTTATAGGTGCAGGTGATGCGGCATTGACTAAGGCGAAGGCCCGCATAATGAATATGGTCGAGAAGGCTGAGATAATGGTTCTAGCAAGCCATGACCTTGCGAACG	1440
Rev1Δwzm	TTCTAGACGAAGTTATAGGTGCAGGTGATGCGGCATTGACTAAGGCGAAGGCCCGCATAATGAATATGGTCGAGAAGGCTGAGATAATGGTTCTAGCAAGCCATGACCTTGCGAACG	798
Rev1Δwzt	-----CAAGCCATGACCTTGCGAACG	1017
Rev1ΔwzmΔwzt	-----CAAGCCATGACCTTGCGAACG	375
Rev1	TCCGTCAAGCTTTGCACACGAGCATTGGTTTTCAAAGCCGGCACAAATTCATTTGATGGCAGGGTAGAAGACGCGATTTCTTCTATAACTCGGGAAATGGGAGCTATAGCATGA	1553
Rev1Δwzm	TCCGTCAAGCTTTGCACACGAGCATTGGTTTTCAAAGCCGGCACAAATTCATTTGATGGCAGGGTAGAAGACGCGATTTCTTCTATAACTCGGGAAATGGGAGCTTAAACATGA	911
Rev1Δwzt	TCCGTCAAGCTTTGCACACGAGCATTGGTTTTCAAAGCCGGCACAAATTCATTTGATGGCAGGGTAGAAGACGCGATTTCTTCTATAACTCGGGAAATGGGAGCTATAGCATGA	1130
Rev1ΔwzmΔwzt	TCCGTCAAGCTTTGCACACGAGCATTGGTTTTCAAAGCCGGCACAAATTCATTTGATGGCAGGGTAGAAGACGCGATTTCTTCTATAACTCGGGAAATGGGAGCTATAGCATGA	488

Los genes *wzm-wzt* fueron secuenciados mediante el método de Sanger, a partir de los fragmentos de ADN amplificados con los cebadores *F7-wzm* y *R7-wzt* en cada una de las cepas indicadas. Los codones *start* (ATG) y *stop* (TGA) de cada gen y el solapamiento interfénico (ATGA) se indican subrayados.

fue más marcado en *Rev1Δwzm*. Curiosamente, este último mutante mostró a su vez una sobreexpresión muy marcada de *wzt*, no observada en el caso contrario, ya que *Rev1Δwzt* mantuvo los niveles de transcripción de *wzm* como los de su parental. El análisis detallado de otros mutantes Δwzm permitió determinar que la sobreexpresión de *wzt* también ocurría ($p \leq 0,05$) en *16MΔwzm* y *B. abortus 2308Δwzm* y *S19Δwzm*. Asimismo, comparativamente, *16MΔwzm* no sólo mostró un aumento en la transcripción de *wbkB* y *wbkC* con respecto a su parental *16M* (como en *Rev1Δwzm* vs. *Rev1*), sino que también lo hizo con la expresión de *gmd* (como *Rev1* vs. *16M*).

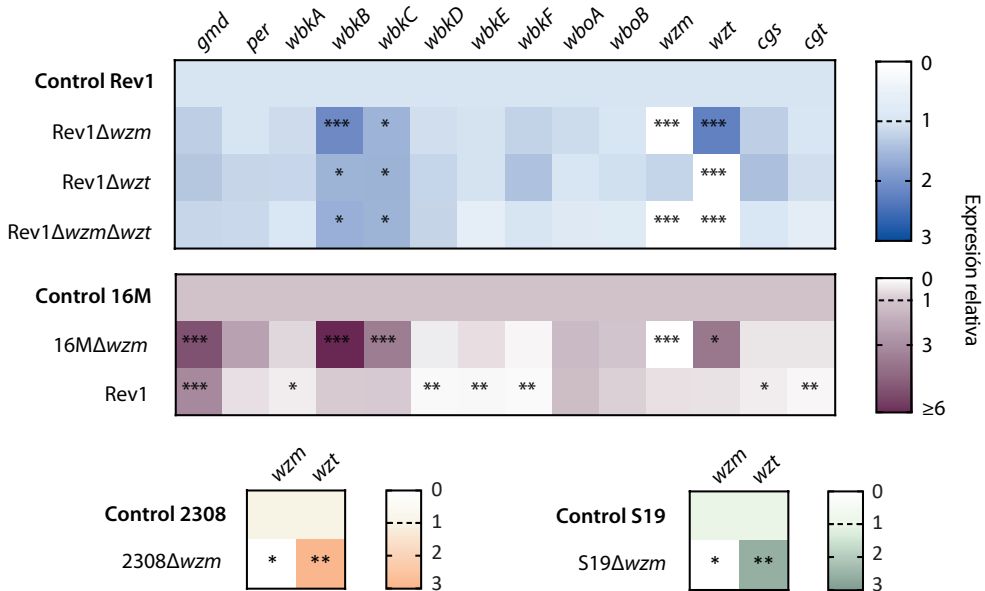


Fig. 17. Expresión relativa de genes relacionados con la biosíntesis de O-PS. Intensidad de la transcripción genética por RT-qPCR calculada por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$; la intensidad del color en las celdas representa la variación media de la transcripción vs. su control correspondiente (valor = 1; indicado con una línea punteada). Cada determinación se realizó 5 veces para *Rev1* y sus mutantes y 2 veces para el resto de cepas. Prueba LSD de Fisher: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$ vs. control en cada caso.

3. Los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ poseen el fenotipo esperado, con un R-LPS y O-PS en el citoplasma

Las pruebas estándar de tipificación de *Brucella* proporcionaron el resultado esperado en las reacciones catalasa, oxidasa y ureasa positivas, crecimiento normal en ausencia de suero en el medio de cultivo y en presencia de 10 % de CO_2 en la atmósfera de incubación (Tabla 11). Además, todos los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$, mostraron fenotipo rugoso en las pruebas de cristal violeta-oxalato y aglutinación con acriflavina; y reversión a fenotipo

liso en dichas pruebas, tras la complementación. La morfología colonial fue homogénea en todos los mutantes, alcanzando igual tamaño colonial que las cepas parentales, de 1-1,2 mm de diámetro para Rev1 o de hasta 2 mm para 2308 y S19 (Fig. 18).

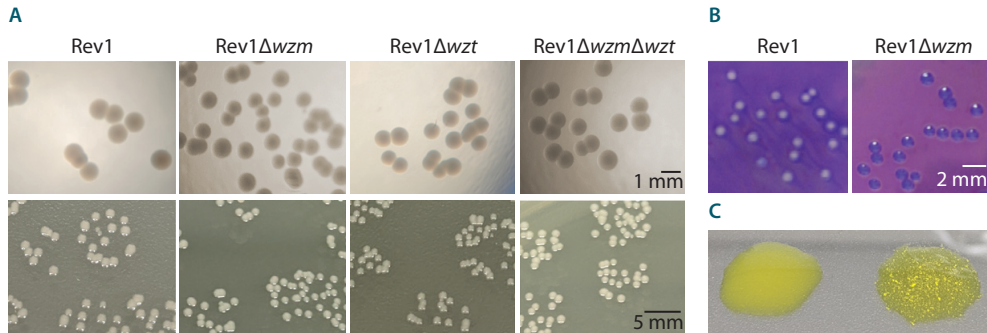


Fig. 18. Morfología colonial de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$. A) Aspecto colonial de Rev1 y sus mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ en placas de BAB, tras 5 días de incubación a 37 °C, observadas a simple vista (fila inferior) o en una lupa de iluminación tangencial (fila superior); B) tinción por la técnica de de cristal violeta-oxalato y C) aglutinación con acriflavina (izquierda: colonias lisas; derecha: rugosas).

En lo que respecta a la susceptibilidad a colorantes, el método clásico de siembra en estría mostró que todos los mutantes Δwzm eran como sus parentales, excepto los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$, que mostraron susceptibilidad total a Saf₁₀₀, en comparación con el normal crecimiento de Rev1 parental y Rev1-NM cuando la incubación se realizó en presencia de CO₂ (Tabla 11).

Tabla 11. Resultado de las pruebas para la tipificación de *Brucella*

Cepa	Actividad catalasa/oxidasa/ureasa	Aglutinación con acriflavina/cristal violeta-oxalato	Crecimiento en colorantes (µg/mL) y BAB-S con/sin CO ₂ al 10 %					
			Tionina			Fucsina		Safranina O
			10	20	40	10	20	100
Rev1	+/+/+	-/S	+/+	+/-	-/-	+/+	+/+	+/-
Rev1 Δwzm	+/+/+	+/R	+/+	+/-	-/-	+/+	+/+	-/-
Rev1 Δwzt	+/+/+	+/R	+/+	+/-	-/-	+/+	+/+	-/-
Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$	+/+/+	+/R	+/+	+/-	-/-	+/+	+/+	-/-
Rev1-NM	+/+/+	-/S	+/+	+/-	-/-	+/+	+/+	+/-
Rev1 Δwzm -NM	+/+/+	+/R	+/+	+/-	-/-	+/+	+/+	-/-
2308	+/+/+	-/S	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+
2308 Δwzm	+/+/+	+/R	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+
2308-NM	+/+/+	-/S	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+
S19	+/+/+	-/S	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+
S19 Δwzm	+/+/+	+/R	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+
S19-NM	+/+/+	-/S	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+

Los mutantes Δwzm de las distintas cepas de *Brucella* mostraron diferencias de tamaño colonial entre sí equivalentes a los existentes entre sus parentales, lo que se correspondió con un n.º de bacterias viables al final de la fase exponencial significativamente menor ($p \leq 0,01$) para Rev1 y Rev1 Δwzm ($\approx 2,7 \times 10^9$ UFC/mL) que para 16M, 2308, S19 y sus mutantes Δwzm ($6-9 \times 10^9$ UFC/mL) (Fig. 19). De hecho, el tiempo de generación (td) requerido por Rev1 y Rev1 Δwzm para duplicar el n.º de UFC fue de ≈ 5 h, mientras que el de 16M, 2308, S19 y sus mutantes Δwzm mostraron un valor de td de ≈ 4 h.

En general, los mutantes Δwzm conservaron la capacidad de multiplicación *in vitro* de sus parentales, mostrando curvas de crecimiento con las fases típicas de latencia, crecimiento exponencial y estacionaria, observándose un mayor enturbiamiento del medio con los mutantes Δwzm que con las cepas lisas parentales (Fig. 19).

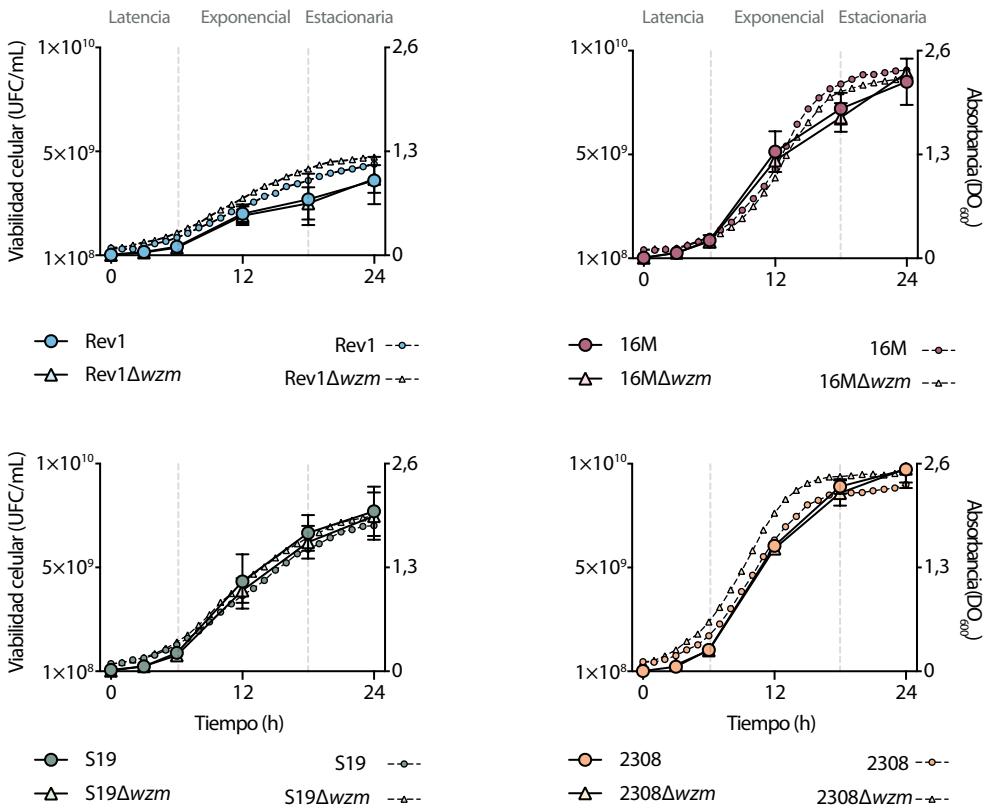


Fig. 19. Crecimiento *in vitro* de distintos mutantes Δwzm . Curvas de multiplicación de Rev1 Δwzm , 16M Δwzm , S19 Δwzm , 2308 Δwzm y sus parentales en TSB (37 °C, 150 r.p.m.), expresadas como el n.º de UFC/mL (media \pm SD; n = 2) determinado a 0, 3, 6, 12, 18 y 24 h post-incubación, y como valores de absorbancia (OD_{600}) medidos cada hora durante 24 h.

Mediante SDS-PAGE y revelado con tinción de plata alcalina modificada para LPS, y WB con anti-epítomos M del O-PS, se comprobó que los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ poseían un R-LPS con núcleo completo y O-PS citoplasmático, y que su complementación restauraba el S-LPS (Fig. 20A). Este WB mostró una banda entre 25 y 75 kDa en Rev1 y en las cepas complementadas, con menor intensidad y restringida a 35-48 kDa en sus mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$, y ausente en el control; análogamente, el WB con suero monoespecífico anti-A aportó el mismo resultado para *B. abortus* 2308, S19 y sus derivados Δwzm . Cuando se utilizaron extractos de LPS purificado a partir de la OM, el WB solamente detectó O-PS en la cepa lisa Rev1, a pesar de detectarse R-LPS por tinción de plata (control de extracción) (Fig. 20B).

La identificación del O-PS presente en las muestras de bacterias completas se amplió mediante WB con los mAb anti-C/Y 33H8 y 42D2 (Fig. 20C). Ambos mAb reaccionaron con Rev1, 16M y, con menor intensidad, con los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$, mostrando todos ellos la banda (parentales: 25-75 kDa; mutantes: 35-48 kDa) descrita con el suero anti-M, ausente en BmH38RmanBcore. Ambas cepas parentales Rev1 y 16M reaccionaron con mayor intensidad con 42D2 que con 33H8, incluso incrementando el tiempo de exposición o la concentración antigénica; sin embargo, con 33H8, Rev1 proporcionó más señal que 16M.

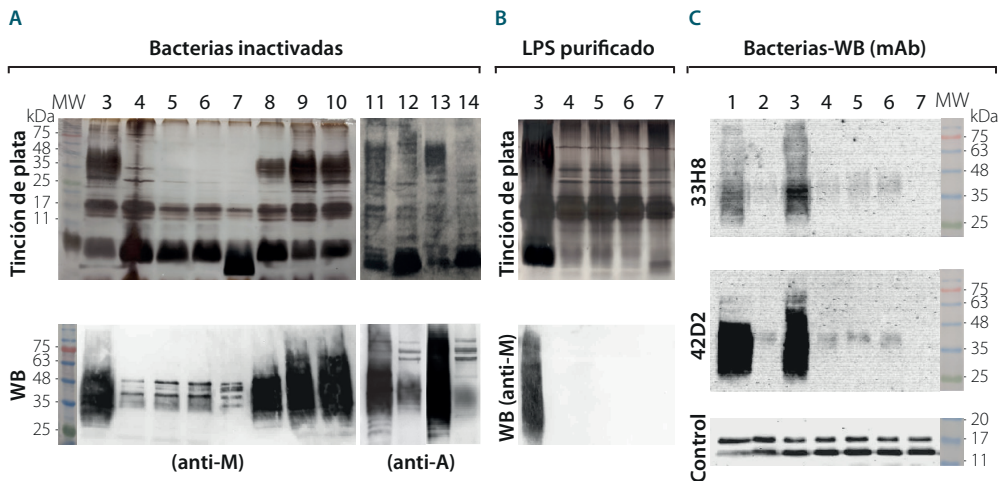


Fig. 20. Perfil de R-LPS con core completo y O-PS citoplasmático en los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$. A) Muestras de bacterias completas inactivadas con fenol o B) extractos de LPS purificado analizados con tinción de plata alcalina modificada (fila superior) o por WB con los sueros monoespecíficos policlonales anti-M o anti-A. C) Epítomos del O-PS en muestras de bacterias completas reconocidos por los mAb 33H8 (fila superior) o 42D2 (fila central), utilizando suero anti-BoPA como control de carga (fila inferior). MW: marcador de peso molecular; 1: 16M; 2: 16M Δwzm ; 3: Rev1; 4: Rev1 Δwzm ; 5: Rev1 Δwzt ; 6: Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$; 7: BmH38RmanB_{core}; 8: Rev1 Δwzm + pSRKwzm; 9: Rev1 Δwzt + pSRKwzt; 10: Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$ + pSRKwzm-wzt; 11: 2308; 12: 2308 Δwzm ; 13: S19; 14: S19 Δwzm .

La antigenicidad del O-PS de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ y sus parentales se estudió mediante WB con sueros ovinos anti-Rev1 Δwzm , anti-16M Δwzm , anti-Rev1, anti-H38 y anti-BoPA, incluyendo bacterias BoPA y *B. abortus* 2308 como controles de reactividad cruzada (Fig. 21). En general, Rev1 Δwzm , Rev1 Δwzt y Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$ exhibieron una reacción similar entre ellos frente a los distintos sueros, mostrando junto a 16M Δwzm una notable respuesta frente a los anticuerpos anti-O-PS (35-48 kDa) generados tras la inmunización de ovinos con Rev1 Δwzm , Rev1 y H38. Todos los sueros con anticuerpos anti-S/LPS y Δwzm mostraron gran afinidad por el O-PS de las bacterias lisas, tanto de *B. melitensis* (25-75 kDa) como de 2308 (25-48 kDa); el suero de BoPA (cepa carente de O-PS) permitió identificar distintas bandas diferentes al O-PS. Curiosamente, los anticuerpos inducidos por 16M Δwzm no reaccionaron con el O-PS de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$, a diferencia del suero de Rev1 Δwzm , y generaron menor reacción que los anticuerpos inducidos por Rev1 Δwzm , frente al O-PS de las cepas lisas.

Independientemente de las diferencias observadas frente al O-PS, el WB de todas las muestras incluyó un patrón de bandas con una señal uniforme en ≈ 16 kDa o 25 kDa revelada por todos los sueros y una banda adicional de ≈ 29 kDa existente únicamente en los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ y parcialmente cubierta por la intensa señal del O-PS en Rev1; esta banda se logró evidenciar más claramente utilizando los sueros anti-Rev1 Δwzm tratados térmicamente (Fig. 21, recuadro punteado).

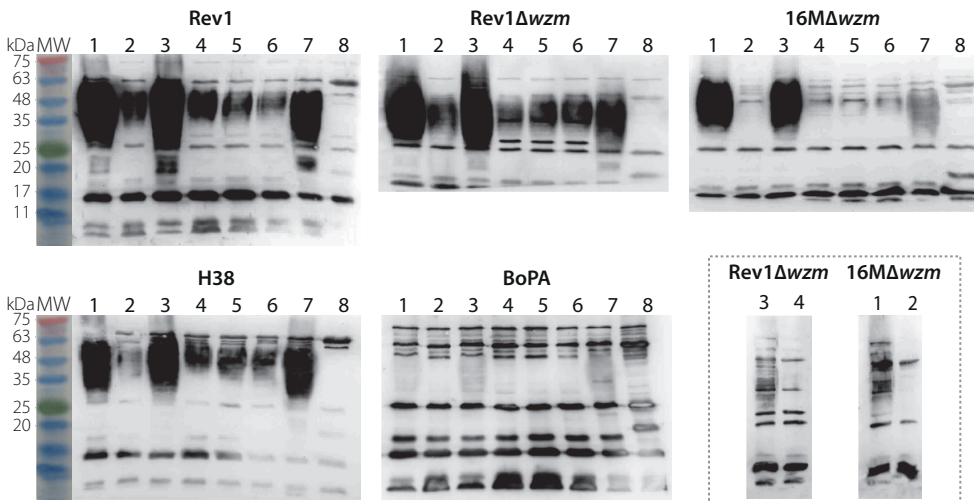


Fig. 21. Reconocimiento antigénico por sueros anti-*Brucella*. WB de distintas cepas (indicadas por calles) utilizando bacterias completas inactivadas con fenol, frente a sueros de ovinos inmunizados con Rev1 Δwzm , 16M Δwzm , Rev1, H38 o BoPA (indicados encima de cada gel); en el recuadro punteado se muestra la reactividad de los sueros anti-Rev1 Δwzm y anti-16M Δwzm tratados con calor. MW: marcador de peso molecular; 1: 16M; 2: 16M Δwzm ; 3: Rev1; 4: Rev1 Δwzm ; 5: Rev1 Δwzt ; 6: Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$; 7: 2308; 8: BoPA.

4. Los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ presentan una susceptibilidad incrementada a ciertos antibióticos

Al estudiar el efecto de las mutaciones $\Delta wzm/\Delta wzt$ sobre la susceptibilidad antibiótica, se observó una inhibición significativa ($p \leq 0,01$) del crecimiento de Rev1 Δwzm , Rev1 Δwzt y Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$ en presencia de PxB_{1,5}, Col₄ y Str_{2,5}, sin diferencias entre mutantes, a las dosis a las que la cepa parental mostró crecimiento como en BAB (Tabla 12).

Tabla 12. Crecimiento de los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ en presencia de antibióticos a los que Rev1 es resistente

Atmósfera de incubación	Medios de cultivo	UFC/0,1 mL (media \pm SD; n = 3) ¹			
		Rev1	Rev1 Δwzm	Rev1 Δwzt	Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$
Normal	BAB	416 \pm 54	247 \pm 20	263 \pm 37	216 \pm 39
	BAB-S	415 \pm 55	237 \pm 22	247 \pm 24	210 \pm 30
	BAB-PxB _{1,5}	386 \pm 34	1 \pm 1 ^a	1,3 \pm 1,5 ^a	1 \pm 1 ^a
	BAB-S-PxB _{1,5}	362 \pm 17	9 \pm 1 ^a	14 \pm 5 ^a	11 \pm 5 ^a
	BAB-Col ₄	358 \pm 30	161 \pm 21 ^a	152 \pm 6 ^a	116 \pm 3 ^a
	BAB-S-Col ₄	358 \pm 30	85 \pm 34 ^a	70 \pm 33 ^a	37 \pm 10 ^a
	BAB-Str _{2,5}	349 \pm 33	74 \pm 10 ^a	94 \pm 10 ^a	16 \pm 11 ^a
	BAB-S-Str _{2,5}	377 \pm 52	223 \pm 6	204 \pm 7	186 \pm 11
10 % de CO ₂	BAB	386 \pm 28	238 \pm 17	257 \pm 34	208 \pm 41
	BAB-S	390 \pm 38	228 \pm 36	239 \pm 8	198 \pm 16
	BAB-PxB _{1,5}	256 \pm 19 ^a	0 ^a	1 \pm 1 ^a	0 ^a
	BAB-S-PxB _{1,5}	256 \pm 19 ^a	0 ^a	1 \pm 1 ^a	0 ^a
	BAB-Col ₄	267 \pm 21 ^a	8 \pm 2 ^a	4 \pm 3 ^a	2 \pm 0 ^a
	BAB-S-Col ₄	314 \pm 50 ^a	1,3 \pm 1,5 ^a	3 \pm 1 ^a	3 \pm 1 ^a
	BAB-Str _{2,5}	309 \pm 67	170 \pm 22 ^a	171 \pm 10 ^a	167 \pm 13 ^a
	BAB-S-Str _{2,5}	264 \pm 21 ^a	104 \pm 7 ^a	104 \pm 9 ^a	87 \pm 8 ^a

¹ Siembra (0,1 mL, por triplicado) de suspensiones con $\approx 10^4$ UFC/mL en placas de BAB o BAB-S suplementadas con 1,5 μ g/mL de polimixina B (PxB_{1,5}), 4 μ g/mL de colistina (Col₄) o 2,5 μ g/mL de estreptomycin (Str_{2,5}) incubadas (37 °C, 8 días) en atmósfera normal o con un 10 % de CO₂. Prueba LSD de Fisher: ^a $p \leq 0,01$ vs. BAB en atmósfera normal.

Como ya se había observado en la tipificación convencional, la suplementación del medio con suero o de la atmósfera de incubación con un 10 % de CO₂ no afectaron al crecimiento de los mutantes con respecto a su control BAB; sin embargo, en presencia de los distintos antibióticos, ambos factores influyeron significativamente en el crecimiento de la cepa Rev1 parental y de sus tres mutantes. En particular, el efecto más notable fue que la adición de suero al medio incrementó la acción antimicrobiana de la Col₄ sobre los mutantes; esta inhibición fue aún más marcada, y también parcial para Rev1, cuando las incubaciones se realizaron en presencia de CO₂. Asimismo, la incubación con un 10 % de

CO₂ en cultivos con PxB_{1,5} resultó inhibitoria para Rev1; este efecto quedó parcialmente enmascarado para los mutantes, debido a su alta sensibilidad a este antibiótico (prácticamente ausencia de crecimiento) en todas las condiciones de cultivo. De hecho, los valores de CMI/CMB₅₀/CMB₉₀ de PxB fueron, respectivamente, de 5,8/11,5/11,5 mg/mL y de 11,5/23/46,5 mg/mL para los mutantes y Rev1. Por el contrario, la incorporación de suero en el medio o incubación en atmósfera con CO₂ disminuyó la acción de la Str_{2,5} frente a los mutantes, permitiendo recuentos más elevados de los mismos. Sin embargo, la utilización conjunta de suero y CO₂ con Str_{2,5} tuvo un efecto inhibitorio tanto con los mutantes como con Rev1.

Por otro lado, Rev1Δwzm, Rev1Δwzt y Rev1ΔwzmΔwzt exhibieron igual o mayor susceptibilidad que Rev1 a los antibióticos utilizados en el tratamiento de la brucelosis humana. En el estudio de cribado por el método de la CMI/CMB (Tabla 13), se observó que los tres mutantes eran más susceptibles que su parental frente a la rifampicina y estreptomycin, siendo la diferencia más marcada con este último antibiótico (3,8 μg/mL para Rev1Δwzm vs. 15 μg/mL para Rev1), sin evidenciar efecto sinérgico con la doxiciclina (Fig. 22A). La gentamicina no mostró diferencias entre parental y mutantes, pero la asociación Dx + Gm mostró menores valores de FIC para el mutante (FIC = 1,5) que para Rev1 (FIC = 2), aunque ambos indicaron un efecto indiferente (no sinérgico).

Tabla 13. Acción individual o combinada sobre los mutantes Rev1 Δwzm/Δwzt de los antibióticos de elección para tratamiento de la brucelosis humana

Cepa	CMI/ CMB ₅₀ /CMB ₉₀ (μg/mL) ¹				FIC ²		
	Dx	Rf	Gm	Str	Dx + Rf	Dx + Gm	Dx + Str
Rev1	0,025/0,05/0,1	0,5/1,0/1,0	0,25/0,25/0,25	15/15/15	2,0	2,0	2,0
Rev1Δwzm	0,025/0,05/0,1	0,25/1,0/1,0	0,25/0,25/0,25	3,8/3,8/7,5	2,0	1,5	2,0
Rev1Δwzt	0,025/0,05/0,1	0,25/1,0/1,0	0,25/0,25/0,25	3,8/3,8/7,5			
Rev1ΔwzmΔwzt	0,025/0,05/0,1	0,25/1,0/1,0	0,25/0,25/0,25	3,8/3,8/7,5		ND	
<i>E. coli</i> K12	1,6/1,6/3,2	>16/>16/>16	0,25/0,50/0,50	15/15/>15			

¹ Valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida para el 50 % (CMB₅₀) o el 90 % (CMB₉₀) de las bacterias, a partir de cultivos con $\approx 1,5 \times 10^6$ UFC/mL en Müller-Hinton expuestos a diluciones seriadas 1 : 2 de doxiciclina (Dx), rifampicina (Rf), gentamicina (Gm) y estreptomycin (Str). ² Índice de inhibición combinada (FIC) = 1,1-2,0 (efecto indiferente). ND: no determinado.

Para profundizar en las diferencias de susceptibilidad frente a la estreptomycin, se estudió la susceptibilidad de los tres mutantes a los distintos antibióticos y sus combinaciones, utilizando el método de siembra en placas de BAB suplementado con los mismos (Fig. 22B). Con ello, se evidenció que los tres mutantes eran más susceptibles que Rev1 no sólo a estreptomycin y rifampicina, sino también a gentamicina, y que las combi-

naciones Dx + Gm y Dx + Str reducían significativamente ($p \leq 0,001$) la supervivencia de los mutantes vs. Rev1parental, una inhibición que fue particularmente marcada para Dx + Str. La combinación Dx + Rf fue altamente efectiva tanto para los mutantes como para su parental Rev1.

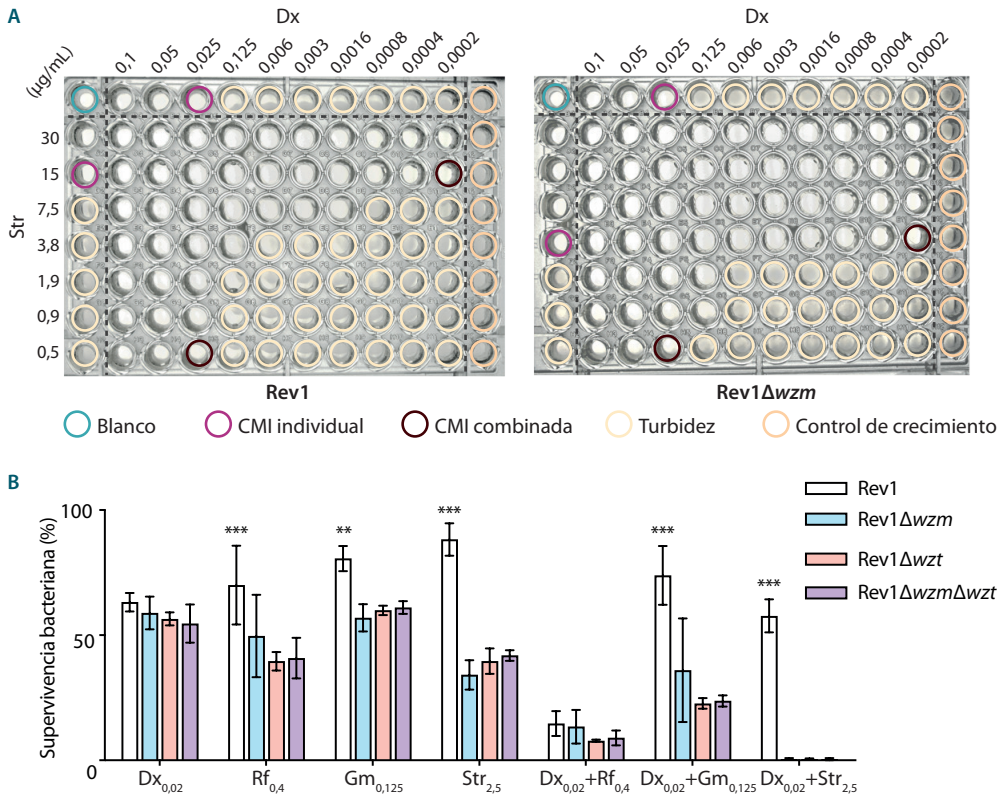


Fig. 22. Susceptibilidad de Rev1 Δwzm/Δwzt a los antibióticos de elección para el tratamiento de la brucelosis humana. A) Ensayo de actividad antibiótica combinada por microdilución en placa con distintas dosis (μg/mL) de Dx y Str frente a Rev1 o Rev1Δwzm. **B)** Supervivencia bacteriana (%) tras sembrar 10⁴ UFC/mL (0,1 mL, por triplicado) en placas de BAB con los distintos antibiótico, a las concentraciones indicadas (μg/mL). El resultado se expresa como la media ± SD (n = 5 para Rev1 y Rev1Δwzm; n = 3 para Rev1Δwzt y Rev1ΔwzmΔwzt); prueba LSD de Fisher: *** $p \leq 0,001$.

5. La envuelta celular sufre cambios pleiotrópicos debido al bloqueo del transporte de O-PS

Debido a que la biosíntesis de LPS está acoplada a la de otros componentes bacterianos involucrados en la integridad de la envuelta celular (Morè et al., 2019), en los mutantes Rev1 Δwzm/Δwzt se identificaron modificaciones en propiedades relacionadas con la estructura de la OM y pared celular.

5.1. Indicadores de configuración de OM: susceptibilidad a safranina O, autoaglutinación, carga de superficie, hidrofobicidad, formación de *biofilm* y producción de EPS

En vista de la total inhibición de los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ vs. Rev1 observada durante las pruebas de tipificación convencional, mediante siembra en estría en BAB-S-Saf₁₀₀ (Tabla 11), se procedió a cuantificar la susceptibilidad a dicho catión monovalente en placas de BAB-S-Saf₅₀ incubadas con y sin 10 % de CO₂ (Fig. 23A). En ausencia de este suplemento de CO₂, todas las cepas sufrieron una drástica inhibición, detectándose recuentos contables en suspensiones con $\approx 10^7$ UFC/mL; sin embargo, la incubación en atmósfera con un 10 % de CO₂ permitió una supervivencia bacteriana significativamente ($p \leq 0,001$) mayor en Rev1 que en los mutantes, los cuales alcanzaron apenas un 6 % de supervivencia. El mutante rugoso BmH38RmanB_{core} utilizado como control destacó por su supervivencia en ambas condiciones de incubación, superior a la de Rev1 incubada en atmósfera normal.

La capacidad de autoaglutinación ha sido ampliamente (pero no sólo) atribuida al fenotipo rugoso. De acuerdo con esto, dicha propiedad fue muy marcada en todos los mutantes de *B. melitensis* y *B. abortus*, en contraste con la estabilidad mantenida en el tiempo de las cepas lisas (Fig. 23B).

La medición del tamaño de partícula indicó que éste era superior ($p \leq 0,01$) en los mutantes *B. melitensis* $\Delta wzm/\Delta wzt$ que en las parentales (Fig. 23C). Además, la medición en el mismo equipo del potencial Z con adición gradual de poli-L-lisina reveló que todos los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ poseían una carga de superficie hasta casi seis veces más positiva que la de las cepas lisas, que mantuvieron la carga estable entre -5 mV y +10 mV (Fig. 23C). De acuerdo con este resultado, los mutantes mostraron un índice de hidrofobicidad similar entre ellos y significativamente superior ($p \leq 0,001$) al de las cepas parentales (Fig. 23D).

La tinción con cristal violeta evidenció una adhesión significativa ($p \leq 0,01$) del colorante a la matriz producida por los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ que se hallaba fijada a las superficies de cristal o poliestireno, durante 3 semanas de incubación, identificándose a simple vista un anillo en la interfase líquido-aire; este resultado contrastó con el de las cepas Rev1, 16M, S19 y 2308 (Fig. 23E). La presencia de bacterias viables en esta matriz se comprobó mediante siembra en BAB de hisopos impregnados en la misma.

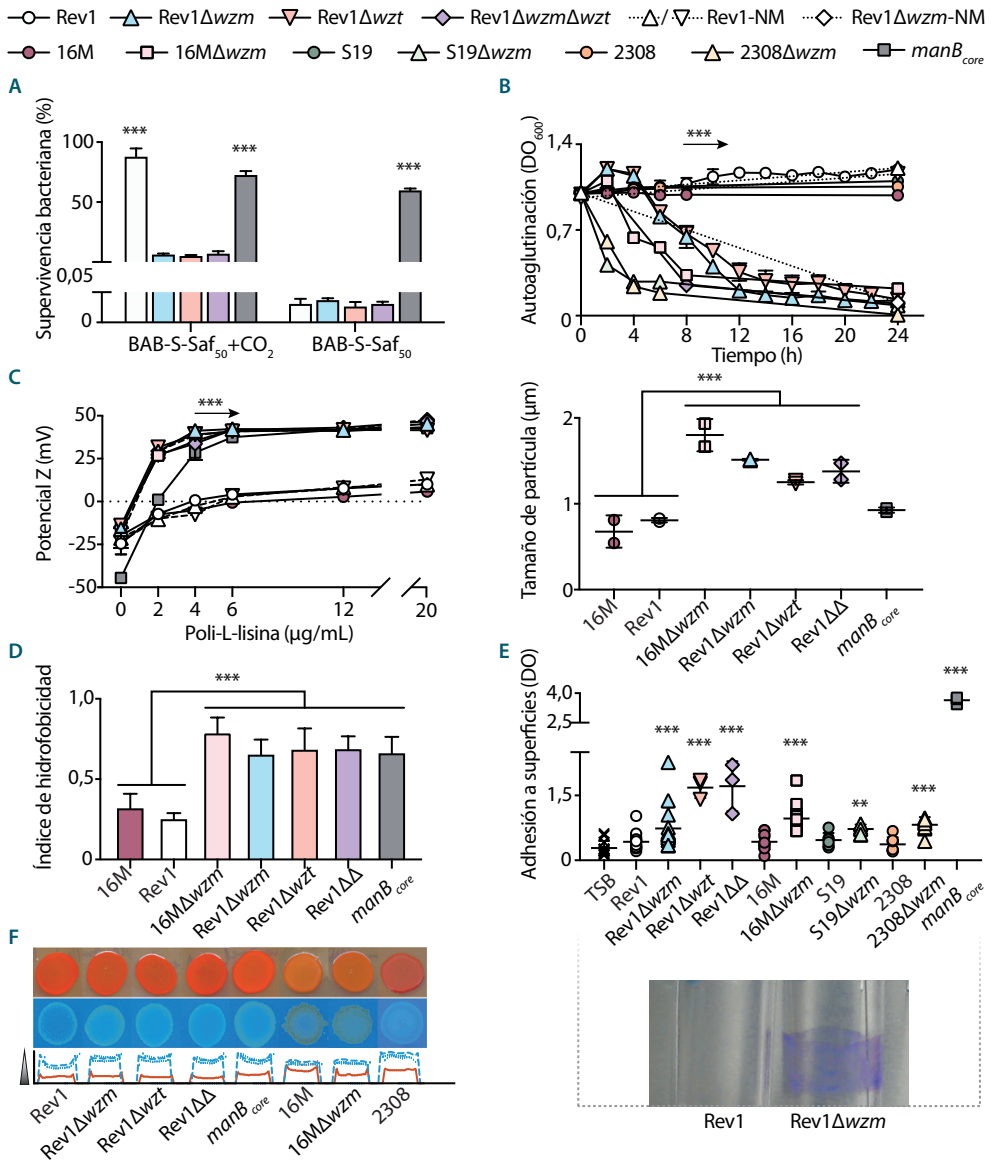


Fig. 23. Propiedades de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ asociadas a la OM. A) Supervivencia bacteriana (%) en placas de BAB-S-Saf₅₀ sembradas con 10^4 UFC/mL (0,1 mL, por triplicado) e incubadas en atmósfera normal o con un 10 % de CO₂ (media \pm SD; n = 3). B) Autoaglutinación en TSB, determinada por valores de DO₆₀₀ (media \pm SD; n = 2) a los intervalos seleccionados. C) Medidas de la carga de superficie mediante potencial Z (panel izdo.) en ausencia (n = 4) o presencia (n = 2) de concentraciones crecientes de poli-L-lisina; y del tamaño de partícula (panel dcho.; n = 2), ambas en un equipo Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical). D) Índice de hidrofobicidad (media \pm SD; n = 3) por exclusión bacteriana de una solución acuosa a otra orgánica. E) Adhesión a superficies en tubos de vidrio (imagen inferior) o en placas de poliestireno (gráfica superior) determinada por DO₆₀₀ tras tinción con cristal violeta (n = 3-16). F) Análisis del EPS por intensidad de Rojo Congo (fila superior y línea roja en fila inferior) o calcoflúor (fila intermedia y línea azul en fila inferior). Prueba LSD de Fisher: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$ vs. el resto de los grupos (paneles A, C dcha. y D), entre cepas lisas y rugosas (paneles B y C izda.), o vs. el control TSB (panel E).

El EPS producido por los tres mutantes derivados de Rev1 mostró afinidad moderada por el Rojo Congo y calcoflúor, generando en este último un nivel de fluorescencia similar en los tres mutantes (Fig. 23F). Asimismo, las dos tinciones se unieron muy débilmente a 16M y 16M Δ wzm, sin diferencias entre ambas cepas, mientras que *B. abortus* 2308 mostró una gran afinidad por el Rojo Congo y una incorporación del calcoflúor intermedia entre la de Rev1 y 16M.

La observación directa con tinción negativa por TEM (Fig. 24A) permitió identificar el EPS alrededor de la superficie bacteriana, tanto en la cepa Rev1 parental como en sus mutantes. El aspecto de este componente extracelular fue como una estructura globular,

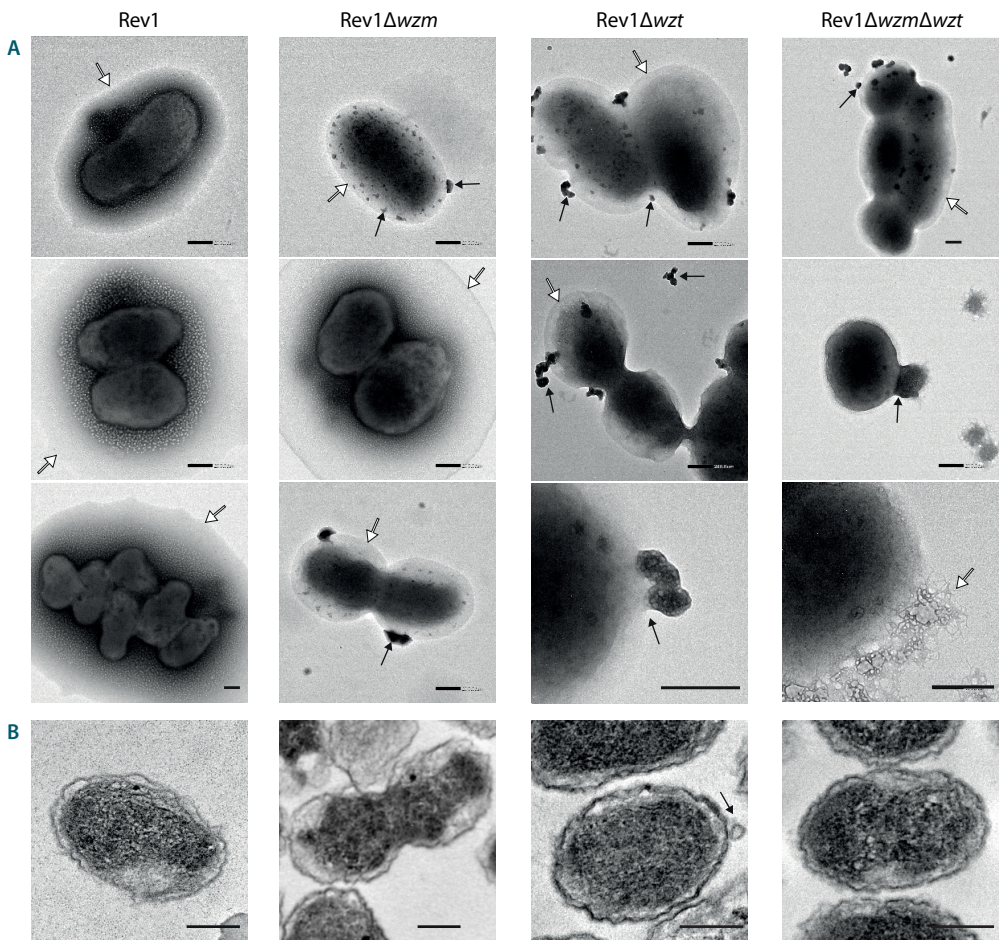


Fig. 24. Morfología de los mutantes Rev1 Δ wzm/ Δ wzt en TEM. Imágenes de estructuras bacterianas mostrando EPS (flechas blancas) y OMV (flechas negras), mediante: A) observación directa tras tinción negativa con acetato de uranilo; o B) previa inclusión en resina y corte por ultramicrotomía. Barras de escala = 200 nm.

más o menos amplia, de bajo contraste rodeando perfectamente cada bacteria aislada o en división, o como un entramado filamentosos, en un estado colapsado. Además, esta técnica reveló la presencia de vesículas de membrana externa (OMV) o *blebs* en los mutantes, como numerosas protuberancias desprendiéndose de la superficie o ya expulsadas de la OM, sin alterar su integridad. Por el contrario, en Rev1 no se identificó ninguna OMV a lo largo del barrido de la muestra.

En las imágenes adquiridas tras fijación con OsO₄ para cortes en resina (Fig. 24B) también se detectó la formación de OMV en los mutantes, así como procesos de división celular, sin advertirse diferencias con respecto a Rev1 a nivel ultraestructural. No obstante, esta técnica causó una alteración generalizada de la morfología celular, con irregularidades en la superficie bacteriana.

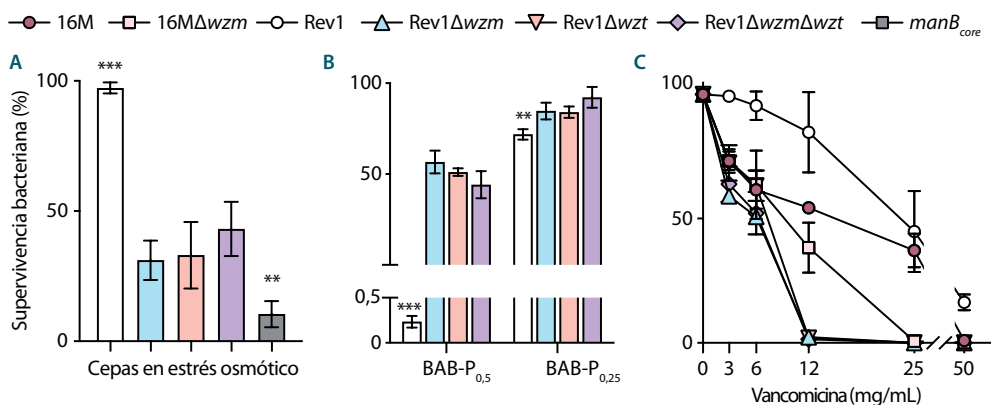
5.2. Remodelación de pared celular: susceptibilidad al estrés osmótico, respuesta a antibióticos β- y no β-lactámicos y análisis del PG

La resistencia que la célula procariota ofrece ante distintos tipos de estrés osmótico es un reflejo de la consistencia y flexibilidad de su OM y pared celular (Rojas et al., 2018). En este sentido, se observó una disminución progresiva de la viabilidad bacteriana bajo presión hiperosmótica iónica con NaCl al 0,5 M, detectándose a las 48 h una supervivencia bacteriana total en Rev1, <50 % en sus mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ y del 10 % en el control BmH38R*manB*_{core} (Fig. 25A). Sin embargo, estas cepas se multiplicaron con normalidad en condiciones de estrés hiperosmótico no iónico en TSB suplementado con sacarosa a 0,34 M o de estrés hiposmótico con TSB diluido en agua, mostrando recuentos muy superiores a los de partida (resultados no mostrados).

La penicilina G, al igual que el resto de β-lactámicos, ejerce su acción antimicrobiana sobre una familia de transpeptidasas denominadas proteínas de unión a penicilinas o PBP (del inglés, *penicillin-binding proteins*), las cuales son decisivas en la conformación de la pared bacteriana. Dada la analogía de estos antibióticos con el dipéptido terminal del PG y sustrato de las PBP D-Ala-D-Ala, estas enzimas ven bloqueado su centro activo y, por ende, interrumpida su actividad de entrecruzamiento del polímero (Kohanski et al., 2010). La susceptibilidad intrínseca de Rev1 frente a 5 UI/mL de penicilina G en medio sólido (Alton et al., 1988) se mantuvo en los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$, mostrando todos ellos inhibición total de crecimiento en BAB-P₅ incluso en la suspensión con 10⁹ UFC/mL. El uso de concentraciones de penicilina G 10 y 20 veces menores permitió cuantificar esta

inhibición, observando mayor susceptibilidad de Rev1 que de los mutantes en BAB- $P_{0,5}$ ($p \leq 0,001$) y algo menos marcada ($p \leq 0,01$) en BAB- $P_{2,5}$ (Fig. 25B). Mientras que la incorporación de suero causó un incremento en todos los recuentos, y la incubación con CO_2 aumentó los de Rev1 y redujo los de los mutantes (no mostrado), en ausencia de estos factores se registró un porcentaje de supervivencia de los mutantes significativamente superior al de la cepa parental, con una diferencia especialmente marcada ($p \leq 0,001$) a la concentración intermedia de 0,5 UI/mL (Fig. 25B). Este resultado se reprodujo en medio líquido mediante la técnica de microdilución, en la cual, aunque el valor de la CMI resultó igual para Rev1 y sus derivados (0,42 UI/mL), los mutantes resultaron más resistentes que su parental frente a la acción bactericida ($CMB_{50/90} = 0,84$ vs. 0,42 UI/mL para Rev1).

Por otro lado, la vancomicina es un antibiótico no β -lactámico que bloquea la síntesis de PG desde la etapa inicial al unirse al precursor D-Ala-D-Ala (Kohanski et al., 2010), Los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ mostraron mayor susceptibilidad que su parental Rev1 a este antibiótico, desde la menor concentración analizada (3,1 mg/mL), con pérdida total de su viabilidad a 12,5 mg/mL; en comparación, Rev1 mostró mayor resistencia a todas las concentraciones de vancomicina analizadas, con una reducción paulatina de la supervivencia hasta los 50 mg/mL. Este mismo efecto se produjo análogamente en $16\Delta wzm$ vs. $16M$, mostrando mayor inhibición el mutante que su parental, la cual, a su vez, resultó más sensible que Rev1 a todas las concentraciones, excepto a 25 mg/mL (Fig. 25C).



El estudio cuantitativo y cualitativo de PG mediante UPLC-MS (Tabla 14 y Fig. 26) reveló menor abundancia relativa de PG en los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ que en las cepas lisas. De hecho, los tres mutantes de Rev1 presentaron de media una reducción de un 12 % menos de PG total que su parental, diferencia que fue aun más pronunciada (del 30 %) entre el mutante 16M Δwzm y su parental.

En lo que respecta a la composición, la estructura básica del bloque de PG en *B. melitensis* fue similar al de otras bacterias (Irazoki et al., 2019), estando constituido por unidades repetidas de *N*-acetilglucosamina (NAcGlc) unida a ácido *N*-acetilmurámico (NAcMur) por una cadena peptídica de L-Ala-D-Glu-mDAP-D-Ala-D-Ala. Adicionalmente, se detectó la sustitución del aminoácido Ala en cuarta posición por Gly, en un pequeño y variable porcentaje de muropéptidos; este reemplazo con Gly fue más frecuente en las parentales que en los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$, mostrando además Rev1 un aumento significativo ($p \leq 0,05$) de más del doble de Gly que 16M. Esta relación de incremento de muropéptidos con Gly se tradujo en una disminución de la abundancia relativa de los muropéptidos sin dicha sustitución, en las distintas cepas analizadas.

La longitud del entramado de PG se mantuvo constante en Rev1, 16M y sus mutantes, ya que no hubo diferencias significativas en los muropéptidos con 1,6-anhidroNAcMur, residuo terminal con un enlace intramolecular que se localiza en el extremo reductor (Vollmer y Bertsche, 2008). Dado que estos grupos representaron un ≈ 10 % del total, se calculó una composición media de en torno a 10 unidades disacáridicas NAcGlc-NAcMur para estas cepas de *B. melitensis*.

La conformación del PG se caracteriza típicamente por el entrecruzamiento de los muropéptidos a través de sus cadenas peptídicas con otras adyacentes, para formar así complejos macromoleculares de distinto grado, previo acortamiento de las cadenas por la actividad DD-carboxipeptidasa de ciertas PBP (Mueller y Levin, 2020). A tal efecto, se identificaron tri- y tetra-péptidos, siendo los últimos predominantes en forma monomérica (M4) no entrecruzada y, en su mayoría, con unión dimérica (D44). De hecho, los dímeros aparecieron de forma prevalente representando alrededor de la mitad del total de PG, en comparación con el 20 %-25 % encontrado para monómeros y trímeros, y el 1-2 % de tetrámeros. En todos los casos, la abundancia relativa de los mono-, di-, tri- y tetrámeros no presentó diferencias significativas entre 16M, Rev1 y sus mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$, indicando que la malla que compone la estructura multicapa del sáculo de PG estaba conservada en estas cepas.

En cuanto al tipo de entrecruzamiento, los mutantes mostraron una menor transpeptidación L,D que sus parentales, observándose diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre $16M\Delta wzm$ y $16M$, y la misma tendencia para los mutantes $Rev1 \Delta wzm/\Delta wzm$ con respecto a su parental; a su vez, $Rev1$ exhibió mayor ($p \leq 0,05$) L,D-transpeptidación que $16M$. Los cambios descritos en el entrecruzamiento realizado por L,D-transpeptidasas (Ldt) se reflejaron en el porcentaje de entrecruzamiento total, que varió entre un 66 % y un 75 %. Mientras que las enzimas Ldt desempeñan la unión por el mDAP en tercera posición de dos tetrapéptidos en sendas isoformas L y D, con pérdida del cuarto aminoácido en el primero de ellos, las PBP catalizan el enlace entre un penta- y tetra-péptido por su cuarto y tercer aminoácido en isoforma D, con pérdida del quinto aminoácido (Vassen, 2018). En este sentido, no se observaron diferencias significativas en la cantidad relativa total de D,D-transpeptidación entre las distintas cepas de *B. melitensis* analizadas. Sin embargo, este tipo de entrecruzamiento fue ligeramente superior en $16M\Delta wzm$ que en $16M$, con una presencia de D44 significativamente ($p \leq 0,05$) superior en este mutante. Además, los complejos T443 y T444 con unión de tetrapéptidos fueron más abundantes ($p \leq 0,05$) en $16M$ que en $Rev1$. Estas diferencias, aunque menores, podrían sugerir que la limitación de actividad Ldt observada en $16M\Delta wzm$ vs. $16M$ y en $16M$ vs. $Rev1$ estaría compensada en cada caso por un aumento de la actividad de las PBP.

Tabla 14. Cantidad y composición relativas de PG en *B. melitensis* $Rev1$, $16M$ y sus derivados $\Delta wzm/\Delta wzt$

Parámetro	Abundancia relativa (%) ¹					
	16M	16M Δwzm	Rev1	Rev1 Δwzm	Rev1 Δwzt	Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$
Cantidad de PG	100 \pm 7,2	70 \pm 9,9 ^a	104 \pm 13,1	89,7 \pm 9,3	96,5 \pm 9,2	87,3 \pm 3,5
Monómeros	23,4 \pm 2,9	25,8 \pm 1,6	20,5 \pm 2,0	21,4 \pm 1,3	23,6 \pm 2,3	20,7 \pm 3,7
Dímeros	47,9 \pm 3,2	46,1 \pm 2,0	51,5 \pm 1,8	49,9 \pm 1,1	49,3 \pm 1,9	50,4 \pm 2,7
Trímeros	25,2 \pm 1,6	23,7 \pm 0,7	22,7 \pm 1,0	23,6 \pm 0,3	22,1 \pm 0,3	23,4 \pm 1,0
Tetrámeros	1,6 \pm 0,3	1,6 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1	1,1 \pm 0,2	1,6 \pm 0,2
Entrecruzamiento total	68,5 \pm 2,5	67,9 \pm 1,5	72,6 \pm 1,8	71,3 \pm 1,3	69,5 \pm 2,0	71,6 \pm 3,3
Transpeptidación L,D	17,9 \pm 1,0	14,5 \pm 0,6 ^a	22,4 \pm 0,8 ^a	21,1 \pm 0,7 ^a	20,9 \pm 0,3	20,8 \pm 0,5
Transpeptidación D,D	50,6 \pm 1,8	53,3 \pm 0,9	50,2 \pm 1,5	50,2 \pm 1,0	48,6 \pm 2,3	50,8 \pm 2,9
Incorporación de Gly	5,7 \pm 0,5	4,5 \pm 0,02	12,7 \pm 0,6 ^a	10,7 \pm 0,2 ^a	10,5 \pm 0,2 ^a	10,7 \pm 0,8 ^a

¹ Cantidad relativa (media \pm SD; n = 3) de cada compuesto/parámetro en cada cepa, determinada, a partir de tres cultivos/cepa ($DO_{600} = 1$) analizados por UPLC-MS. Se normalizó la cantidad total de PG vs. la media del control $16M$ y se cuantificó el área de cada pico de los cromatogramas; prueba LSD de Fisher: ^a $p \leq 0,05$ con variación $>10\%$ vs. $16M$.

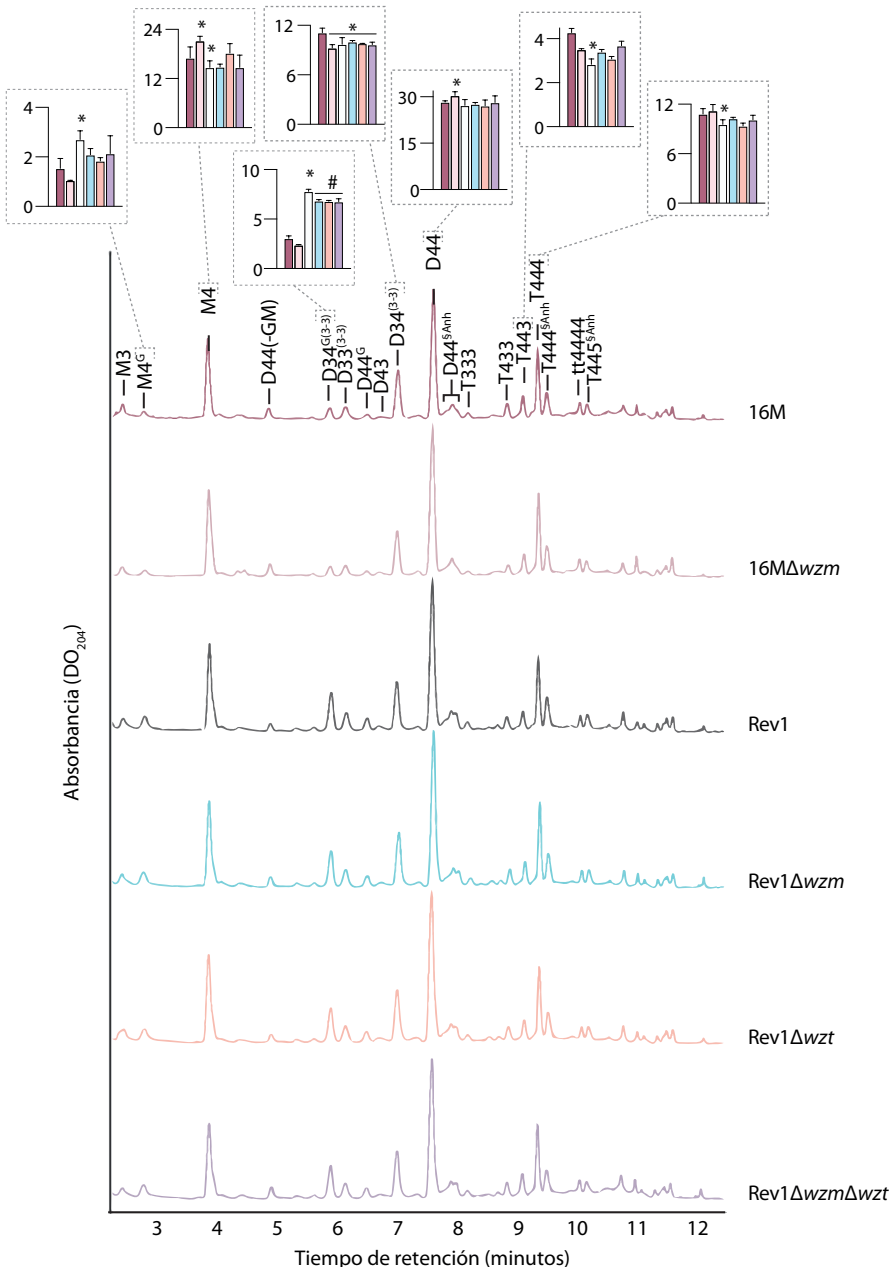


Fig. 26. Análisis de PG en UPLC-MS. Cromatogramas representativos para cada cepa, en los que se indican los picos de absorbancia a DO_{204} de las muestras analizadas a distintos tiempos de retención; dichos picos corresponden a los muropéptidos que se nombran con una letra (M: monómero, D: dímero, T: trímero o tt: tetrámero) que indica el tipo de entrecruzamiento o ausencia de él entre cadenas peptídicas, seguida del n.º de aa en las cadenas (5: pentapéptido, 4: tetrapéptido o 3: tripéptido), y existencia de modificaciones tales como ^G: incorporación de Gly, ³⁻³: enlace por enzimas Ldt, (-GM): pérdida de NAcGlc y NAcMur, ^{Anh}: residuo terminal 1,6-anhidroNAcMur y ^S: modificación no determinada. Los picos sin etiquetar corresponden a muropéptidos no definidos. En los gráficos de barras se muestran los resultados de abundancia relativa (%; media \pm SD; n = 3) de todos los muropéptidos que proporcionaron diferencias significativas según la prueba LSD de Fisher: * $p \leq 0,05$ vs. 16M o # $p \leq 0,05$ vs. Rev1 con variación >10 %.

6. Actividad de los factores solubles de la respuesta inmune frente a los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$

En el plasma sanguíneo se encuentran factores solubles del sistema inmune de gran relevancia tanto para la respuesta innata como para la adaptativa. Por ello, el estudio *in vitro* de la resistencia bacteriana ante péptidos antimicrobianos y el sistema del complemento, así como de la generación de anticuerpos con actividad antimicrobiana, proporciona información acerca de la capacidad de supervivencia de las bacterias en el organismo del hospedador y del establecimiento de una respuesta adaptativa efectiva *in vivo*.

6.1. Los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ son altamente susceptibles a los péptidos catiónicos y al sistema del complemento

La susceptibilidad a PxB se utiliza como modelo de péptido catiónico bactericida cuya diana son los grupos fosfato del LPS de *Brucella* (Martínez de Tejada et al., 1995). Los valores de CMI/CMB₅₀ a PxB fueron más elevados para 16M (23,4/93,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que para Rev1 (11,7/23,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y muy bajos para las dos cepas *B. abortus* parentales, e iguales entre ellas (3,9/7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A su vez, la concentración de PxB requerida para la inhibición de los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ fue la mitad (5,9/11,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que para Rev1, sin mostrar diferencias entre ellos (Tabla 15). Rev1 fue la única cepa que mostró una CMB₉₀ mayor que la CMB₅₀, siendo la primera cuatro veces superior a la de los mutantes.

Tabla 15. Valores de CMI y CMB a la PxB para *B. melitensis* Rev1 y 16M, *B. abortus* 2308 y S19, y sus mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$

Parámetro ¹	Concentración de polimixina B ($\mu\text{g}/\text{mL}$)										
	Rev1				16M		2308		S19		Control
	WT	Δwzm	Δwzt	$\Delta wzm\Delta wzt$	WT	Δwzm	WT	Δwzm	WT	Δwzm	<i>E. coli</i> K12
CMI	11,7	5,9	5,9	5,9	23,4	11,7	3,9	1,0	3,9	1,0	$\leq 1,5$
CMB ₅₀	23,4	11,7	11,7	11,7	93,5	23,4	7,8	2,0	7,8	2,0	$\leq 1,5$
CMB ₉₀	46,9	11,7	11,7	11,7	93,5	23,4	7,8	2,0	7,8	2,0	$\leq 1,5$

¹ CMI: concentración mínima inhibitoria; CMB: concentración mínima bactericida para el 50 % (CMB₅₀) o el 90 % (CMB₉₀) de las bacterias, a partir de cultivos con $\approx 1,5 \times 10^6$ UFC/mL en Müller-Hinton expuestos a diluciones seriadas 1 : 2 de polimixina.

El ensayo de supervivencia a PxB en medio ácido con distintas concentraciones de antibiótico confirmó las diferencias entre cepas detectadas en el estudio de microdilución anterior. Así, entre las cepas parentales, la cepa virulenta 16M mostró la mayor supervivencia con este polipéptido, resistiendo perfectamente concentraciones de 1,5 mg/mL;

seguida de 2308 y Rev1, ambas con total inhibición a esta concentración, y de S19, que mostró inhibición a 0,8 mg/mL. Comparativamente, Rev1 Δ wzm mostró total pérdida de viabilidad en presencia de 0,1 mg/mL (la concentración más baja testada), lo que supone una susceptibilidad, al menos, ocho veces mayor que la de su parental. Los mutantes 16M Δ wzm y 2308 Δ wzm/S19 Δ wzm resistieron hasta 0,4 y 0,2 mg/mL, respectivamente, siendo todos los mutantes más susceptibles que sus parentales (Fig. 27A).

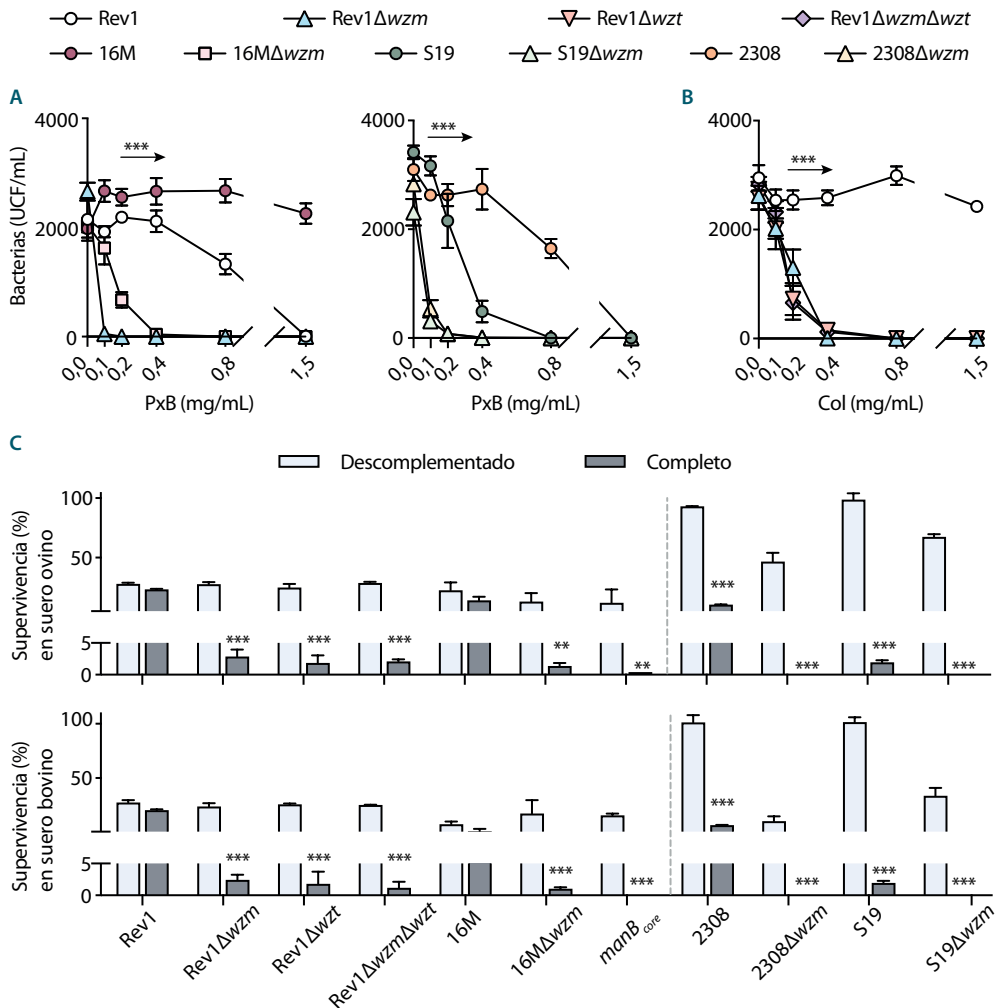


Fig. 27. Susceptibilidad de distintos mutantes Δ wzm/ Δ wzt a los péptidos catiónicos y complemento de la respuesta inmune innata. Viabilidad bacteriana en presencia de: A) polimixina; B) colistina; y C) complemento de sueros convencionales ovinos y bovinos completos o descomplementados por calor, tras 3 h (cepas *B. abortus*) o 18 h (cepas *B. melitensis*) de incubación a 37 °C. La viabilidad bacteriana se expresó como la media \pm SD del n.º de UFC/mL (n = 6) o del % de supervivencia vs. PBS (n = 2). Prueba LSD de Fisher: *** p \leq 0,001 y ** p \leq 0,01 entre cepas lisas y rugosas (paneles A y B) o vs. suero descomplementado para una misma cepa (panel C).

Con el objetivo de discernir si la susceptibilidad a péptidos catiónicos era similar en los distintos mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$, se aplicó una modificación al modelo utilizando colistina (polimixina E), de menor potencia (Kwa et al., 2007) y menor actividad inhibitoria frente a *Brucella* (Jensen y Halling, 2010) que la PxB. De este modo, se comprobó que la supervivencia de los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ fue similar entre ellos, mostrando una pérdida total de viabilidad a 0,4 mg/mL de Col, mientras que los recuentos de Rev1 permanecieron invariables incluso en 1,5 mg/mL (Fig. 27B).

La defensa de respuesta innata mediada por las glucoproteínas del sistema del complemento, presente en los sueros ovinos y bovinos, fue muy efectiva frente a los mutantes rugosos tanto de *B. melitensis* como de *B. abortus*, dada la gran pérdida de viabilidad bacteriana ($p \leq 0,001$) observada en presencia de sueros completos (<4 % de supervivencia) vs. los mismos sueros descomplementados (Fig. 27C). Aunque los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ no mostraron diferencias entre ellos, sí se observó un grado variable de inhibición de los distintos mutantes Δwzm , según la especie de la cepa parental. Incubaciones de 45 o 90 min no permitieron evidenciar efecto alguno del complemento en ninguna cepas; tampoco se vieron diferencias a 3 h con Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ y 16M Δwzm (datos no mostrados), pero sí a tiempos más prolongados; mientras que bastó con una incubación de 3 h para observar la total inhibición de 2308 Δwzm y S19 Δwzm con el suero completo. Asimismo, las cepas parentales Rev1 y 16M mantuvieron una supervivencia próxima al 100 % tras 3 h de incubación con suero completo, que disminuyó a las 18 h tanto con suero completo como con descomplementado. No obstante, las cepas lisas de *B. melitensis* no vieron limitada su viabilidad como consecuencia de la acción del complemento, ni tras 18 h. Contrariamente, todas las cepas de *B. abortus* mostraron menor supervivencia ($p \leq 0,001$) en presencia del complemento que con suero inactivado. Cabe destacar que el suero descomplementado fue ligeramente más inhibitorio para 2308 Δwzm y S19 Δwzm cuando se obtuvo a partir de vacas (10-40 % de supervivencia) que de corderos (40-70 % de supervivencia), sin ello suponer una diferencia entre las cepas parentales *B. abortus* (>90 % de supervivencia) o de *B. melitensis* (10-30 % de supervivencia).

6.2. Los anticuerpos anti-Rev1 Δwzm presentes en suero ovino tienen actividad antimicrobiana *in vitro*

Para comparar la eficacia de los anticuerpos generados tras la inoculación de ganado ovino con Rev1 Δwzm o 16M Δwzm , se estudió si estas inmunoglobulinas eran activas frente a cepas virulentas de *Brucella*, bien por activación del complemento con inmuno-

globulinas a través de la vía clásica o, directamente, gracias a su acción neutralizante de los anticuerpos en ausencia de este (*bacterial killing*) (Dunkelberger y Song, 2010; Forthal, 2015). En este sentido, no se observaron diferencias entre los sueros inmunes y no inmunes frente a 16M ni a 2308. Sin embargo, la supervivencia de BoPA se vio significativamente reducida al incubar la bacteria con el suero de animales inmunizados con Rev1Δwzm en comparación con sueros de ovinos infectados con 16MΔwzm y no inmunes (libres de anticuerpos), tanto completos ($p \leq 0,05$) como descomplementados ($p \leq 0,001$) (Fig. 28). Cabe señalar la importancia de que los sueros utilizados sufrieran únicamente un proceso de descongelación, para prevenir de este modo la pérdida de factores solubles y garantizar la repetibilidad de este ensayo.

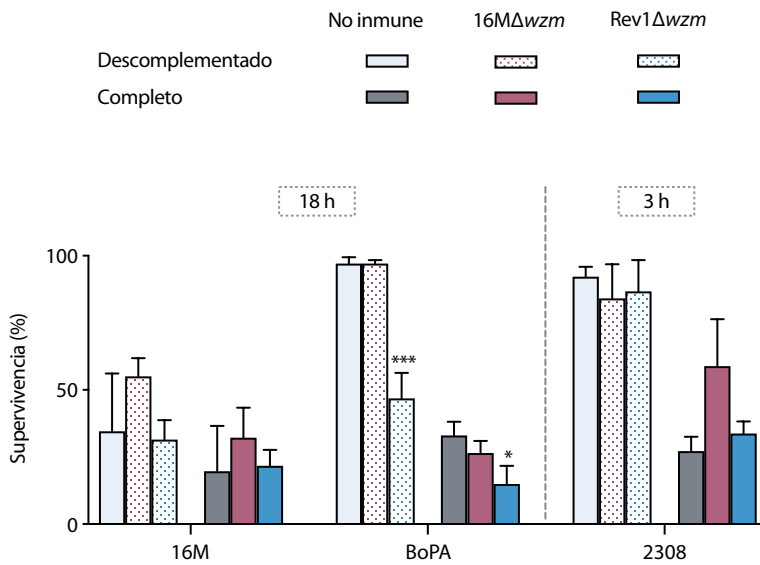


Fig. 28. Efecto bactericida (*bacterial killing*) del suero de ovinos inmunizados con 16MΔwzm o Rev1Δwzm. Supervivencia (%) de 16M y BoPA tras 18 h de incubación, y de 2308 tras 3 h de incubación con sueros de ovinos inmunizados con 16MΔwzm (rojo) o Rev1Δwzm (azul), completos (color sólido) o descomplementados (punteado), en comparación con sueros de ovinos libres de anticuerpos anti-*Brucella* (no inmune; gris). Resultados expresados como la media ± SD de dos experimentos independientes, cada uno de ellos con dos réplicas técnicas. Prueba LSD de Fisher: *** $p \leq 0,001$, * $p \leq 0,05$ vs. suero no inmune en cada grupo.

7. Rev1 Δ wzm posee excelentes propiedades vacunales en el modelo murino preclínico

7.1. Multiplicación esplénica de los mutantes Δ wzm/ Δ wzt

Los tres mutantes Rev1 Δ wzm/ Δ wzt mostraron una gran atenuación en ratones BALB/c que, tras ser infectados con dosis elevadas (10^8 UFC/ratón), mostraron una progresiva eliminación de la infección hasta encontrarse todos ellos libres de bacterias a las 4 semanas PI (Fig. 29A).

Curiosamente, los ratones inoculados con Rev1 Δ wzm mostraron una fuerte esplenomegalia transitoria, a las 2 semanas PI, que no se observó con Rev1 Δ wzt ni con el doble mutante. A continuación, en el estudio dosis-respuesta, se comprobó que era un efecto dosis-dependiente, apreciable a 10^7 UFC/ratón y más intenso a dosis de 10^8 UFC/ratón (Fig. 29B). Este resultado se observó de nuevo con el grupo de ratones ($n = 5$) inoculados con 10^8 UFC/ratón, utilizado como control para estudiar la evolución de la infección por Rev1 Δ wzm a dosis de 10^6 UFC/ratón (Fig. 29C). Además, 10^8 UFC/ratón proporcionó infecciones intragrupo más homogéneas que dosis inferiores de Rev1 Δ wzm.

La esplenomegalia seguida de una rápida eliminación de la infección fue un proceso exclusivo de los mutantes Δ wzm/ Δ wzt derivados de Rev1, más marcado y homogéneo entre los animales inoculados con Rev1 Δ wzm; esta reacción esplénica no se observó en los ratones inoculados con los mutantes de *B. abortus* S19 Δ wzm o 2308 Δ wzm en iguales condiciones experimentales (con 10^8 UFC/ratón, IP), que mostraron todos los bazoos con $<0,2$ g/bazo y una infección más persistente con todos los animales infectados a las 6 semanas PI que la de los mutantes de *B. melitensis* (Fig. 29D), al igual que 16M Δ wzm en trabajos anteriores (Zabalza Baranguá, 2017).

7.2. Perfil de citoquinas asociado a la esplenomegalia por Rev1 Δ wzm

Habida cuenta de la intensa esplenomegalia inducida por Rev1 Δ wzm en todos los animales y de la relación entre este fenómeno y la producción de ciertas citoquinas responsables de mediar una respuesta inmune adaptativa eficaz, se analizó el perfil de IL-6, IL-12p40, TNF- α e IF- γ en ratones BALB/c inmunizados con los mutantes Rev1 Δ wzm/ Δ wzt (10^8 UFC/ratón, vía IP). La cuantificación de estas citoquinas en el

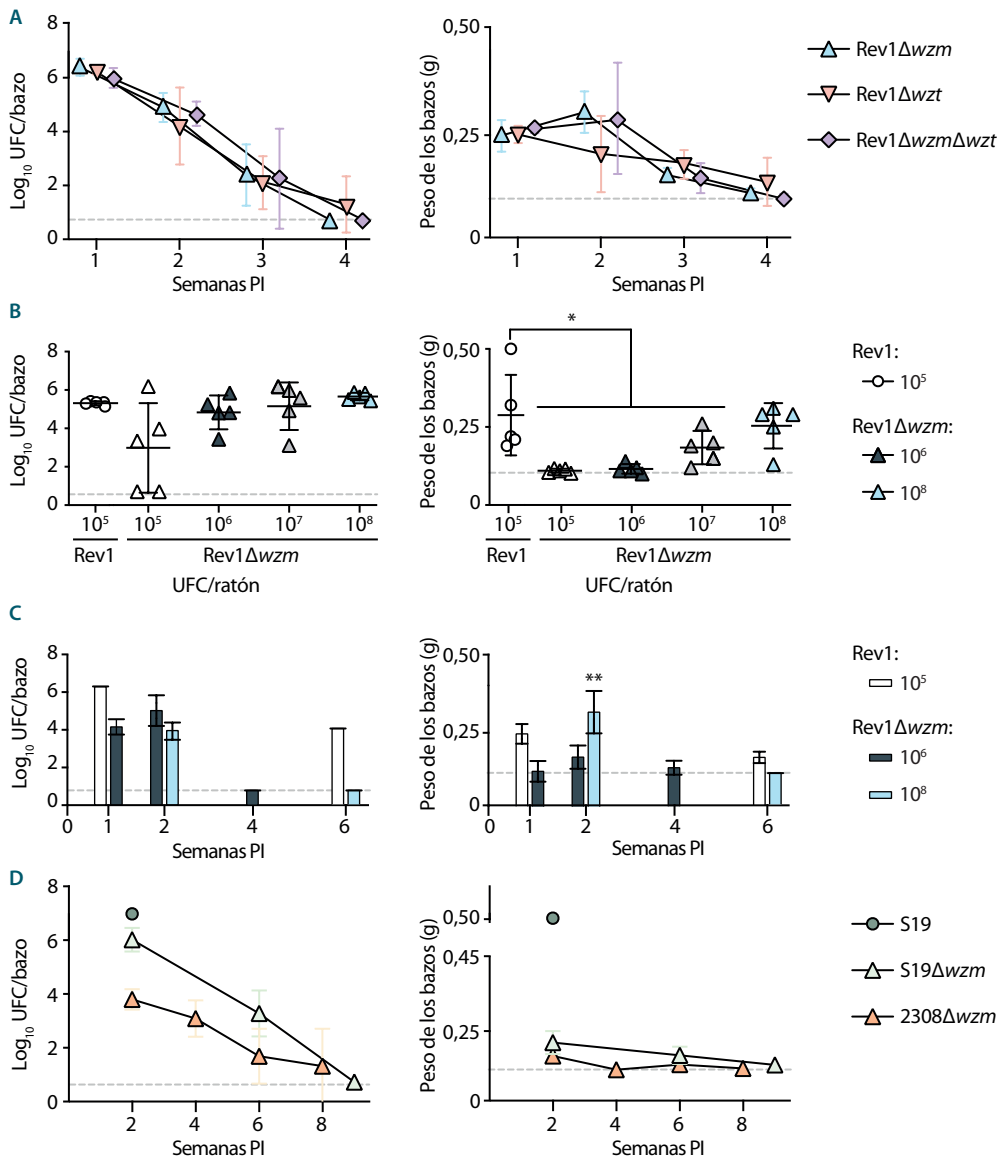


Fig. 29. Estudios de multiplicación esplénica de mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ en ratones BALB/c. Grupos de 3-5 ratones BALB/c (media \pm SD) fueron inoculados por vía IP con las dosis y cepas indicadas en cada estudio para determinar: **A)** curvas de multiplicación esplénica tras la infección con 10^8 UFC/ratón de los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$; **B)** estudio dosis-respuesta tras 2 semanas PI con 10^5 , 10^6 , 10^7 o 10^8 UFC/ratón de Rev1 Δwzm vs. control Rev1 en condiciones estándar (10^5 UFC/ratón, SC); **C)** multiplicación esplénica y pesos de los bazos de Rev1 Δwzm a 10^6 vs. controles 10^8 UFC/ratón (a 2 y 6 semanas PI) y Rev1(a 1 y 6 semanas PI); y **D)** curvas de multiplicación esplénica tras la infección con 10^8 UFC/ratón de los mutantes S19 Δwzm y 2308 Δwzm , vs. S19 control en condiciones estándar (10^5 UFC/ratón, SC) a 2 semanas PI. Resultados expresados como la media \pm SD de los log₁₀ UFC/bazo individuales o de los pesos de los bazos (gramos). Las líneas discontinuas representan en límite de detección: log₁₀ 5 UFC/bazo = 0,70 y 0,1 g/bazo para ratones BALB/c adultos. Prueba LSD de Fisher o t de Student para dos muestras independientes: ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$ vs. los otros grupos del mismo intervalo analizado.

siero y bazo de los ratones reveló un patrón particular para Rev1 Δ wzm, diferenciable del inducido por los otros mutantes, según se detalla a continuación (Fig. 30).

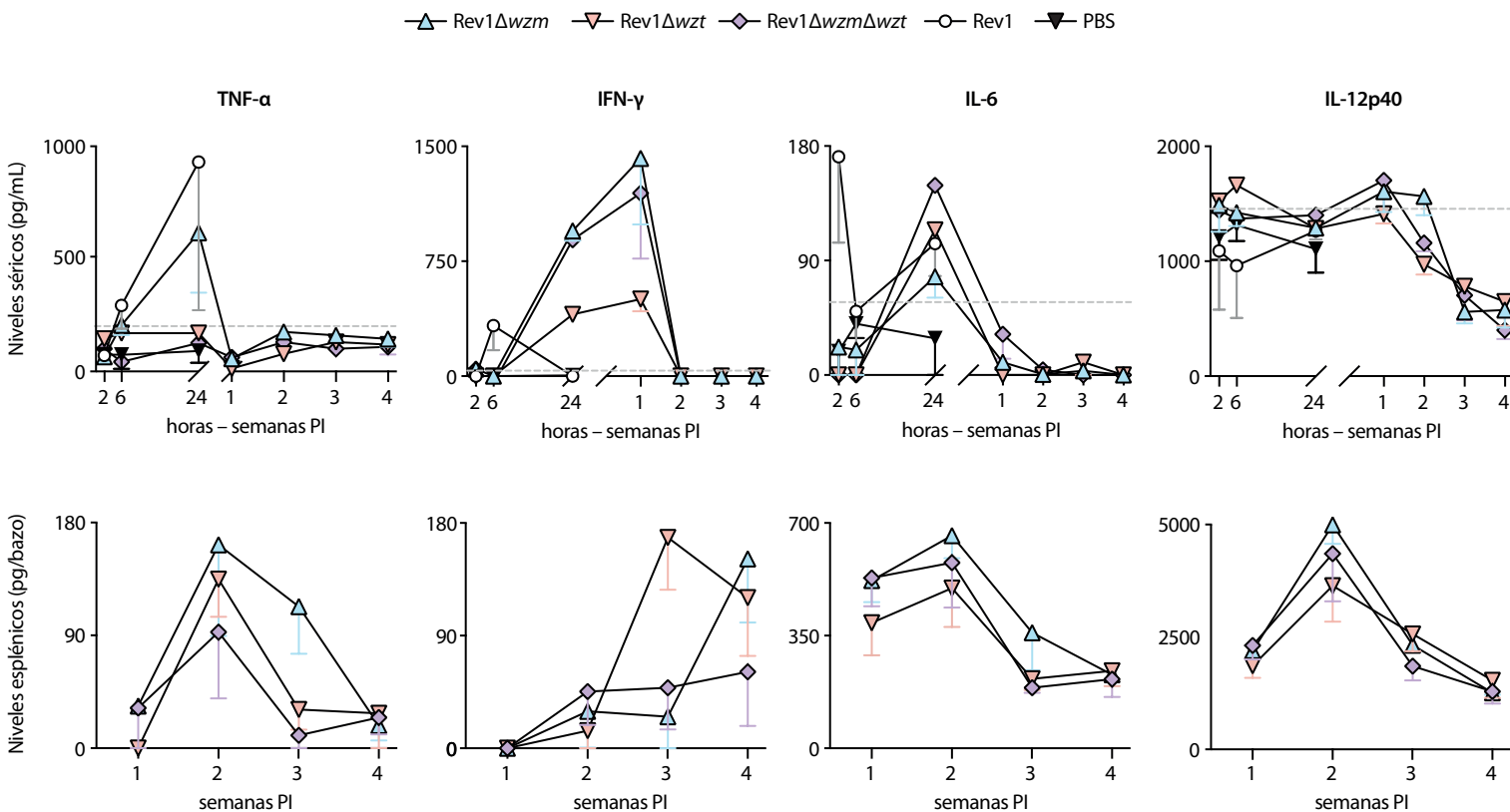
En suero, los mutantes Rev1 Δ wzm/ Δ wzt indujeron un pico de IL-6 que alcanzó niveles máximos a 24 h PI, así como una concentración estable de IL-12p40 similar o incluso por debajo de la obtenida con el control sin vacunar. Sin embargo, Rev1 Δ wzm se diferenció de Rev1 Δ wzt por desencadenar la producción a 24 h de un alto nivel circulante de TNF- α e IFN- γ circulantes; esta última citoquina se mantuvo a altos niveles hasta 1 semana PI, efecto también observado con el doble mutante.

En los bazos, se observaron patrones de IL-6 e IL-12p40 similares con los tres mutantes Rev1 Δ wzm/ Δ wzt, mostrando un pico de máxima producción a las 2 semanas PI, que se correspondió con un pico de TNF- α . No obstante, este aumento local de TNF- α en bazo a 2 semanas PI fue ligeramente mayor y más homogéneo con Rev1 Δ wzm que con los otros mutantes, y se mantuvo elevado hasta las 3 semanas PI, mientras que con los otros mutantes disminuyó rápidamente alcanzando niveles basales a las 3 semanas PI. Además, la presencia de IFN- γ en bazo mostró un patrón diferente con cada uno de los tres mutantes, presentando un aumento lento y a bajos niveles a lo largo de las 4 semanas con Rev1 Δ wzm Δ wzt, un drástico incremento a 3 semanas PI y posterior disminución con Rev1 Δ wzt, y niveles moderados hasta desencadenar un pico a las 4 semanas PI con Rev1 Δ wzm, pico que coincidió con la total eliminación de este mutante en los bazos.

7.3. Rev1 Δ wzm es más eficaz que Rev1 Δ wzt frente a la infección virulenta por *B. melitensis* y protege mejor que Rev1 frente a *B. ovis* en ratones BALB/c

Los estudios de eficacia en ratones BALB/c (Tabla 16) evidenciaron que tanto Rev1 Δ wzm como Rev1 Δ wzt protegían frente a la infección virulenta por *B. melitensis* a los niveles de la vacuna de referencia Rev1 ($p > 0,05$), en ratones previamente vacunados por vía IP. Sin embargo, Rev1 Δ wzm mostró una protección superior a los otros mutantes cuando los animales se inmunizaron por vía SC (un modelo preclínico más exigente que la vía IP), por lo que se seleccionó Rev1 Δ wzm como el mejor candidato para posteriores estudios.

A continuación, se analizó si dosis inferiores de Rev1 Δ wzm conferirían una protección equivalente, con independencia de la esplenomegalia. Para ello, se inmunizaron ratones BALB/c por vía IP con 10^6 UFC/mL, comprobándose que la protección conferida frente a *B. melitensis* con esta dosis era insuficiente.



La inmunización por vía IP con el mutante Rev1 Δ wzm a la dosis óptima de 10⁸ UFC/mL demostró una protección frente a *B. ovis* muy superior a la conferida por Rev1 ($p \leq 0,001$). Sin embargo, esta cepa no resultó efectiva frente a la infección virulenta por *B. abortus*. De hecho, solamente la vacuna de referencia S19, seguida de Rev1, fueron eficaces frente a 2308::Gm, ya que los mutantes 2308 Δ wzm y S19 Δ wzm no mejoraron el resultado obtenido en el grupo control sin vacunar.

Tabla 16. Eficacia vacunal de los mutantes Δ wzm/ Δ wzt frente a la infección virulenta por *B. melitensis*, *B. ovis* y/o *B. abortus* en ratones BALB/c

Vacunación			Infección virulenta				
Vacuna	UFC/ratón	Vía	Cepa de desafío	Log ₁₀ UFC/bazo ¹	N.º de animales no infectados/totales	UP	
Rev1 Δ wzm	10 ⁸	IP	<i>B. melitensis</i> H38::Gm	1,9 ± 1,8 ^a	6/10 ^c	3,9	
		SC		2,4 ± 1,3 ^a	2/5 ^c	3,4	
10 ⁶	IP	5,1 ± 0,7 ^b		0/5 ^d	0,7		
	SC	2,1 ± 1,6 ^a		3/5 ^c	3,7		
Rev1 Δ wzt	10 ⁸	IP		4,9 ± 1,3 ^b	0/5 ^d	0,9	
SC		3,1 ± 1,5		1/5	2,7		
Rev1 Δ wzm Δ wzt	10 ⁸	IP		3,2 ± 1,6	0/5 ^d	2,6	
SC		1,3 ± 0,9 ^a		6/14 ^c	4,5		
Rev1	10 ⁵	SC		5,8 ± 0,6	0/13 ^d	NA	
PBS	NA	SC		<i>B. ovis</i> PA::Gm	1,3 ± 0,9 ^{ab}	4/5 ^{cd}	5,3
Rev1 Δ wzm	10 ⁸	IP			5,4 ± 0,5	0/5	1,0
SC	4,4 ± 1,5	0/5			2,0		
Rev1	10 ⁵	SC			6,4 ± 0,1	0/5	NA
PBS	NA	SC		<i>B. abortus</i> 2308::Gm	4,1 ± 1,6	0/5	1,9
Rev1 Δ wzm	10 ⁸	IP			3,0 ± 1,4	1/5	3,0
SC		4,1 ± 1,1			0/5	1,9	
2308 Δ wzm	10 ⁸	IP	3,7 ± 2,2		1/5	2,3	
SC		4,2 ± 1,9	1/5		1,8		
S19 Δ wzm	10 ⁸	IP	2,3 ± 1,7 ^a		5/15 ^c	3,7	
SC		2,6 ± 1,8	3/5 ^c		3,4		
S19	10 ⁵	SC	6,0 ± 1,6 ^b		0/14 ^d	NA	
Rev1	10 ⁵	SC					
PBS	NA	SC					

¹ Grupos de 5 ratones BALB/c fueron vacunados con las dosis, vía y cepas indicadas, utilizando como controles de vacunación eficaz las cepas Rev1 y S19, y PBS como control sin vacunar; tras 4 semanas, todos los animales fueron infectados por vía IP con las cepas H38::Gm (10⁴ UFC/ratón), BoPA::Gm (5 × 10⁵ UFC/ratón) o 2308::Gm (5 × 10⁴ UFC/ratón) y sacrificados 2, 3 o 2 semanas después, respectivamente, para determinar el log₁₀ UFC/bazo de las cepas virulentas (media ± SD; n ≥ 5); UP: unidades de protección calculadas como la media del log₁₀ UFC/bazo en el control PBS sin vacunar menos la del grupo correspondiente; NA: no aplica; límite de detección: log₁₀ 5 UFC/bazo = 0,70; prueba LSD de Fisher: ^ap ≤ 0,001 vs. grupo PBS o ^bp ≤ 0,001 vs. Rev1; Chi-cuadrado: ^cp ≤ 0,01 vs. grupo PBS o ^dp ≤ 0,01 vs. Rev1.

8. Rev1 Δwzm es estable y mantiene la respuesta de Rev1 ante el estrés ambiental

Una vez seleccionado el mutante Rev1 Δwzm en base a los resultados de atenuación e inmunogenicidad, se evaluó su estabilidad y susceptibilidad a factores del medio ambiente vs. la de Rev1, para determinar su utilidad práctica como candidato vacunal.

8.1. Estabilidad tras pases *in vitro* e *in vivo*

Los subcultivos seriados de Rev1 Δwzm y Rev1 mostraron estabilidad genética por PCR convencional tras 20 pases del mutante y 15 pases de Rev1. A diferencia de la parental, el subcultivo de Rev1 Δwzm en placas de BAB se pudo realizar durante más de 20 pases seriados, mientras que la cepa Rev1 fue perdiendo progresivamente su capacidad de multiplicación *in vitro*, por lo que no se pudieron completar más de 15 pases seriados; este fenómeno fue especialmente evidente cuando las placas se incubaron en atmósfera normal, en comparación con los subcultivos en atmósfera con un 10 % de CO₂. A nivel genético, tanto el mutante como la parental mostraron estabilidad tras 20 y 15 subcultivos seriados, respectivamente, en las PCR que detectaron la delección del gen *wzm* en el mutante (gen completo en Rev1) y la integridad de las regiones GI-2 y *wbk*, con ausencia de cicatrices e intermediarios circulares en estas regiones genéticas (Fig. 31A).

De acuerdo con la estabilidad genética, las bacterias de Rev1 Δwzm obtenidas en los distintos pases seriados *in vitro* mostraron el fenotipo rugoso por la técnica de cristal violeta-oxalato y presencia de O-PS citoplasmático evidenciado por WB con suero mono-específico anti-M, en contraste con el fenotipo liso de Rev1 y con la ausencia de O-PS en el control BmH38R*manB*_{core} (Fig. 31B).

En ratones, tras cinco pases sucesivos (realizando uno cada tres días PI, a partir de la cepa recogida de los bazos), Rev1 Δwzm mantuvo su capacidad infectiva en cada pase, recuperándose $5,1 \pm 0,4 \log_{10}$ UFC/bazo e induciendo tamaños esplénicos de $0,24 \pm 0,7$ g/bazo (Fig. 31C). Además, en cada pase por ratón, se confirmó la estabilidad genética y fenotípica de las bacterias aisladas, siguiendo los procedimientos mencionados anteriormente.

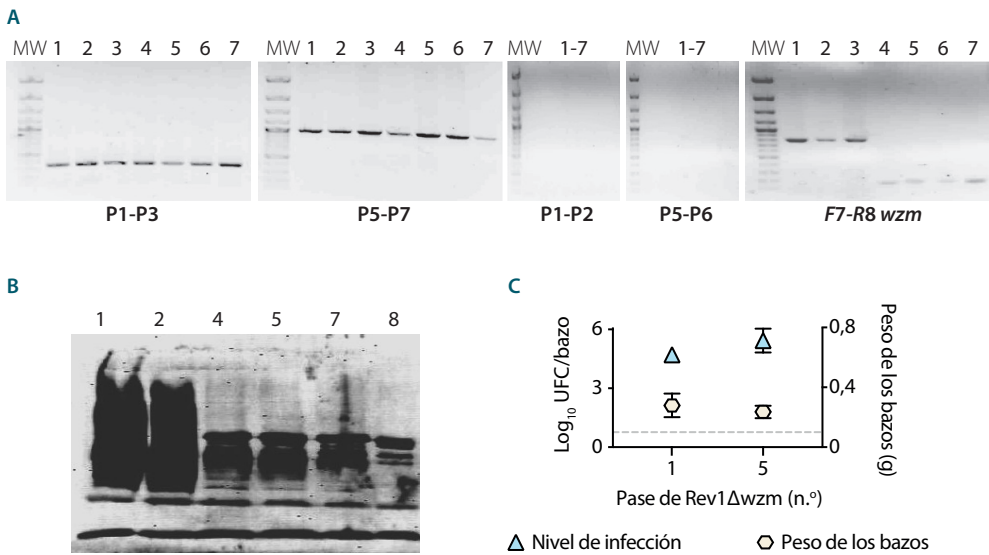


Fig. 31. Estudio de estabilidad de Rev1Δwzm tras pases seriados *in vitro* e *in vivo*. **A)** Amplificación por PCR de los fragmentos indicadores de integridad cromosómica en las regiones *wbo* de la isla genómica Gl-2 y *wbk*, con los cebadores P1-P3 (352 pb) y P5-P7 (1.016 pb), respectivamente; ausencia de amplificación con los cebadores P1-P2 y P5-P6, indicando que no se ha producido escisión genética en dichas regiones; y amplificación de 156 pb en el mutante y 798 pb en la parental con los cebadores F7-R8 de *wzm*. **B)** WB anti-M con bacterias completas inactivadas con fenol frente a un suero mono-específico anti-M. **C)** Multiplicación esplénica (UFC/bazo) y peso de los bazos (g) obtenidos en el 1^{er} y 5^o pases en ratones CD1 inoculados con Rev1Δwzm recuperado de los bazos de ratones tras inoculaciones seriadas en estos animales. Los resultados se expresan como la media ± SD (n = 3); la línea discontinua indica el límite de detección (log₁₀ 5 UFC/bazo = 0,70) y el peso normal de un bazo (0,1 g). MW: marcador de peso molecular; 1: Rev1 control; 2: Rev1 tras pase n.º 15 en BAB, en condiciones estándar (37 °C, atmósfera normal); 3: Rev1 tras pase n.º 15 en BAB e incubación con 10 % CO₂; 4: Rev1Δwzm control; 5: Rev1Δwzm pase n.º 20 en BAB, en condiciones estándar; 6: Rev1Δwzm tras pase n.º 20 en BAB con 10 % CO₂; 7: Rev1Δwzm tras 5 pases consecutivos por ratón; 8: BmH38R*manB*_{core}.

8.2. Susceptibilidad a factores ambientales

La supervivencia del mutante Rev1Δwzm frente a distintos tipos de estrés, tales como la desecación en presencia o ausencia de radiación solar, temperatura, detergentes, oxidación, pH ácido o privación de nutrientes, es reflejo de las condiciones presentes en el medio externo (Corbel, 2006; Mirabella et al., 2013; Potts, 1994) o en el nicho replicativo del hospedador (Baldwin y Goenka, 2006; Roop et al., 2004, 2009). Todas estas propiedades fueron similares entre Rev1Δwzm y su parental Rev1.

En condiciones de desecación, todas las cepas fueron más susceptibles a la misma cuando estuvieron expuestas a luz solar que mantenidas en oscuridad. Las cepas Rev1

y su mutante, y también 16MΔwzm, fueron más susceptibles a la desecación que la cepa virulenta 16M ($p \leq 0,001$), especialmente en presencia de luz solar (0,2-1,5 % de supervivencia bacteriana; Fig. 32A).

Los compuestos surfactantes también causaron una gran inhibición de todas las cepas, que fue total cuando se utilizó el detergente aniónico SDS, incluso a concentra-

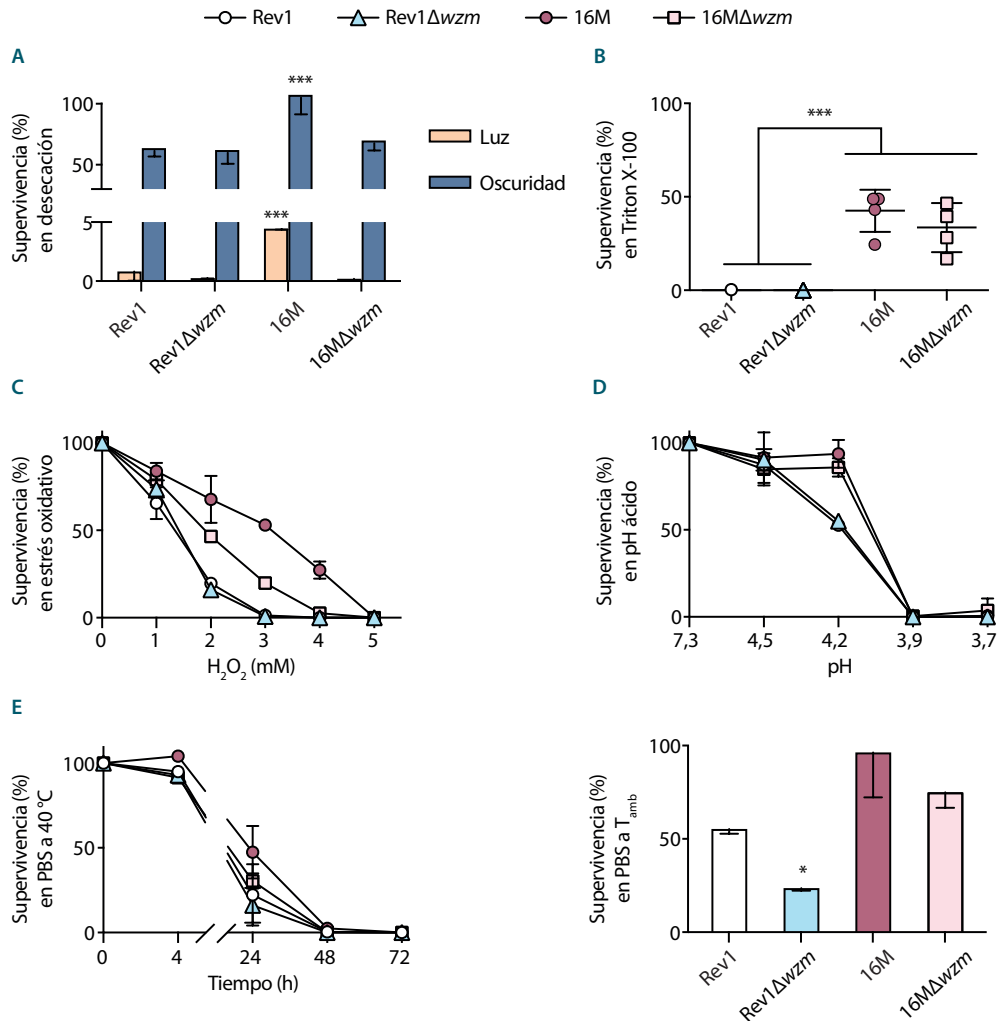


Fig. 32. Susceptibilidad a factores ambientales. Supervivencia bacteriana (%) en condiciones de: **A)** desecación en TSB, a T_{amb} en oscuridad o bajo radiación solar, durante 6 días; **B)** detergentes, con el surfactante no iónico Tritón X-100 al 0,1 %, durante 1 h; **C)** estrés oxidativo, con H₂O₂, durante 1 h; **D)** estrés ácido, en TSB acidificado, durante 1 h; y **E)** privación de nutrientes, en PBS a 40 °C durante 72 h (izquierda), o a T_{amb} durante 6 días (derecha). Todos los resultados se expresan como media ± SD de 2-3 experimentos independientes. Prueba LSD de Fisher: *** $p \leq 0,001$.

ciones de 0,06 % se inhibieron 10^9 UFC/mL. Con el compuesto no iónico Triton X-100 al 0,1 % se pudieron detectar ciertas diferencias entre cepas Rev1 vs. 16M ($p \leq 0,001$), ya que la inhibición fue total para Rev1 y su mutante y superior al 50 % para 16M y su mutante, sin diferencias entre los mutantes Rev1 Δ wzm o 16M Δ wzm y su correspondiente parental (Fig. 32B).

En presencia de concentraciones crecientes de H₂O₂, como causante de estrés oxidativo, se observó una reducción progresiva en la supervivencia de todas las cepas, con una pérdida completa de su viabilidad a 3 mM para Rev1 Δ wzm y Rev1, a 4 mM para 16M Δ wzm y a 5 mM para 16M (Fig. 32C).

La acidificación del ambiente no supuso un perjuicio para 1Rev1 Δ wzm y su parental hasta exponerse a pH 4,2, en el cual la viabilidad bacteriana se redujo hasta un 54 % de supervivencia media, pero no así en el caso de 16M y su mutante; valores de pH inferiores a 3,9 resultaron letales para todas las cepas (Fig. 32D).

El efecto de privación de nutrientes a lo largo del tiempo se estudió a 40 °C, por ser la temperatura corporal normal de pequeños rumiantes (Pourjafar et al., 2012), y condujo a una reducción gradual de la supervivencia, con pérdida total de viabilidad en todas las cepas tras 48 h (Fig. 32E, panel izdo.); antes, a 24 h, la cepa virulenta 16M mostró mayor supervivencia que las demás cepas, exhibiendo Rev1 Δ wzm de nuevo una respuesta similar a la de Rev1. A T_{amb}, la viabilidad de Rev1 Δ wzm al cabo de 6 días fue menor que la de Rev1, y esta a su vez inferior que la de 16M Δ wzm, mostrando 16M una persistencia casi total (Fig. 32E, panel dcho.).

El impacto aislado de la temperatura se estudió en TSB (no mostrado), obteniéndose multiplicación de todas las cepas tras 24 h de incubación a 40 °C, así como de 16M y 16M Δ wzm tras 6 días a T_{amb}, mientras que Rev1 y Rev1 Δ wzm no pudieron dividirse en estas condiciones y vieron reducida su supervivencia.

9. Depósito de la cepa *B. melitensis* Rev1 Δ wzm y transferencia de conocimiento

En virtud de los resultados obtenidos, Rev1 Δ wzm se depositó en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT; código n.º 9401), siguiendo las detalladas instrucciones basadas en el Tratado de Budapest de la Organización Mundial de la Propiedad

Intelectual (OMPI) que garantiza el reconocimiento de la cepa en todos los países acogidos a él (OMPI, 1977). Tal y como recomienda el tratado, tras la liofilización de la cepa en la CECT, se comprobó que el mutante conservaba las características que motivaron su depósito, así como la homogeneidad de tamaño y fase (por la prueba de cristal violeta-oxalato) y ausencia de contaminación. Para ello, el vial recibido de la CECT (Fig. 33) se reconstituyó en 250 μ L de TSB y, mediante diluciones decimales seriadas en PBS y siembra (0,1 mL, por triplicado) de las mismas en BAB, se determinó que el n.º de UFC/mL era similar al utilizado para la liofilización, lo que indicó la resistencia del candidato vacunal al proceso de liofilización. Además, Rev1 Δ wzm ha sido objeto de una patente (WO/2019/101993 - PCT/EP2018/082539), cuya propiedad intelectual es compartida entre CSIC y UPNA, está licenciada a la *spin-off* del CSIC Brucella GreenVac S.L. y recientemente se ha logrado la patente definitiva en varios países.

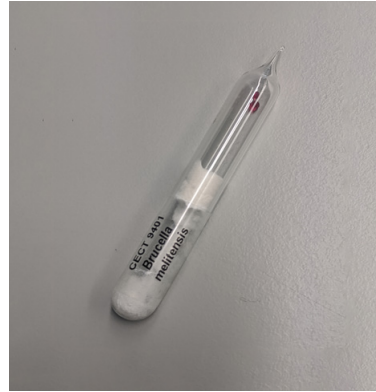


Fig. 33. Liófilo del candidato vacunal *B. melitensis* Rev1 Δ wzm. Ampolla de vidrio al vacío procedente de la CECT que contiene gel de sílice (rosa) como indicador de preservación del vacío, un filtro de papel hidrófobo (central) y el pellet liofilizado de Rev1 Δ wzm.

Discusión

El estudio de candidatos rugosos, espontáneos o derivados de cepas lisas por técnicas de biología molecular, con el objetivo último de mejorar y reemplazar la actual vacuna Rev1, ha permitido acumular en las últimas décadas un amplio bagaje científico (Fontana et al., 2016; González et al., 2008; Hou et al., 2019; Moriyón et al., 2004; Yang et al., 2013) para seguir profundizando en los mecanismos de atenuación de *Brucella*. Entretanto, el presente trabajo supone el primer estudio de mutantes rugosos que compara paralela y detalladamente el efecto derivado de truncar uno, otro o los dos componentes del sistema Wzm/Wzt, descifrando las diferencias que una misma mutación puede desempeñar sobre un distinto *background* tanto a nivel de especie como de cepa.

Con este propósito, en este capítulo se desarrollaron y analizaron los correspondientes mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ de *B. melitensis* Rev1 o *B. abortus* 2308 y S19, incluyendo además en el estudio el mutante Δwzm de 16M (Zabalza Baranguá, 2017). Para generar Rev1 Δwzm , 2308 Δwzm y S19 Δwzm se utilizó el vector recombinante pJQKm Δwzm (Zabalza Baranguá, 2017) y se construyó el vector pJQKm Δwzt para desarrollar no sólo el mutante simple Rev1 Δwzt , sino también el doble Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$ sobre Rev1 Δwzm . Tal estrategia se pudo llevar a cabo gracias a que el cebador R2-*wzt* se diseñó para hibridar fuera de la secuencia a eliminar en *wzm*, puesto que en caso contrario la recombinación homóloga no habría sido posible. Sin embargo, dado que el desarrollo del mutante doble conllevó necesariamente un mayor número de subcultivos, en igualdad de condiciones se recomendaría el empleo de uno de los mutantes simples en su lugar. No obstante, su construcción se realizó suprimiendo el uso de antibióticos en la segunda recombinación, aspecto que resultó decisivo para evitar cambios fenotípicos derivados de presión selectiva.

Dado que los genes *wzm* y *wzt* codifican por un sistema que requiere de dos componentes proteicos para su correcto funcionamiento, y además se sitúan en el cromosoma de *Brucella* de manera contigua en el citado orden (Godfroid et al., 2000), se ha asumido comúnmente que la delección de cualquiera de los dos tendría un efecto análogo, además de que truncar el primero impediría la expresión del segundo. Nada más lejos de la realidad, los mutantes Δwzm mostraron una marcada sobreexpresión del gen *wzt*, mientras que este resultado no se observó en el caso contrario, aportando Rev1 Δwzt un valor de expresión de *wzm* similar al de la parental. Tal efecto de alteración de la expresión en el gen *downstream* a consecuencia de modificaciones en el *upstream*, unido al hecho de que *wzm* y *wzt* comparten parte de sus respectivos codones *stop* y *start* sugiere, tal y como se

ha descrito en otras bacterias gramnegativas, la existencia de un mecanismo de regulación mediante la conformación de un operón (Goldberg, 1999; Rocchetta y Lam, 1997) con un marco de lectura múltiple (Johnson y Chisholm, 2004).

Adicionalmente, los tres mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ realizados sobre el mismo *background* compartieron una sobreexpresión de los genes de biosíntesis de O-PS *wbkB* y *wbkC* en comparación con la mostrada por su parental Rev1. Estos genes codifican para una enzima sin función asignada y una formiltransferasa (Godfroid et al., 2000), por lo que quedaría abierta la posibilidad de que el antígeno en formación presentara modificaciones. Sin embargo, una reducción en la longitud de su O-PS no parece esperable, ya que no se detectó una represión o disminución de la expresión de los genes de biosíntesis de la cadena. Por lo tanto, la diferente reactividad del O-PS interno de los mutantes rugosos observada en WB podría asociarse con una cantidad reducida, puesto que el ciclo de transporte y reciclaje del bactoprenol bloqueado junto al O-PS impediría la síntesis de nuevas cadenas (Rocchetta y Lam, 1997). Esta acumulación de antígeno en el citoplasma autolimitada no supone repercusiones detectables sobre el crecimiento de los mutantes, que proporcionaron unas curvas de multiplicación bacteriana similares a las de sus parentales.

Aunque el crecimiento de las cepas Rev1 Δwzm , Rev1 Δwzt y Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$ no se vio afectado por la mutación, estas mostraron una mayor susceptibilidad antibiótica que Rev1. El incremento del efecto inhibitorio de las polimixinas en las cepas rugosas (Jensen y Halling, 2010) es consecuencia de una mayor accesibilidad de los cationes a los grupos fosfato aniónicos, los cuales aparecen expuestos en ausencia de O-PS (Martínez de Tejada et al., 1995). Se observó además que su actividad, tanto frente a Rev1 como a los mutantes derivados de esta cepa, se vio incrementada en presencia de suero o CO₂, en línea con estudios anteriores (Jensen y Halling, 2010), de un modo opuesto al efecto mostrado con la estreptomycin. Por un lado, el suero podría estar potenciando el efecto de las polimixinas gracias a que los anticuerpos y proteínas del sistema del complemento presentes en él comparten con estas su sitio de acción (Davis et al., 1971). Por el contrario, ha sido ampliamente descrito un efecto antagónico entre el suero y los aminoglucósidos debido a que la elevada concentración de cationes divalentes presentes en él obstaculizarían su penetración en la célula (Hancock, 1981). Por otro lado, al CO₂ se le atribuye la capacidad de acidificar el medio y alterar ciertas rutas metabólicas causando la acumulación de metabolitos intermedios (Daniels et al., 1985; Debs-Louka et al., 1999), intensificando así la acción de las polimixinas frente a Rev1 y sus mutantes. Se ha descrito que

tal efecto puede variar dentro de distintas especies de un mismo género bacteriano o incluso de miembros de estas (Daniels et al., 1985) y, de hecho, contrasta con lo reportado para otras especies de *Brucella* (Jensen y Halling, 2010). Por su parte, la estreptomycinina causó una menor inhibición en los mutantes cuando estos se incubaron en atmósfera con CO₂, de acuerdo con la pérdida de actividad que este antibiótico experimenta a pH ácido (Akova et al., 1999; Hancock, 1981). Adicionalmente, la acción de los aminoglucósidos conduce a la formación de diversos radicales libres oxidantes que resultan letales para la bacteria (Kohanski et al., 2010), que serían neutralizados por el efecto tamponante del CO₂ al disociarse en presencia de agua en HCO₃⁻ (Amaral-Silva et al., 2019; Queliconi et al., 2013; Thomas, 1976), disminuyendo así el efecto inhibitorio de la estreptomycinina. De hecho, se ha propuesto el bloqueo de las anhidrasas carbónicas de la bacteria, responsables de dicha disociación, como estrategia para evitar este mecanismo de resistencia (Capasso y Supuran, 2017).

El hecho de que los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ sean más susceptibles a los antibióticos es especialmente relevante vista la intensa inhibición lograda con una combinación de doxiciclina y estreptomycinina. Este es el tratamiento de elección que se aplica frente a la brucelosis humana (Ariza et al., 1986), pero no resulta efectivo en el caso de Rev1 (Blasco y Díaz, 1993; Grilló, De Miguel, et al., 2006), confiriendo de este modo mayor seguridad al manejo de los mutantes. Aunque se observó una alteración en la resistencia al aminoglucósido en presencia de suero o CO₂, su acción se restauró prácticamente por completo con la adición conjunta de ambos, por lo que no sería esperable que su efectividad *in vivo* se viera comprometida por estos factores. Esta mayor susceptibilidad de los mutantes a la estreptomycinina posiblemente sea debida a la existencia en ellos de modificaciones de membrana que permiten un mayor acceso del aminoglucósido (Hancock, 1981) mediante interacciones electrostáticas (Kohanski et al., 2010). Efectivamente, se comprobó que el bloqueo del transporte de O-PS provoca en los mutantes cambios pleiotrópicos en su envuelta celular.

La biosíntesis del LPS está estrechamente relacionada con la de otros componentes implicados en mantener la integridad de la bacteria (Morè et al., 2019). La pérdida o acortamiento del O-PS se ha asociado con propiedades interrelacionadas de OM tales como autoaglutinación espontánea (Caro-Hernández et al., 2007), incremento de la hidrofobicidad y carga negativa (González et al., 2008) y una mayor adhesión a superficies (Nakao et al., 2012); todas ellas exhibidas por los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$. Ciertamente, la adhesión a distintos materiales es un fenómeno dependiente de la naturaleza de estos y de la

carga bacteriana (Fletcher y Loeb, 1979); sin embargo, el aumento de la adhesión también es un rasgo típico de la fase estacionaria (Potts, 1994). Por lo tanto, debido a que tras 3 semanas de incubación se confirmó la viabilidad de las bacterias adheridas tanto en mutantes como parentales, no se puede descartar que las diferencias en formación de *biofilm* se deban a una repulsión del cristal violeta por las cepas lisas, mientras que las rugosas lo incorporan activamente por interacciones iónicas con su superficie hidrofóbica (Popescu y Doyle, 1996). Del mismo modo, la safranina O, al tratarse igualmente de un catión básico, es ampliamente adsorbida por la membrana hidrofóbica (Atun et al., 1998) de los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$, por lo que su mayor susceptibilidad es reflejo de modificaciones en la OM y pared celular (Jankowski et al., 2005). Asimismo, al margen de diferencias en la naturaleza del LPS asociadas a la cepa parental, en ausencia de O-PS externo quedan expuestos el lípido A y *core*, cuyas cargas negativas presentan afinidad por la safranina O (Clifton et al., 2016; Fontana et al., 2016; Perevoshchikova et al., 2009; Vaara, 1992). En todos los casos la acción inhibitoria se mitigó en presencia de CO₂, probablemente a consecuencia de su capacidad anteriormente discutida para tamponar especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales puede generar la safranina O causando daño en la envuelta celular (Jankowski et al., 2005).

A partir de la OM, se observó en los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ mediante TEM la liberación de un elevado número de OMV, ausentes en la parental. Su cantidad y composición se asocia en *Brucella* con la ausencia de O-PS (Avila-Calderón et al., 2020; Gamazo y Moriyón, 1987; Ruiz-Palma et al., 2021; Solanki et al., 2021) y son especialmente frecuentes en cepas que autoaglutinan (Godefroid et al., 2010). De hecho, los distintos mutantes rugosos estudiados mostraron un mayor tamaño de partícula y una tendencia a un enturbiamiento del caldo de cultivo superior a los de las parentales lisas, en línea con la elevada producción de *blebs* a partir de la membrana en las primeras. La producción de estas nanovesículas respondería a estímulos extra e intracelulares como protección frente al estrés y a la acumulación de metabolitos (Manning y Kuehn, 2013), como sería la exposición de un R-LPS en lugar de S-LPS y la interrupción de su maquinaria de biosíntesis.

Además, la técnica de tinción negativa posibilitó la visualización mediante TEM de polímeros extracelulares, tanto en los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ como en su parental Rev1, lo cual supone generalmente un reto tras el procesado de muestras para microscopía debido a su elevado contenido en agua y tendencia a colapsar (Dohnalkova et al., 2011). Su composición también pareció depender del tipo de LPS, dada la unión diferencial del EPS de

Rev1 con calcoflúor respecto a sus mutantes y homogénea con Rojo Congo, pero también de la cepa parental vistas las diferencias entre distintas *brucellae*; variabilidad vinculada con la preferencia de hospedador y virulencia (Uzureau et al., 2007). De hecho, entre las funciones del EPS se incluye la adhesión a sustratos, protección frente al reconocimiento de anticuerpos, a la fagocitosis y a la desecación gracias a la retención de agua (Potts, 1994; Schaechter, 2004). Por ello, la menor tolerancia a la desecación en los mutantes, entendida como respuesta al estrés hiperosmótico, podría ser debida no sólo a una aceleración en la pérdida de agua por su superficie más hidrofóbica (Potts, 1994), sino también a modificaciones en el tipo de EPS. En efecto, se observó en los mutantes una reducción en la resistencia frente a la presión con NaCl, pero no así con sacarosa, lo cual pone de relieve e insiste en la importancia del osmolito a utilizar en estos estudios (Cheung et al., 2009; Pilizota y Shaevitz, 2013; Schuster et al., 2020; Shabala et al., 2009). Esta variación implica además cambios estructurales en los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ a nivel de OM y pared celular, puesto que la consistencia de estos componentes de envuelta bacteriana, que además están covalentemente unidos entre sí (Godessart et al., 2021), está asociada directamente con la protección osmótica (Morè et al., 2019).

La reorganización de la pared celular sufrida por los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$, como compensación fenotípica al bloqueo de bactoprenol (MacCain et al., 2018), se advirtió también mediante cambios en la susceptibilidad a penicilina G y vancomicina, así como en la cantidad y estructura del PG. Sorprendentemente $Rev1\Delta wzm$, $Rev1\Delta wzt$ y $Rev1\Delta wzm\Delta wzt$ mostraron una susceptibilidad al β -lactámico de menor intensidad que la de Rev1 cuando se incubaron en condiciones estándar. La incorporación de CO₂ provocó en esta cepa, al igual que en 16M (Zabalza-Baranguá et al., 2023), un aumento de su supervivencia, quizá debido a la estimulación de enzimas β -lactamasa (Corkill et al., 1994) —las cuales, no obstante, no han sido identificadas en el genoma de estas parentales (Salmon-Divon et al., 2018)— o al tamponamiento con CO₂ de las ROS, que se forman en exceso en formas con pared deficiente (Kawai et al., 2015). El hecho de suplementar el medio con suero mantuvo el patrón de una mayor resistencia a penicilina G en los mutantes, pero proporcionó recuentos más elevados en todas las cepas. Aunque la inclusión de suero puede ser perjudicial para algunas formas L generadas por el β -lactámico, este no afecta al crecimiento de las formas estables (Shimokawa et al., 1994) y además podría presentar factores capaces de interferir con la penicilina G (Banai et al., 2002). Puesto que no sería esperable que los mutantes $Rev1 \Delta wzm/\Delta wzt$ presentaran alteraciones en la diana de acción, la menor susceptibilidad a este antibiótico podría ser debida a la alteración de su permeabilidad (Blumberg y Strominger, 1974), a un enmascaramiento de

las PBP por su propio sustrato (Lepage et al., 1995) o por otros productos o estructuras (Livermore, 1987), o a cambios en la actividad de las PBP que podrían conllevar la remodelación del PG (Morè et al., 2019; Peters et al., 2018).

Las diferencias en la susceptibilidad a la vancomicina también revelaron cambios entre la pared de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ y las cepas lisas. Aunque las bacterias gramnegativas son típicamente resistentes a este aminoglucósido (Murray et al., 2016), los mutantes mostraron una mayor susceptibilidad. Es posible que la ausencia de la maquinaria de biosíntesis de S-LPS en el periplasma pueda estar facilitando el acceso de la vancomicina a los precursores de la pared, y que una limitación de la síntesis de PG potencie su actividad. En cualquier caso, es esperable que el metabolismo de la bacteria sufra modificaciones importantes como consecuencia del bloqueo de la síntesis de pared celular (Kawai et al., 2015).

El análisis mediante UPLC-MS confirmó que truncar el sistema Wzm/Wzt afecta directamente a la biogénesis de la pared celular. Se cuantificó que los mutantes de *B. melitensis* presentaban hasta un 30 % menos de PG que las parentales Rev1 o 16M; en línea con estudios anteriores que concluyeron una menor cantidad de pared en las cepas rugosas que en las lisas, a partir de extractos brutos de *B. abortus* (Kreutzer et al., 1977). El resultado de composición del PG reveló en Rev1 un mayor número que en 16M de muropéptidos con Gly en lugar de Ala, estrategia frecuentemente aplicada por bacterias grampositivas para resistir a la vancomicina (Stogios y Savchenko, 2020). Esta relación se mantuvo en sus respectivos mutantes, con una presencia de Gly ligeramente disminuida respecto a la parental, de acuerdo con el resultado obtenido de susceptibilidad al aminoglucósido. Dado que estos residuos son activamente incorporados por las enzimas Ldt (Cava y De Pedro, 2014), se pudo observar una relación directa entre su proporción y la del entrecruzamiento total, condicionado por las variaciones en transpeptidación L,D. La conformación de la pared en los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ mostró una tendencia a presentar un menor entrecruzamiento L,D que las parentales entre hebras adyacentes, lo cual supondría una reducción en la integridad de la malla y en la resistencia al estrés osmótico (Takacs et al., 2013), tal y como se ha descrito para los mutantes de Rev1. Con todo ello, las diversas compensaciones expuestas insisten en el acoplamiento esencial, versátil y funcional entre la biosíntesis del LPS, OM y pared celular; y prueban la hipótesis inicial de que el bloqueo del O-PS provoca cambios pleiotrópicos en *Brucella*.

Las múltiples diferencias obtenidas en la caracterización de la envuelta celular en los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$, junto a la ausencia de O-PS externo explicarían su susceptibilidad a los péptidos catiónicos, debido a una mayor penetración y acceso a los grupos fosfato (Allen et al., 1998; Martínez de Tejada et al., 1995; Vaara, 1992), tal y como se ha reportado para otras cepas rugosas (González et al., 2008; Stranahan y Arenas-Gamboa, 2021; Zabalza Baranguá, 2017). Igualmente, todos ellos fueron drásticamente inhibidos por el sistema del complemento presente en suero ovino o bovino. No obstante, mientras que las diferencias en *B. melitensis* fueron cuantificadas tras 18 h de incubación con suero, tanto los mutantes de *B. abortus* como sus parentales sufrieron una pérdida completa de viabilidad en este tiempo (González et al., 2008), apreciándose diferencias en estas cepas con un tiempo más reducido de 3 h. Tal variación en la susceptibilidad entre especies es posible que sea consecuencia de la distinta naturaleza de su LPS, ya que no sólo una mayor longitud y densidad de moléculas de O-PS externas aportan resistencia a estos factores, sino también la propia configuración del R-LPS (Whitfield et al., 1997). Estos resultados *in vitro* de susceptibilidad de los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ a factores solubles del sistema inmune innato suponen una aproximación a su atenuación *in vivo*.

En modelo murino de infección esplénica, los mutantes 2308 Δwzm y S19 Δwzm de *B. abortus* se eliminaron alrededor de 9 semanas PI; persistencia inferior a las más de 30 o de 12 semanas, respectivamente, que tarda en resolverse la infección con 2308 o con las vacunas de referencia S19 y Rev1 (Grilló et al., 2012). Sorprendentemente, la eliminación de los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ se logró en un tiempo muy corto de alrededor de 4 semanas. Y, al contrario que con otros mutantes rugosos en *B. melitensis* (González et al., 2008; Zabalza Baranguá, 2017), disminuir la dosis de infección no incrementó su persistencia. Sin embargo, la dosis seleccionada sí influyó en la inmunogenicidad de la bacteria, ya que sólo con 10^8 UFC/mL de Rev1 Δwzm se obtuvo un aumento en el peso de los bazo a 2 semanas PI similar al generado por Rev1, el cual no se reprodujo con ninguno de los otros mutantes estudiados, y que suele ser consecuencia de un reclutamiento de neutrófilos y macrófagos para el control de la infección (Baldwin y Goenka, 2006; Guilloteau et al., 2003). La activación de los macrófagos es estimulada por una secreción interdependiente y regulada de IFN- γ , TNF- α e IL-12, fundamentales para frenar la infección intracelular de *Brucella* (Eckstein et al., 2020; Guilloteau et al., 2003; Kazemi et al., 2019) y despertar una respuesta inmune protectora (Baldwin y Goenka, 2006; Dorneles, Teixeira-Carvalho, et al., 2015; Jain-Gupta et al., 2019; Sancho et al., 2014). Conforme a ello, así como la producción de IL-12 e IL-6, citoquinas que contribuyen a la respuesta Th1 (Dorneles, Lima, et al., 2015), fue similar tras la inoculación con

los tres mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ y la de IL-6 mínima en suero a las primeras horas PI en comparación con Rev1 —al igual que se reporta para otros mutantes de *B. melitensis* que provocan esplenomegalia transitoria (Crawford et al., 1996)—, el mutante Rev1 Δwzm desencadenó la liberación en suero de altos niveles de TNF- α junto con IFN- γ . Además, la esplenomegalia transitoria causada por Rev1 Δwzm se tradujo en un pico de TNF- α en bazo mantenido hasta 3 semanas y en un aumento sostenido de la secreción local de IFN- γ que excedió la eliminación de la bacteria. Si bien el incremento del tamaño del bazo en ratones ha sido vinculado con el papel de los glucanos cíclicos en *B. abortus* (Roset et al., 2014), no se observaron diferencias a nivel de transcripción en los genes *cgs* y *cgt* de los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ que pudieran explicar las variaciones de esplenomegalia entre ellos. De hecho, 16M Δwzm presentó una mayor expresión de ambos genes que Rev1 y sus mutantes, pero no indujo inflamación del bazo.

La capacidad de Rev1 Δwzm para activar la respuesta inmune adaptativa quedó patente al detectarse por WB la formación de abundantes anticuerpos específicos frente a diversos epítomos de *Brucella* spp., los cuales reaccionaron intensamente con el O-PS. Por el contrario, 16M Δwzm , además de no provocar esplenomegalia y persistir tres veces más (Zabalza Baranguá, 2017), pareció desencadenar una menor cantidad de anticuerpos anti-O-PS, aportando una reacción moderada con el O-PS de las cepas lisas y no detectable en las rugosas. Tal diferencia de inmunogenicidad se manifestó en la eficacia de cada una de las cepas para inhibir *in vitro* brucellae virulentas. Mientras que los anticuerpos específicos no aportaron valor añadido a la acción inhibitoria del suero ovino frente a 16M y 2308, el suero de animales inmunizados con Rev1 Δwzm , y no así con 16M Δwzm , redujo la viabilidad de BoPA, especie que por ser naturalmente rugosa resulta especialmente accesible para los anticuerpos (Monreal et al., 2003). Sin embargo, la inmunidad humoral frente a las bacterias intracelulares presenta un papel limitado (Skendros y Boura, 2013); concentraciones elevadas de anticuerpos pueden incluso bloquear el efecto del complemento, por lo que es fundamental que su actuación se coordine con la inmunidad celular para promover la fagocitosis (Hoffmann y Houle, 1995). De hecho, la mayor efectividad de las vacunas vivas de *Brucella* sobre las vacunas con bacterias muertas radica en la respuesta inmune celular que las primeras logran despertar (Winter et al., 1996). Por ello, resultó determinante establecer, en comparación con el resto de mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$, la eficacia *in vivo* de Rev1 Δwzm en modelo murino preclínico.

La protección frente a la infección virulenta con *B. melitensis* que confirió la vacunación con 10^8 UFC/mL de Rev1 Δwzm por vía IP y SC en ratones resultó análoga a la del

grupo control Rev1, y superior a la proporcionada por Rev1 Δ wzt y Rev1 Δ wzm Δ wzt. Tal y como se ha determinado con otros mutantes rugosos (González et al., 2008), la aplicación de una dosis de vacunación inferior a la óptima causó una reducción de la eficacia. Esta diferencia entre la inmunogenicidad exhibida por los mutantes Rev1 Δ wzm/ Δ wzt puede ser debida a la presencia diferencial de las proteínas Wzm y Wzt, y apoyaría la hipótesis de que Wzt desempeña un importante papel en la inducción de inmunidad (X. Wang, Yan, et al., 2014). El reconocimiento terminal y unión del O-PS por esta proteína (Cuthbertson et al., 2007) podría entrañar modificaciones necesarias para aportar al antígeno su conformación definitiva. Adicionalmente, la sobreexpresión del gen *wzt* detectada en Rev1 Δ wzm, en caso de mantenerse a nivel de traducción, podría estar respondiendo a una acumulación de O-PS en el citoplasma. Además de frente a *B. melitensis*, Rev1 Δ wzm exhibió protección cruzada frente a *B. ovis*., igualando e incluso mejorando la mostrada por Rev1 por las vías SC e IP, probablemente debido a la exposición de epítomos comunes de R-LPS. De este modo, Rev1 Δ wzm podría utilizarse en aquellas regiones en las que ha reemergido la epididimitis ovina a consecuencia de la prohibición del uso de Rev1 (Picard-Hagen et al., 2015). Estos resultados demuestran que una gran persistencia no es un requisito fundamental para la inducción de inmunidad en modelo murino; hasta el momento, se había asumido la necesidad de sacrificar la seguridad en aras de la protección (Barrio et al., 2009; Grilló et al., 2000; Moriyón et al., 2004). De hecho, solamente los mutantes Δ wzm de 16M, con virulencia residual similar a Rev1, fueron igual de eficaces que esta cepa (González et al., 2008; Zabalza Baranguá, 2017), mientras que 16M Δ wzt presentó menor persistencia y protección (Z. Wang et al., 2014). Novedosamente, el mutante Rev1 Δ wzm se postula como un candidato igual de eficaz pero mucho más atenuado que la actual vacuna Rev1.

Una vez seleccionado el mutante Rev1 Δ wzm como un prometedor candidato vacunal, se determinó que su atenuación y demás propiedades no comprometerían, *a priori*, su producción a escala industrial, dado que Rev1 precisa de un manejo cuidadosamente estandarizado (Moriyón et al., 2004) y una limitación del número de pases en su propagación (Grilló et al., 2012). Así como la parental Rev1 utilizada en la construcción del mutante no sufrió disociación en las condiciones empleadas, su viabilidad se redujo al cabo de quince pases *in vitro*. Por el contrario, Rev1 Δ wzm permaneció estable tanto genética como fenotípicamente, ya que tras veinte pases en placa o cinco por ratón se detectó el mantenimiento de la mutación Δ wzm, la integridad de las regiones GI-2/*wbk* responsables de disociación en la parental, la producción de O-PS interno y su capacidad infectiva. Estos resultados sugieren que Rev1 Δ wzm no tiende a sufrir deriva antigénica.

Además, esta cepa mostró un crecimiento similar al de Rev1 incluso en presencia de CO₂, al contrario que 16MΔ*wzm* (Zabalza Baranguá, 2017), y resultó resistente al proceso de liofilización. Del mismo modo, Rev1Δ*wzm* se comportó como Rev1 frente a diversos tipos de estrés.

Los distintos ensayos de susceptibilidad al estrés ambiental con *B. melitensis* evidenciaron, además, una diferencia generalizada entre las parentales de Rev1Δ*wzm* y 16MΔ*wzm*, plasmada a su vez en el comportamiento de los mutantes. La inhibición total o parcial de las cepas en condiciones de desecación es consecuencia del efecto, no sólo de la plasmólisis en un medio hiperosmótico con nula actividad de agua, sino también de otros factores biofísicos como el estrés oxidativo y la radiación solar, permaneciendo el daño sufrido por el material genético y proteínas más allá de la rehidratación (Potts, 1994). La mayor supervivencia de 16M a la desecación puede deberse a propiedades descritas intrínsecas a la propia cepa, tales como diferencias de membrana, EPS y glucanos cíclicos, los cuales regulan la presión osmótica entre las membranas (Potts, 1994; Roset et al., 2014). Interesantemente, los genes que codifican por estos azúcares periplasmáticos aparecieron más expresados en la cepa virulenta que en Rev1. Dado que los glucanos cíclicos también están involucrados en la resistencia a detergentes y estrés oxidativo (Mirabella et al., 2013), así como en la evasión de la respuesta inmune del hospedador (Arellano-Reynoso et al., 2005; Briones et al., 2001; Haag et al., 2010; Roset et al., 2014), en caso de mantenerse a nivel de traducción, dicha disminución en la expresión de *cgs* y *cgt* sería consistente con la mayor susceptibilidad descrita a estos factores y atenuación de Rev1.

Diversos estudios de genómica (Issa y Ashhab, 2016), transcriptómica (Kornspan et al., 2020; Salmon-Divon et al., 2018, 2019) y proteómica (DelVecchio et al., 2002; Eschenbrenner et al., 2002) han descrito la existencia de modificaciones en Rev1, en comparación con 16M, que afectan a su metabolismo y se relacionan con una disminución de su virulencia. Entre ellas se encontraron mutaciones en genes de la síntesis de pared celular (Salmon-Divon et al., 2018) que podrían explicar la susceptibilidad de Rev1 a la penicilina y las diferencias en la conformación de PG observadas. Además, la existencia de modificaciones entre la pared celular de Rev1 y 16M explicaría el porqué de la detección mediante WB de una banda de ≈29 kDa en la cepa vacunal y sus mutantes, pero no en la virulenta; estos anticuerpos generados en animales inmunizados con Rev1 y, especialmente, con Rev1Δ*wzm* —que presentó un 14,3 % menos de pared celular— podrían ser específicos frente a proteínas enmascaradas por el PG (Godessart et al., 2021) en el caso de 16M y su mutante y, por lo tanto, menos accesibles al sistema inmune. Tal

particularidad antigénica podría ser de especial interés para el desarrollo de una prueba diagnóstica específica con el fin de diferenciar los animales vacunados con Rev1 o Rev1 Δ wzm de la infección virulenta por *B. melitensis* o *B. ovis*.

Adicionalmente, el uso de anticuerpos monoclonales permitió identificar mediante WB otras diferencias de antigenicidad entre Rev1 y 16M. Aunque la respuesta resultó moderada en ambas cepas, la primera exhibió una señal más intensa con el mAb 33H8: C/Y (A = M) que con el 42D2: C/Y (A > M) de manera sistemática. Hasta la fecha, el epítipo C/Y (A > M) se ha identificado como una cadena de $\geq(\alpha-1,2)_5$, mientras que el C/Y (A = M) no parece corresponder a unidades más cortas que hexasacáridos (Zygmunt et al., 2015). Por ello, es razonable deducir que, aunque en *B. melitensis* prevalecerían cadenas en $\alpha-1,2$ con menos de 6 residuos, estas serían más largas en Rev1; o, en otras palabras, esta cepa presentaría una conformación diferente de su O-PS con menor proporción de enlaces $\alpha-1,3$ que 16M. Esta diferencia antigénica podría estar relacionada con la variación en la transcripción de los genes de biosíntesis de O-PS obtenida en Rev1 respecto a 16M: menor para *wbkA*, *wbkD*, *wbkE* y *wbkF* y mayor para *gmd*. Además, también se detectó en el mutante 16M Δ wzm un aumento de *gmd* respecto a 16M, sobreexpresión no reproducida por Rev1 Δ wzm respecto a su parental. Todo ello abriría la puerta a diferencias antigénicas en el O-PS de 16M, Rev1 y sus mutantes.

En otras bacterias gramnegativas se ha relacionado la exposición de cadenas cortas de O-PS con una mayor susceptibilidad a la fagocitosis (Williams et al., 2017). Esta puede ser la causa de la pérdida de virulencia de Rev1, dada la disminución de la expresión de algunos de los genes de biosíntesis de su cadena en comparación con la de 16M. De hecho, la atenuación de Rev1 podría estar relacionada con la mayor susceptibilidad observada no sólo a péptidos catiónicos, sino también al pH ácido y estrés oxidativo, propios del ambiente del nicho intracelular. Esta diferencia en la longitud del O-PS entre parentales es esperable que se conserve en sus mutantes. Efectivamente, 16M Δ wzm es más resistente a estos factores que Rev1 Δ wzm, y capaz de persistir más tiempo en ratón al escapar al sistema inmune generando una respuesta inflamatoria a nivel esplénico reducida (Zabalza Baranguá, 2017). Asimismo, 16M Δ wzm parece despertar una respuesta serológica menos intensa, en vista de la menor señal obtenida en WB con los anticuerpos anti-O-PS que genera en comparación con Rev1 Δ wzm. El hecho de que Rev1 Δ wzm mantuviera la fuerte susceptibilidad a factores ambientales mostrada por Rev1, mayor que la de 16M y su mutante, es trascendente para evitar focos de infección y transmisión no sólo en fluidos animales, sino a través del alimento y agua de bebida (Her et al., 2010).

Por tanto, se puede concluir que, además de la mutación particular, la parental ejerce una influencia decisiva sobre las cepas derivadas de ella (Barrio et al., 2009; González et al., 2008). La combinación de las características intrínsecas a cada cepa o especie de *Brucella* y el efecto derivado de truncar diferencialmente el sistema transportador de O-PS Wzm/Wzt origina un patrón particular no predecible de atenuación y protección en modelo murino (Tabla S1), poniendo de manifiesto el singular equilibrio entre seguridad e inmunogenicidad del mutante Rev1 Δ wzm.

Tabla S1. Resumen de las propiedades vacunales de distintos mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ de *Brucella* spp. en modelos murinos

Parental	Gen mutado	Referencia	Dosis (UFC/ratón)	Persistencia vía IP (semanas PI)	Esplenomegalia	Cepa de <i>challenge</i> vía IP/dosis (UFC/ratón)	UP vía IP	UP vía SC	Control/UP	
<i>B. melitensis</i>	16M	<i>wzm</i>	González et al., 2008	10 ⁸	>6	No	H38/1 × 10 ⁴	3,1-3,7 ^a	4,1	Rev1/3,2
		<i>wzm</i>	Zabalza Baranguá, 2017	10 ⁸	10-12	No	H38/1 × 10 ⁴	4,2	3,9	Rev1/3,8
		<i>wzt</i>	Z. Wang, Niu, et al., 2014	10 ⁶	9-10	ND	16M/1 × 10 ⁵	2,0	ND	M5/2,3
		<i>wzm</i>	Este capítulo	10 ⁸	3-4	Sí	H38/1 × 10 ⁴	3,9	3,4	Rev1/4,5
	Rev1	<i>wzt</i>	Este capítulo	10 ⁸	4	No	H38/1 × 10 ⁴	3,7	0,9	Rev1/4,5
		<i>wzm-wzt</i>	Este capítulo	10 ⁸	3-4	Heterogénea	H38/1 × 10 ⁴	2,7	2,6	Rev1/4,5
<i>B. abortus</i>	2308	<i>wzm</i>	Este capítulo	10 ⁸	9	No	2308/5 × 10 ⁴	3,0	1,9	S19/3,7
		<i>wzt</i>	Zhang et al., 2013	10 ⁷	3	ND	2308/1 × 10 ⁷	5,8 ^b	ND	RB51/5,8 ^b
			X. Wang, Wang, et al., 2014	10 ⁸	>8	No	ND	ND	ND	ND
	S19	<i>wzm</i>	Este capítulo	10 ⁸	7-9	No	2308/5 × 10 ⁴	2,3	1,8	S19/3,7
			Lalsiamthara et al., 2020	10 ⁶⁻⁵	8-13	ND	544/2 × 10 ⁵	1,9	ND	S19/2,9
	<i>wzt</i>	X. Wang, Wang, et al., 2014	10 ⁸	>8	No	ND	ND	ND	ND	
<i>B. suis</i>	bv2	<i>wzm</i>	Aragón-Aranda et al., 2020	10 ⁸	<6	Sí	<i>B. suis</i> 2/1 × 10 ⁵	ND	3,9	Rev1/3,0
		<i>wzm</i>	Poveda Urkixo, 2022	10 ⁸	>10	Sí	<i>B. suis</i> 2/2 × 10 ⁵	4,1	3,1	ND

^a 3,7 UP con 10 ratones/grupo; ^b Valor de UP calculado con los datos de protección total reportados por los autores (0 UFC/bazo) y considerando como el límite de detección log 5 UFC/bazo = 0,70; además, la protección de este mutante está realizada sacrificando los animales a 1 semana post-*challenge*, en lugar de a las 2 semanas del modelo de referencia; ND: no determinado; UP: unidades de protección calculadas como la media del log₁₀ UFC/bazo en el control PBS menos la del grupo inoculado con el mutante correspondiente.

Bibliografía

- Akova, M., Gür, D., Livermore, D. M., Kocagöz, T. y Akalin, H. E. (1999). *In vitro* activities of antibiotics alone and in combination against *Brucella melitensis* at neutral and acidic pHs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(5), 1298-1300. <https://doi.org/10.1128/aac.43.5.1298>
- Allen, C. A., Adams, L. G. y Ficht, T. A. (1998). Transposon-derived *Brucella abortus* rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. *Infection and Immunity*, 66(3), 1008-1016. <https://doi.org/10.1128/iai.66.3.1008-1016.1998>
- Alton, G. G., Elberg, S. S. y Crouch, D. (1967). Rev. 1 *Brucella melitensis* vaccine. The stability of the degree of attenuation. *Journal of Comparative Pathology*, 77(3), 293-300. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(67\)90038-2](https://doi.org/10.1016/0021-9975(67)90038-2)
- Alton, G. G., Jones, L., Angus, R. y Verger, J. (1988). *Techniques for the brucellosis laboratory*. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Paris, France.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Alvarez, L., Cordier, B., van Teeffelen, S. y Cava, F. (2020). Analysis of Gram-negative bacteria peptidoglycan by ultra-performance liquid chromatography. *Bio-Protocol*, 10(19), 1-14. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3780>
- Amaral-Silva, D., Al-Gousous, J., Davies, N. M., Bou Chacra, N., Webster, G. K., Lipka, E., Amidon, G. y Löbenberg, R. (2019). Simulated, biorelevant, clinically relevant or physiologically relevant dissolution media: The hidden role of bicarbonate buffer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 142(May), 8-19. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.06.006>
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 48, Suppl 1:5-16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5
- Aragón-Aranda, B., De Miguel, M. J., Lázaro-Antón, L., Salvador-Bescós, M., Zúñiga-Ripa, A., Moriyón, I., Iriarte, M., Muñoz, P. M. y Conde-Álvarez, R. (2020). Development of attenuated live vaccine candidates against swine brucellosis in a non-zoonotic *B. suis* biovar 2 background. *Veterinary Research*, 51(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00815-8>
- Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A. E., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyón, I. y Gorvel, J. P. (2005). Cyclic β -1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nature Immunology*, 6(6), 618-625. <https://doi.org/10.1038/ni1202>
- Ariza, J., Bosch, J., Gudiol, F., Liñares, J., Viladrich, P. F. y Martín, R. (1986). Relevance of *in vitro* antimicrobial susceptibility of *Brucella melitensis* to relapse rate in human brucellosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 30(6), 958-960. <https://doi.org/10.1128/AAC.30.6.958>
- Atun, G., Hisarli, G. y Tunçay, M. (1998). Adsorption of safranin-O on hydrophilic and hydrophobic

- glass surfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 143(1), 27-33. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(98\)00494-4](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(98)00494-4)
- Avila-Calderón, E. D., Medina-Chávez, O., Flores-Romo, L., Hernández-Hernández, J. M., Donis-Maturano, L., López-Merino, A., Arellano-Reynoso, B., Aguilera-Arreola, M. G., Ruiz, E. A., Gomez-Lunar, Z., Witonsky, S. y Contreras-Rodríguez, A. (2020). Outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* modulate immune response and induce cytoskeleton rearrangement in peripheral blood mononuclear cells. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1-18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.556795>
- Baldwin, C. L. y Goenka, R. (2006). Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: Does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? *Critical reviews in immunology*, 26(5), 407-442. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.v26.i5.30>
- Banai, M., Adams, L. G., Frey, M., Pugh, R. y Ficht, T. A. (2002). The myth of *Brucella* L-forms and possible involvement of *Brucella* penicillin-binding proteins (PBPs) in pathogenicity. *Veterinary Microbiology*, 90(1-4), 263-279. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00213-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00213-4)
- Barrio, M. B., Grilló, M. J., Muñoz, P. M., Jacques, I., González, D., De Miguel, M. J., Marín, C. M., Barberán, M., Letesson, J. J., Gorvel, J. P., Moriyón, I., Blasco, J. M. y Zygmunt, M. S. (2009). Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less effective than Rev 1 vaccine against *Brucella melitensis* infection of sheep. *Vaccine*, 27(11), 1741-1749. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.025>
- Blasco, J. M. y Díaz, R. (1993). *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine as a cause of human brucellosis. *The Lancet*, 342(8874), 805. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)91571-3](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)91571-3)
- Blumberg, P. M. y Strominger, J. L. (1974). Interaction of penicillin with the bacterial cell: Penicillin-binding proteins and penicillin sensitive enzymes. *Bacteriological Reviews*, 38(3), 291-335. <https://doi.org/10.1128/mmbr.38.3.291-335.1974>
- Brones, G., Iñón de Iannino, N., Roset, M., Vigliocco, A., Silva Paulo, P. y Ugalde, R. A. (2001). *Brucella abortus* cyclic β -1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infection and Immunity*, 69(7), 4528-4535. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4528-4535.2001>
- Caffalette, C. A. y Zimmer, J. (2021). Cryo-EM structure of the full-length WzmWzt ABC transporter required for lipid-linked O antigen transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(1), 1-10. <https://doi.org/10.1073/pnas.2016144118>
- Capasso, C. y Supuran, C. (2017). Inhibition of bacterial carbonic anhydrases as a novel approach to escape drug resistance. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(11), 1237-1248. <https://doi.org/10.2174/1568026617666170104101058>
- Caro-Hernández, P., Fernández-Lago, L., De Miguel, M. J., Martín-Martín, A. I., Cloeckaert, A., Grilló,

- M. J. y Vizcaíno, N. (2007). Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. *Infection and Immunity*, 75(8), 4050-4061. <https://doi.org/10.1128/IAI.00486-07>
- Cava, F. y De Pedro, M. A. (2014). Peptidoglycan plasticity in bacteria: Emerging variability of the murein sacculus and their associated biological functions. *Current Opinion in Microbiology*, 18(1), 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.01.004>
- Cheung, C., Lee, J., Lee, J. y Shevchuk, O. (2009). The effect of ionic (NaCl) and non-ionic (sucrose) osmotic stress on the expression of β -galactosidase in wild type *E.coli* BW25993 and in the isogenic BW25993 Δ lacI mutant. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)*, 13(April), 1-6.
- Clarck, D. P. y Pazdernik, N. J. (2009). *Biotechnology: Applying the Genetic Revolution* (1st ed.). Elsevier Academic Press.
- Clifton, L. A., Ciesielski, F., Skoda, M. W. A., Paracini, N., Holt, S. A. y Lakey, J. H. (2016). The effect of lipopolysaccharide core oligosaccharide size on the electrostatic binding of antimicrobial proteins to models of the Gram-negative bacterial outer membrane. *Langmuir*, 32(14), 3485-3494. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b00240>
- Corbel, M. J. (2006). Brucellosis in humans and animals. En *World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Organisation for Animal Health* (p. 102).
- Corkill, J. E., Deveney, J., Pratt, J., Shears, P., Smyth, A., Heaf, D. y Hart, C. (1994). Effect of pH and CO₂ on *in vitro* susceptibility of *Pseudomonas cepacia* to beta-lactams. *Pediatric research*, 35(3), 299-302. <https://doi.org/10.1203/00006450-199403000-00003>
- Crawford, R. M., Van De Verg, L., Yuan, L., Hadfield, T. L., Warren, R. L., Drazek, E. S., Hough, H. H., Hammack, C., Sasala, K., Polsinelli, T., Thompson, J., y Hoover, D. L. (1996). Deletion of *purE* attenuates *Brucella melitensis* infection in mice. *Infection and immunity*, 64(6), 2188-2192. <https://doi.org/10.1128/iai.64.6.2188-2192.1996>
- Cuthbertson, L., Kimber, M. S. y Whitfield, C. (2007). Substrate binding by a bacterial ABC transporter involved in polysaccharide export. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19529-19534. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705709104>
- Cuthbertson, L., Powers, J. y Whitfield, C. (2005). The C-terminal domain of the nucleotide-binding domain protein Wzt determines substrate specificity in the ATP-binding cassette transporter for the lipopolysaccharide O-antigens in *Escherichia coli* serotypes O8 and O9a. *Journal of Biological Chemistry*, 280(34), 30310-30319. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504371200>
- Czerwonka, G., Guzy, A., Kałuża, K., Grosicka, M., Dańczuk, M., Lechowicz, Ł., Gmitter, D., Kowalczyk, P. y Kaca, W. (2016). The role of *Proteus mirabilis* cell wall features in biofilm formation. *Archives of Microbiology*, 198(9), 877-884. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1249-x>
- Daniels, J. A., Krishnamurthi, R. y Rizvi, S. S. H. (1985). A review of effects of carbon dioxide on

- microbial growth and food quality. *Journal of Food Protection*, 48(6), 532-537. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-48.6.532>
- Davis, S. D., Iannetta, A. y Wedgwood, R. J. (1971). Paradoxical synergism and antagonism between serum and the antibacterial activity of colistin. *Journal of Infectious Diseases*, 123(4), 392-398. <https://doi.org/10.1093/infdis/123.4.392>
- Debs-Louka, E., Louka, N., Abraham, G., Chabot, V. y Allaf, K. (1999). Effect of compressed carbon dioxide on microbial cell viability. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 626-631. <https://doi.org/10.1128/aem.65.2.626-631.1999>
- DelVecchio, V. G., Wagner, M. A., Eschenbrenner, M., Horn, T. A., Kraycer, J. A., Estock, F., Elzer, P. y Mujer, C. V. (2002). *Brucella* proteomes - A review. *Veterinary Microbiology*, 90(1-4), 593-603. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00239-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00239-0)
- Dohnalkova, A. C., Marshall, M. J., Arey, B. W., Williams, K. H., Buck, E. C. y Fredrickson, J. K. (2011). Imaging hydrated microbial extracellular polymers: Comparative analysis by electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1254-1262. <https://doi.org/10.1128/AEM.02001-10>
- Dong, H., Liu, W., Peng, X. y Wu, Q. (2015). The effects of RegM on stress responses in *Brucella melitensis*. *Current Microbiology*, 70(5), 730-734. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0782-1>
- Dorneles, E. M. S., Lima, G. K., Teixeira-Carvalho, A., Araújo, M. S. S., Martins-Filho, O. A., Sriranganathan, N., Al Qublan, H., Heinemann, M. B. y Lage, A. P. (2015). Immune response of calves vaccinated with *Brucella abortus* S19 or RB51 and revaccinated with RB51. *PLoS ONE*, 10(9), e0136696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136696>
- Dorneles, E. M. S., Teixeira-Carvalho, A., Araújo, M. S. S., Sriranganathan, N. y Lage, A. P. (2015). Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination. En *Vaccine* (Vol. 33, Número 31, pp. 3659-3666). *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.05.057>
- Dunkelberger, J. R. y Song, W. C. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*, 20(1), 34-50. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.139>
- Eckstein, C., Mol, J. P. S., Costa, F. B., Nunes, P. P., Lima, P. A., Melo, M. M., Carvalho, T. P., Santos, D. O., Silva, M. F., Carvalho, T. F., Costa, L. F., Melo Junior, O. A. O., Giunchette, R. C., Paixão, T. A. y Santos, R. L. (2020). *Brucella ovis* mutant in ABC transporter protects against *Brucella canis* infection in mice and it is safe for dogs. *PLoS ONE*, 15(4), 1-20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231893>
- Eschenbrenner, M., Wagner, M. A., Horn, T. A., Kraycer, J. A., Mujer, C. V., Hagijs, S., Elzer, P. y DelVecchio, V. G. (2002). Comparative proteome analysis of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev 1 and a virulent strain 16M. *Journal of Bacteriology*, 184(18), 4962-4970. <https://doi.org/10.1128/JB.184.18.4962-4970.2002>
- Eskra, L., Canavessi, A., Carey, M. y Splitter, G. (2001). *Brucella abortus* genes identified following constitutive growth and macrophage infection. *Infection and Immunity*, 69(12), 7736-7742. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7736-7742.2001>

- España, Ministerio de Economía y Competitividad. (2015). *Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Boletín Oficial del Estado*, 34 (pp. 27940-27973).
- España, Ministerio de la Presidencia. (2013). *Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Boletín Oficial del Estado*, 34 (pp. 11370-11421).
- EUCAST: European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. En *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)*.
- Fletcher, M. y Loeb, G. I. (1979). Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine *Pseudomonas* to solid surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 37(1), 67-72. <https://doi.org/10.1128/aem.37.1.67-72.1979>
- Fontana, C., Conde-Álvarez, R., Ståhle, J., Holst, O., Iriarte, M., Zhao, Y., Arce-Gorvel, V., Hanniffy, S., Gorvel, J.-P., Moriyón, I. y Widmalm, G. (2016). Structural studies of lipopolysaccharide-defective mutants from *Brucella melitensis* identify a core oligosaccharide critical in virulence. *Journal of Biological Chemistry*, 291(14), 7727-7741. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.701540>
- Forthal, D. N. (2015). Functions of antibodies. En *Antibodies for Infectious Diseases* (Vol. 2, Número 4, pp. 25-48). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1128/9781555817411.ch2>
- Gamazo, C. y Moriyón, I. (1987). Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infection and Immunity*, 55(3), 609-615. <https://doi.org/10.1128/iai.55.3.609-615.1987>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. y Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. En J. M. Walker (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press (pp. 571-607). <https://doi.org/10.1385/1592598900>
- Godefroid, M., Svensson, M. V., Cambier, P., Uzureau, S., Mirabella, A., De Bolle, X., Van Cutsem, P., Widmalm, G. y Letesson, J. J. (2010). *Brucella melitensis* 16M produces a mannan and other extracellular matrix components typical of a biofilm. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59(3), 364-377. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00689.x>
- Godessart, P., Lannoy, A., Dieu, M., Van der Verren, S. E., Soumillion, P., Collet, J. F., Remaut, H., Renard, P. y De Bolle, X. (2021). β -barrels covalently link peptidoglycan and the outer membrane in the α -proteobacterium *Brucella abortus*. *Nature Microbiology*, 6(1), 27-33. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00799-3>
- Godfroid, F., Cloeckart, A., Taminiou, B., Danese, I., Tibor, A., De Bolle, X., Mertens, P. y Letesson, J. J. (2000). Genetic organisation of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of *Brucella melitensis* 16M (*wbk*). *Research in microbiology*, 151(8), 655-668. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(00\)90130-x](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(00)90130-x)

- Goldberg, J. B. (1999). Genetics of Bacterial Polysaccharides. En *Genetics of Bacterial Polysaccharides* (1st ed.). CRC Press LLC. <https://doi.org/10.1201/9781420074413>
- González, D., Grilló, M. J., De Miguel, M. J., Ali, T., Arce-Gorvel, V., Delrue, R. M., Conde-Alvarez, R., Muñoz, P. M., López-Goñi, I., Iriarte, M., Marín, C. M., Weintraub, A., Widmalm, G., Zygmunt, M., Letesson, J. J., Gorvel, J. P., Blasco, J. M. y Moriyón, I. (2008). Brucellosis vaccines: Assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *PLoS one*, 3(7), e2760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002760>
- Green, M. R. y Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.
- Grilló, M. J., Blasco, J. M., Gorvel, J., Moriyón, I. y Moreno, E. (2012). What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Veterinary Research*, 43(1), 1-35. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-29>
- Grilló, M. J., Bosseray, N. y Blasco, J. M. (2000). *In vitro* markers and biological activity in mice of seed lot strains and commercial *Brucella melitensis* Rev 1 and *Brucella abortus* B19 vaccines. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, 28(2), 119-127. <https://doi.org/10.1006/biol.2000.0249>
- Grilló, M. J., De Miguel, M. J., Muñoz, P. M., Marín, C. M., Ariza, J. y Blasco, J. M. (2006). Efficacy of several antibiotic combinations against *Brucella melitensis* Rev 1 experimental infection in BALB/c mice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(3), 622-626. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl289>
- Grilló, M. J., Manterola, L., De Miguel, M. J., Muñoz, P. M., Blasco, J. M., Moriyón, I. y 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(15), 2910-2916. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.12.038>
- Grilló, M. J., San Román Aberasturi, B., Palacios Chaves, L., Mena Bueno, S. y Zabalza Baranguá, A. (2017). *A modified Brucella vaccine strain for the treatment of brucellosis* (WO/2019/101993-International patent application N.º PCT/EP2018/082539).
- Guilloteau, L. A., Dornand, J., Gross, A., Olivier, M., Cortade, F., Le Vern, Y. y Kerboeuf, D. (2003). Nramp1 is not a major determinant in the control of *Brucella melitensis* infection in mice. *Infection and Immunity*, 71(2), 621-628. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.2.621-628.2003>
- Haag, A. F., Myka, K. K., Arnold, M. F. F., Caro-Hernández, P. y Ferguson, G. P. (2010). Importance of lipopolysaccharide and cyclic β -1,2-glucans in *Brucella*-mammalian infections. *International Journal of Microbiology*, 2010(124509), 1-12. <https://doi.org/10.1155/2010/124509>
- Hancock, R. E. (1981). Aminoglycoside uptake and mode of action - with special reference to streptomycin and gentamicin. II. Effects of aminoglycosides on cells. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 8(4), 249-276. <https://doi.org/10.1093/Jac/8.4.249>
- Hensel, M. E., Garcia-Gonzalez, D. G., Chaki, S. P., Hartwig, A., Gordy, P. W., Bowen, R., Ficht, T. A., y Arenas-Gamboa, A. M. (2020). Vaccine candidate *Brucella melitensis* 16M Δ vjbR is safe in a

- pregnant sheep model and confers protection. *mSphere*, 5(3), e00120-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00120-20>
- Her, M., Cho, D. H., Kang, S. Il, Cho, Y. S., Hwang, I. Y., Bae, Y. C., Yoon, H., Heo, Y. R., Jung, S. C. y Yoo, H. (2010). The development of a selective medium for the *Brucella abortus* strains and its comparison with the currently recommended and used medium. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 67(1), 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.12.013>
- Higuchi, R., Krummel, B. y Saiki, R. (1988). A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Research*, 16(15), 7351-7367. <https://doi.org/10.1093/nar/16.15.7351>
- Hoffmann, E. M. y Houle, J. J. (1995). Contradictory roles for antibody and complement in the interaction of *Brucella abortus* with its host. *Critical Reviews in Microbiology*, 21(3), 153-163. <https://doi.org/10.3109/10408419509113538>
- Hou, H., Liu, X. y Peng, Q. (2019). The advances in brucellosis vaccines. *Vaccine*, 37(30), 3981-3988. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.05.084>
- Irazoki, O., Hernandez, S. B. y Cava, F. (2019). Peptidoglycan muropeptides: Release, perception, and functions as signaling molecules. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00500>
- Issa, M. N. y Ashhab, Y. (2016). Identification of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine-strain genetic markers: Towards understanding the molecular mechanism behind virulence attenuation. *Vaccine*, 34(41), 4884-4891. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.059>
- Izquierdo, L., Merino, S., Regué, M., Rodriguez, F. y Tomás, J. M. (2003). Synthesis of a *Klebsiella pneumoniae* O-antigen heteropolysaccharide (O12) requires an ABC 2 transporter. *Journal of Bacteriology*, 185(5), 1634-1641. <https://doi.org/10.1128/JB.185.5.1634-1641.2003>
- Jain-Gupta, N., Waldrop, S. G., Tenpenny, N. M., Witonsky, S. G., Boyle, S. M. y Sriranganathan, N. (2019). Rough *Brucella neotomae* provides protection against *Brucella suis* challenge in mice. *Veterinary Microbiology*, 239. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108447>
- Jankowski, A., Jankowski, S., Mirończyk, A. y Niedbach, J. (2005). The action of photosensitizers and serum in a bactericidal process. II. The effects of dyes: Hypericin, eosin Y and saphranine O. *Polish Journal of Microbiology*, 54(4), 323-330.
- Jensen, A. E. y Halling, S. M. (2010). Effect of polymyxin B and environmental conditions on isolation of *Brucella* species and the vaccine strain RB51. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 33(2), 121-131. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2008.08.005>
- Johnson, Z. I. y Chisholm, S. W. (2004). Properties of overlapping genes are conserved across microbial genomes. *Genome Research*, 14(11), 2268-2272. <https://doi.org/10.1101/gr.2433104>
- Kamens, J. (2015). The Addgene repository: An international nonprofit plasmid and data resource. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D1152-D1157. <https://doi.org/10.1093/nar/gku893>

- Kanehisa, M. y Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kawai, Y., Mercier, R., Wu, L. J., Domínguez-Cuevas, P., Oshima, T. y Errington, J. (2015). Cell growth of wall-free L-form bacteria is limited by oxidative damage. *Current Biology*, 25(12), 1613-1618. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.031>
- Kazemi, S., Vaisi-Raygani, A., Keramat, F., Saidijam, M., Soltanian, A. R., Alahgholi-Hajibehzad, M., Hashemi, S. H. y Alikhani, M. Y. (2019). Evaluation of the relationship between IL-12, IL-13 and TNF- α gene polymorphisms with the susceptibility to brucellosis: A case control study. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4678-8>
- Khan, S. R., Gaines, J., Roop, R. M. y Farrand, S. K. (2008). Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), 5053-5062. <https://doi.org/10.1128/AEM.01098-08>
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J. y Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423-435. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>
- Kornspan, D., Lubkovskaia, R., Mathur, S., Yeheskel, A. y Salmon-Divon, M. (2020). Genomic analysis of natural rough *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine strains: identification and characterization of mutations in key genes associated with bacterial lps biosynthesis and virulence. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 1-15. <https://doi.org/10.3390/ijms21249341>
- Kreutzer, D. L., Scheffel, J. W., Draper, L. R. y Robertson, D. C. (1977). Mitogenic activity of cell wall components from smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infection and Immunity*, 15(3), 842-845. <https://doi.org/10.1128/iai.15.3.842-845.1977>
- Kuo, J. (2007). *Electron Microscopy: Methods and Protocols* (2nd ed.). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-776-1>
- Kwa, A., Kasiakou, S. K., Tam, V. H. y Falagas, M. E. (2007). Polymyxin B: Similarities to and differences from colistin (polymyxin E). *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 5(5), 811-821. <https://doi.org/10.1586/14787210.5.5.811>
- Lalsiamthara, J., Kaur, G., Gogia, N., Ali, S. A., Goswami, T. K. y Chaudhuri, P. (2020). *Brucella abortus* S19 *rfbD* mutant is highly attenuated, DIVA enable and confers protection against virulent challenge in mice. *Biologicals*, 63, 62-67. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.11.005>
- Leong, D., Díaz, R., Milner, K., Rudbach, J. y Wilson, J. B. (1969). Some structural and biological properties of *Brucella* endotoxin. *Infection and immunity*, 1(2), 174-182. <https://doi.org/10.1128/iai.1.2.174-182.1970>
- Lepage, S., Lakaye, B., Galleni, M., Thamm, I., Crine, M., Gros Lambert, S. y Frère, J. M. (1995). Saturation of penicillin-binding protein 1 by β -lactam antibiotics in growing cells of *Bacillus licheniformis*. *Molecular Microbiology*, 16(2), 365-372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02308.x>

- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Livermore, D. M. (1987). Mechanisms of resistance to cephalosporin antibiotics. *Drugs*, 34(2), 64–88. <https://doi.org/10.2165/00003495-198700342-00007>
- MacCain, W. J., Kannan, S., Jameel, D. Z., Jerry M. Troutman, K. y Young, K. D. (2018). A defective undecaprenyl pyrophosphate synthase induces mutations in the isoprenoid pathway of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 200(18), 1–18.
- Madyagol, M., Al-Alami, H., Levarski, Z., Drahovská, H., Turňa, J. y Stuchlík, S. (2011). Gene replacement techniques for *Escherichia coli* genome modification. *Folia Microbiologica*, 56(3), 253–263. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0035-z>
- Maier, R. M. y Pepper, I. L. (2015). Bacterial Growth. En *Environmental Microbiology* (3rd ed., pp. 37–56). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00003-X>
- Mancilla, M., Grilló, M. J., De Miguel, M. J., López-Goñi, I., San-Román, B., Zabalza-Baranguá, A. y Moriyón, I. (2013). Deletion of the GI-2 integrase and the *wbKA* flanking transposase improves the stability of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine. *Veterinary Research*, 44(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-105>
- Manning, A. J. y Kuehn, M. J. (2013). Functional advantages conferred by extracellular prokaryotic membrane vesicles. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 23(1–2), 131–141. <https://doi.org/10.1159/000346548>
- Martínez de Tejada, G., Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E. y Moriyón, I. (1995). The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infection and Immunity*, 63(8), 3054–3061. <https://doi.org/10.1128/iai.63.8.3054-3061>
- Mateu-de-Antonio, E. M. y Martín, M. (1995). *In vitro* efficacy of several antimicrobial combinations against *Brucella canis* and *Brucella melitensis* strains isolated from dogs. *Veterinary Microbiology*, 45(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)00122-D](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)00122-D)
- Mirabella, A., Terwagne, M., Zygmunt, M. S., Cloeckaert, A., De Bolle, X. y Letesson, J. J. (2013). *Brucella melitensis* MucR, an orthologue of *Sinorhizobium meliloti* MucR, is involved in resistance to oxidative, detergent, and saline stresses and cell envelope modifications. *Journal of Bacteriology*, 195(3), 453–465. <https://doi.org/10.1128/JB.01336-12>
- Mohammad, M. M., Tomita, N., Ohta, M. y Movileanu, L. (2016). The transmembrane domain of a bicomponent ABC transporter exhibits channel-forming activity. *ACS Chemical Biology*, 11(9), 2506–2518. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00383>
- Monreal, D., Grilló, M. J., González, D., Marín, C. M., De Miguel, M. J., López-Goñi, I., Blasco, J. M., Cloeckaert, A. y Moriyón, I. (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. *Infection and immunity*, 71(6), 3261-3271. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3261-3271.2003>
- Morè, N., Martorana, A. M., Biboy, J., Otten, C., Winkle, M., Gurnani Serrano, C. K., Silva, A. M., Atkinson, L., Yau, H., Breukink, E., Den Blaauwen, T., Vollmer, W. y Polissi, A. (2019). Peptidoglycan remodeling enables *Escherichia coli* to survive severe outer membrane assembly defect. *mBio*, 10(1), 1-18. <https://doi.org/10:e02729-18>
- Moriyón, I., Grilló, M. J., Monreal, D., González, D., Marín, C., López-Goñi, I., Mainar-Jaime, R. C., Moreno, E. y Blasco, J. M. (2004). Rough vaccines in animal brucellosis: Structural and genetic basis and present status. *Veterinary research*, 35(1), 1-38. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003037>
- Mueller, E. A. y Levin, P. A. (2020). Bacterial cell wall quality control during environmental stress. *mBio*, 11(5), 1-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.02456-20>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S. y Pfaller, M. A. (2016). *Medical Microbiology* (8.ª ed.). Elsevier.
- Nakao, R., Ramstedt, M., Wai, S. N. y Uhlin, B. E. (2012). Enhanced biofilm formation by *Escherichia coli* LPS mutants defective in Hep biosynthesis. *PLoS ONE*, 7(12), 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051241>
- Nakashima, N. y Miyazaki, K. (2014). Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2), 2773-2793. <https://doi.org/10.3390/ijms15022773>
- OIE. (2022). Chapter 3.1.4: Brucellosis (Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). En *Office International of Epizootics, World Organisation for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. (8th ed.). World Organisation for Animal Health.
- OMPI: Organización Mundial de la Propiedad Intelectual. (1977). *Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para fines de patentes*. <https://doi.org/10.1017/s0020782900045046>
- Pasupuleti, M., Schmidtchen, A. y Malmsten, M. (2012). Antimicrobial peptides: Key components of the innate immune system. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32(2), 143-171. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.594423>
- Pelicic, V., Reyrat, J. M. y Gicquel, B. (1996). Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, 178(4), 1197-1199. <https://doi.org/10.1128/jb.178.4.1197-1199.1996>
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., ... Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*, 18(7), e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
- Perevoshchikova, I. V., Sorochkina, A. I., Zorov, D. B. y Antonenko, Y. N. (2009). Safranin O as a fluorescent probe for mitochondrial membrane potential studied on the single particle level and

- in suspension. *Biochemistry (Mosc)*, 74(6), 663-671. <https://doi.org/10.1134/s000629790906011x>. PMID: 19645672
- Peters, K., Pazos, M., Edoó, Z., Hugonnet, J. E., Martorana, A. M., Polissi, A., VanNieuwenhze, M. S., Arthur, M. y Vollmer, W. (2018). Copper inhibits peptidoglycan LD-transpeptidases suppressing β -lactam resistance due to bypass of penicillin-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(42), 10786-10791. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809285115>
- Picard-Hagen, N., Berthelot, X., Champion, J. L., Eon, L., Lyazrhi, F., Marois, M., Peglion, M., Schuster, A., Trouche, C. y Garin-Bastuji, B. (2015). Contagious epididymitis due to *Brucella ovis*: relationship between sexual function, serology and bacterial shedding in semen. *BMC Veterinary Research*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0440-7>
- Pilizota, T. y Shaevitz, J. W. (2013). Plasmolysis and cell shape depend on solute outer-membrane permeability during hyperosmotic shock in *E. coli*. *Biophysical Journal*, 104(12), 2733-2742. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.05.011>
- Popescu, A. y Doyle, R. (1996). The Gram stain after more than a century. *Biotechnic and Histochemistry*, 71(3), 145-151. [https://doi.org/10.1016/S0246-0343\(10\)19912-2](https://doi.org/10.1016/S0246-0343(10)19912-2)
- Potts, M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. En *Microbiological Reviews* (Vol. 58, Número 4, pp. 755-805). <https://doi.org/10.1128/membr.58.4.755-805.1994>
- Pourjafar, M., Badieli, K., Chalmeh, A. A., Rahmani Shahraki, A. R. y Naghib, M. (2012). Body temperature in horses, cattle, sheep and goats measured by mercury, digital and non-contact infrared thermometers. *Online Journal of Veterinary Research*, 16(4), 195-203.
- Poveda Urkixo, I. (2022). *Título*. Tesis doctoral, Universidad Pública de Navarra, España.
- Quandt, J. y Hynes, M. F. (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene*, 127(1), 15-21. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90611-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90611-6)
- Queliconi, B. B., Marazzi, T. B. M., Vaz, S. M., Brookes, P. S., Nehrke, K., Augusto, O. y Kowaltowski, A. J. (2013). Bicarbonate modulates oxidative and functional damage in ischemia-reperfusion. *Free Radical Biology and Medicine*, 55, 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.007>
- Rehbinder, C., Alenius, S., Bures, J., De las Heras, M., Greko, C., Kroon, P. S. y Gutzwiller, A. (2000). FELASA recommendations for the health monitoring of experimental units of calves, sheep and goats - Report of the federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Animal Health. *Laboratory Animals*, 34(4), 329-350. <https://doi.org/10.1258/002367700780387723>
- Rocchetta, H. L. y Lam, J. S. (1997). Identification and functional characterization of an ABC transport system involved in polysaccharide export of A-band lipopolysaccharide in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 179(15), 4713-4724. <https://doi.org/10.1128/jb.179.15.4713-4724.1997>
- Rojas, E. R., Billings, G., Odermatt, P. D., Auer, G. K., Zhu, L., Miguel, A., Chang, F., Weibel, D. B., Theriot, J. A. y Huang, K. C. (2018). The outer membrane is an essential load-bearing element in

- Gram-negative bacteria. *Nature*, 559(7715), 617-621. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0344-3>
- Roop, R. M., Bellaire, B. H., Valderas, M. W. y Cardelli, J. A. (2004). Adaptation of the brucellae to their intracellular niche. *Molecular Microbiology*, 52(3), 621-630. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04017.x>
- Roop, R. M., Gaines, J. M., Anderson, E. S., Caswell, C. C. y Martin, D. W. (2009). Survival of the fittest: How *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Medical Microbiology and Immunology*, 198(4), 221-238. <https://doi.org/10.1007/s00430-009-0123-8>
- Rosenberg, M., Gutnick, D. y Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9(1), 29-33. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x>
- Roset, M. S., Ciocchini, A. E., Ugalde, R. A. y Iñón de Iannino, N. (2006). The *Brucella abortus* cyclic β -1,2-glucan virulence factor is substituted with O-ester-linked succinyl residues. *Journal of Bacteriology*, 188(14), 5003-5013. <https://doi.org/10.1128/JB.00086-06>
- Roset, M. S., Ibañez, A. E., De Souza Filho, J. A., Spera, J. M., Minatel, L., Oliveira, S. C., Giambartolomei, G. H., Cassataro, J. y Briones, G. (2014). *Brucella* cyclic B-1,2-glucan plays a critical role in the induction of splenomegaly in mice. *PLoS ONE*, 9(7), 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101279>
- Ruiz-Palma, M. del S., Avila-Calderón, E. D., Aguilera-Arreola, M. G., López-Merino, A., Ruiz, E. A., Morales-García, M. del R., López-Villegas, E. O., Gomez-Lunar, Z., Arellano-Reynoso, B. y Contreras-Rodríguez, A. (2021). Comparative proteomic analysis of outer membrane vesicles from *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella canis* and *Brucella neotomae*. *Archives of Microbiology*, 203(4), 1611-1626. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02170-w>
- Salmon-Divon, M., Yeheskel, A. y Kornspan, D. (2018). Genomic analysis of the original Elberg *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine strain reveals insights into virulence attenuation. *Laboratory Animals*, 9(1), 1436-1448. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1511677>
- Salmon-Divon, M., Zahavi, T. y Kornspan, D. (2019). Transcriptomic analysis of the *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine strain in an acidic environment: Insights into virulence attenuation. *Frontiers in Microbiology*, 10(February), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00250>
- Sancho, P., Tejedor, C., Sidhu-Muñoz, R. S., Fernández-Lago, L. y Vizcaíno, N. (2014). Evaluation in mice of *Brucella ovis* attenuated mutants for use as live vaccines against *B. ovis* infection. *Veterinary Research*, 45(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-61>
- Sayers, E. W., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D. C., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., Skripchenko, Y., ... Sherry, S. T. (2022). Database resources of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D20-D26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>
- Schaechter, M. (2004). *The Desk Encyclopedia of Microbiology* (1st ed.). Elsevier Academic Press.

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., y Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schurig, G. G., Roop, R. M., Bagchi, T., Boyle, S., Buhrman, D. y Sriranganathan, N. (1991). Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology*, 28(2), 171-188. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(91\)90091-S](https://doi.org/10.1016/0378-1135(91)90091-S)
- Schurig, G. G., Sriranganathan, N. y Corbel, M. J. (2002). Brucellosis vaccines: Past, present and future. *Veterinary Microbiology*, 90(1-4), 479-496. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00255-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00255-9)
- Schuster, C. F., Wiedemann, D. M., Kirsebom, F. C. M., Santiago, M., Walker, S. y Gründling, A. (2020). High-throughput transposon sequencing highlights the cell wall as an important barrier for osmotic stress in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and underlines a tailored response to different osmotic stressors. *Molecular Microbiology*, 113(4), 699-717. <https://doi.org/10.1111/mmi.14433>
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. y Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3381-3385. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg520>
- Scupham, A. J. y Triplett, E. W. (1997). Isolation and characterization of the UDP-glucose 4'-epimerase-encoding gene, *galE*, from *Brucella abortus* 2308. *Gene*, 202(1-2), 53-59. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00453-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00453-8)
- Shabala, L., Bowman, J., Brown, J., Ross, T., McMeekin, T. y Shabala, S. (2009). Ion transport and osmotic adjustment in *Escherichia coli* in response to ionic and non-ionic osmotic stress. *Environmental Microbiology*, 11(1), 137-148. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01748.x>
- Shimokawa, O., Ikeda, M., Umeda, A. y Nakayama, H. (1994). Serum inhibits penicillin-induced L-form growth in *Staphylococcus aureus*: A note of caution on the use of serum in cultivation of bacterial L-forms. En *Journal of Bacteriology* (Vol. 176, Número 9, pp. 2751-2753). <https://doi.org/10.1128/jb.176.9.2751-2753.1994>
- Singh, D. R., Mohammad, M. M., Patowary, S., Stoneman, M. R., Oliver, J. A., Movileanu, L. y Raicu, V. (2013). Determination of the quaternary structure of a bacterial ATP-binding cassette (ABC) transporter in living cells. *Integr. Biol.*, 5(2), 312-323. <https://doi.org/10.1039/C2IB20218B>
- Skendros, P. y Boura, P. (2013). Immunity to brucellosis. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 32(1), 137-147. <https://doi.org/10.20506/rst.32.1.2190>
- Solanki, K. S., Varshney, R., Qureshi, S., Thomas, P., Singh, R., Agrawal, A. y Chaudhuri, P. (2021). Non-infectious outer membrane vesicles derived from *Brucella abortus* S19Δ*per* as an alternative acellular vaccine protects mice against virulent challenge. *International Immunopharmacology*, 90(November 2020), 107148. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107148>
- Soler-Lloréns, P., Gil-Ramírez, Y., Zabalza-Baranguá, A., Iriarte, M., Conde-Álvarez, R., Zúñiga-Ripa, A., San Román, B., Zygmunt, M. S., Vizcaíno, N., Cloeckert, A., Grilló, M. J., Moriyón, I. y López-Goñi,

- I. (2014). Mutants in the lipopolysaccharide of *Brucella ovis* are attenuated and protect against *B. ovis* infection in mice. *Veterinary Research*, 45(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0072-0>
- Stogios, P. J. y Savchenko, A. (2020). Molecular mechanisms of vancomycin resistance. *Protein Science*, 29(3), 654-669. <https://doi.org/10.1002/pro.3819>
- Stranahan, L. W. y Arenas-Gamboa, A. M. (2021). When the going gets rough: The significance of *Brucella* lipopolysaccharide phenotype in host-pathogen interactions. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.713157>
- Takacs, C. N., Hocking, J., Cabeen, M. T., Bui, N. K., Poggio, S., Vollmer, W. y Jacobs-Wagner, C. (2013). Growth medium-dependent glycine incorporation into the peptidoglycan of *Caulobacter crescentus*. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057579>
- Thomas, R. C. (1976). The effect of carbon dioxide on the intracellular pH and buffering power of snail neurones. *The Journal of Physiology*, 255(3), 715-735. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1976.sp011305>
- Tsai, C. M. y Frasch, C. E. (1982). A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 119(1), 115-119. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90673-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90673-X)
- Ugalde, J. E., Comerci, D. J., Leguizamón, M. S., y Ugalde, R. A. (2003). Evaluation of *Brucella abortus* phosphoglucomutase (pgm) mutant as a new live rough-phenotype vaccine. *Infection and immunity*, 71(11), 6264-6269. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.11.6264-6269.2003>
- Unión Europea. (2010). *Directiva 2010/63/UE de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.*
- Uzureau, S., Godefroid, M., Deschamps, C., Lemaire, J., De Bolle, X. y Letesson, J. J. (2007). Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*. *Journal of Bacteriology*, 189(16), 6035-6047. <https://doi.org/10.1128/JB.00265-07>
- Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological reviews*, 56(3), 395-411. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq040>
- Vassen, V. (2018). *Polarity of Envelope Growth and Heterogeneity of the Outer Membrane of Brucella abortus*. Tesis doctoral, Universidad de Namur, Bélgica.
- Vollmer, W. y Bertsche, U. (2008). Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. En *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1778, Número 9, pp. 1714-1734). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.06.007>
- Wang, X., Wang, L., Lu, T., Yang, Y., Chen, S., Zhang, R., Lang, X., Yan, G., Qian, J., Wang, X., Meng, L. y Wang, X. (2014). Effects of partial deletion of the *wzm* and *wzt* genes on lipopolysaccharide synthesis and virulence of *Brucella abortus* S19. *Molecular Medicine Reports*, 9(6), 2521-2527. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2104>
- Wang, X., Yan, G. M., Zhang, R., Lang, X. L., Yang, Y. L., Li, X. Y., Chen, S., Qian, J. y Wang, X. L. (2014). Immunogenic response induced by *wzm* and *wzt* gene deletion mutants from *Brucella abortus* S19. *Molecular Medicine Reports*, 9(2), 653-658. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1810>

- Wang, Z., Niu, J. R., Wang, X. L., Wu, T. L., Cheng, J., Lu, L. y Wu, Q. M. (2014). Evaluation of a *Brucella melitensis* mutant deficient in O-polysaccharide export system ATP-binding protein as a rough vaccine candidate. *Microbes and Infection*, 16(8), 633-639. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.06.013>
- Whitfield, C., Amor, P. A. y Köplin, R. (1997). Modulation of the surface architecture of Gram-negative bacteria by the action of surface polymer: Lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Molecular Microbiology*, 23(4), 629-638. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.2571614.x>
- Williams, D. M., Ovchinnikova, O. G., Koizumi, A., Mainprize, I. L., Kimber, M. S., Lowary, T. L. y Whitfield, C. (2017). Single polysaccharide assembly protein that integrates polymerization, termination, and chain-length quality control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(7), E1215-E1223. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613609114>
- Winter, A. J., Schurig, G. G., Boyle, S. M., Sriranganathan, N., Bevins, J. S., Enright, F. M., Elzer, P. H., y Kopec, J. D. (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. *American journal of veterinary research*, 57(5), 677-683.
- Wood, P. J. (1980). Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 85(2), 271-287. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)84676-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)84676-5)
- Yang, X., Skyberg, J. A., Cao, L., Clapp, B., Thornburg, T. y Pascual, D. W. (2013). Progress in *Brucella* vaccine development. *Frontiers in Biology*, 8(1), 60-77. <https://doi.org/10.1007/s11515-012-1196-0>
- Zabalza Baranguá, A. (2017). *Desarrollo de vacunas marcadas con GFP frente a la brucelosis ovina y tests diagnósticos asociados*. Tesis doctoral, Universidad Pública de Navarra, España.
- Zabalza-Baranguá, A., San-Román, B., Chacón-Díaz, C., de Miguel, M. J., Muñoz, P. M., Iriarte, M., Blasco, J. M., y Grilló, M. J. (2019). GFP tagging of *Brucella melitensis* Rev1 allows the identification of vaccinated sheep. *Transboundary and emerging diseases*, 66(1), 505-516. <https://doi.org/10.1111/tbed.13053>
- Zabalza-Baranguá, A., Poveda-Urkixo, I., Mena-Bueno, S., Ramírez, G. A., De Bolle, X., y Grilló, M. J. (2023). Vaccine properties of *Brucella melitensis* 16M Δ wzm and reactivation of placental infection in pregnant sheep. *Vaccine*, S0264-410X(23)00028-2. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.01.017>.
- Zhang, M., Han, X., Liu, H., Tian, M., Ding, C., Song, J., Sun, X., Liu, Z. y Yu, S. (2013). Inactivation of the ABC transporter ATPase gene in *Brucella abortus* strain 2308 attenuated the virulence of the bacteria. *Veterinary Microbiology*, 164(3-4), 322-329. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.02.017>
- Zhao, Y., Arce-Gorvel, V., Conde-Álvarez, R., Moriyón, I. y Gorvel, J. P. (2018). Vaccine development targeting lipopolysaccharide structure modification. *Microbes and Infection*, 20(9-10), 455-460. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.11.006>
- Zygmunt, M. S., Bundle, D. R., Ganesh, N. V., Guiard, J. y Cloeckert, A. (2015). Monoclonal antibody-defined specific C epitope of *Brucella* O-polysaccharide revisited. *Clinical and Vaccine Immunology*, 22(8), 979-982. <https://doi.org/10.1128/CVI.00225-15>

Capítulo 2

Desarrollo de un nuevo medio de cultivo selectivo para el aislamiento de brucellae en muestras de campo

Introducción

La brucelosis ovina se caracteriza por inducir abortos y otras alteraciones del tracto reproductor de los animales que conllevan la excreción de bacterias en placentas, fluidos vaginales, leche y semen. El aislamiento del patógeno en muestras animales es la única prueba confirmatoria de la presencia del patógeno en el rebaño. Sin embargo, *Brucella* es una bacteria de crecimiento lento cuya identificación puede quedar enmascarada por la presencia de microorganismos contaminantes de crecimiento rápido habituales tanto en la microbiota de los animales como en el medio ambiente en el que se toman las muestras. En consecuencia, para posibilitar el correcto aislamiento de *Brucella* resulta esencial el uso de medios selectivos capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos contaminantes, sin inhibir a *Brucella* (OIE, 2022).

El primer medio selectivo del que se tiene constancia para el aislamiento de *Brucella* a partir de muestras de campo (en concreto, muestras de leche) fue desarrollado a principios del siglo XX por Huddleson (Huddleson, 1920). Dicho medio se elaboró con una base de agar suplementado con colorantes de acción bacteriostática (Brodie y Sinton, 1975). Desde entonces, la incorporación de antibióticos y suplementos permitió mejorar sustancialmente la técnica, adaptándola a los diversos tipos de muestras animales y cepas de *Brucella*, hasta alcanzar un significativo desarrollo de distintos medios selectivos sólidos, durante la segunda mitad del siglo XX (Bowden et al., 1993; Brinley Morgan, 1960; Brown et al., 1971; Ewalt et al., 1983; Farrell, 1974; Farrell y Robertson, 1972; Felsenfeld et al., 1951; Jones y Morgan, 1958; Kuzdas y Morse, 1953; Mair, 1955; Morris, 1956; Renoux, 1954; W. Ryan, 1967; Thayer y Martin, 1966). Entre ellos, el medio de Farrell (FM) ha sido y es ampliamente utilizado debido a su acción altamente inhibitoria de altas concentraciones de bacterias de rápido crecimiento; además, el hecho de ser translúcido facilita la identificación colonial. Sin embargo, la idoneidad del FM ha sido puesta en entredicho debido a la fuerte inhibición que la bacitracina y el ácido nalidíxico ejercen sobre algunas cepas de *Brucella* (Marín, Alabart, et al., 1996), utilizándose en determinados trabajos un FM modificado con menor concentración de bacitracina para evitar la inhibición de *B. melitensis* H38 (Barrio et al., 2009; Guilloteau et al., 2006; Verger et al., 1995). Otro de los medios de cultivo selectivo más utilizados para el primo-aislamiento de *Brucella* es el de Thayer-Martin modificado (TMm; Thayer y Martin, 1966; Brown et al., 1971); este medio es más permisivo que el FM para todas las especies de *Brucella*, pero también es menos inhibitorio para los microorganismos contaminantes. Por ello, el método recomendado durante muchos años por la OIE fue el cultivo simultáneo en FM

y TMm (Barrio et al., 2009; Guilloteau et al., 2006; Jiménez de Bagüés et al., 1995). Más recientemente, con la finalidad de incrementar la selectividad de TMm y evitar el uso de hemoglobina que dificulta enormemente la identificación colonial de *Brucella*, se formuló el medio CITA (CM; De Miguel et al., 2011) con una base de agar transparente suplementada con suero fetal bovino y los antimicrobianos del TMm (vancomicina, colistina, nistatina y nitrofurantoína), pero incrementando la concentración de vancomicina (como en FM) y añadiendo anfotericina B para lograr un mayor efecto antifúngico.

Dados los buenos resultados obtenidos con CM (De Miguel et al., 2011; Vicente et al., 2014), la estrategia recomendada actualmente para el aislamiento de *Brucella* a partir de muestras veterinarias es el cultivo simultáneo en los medios FM y CM (OIE, 2022). No obstante, ambos medios contienen elevadas concentraciones de polimixinas que resultan críticas para el aislamiento de ciertas brucellae (Jensen y Halling, 2010; Kerrinnes et al., 2015) y, en particular, pueden interferir en la identificación de cepas atenuadas utilizadas en estudios de campo (Castaño-Zubieta et al., 2021; Hensel et al., 2020; Palmer et al., 1997; Pérez-Sancho et al., 2014; Wang et al., 2013, 2014); de hecho, estos antimicrobianos se utilizan como modelo de susceptibilidad a péptidos catiónicos del sistema inmune innato, a los cuales estas cepas son muy sensibles (Freer et al., 1996, 1999; Kerrinnes et al., 2015; Martínez de Tejada et al., 1995; Mena-Bueno et al., 2022; Monreal et al., 2003; Sola-Landa et al., 1998). Por ello, un aspecto fundamental para evitar sesgos experimentales en estudios de seguridad y eficacia con nuevos candidatos vacunales en especies ganaderas es determinar su viabilidad y condiciones óptimas de cultivo en los medios selectivos.

Adicionalmente, la incorporación de marcajes colorimétricos ha experimentado un importante auge, ya que facilitan la identificación directa del microorganismo de interés dentro de un cultivo polimicrobiano, reduciendo el tiempo de trabajo y el coste de las determinaciones. Los medios colorimétricos pueden ser diferenciales o cromogénicos, destacando los segundos por restringir el viraje de color a la colonia bacteriana, sin afectar al agar circundante. Estos medios constan de un cromógeno soluble en el medio que está conformado por un cromóforo, generalmente derivado del indoxil, unido a un sustrato determinado. Cuando enzimas específicas de la bacteria hidrolizan el enlace entre ambos grupos, el cromóforo se torna insoluble, se oxida y adquiere color. Dado que una actividad enzimática particular no suele constituir un rasgo bacteriano exclusivo, es frecuente la combinación de diferentes agentes diferenciales y selectivos (Orenga et al., 2009; Perry, 2017). En el caso de *Brucella*, un marcador microbiológico de identificación adicional al color sería la prolongada incubación requerida y la morfología colonial.

En el presente capítulo, antes de abordar los estudios de seguridad en ganado ovino del capítulo 3, se revisó el crecimiento del candidato vacunal Rev1 Δ wzm (muy susceptible a polimixinas) desarrollado en el capítulo anterior de esta tesis, en los medios FM y CM. Tras comprobar la inhibición del mutante y otras cepas en ambos medios de cultivo, en este capítulo 2 se ha generado el denominado *Brucella* Selective Medium (BSM) que mejora significativamente el aislamiento de algunas cepas de *Brucella* sensibles a polimixinas y, en particular, el de Rev1 Δ wzm. Además, en este capítulo 2, se validó el nuevo medio BSM vs. CM, primero, en condiciones de laboratorio con otras brucellae y microorganismos que frecuentemente contaminan las muestras veterinarias y, a continuación, con un total de 1.2789 muestras ovinas obtenidas de campo. Al analizar otras brucellae, se observó que tanto BSM como CM recién preparados (la misma semana de su uso) inhibían significativamente el crecimiento de *B. abortus* bv1; sin embargo, este efecto desaparecía tras 4 semanas de almacenaje de las placas a 4 °C. El análisis de las causas de esta inhibición permitió formular el nuevo medio de cultivo selectivo libre de suero de ternera denominado *Brucella* Selective Improved Culture (*BruSIC*) y validarlo en condiciones de laboratorio y con muestras de campo de animales libres de brucelosis. Como resultado, observamos que *BruSIC*: i) permite el crecimiento de todas las brucellae analizadas como en BAB y BAB-S; ii) mejora significativamente el aislamiento de todas las brucellae con respecto a CM y FM, incluso cepas suero-dependientes como *B. ovis* PA; iii) mejora el aislamiento de *Brucella abortus* bv1 con respecto a BSM y CM; iv) permite un crecimiento colonial más rápido de todas las brucellae; y (v) al no utilizar suero bovino en la formulación, conlleva beneficios asociados a prescindir del empleo de material biológico de origen animal (bovino), sencillez de preparación y reducción de costes de producción.

Materiales y métodos

1. Cepas de *Brucella* utilizadas, conservación, condiciones de cultivo y preparación de inóculos

Las cepas de *Brucella* utilizadas en este capítulo de tesis se presentan en la [Tabla 17](#). La conservación de las mismas se realizó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, en leche descremada al 10 % con un 3 % de lactosa; y su manipulación y cultivo se realizó en TSB, BAB o BAB-S, según se describe en el capítulo 1, y en los medios que se detallan en cada estudio.

Tabla 17. Cepas de *Brucella* utilizadas en el capítulo 2

<i>Brucella</i>	Descripción	Referencia
16M	Cepa virulenta de referencia <i>B. melitensis</i> bv1; S-LPS	
H38	Cepa virulenta <i>B. melitensis</i> bv1; S-LPS	Colección del IdAB
Rev1	Cepa vacunal de referencia <i>B. melitensis</i> bv1; sensible a penicilina; resistente a estreptomicina; S-LPS	
16M Δ wzm	Mutante rugoso de 16M con delección en el gen <i>wzm</i> ; O-PS en citoplasma	Zabalza Baranguá, 2017
Rev1 Δ wzm	Mutante rugoso de Rev1 con delección en el gen <i>wzm</i> ; O-PS en citoplasma; sensible a penicilina y estreptomicina	
Rev1 Δ wzt	Mutante rugoso de Rev1 con delección en el gen <i>wzt</i> ; O-PS en citoplasma; sensible a penicilina y estreptomicina	Capítulo 1 de esta tesis
Rev1 Δ wzm Δ wzt	Mutante rugoso de Rev1 con delección en los genes <i>wzm</i> y <i>wzt</i> ; O-PS en citoplasma; sensible a penicilina y estreptomicina	
2308	Cepa virulenta de referencia <i>B. abortus</i> bv1; S-LPS	Colección del IdAB
2308 Δ wzm	Mutante rugoso de 2308 con delección en el gen <i>wzm</i> ; O-PS en citoplasma	Capítulo 1 de esta tesis
Ba1	Cepas de campo <i>B. abortus</i> bv1 ($n = 5$) y 2308 de distintos orígenes ($n = 3$); S-LPS	LCSA y colección del IdAB
S19	Cepa vacunal de referencia en <i>B. abortus</i> bv1; sensible a penicilina G y eritritol; S-LPS	Colección del IdAB
S19 Δ wzm	Mutante rugoso de S19 con delección en el gen <i>wzm</i> ; O-PS en citoplasma	Capítulo 1 de esta tesis
RB51	Cepa vacunal rugosa <i>B. abortus</i> bv1; resistente a rifampicina; R-LPS	LCSA
Ba3	Aislado de campo <i>B. abortus</i> bv3; S-LPS	
BoPA	Cepa rugosa virulenta de referencia <i>B. ovis</i> PA; 10 % CO ₂ - y suero-dependiente	Colección del IdAB
<i>B. canis</i>	Cepa rugosa virulenta de referencia <i>B. canis</i> RM6/66	
Bs1	Cepa virulenta de referencia <i>B. suis</i> bv1 1330; S-LPS	LCSA
Bs2	Cepa virulenta de campo <i>B. suis</i> bv2; S-LPS	Colección del IdAB; Poveda-Urkixo, 2022

LCSA: Laboratorio Central de Sanidad (Laboratorio Nacional de Referencia para Brucelosis; Santa Fe, Granada).

Las suspensiones bacterianas se prepararon mediante ajuste espectrofotométrico (SmartSpec Plus, BioRad) a 600 nm de longitud de onda (DO_{600}), como se ha descrito en el capítulo 1 de esta tesis, determinándose el número de UFC/mL a partir de la dilución que contenía entre 25 y 250 UFC en cada 0,1 mL; y los resultados se expresaron como la media \pm SD ($n = 3$) de UFC/mL.

2. Preparación de los medios de cultivo selectivos para *Brucella*

Como se muestra en la [Tabla 18](#), la composición de FM y CM consistió en una base de BAB-S suplementada con el liofilizado comercial de antimicrobianos del FM (refs. SR0083A, Oxoid o 6017, Condalab) reconstituido en 1 : 1 metanol : agua ultrapura o con los antimicrobianos de CM (todos de Sigma-Aldrich) pesados individualmente y reconstituidos en el diluyente adecuado: 20 mg/L de vancomicina (V_{20} ; ref. V2002) y 7,5 mg/L de colistina ($Col_{7,5}$; ref. C1511) en agua ultrapura, 10 mg/L de nitrofurantoína ($Nitro_{10}$; ref. N7878) en *N,N*-dimetilformamida (DMF; ref. 227056, Sigma-Aldrich), 100.000 UI/L de nistatina ($Nista_{100}$; ref. N3503) en metanol (VWR Chemicals) y 4 mg/L de anfotericina B ($AnfoB_4$; ref. A4888) en dimetilsulfóxido (DMSO; ref. 23.500.297, VWR Chemicals). Estos antimicrobianos se prepararon a una concentración 1.000X, esterilizando por filtración en 0,2 μ m (Sarstedt) aquellos diluidos en agua, se alicuotaron individualmente (1 mL/vial) y se conservaron a -20 °C hasta su uso. Para elaborar BSM, se prepararon los antimicrobianos como se ha descrito para CM, pero utilizando concentraciones reducidas de vancomicina y colistina (*i. e.*, V_{10} y Col_4) o, tan pronto como estuvo disponible, con el suplemento liofilizado de antimicrobianos del medio *BruSIC* producido por la empresa Reactivos Para Diagnóstico, S.L. (RPD; [Fig. 34](#)).

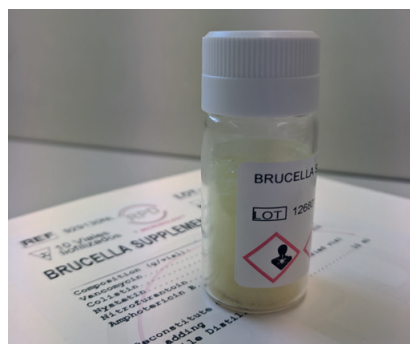


Fig. 34. Suplemento liofilizado de antimicrobianos para la preparación de los medios de cultivo selectivo BSM y *BruSIC* desarrollados en esta tesis. Vial con la mezcla de antimicrobianos para preparar 500 mL de medio selectivo formada por vancomicina (5 mg), colistina (2 mg), nitrofurantoína (5 mg), nistatina (50.000 UI) y anfotericina B (2 mg). Viales elaborados por la empresa RPD.

El protocolo general para la preparación de 1 L de estos medios de cultivo consistió en pesar 40 g de BAB y diluirlos en 945 mL (para CM o BSM) o en 930 mL (para FM) de agua ultrapura, autoclavar (121 °C, 15 min) y dejar atemperar a 50 °C; añadir 50 mL de NBCS estéril y 5 mL de antimicrobianos (1 mL de cada uno) preparados como se especifica

arriba para los medios CM y BSM o 20 mL de suplemento FM (2 viales, 10 mL/vial), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuando el medio BSM se preparó con suplemento liofilizado de antimicrobianos elaborado por RPD, se siguió el procedimiento descrito para FM. El medio *BruSIC* se preparó diluyendo 40 g de BAB junto a 1 g de carbón activado (ref. CA0351005P, Omya Clariana) en 980 mL de agua ultrapura y, tras autoclavar y atemperar a 50 °C, se añadieron 2 viales del suplemento liofilizado *BruSIC* producido por RPD reconstituido en 10 mL/vial de agua ultrapura estéril. En todos los casos, tras añadir los antimicrobianos, el medio con se homogeneizó mediante agitación magnética y se dispensó en placas Petri (Sarstedt) a razón de 30 mL/placa. A continuación, las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C o durante 3 días a T_{amb} para asegurar la ausencia de microorganismos contaminantes. Asimismo, antes de su uso, se comprobó

Tabla 18. Composición de los medios de cultivo selectivos para *Brucella* utilizados en el capítulo 2

Componente ²	Medios de cultivo selectivos utilizados ¹			
	FM	CM	BSM	<i>BruSIC</i>
Suplemento	5 % NBCS ³	5 % NBCS ³	5 % NBCS ³	1 g/L de carbón activado ⁴
Antimicrobianos	Suplemento liofilizado FM ⁵	Antimicrobianos individuales ⁶		Suplemento liofilizado <i>BruSIC</i> ⁷
	V ₂₀	V ₂₀ en agua ultrapura		V ₁₀
Antibióticos	PxB ₅	Col _{7,5} en agua ultrapura		Col ₄
	Nal ₅	Nitro ₁₀ en DFM		Nitro ₁₀
	Baci ₂₅			
Antifúngicos	Nista ₁₀₀	Nista ₁₀₀ en metanol		Nista ₁₀₀
	Ciclo ₁₀₀	AnfoB ₄ en DMSO		AnfoB ₄

¹ FM: medio Farrell (Farrell et al., 1974); CM: medio CITA (De Miguel et al., 2011); BSM: *Brucella* Selective Medium (esta tesis); *BruSIC*: *Brucella* Selective Improved Culture (esta tesis). ² Todos los medios se prepararon en BAB: 40 g/L de Blood Agar Base n.º 2 (Oxoid, ref. CM0271) diluidos en agua ultrapura. ³ 50 mL/L de NBCS (Gibco, ref. 16010159). ⁴ Carbón activado (Omya Clariana, ref. CA0351005P). ⁵ Suplemento antimicrobiano liofilizado comercial de FM (Oxoid, ref. SR0083A o Condalab, ref. 6017) formado por 20 mg/L de vancomicina (V₂₀), 5.000 UI/L de polimixina B (PxB₅), 5 mg/L de ácido nalidixico (Nal₅), 25.000 UI/L de bacitracina (Baci₂₅), 100.000 UI/L de nistatina (Nista₁₀₀) y 100 mg/L de cicloheximida (Ciclo₁₀₀). ⁶ Agentes antimicrobianos de CM pesados y diluidos individualmente: 20 mg/L de vancomicina (V₂₀; ref. V2002) en agua ultrapura, 7,5 mg/L de colistina (Col_{7,5}; ref. C1511) en agua ultrapura, 10 mg/L de nitrofurantoina (Nitro₁₀; ref. N7878) en *N,N*-dimetilformamida (DMF), 4 mg/l de anfotericina B (AnfoB₄; ref. A4888) en dimetilsulfóxido (DMSO) y 100.000 UI/L de nistatina (Nista₁₀₀; ref. N3503) en metanol. ⁷ Suplemento liofilizado *BruSIC* formado por V₁₀ (10 mg/L), Col₄ (4 mg/L), Nitro₁₀, Nista₁₀₀ y AnfoB₄.

el correcto funcionamiento de los antimicrobianos en cada tanda de placas, mediante el cultivo de 10^3 UFC/placa de Rev1 Δwzm (se inhibe en CM y FM y crece en BSM y BruSIC en igual número que en BAB). Salvo que se indique lo contrario, las placas se utilizaron la misma semana de su preparación.

3. Estudios de susceptibilidad antibiótica

3.1. Estudios de actividad bacteriostática (CMI) y bactericida (CMB) de distintos agentes antimicrobianos

Por un lado, se determinaron los valores de CMI, CMB₅₀ y CMB₉₀ del mutante Rev1 Δwzm y su parental Rev1 frente a cada uno de los antimicrobianos que componen el medio CM y, por otro lado, con esos mismos parámetros se determinó la susceptibilidad de las cepas *B. abortus* 2308 y S19 y *B. melitensis* 16M y Rev1 y sus mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ a la colistina. En todos los casos, se utilizó el método estándar de microdilución (EUCAST, 2003) en placas de 96 pocillos (Sarstedt), siguiendo la metodología descrita en el capítulo 1 de esta tesis (apartado 3.6.). La cepa *E. coli* K12 (colección del IdAB) se utilizó como control y los valores individuales de CMI y CMB se establecieron con respecto a los siguientes rangos de cada antimicrobiano: 640-0,625 $\mu\text{g/mL}$ de vancomicina, 750-0,25 $\mu\text{g/mL}$ de colistina, 320-0,625 $\mu\text{g/mL}$ de nitrofurantoína, 3.200-6,25 UI/mL de nistatina y 128-0,25 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B.

3.2. Estudios de actividad sinérgica entre vancomicina y colistina

Siguiendo la metodología descrita en el capítulo 1 de esta tesis, se determinaron los valores de CMI combinada y el índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) de la combinación vancomicina y colistina frente al mutante Rev1 Δwzm y su parental. Los valores de FIC se evaluaron por la técnica de tablero de ajedrez o *chequerboard* (Mateu-de-Antonio y Martín, 1995), para determinar si existía efecto sinérgico (FIC < 0,5), aditivo (FIC = 0,5-1,0), indiferente (FIC = 1,1-2,0) o antagónico (FIC > 2,0) entre ambos antibióticos para cada cepa, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{FIC} = \frac{\text{CMI del antibiótico A combinado}}{\text{CMI del antibiótico A solo}} + \frac{\text{CMI del antibiótico B combinado}}{\text{CMI del antibiótico B solo}}$$

3.3. Efecto de distintas concentraciones de vancomicina y colistina en CM y necesidad de NBCS para el crecimiento de Rev1Δwzm en medios selectivos

Se prepararon placas de BAB y BAB-S con Nitro₁₀, Nista₁₀₀ y AnfoB₄ (las concentraciones de CM) más todas las combinaciones posibles de las siguientes concentraciones de vancomicina y colistina: V₂₀, V₁₅ o V₁₀ y Col₈, Col₆ o Col₄. En cada medio, se sembraron 0,1 mL de una suspensión con $\approx 5 \times 10^2$ UFC/mL de Rev1Δwzm, por triplicado y, tras incubar las placas a 37 °C durante 5-7 días, se determinó la media \pm SD (n = 3) del número de UFC/0,1 mL.

3.4. Estudio del efecto inhibitorio de la colistina en medio sólido y del tiempo de almacenamiento de las placas sobre el crecimiento de *B. abortus* bv1

Para comprobar si la inhibición de *B. abortus* bv1 observada en los medios CM y BSM se debía a la presencia de colistina, se analizó el crecimiento de la cepa de referencia *B. abortus* bv1 2308 (0,1 mL de una suspensión con $\approx 10^3$ UFC/mL, por triplicado) en placas de BAB-S suplementado con la concentración de colistina del medio BSM (BAB-S-Col₄) preparadas en fresco (la misma semana de su uso). Además, para determinar el efecto del tiempo de almacenamiento sobre dicha inhibición, se utilizaron las mismas placas tras 2, 4 y 8 semanas de almacenaje a 4 °C; como control para determinar el porcentaje de supervivencia bacteriana, se utilizaron placas de BAB. Siguiendo esta metodología, se analizó el crecimiento de la misma cepa 2308 en BSM modificado con concentraciones decrecientes de colistina (3, 2, 1, 0,5 y 0 µg/mL), preparado en fresco o tras almacenaje de 8 semanas de almacenaje a 4 °C.

4. Evaluación de la productividad de los medios selectivos para el aislamiento de *Brucella* en condiciones de laboratorio

Los distintos estudios de productividad de FM, CM, BSM y BruSIC (*i. e.*, capacidad del medio selectivo para permitir el crecimiento de *Brucella* con respecto a en un medio sin antibióticos) en condiciones de laboratorio se realizaron con las cepas de *Brucella* que se detallan en el apartado correspondiente de la sección de resultados y se describen en la [Tabla 17](#). Con ellas, se prepararon suspensiones con diluciones decimales entre 10⁹ y 10³ UFC/mL de la cepa sometida a estudio (ver apartado 2 de esta sección) y se sembraron (0,1 mL, por triplicado) individualmente en los distintos medios selectivos y en BAB (o BAB-S para BoPA) como control. Tras incubar las placas a 37 °C, durante 7-14 días, por

duplicado en atmósferas normal y con un 10 % de CO₂, se determinó la media ± SD (n = 3) del número de UFC/0,1 mL y, en su caso, el porcentaje de supervivencia en el medio selectivo vs. el control BAB o BAB-S.

Tras detectarse una severa inhibición de las cepas *B. abortus* bv1 2308, S19 y RB51 en los medios BSM y CM, se analizó si se trataba de un fenotipo asociado a las cepas de referencia utilizadas o si, por el contrario, estaba asociado al biovar 1 y si también ocurría con cepas de campo y en otros biovares. Además, en vista de los resultados obtenidos con BAB-S-Col₄ en el experimento descrito en el apartado 3.4, se analizó el efecto del tiempo de almacenaje de las placas de ambos medios selectivos sobre el crecimiento de distintas cepas. Para ello, se seleccionaron 9 cepas de Ba1 de distintos orígenes y una cepa Ba3 (Tabla 17) y se sembraron (0,1 mL, por triplicado) suspensiones con diluciones decimales entre 10⁹ y 10³ UFC/mL de cada cepa, en placas de BSM y CM preparadas la misma semana de su uso (en fresco) o almacenadas a 4 °C durante 8 semanas. Los resultados se expresaron como el porcentaje de supervivencia bacteriana en el medio selectivo vs. el control BAB para cada cepa.

5. Monitorización de las propiedades fisicoquímicas de los medios CM y BSM, durante su almacenaje a 4 °C

Para profundizar en las causas de la inhibición de *B. abortus* bv1 en placas frescas de CM y BSM, se analizó si dicha inhibición también sucedía con los antimicrobianos en medio líquido, recién reconstituido o tras su almacenaje a 4 °C, para descartar efectos sobre los mismos en medio sólido debidos a una posible pérdida de agua. Asimismo, se analizaron posibles variaciones de pH en los medios selectivos sólidos que pudieran afectar a la actividad de los antimicrobianos de CM y BSM.

Para el primer análisis, se determinaron los valores de CMI (ver apartado 3.1., arriba) de *B. abortus* 2308 frente al suplemento antimicrobiano de BSM en TSB y TSB-S, así como a diluciones 1 : 2 del mismo, bien recién reconstituido o tras su conservación a 4 °C durante 4 semanas. La cepa *B. melitensis* Rev1 se utilizó como control, por no verse inhibida por la combinación antibiótica de BSM.

Por otra parte, las variaciones de pH en CM y BSM se determinaron mediante tiras indicadoras de pH (Merck) impregnadas en el medio de placas recién preparadas y tras 2, 3 y 4 semanas de almacenamiento a 4 °C.

6. Análisis de propiedades bioquímicas de *Brucella* para el desarrollo de un medio de cultivo diferencial

Con el propósito de facilitar la identificación colonial de *Brucella* en el nuevo medio selectivo, se estudiaron distintas propiedades fisicoquímicas del patógeno con potencial aplicación en un medio diferencial clásico o cromogénico.

Por un lado, se estudió el uso de indicadores colorimétricos de pH en los medios TSA, BAB y BSM, añadiendo 0,02 g/L de azul de bromotimol (amarillo a pH 6,0 y azul a pH 7,6) o rojo neutro (rojo a pH 6,8 y amarillo a pH 8,0) (ambos de Sigma-Aldrich). En estos medios, se sembraron (0,1 mL, por triplicado) diluciones decimales con entre 10^9 y 10^3 UFC/mL de Rev1 Δ wzm o de las bacterias contaminantes *E. coli*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, y las placas se incubaron a 37 °C hasta la aparición de colonias.

Por otro lado, con el objetivo de restringir el marcaje de color únicamente a la colonia bacteriana, se investigaron aquellas reacciones metabólicas distintivas de *Brucella* con potencial actividad para interaccionar y descomponer un sustrato cromogénico añadido al medio de cultivo selectivo. Para ello, se analizaron y seleccionaron distintas enzimas con actividad hidrolasa anotadas para *B. melitensis* en los repositorios KEGG (Kanehisa y Goto, 2000) y Universal Protein Knowledgebase (UniProt; The UniProt Consortium, 2021). A continuación, se estudió la huella metabólica de *B. melitensis* 16M y Rev1, *B. abortus* 2308 y S19, y sus cuatro derivados Δ wzm, utilizando el panel GEN III MicroPlate (Biolog), ya que permite caracterizar el uso de 71 sustratos como fuente única de carbono y la susceptibilidad bacteriana a 23 compuestos químicos. Las determinaciones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante con pequeñas modificaciones. En detalle, se dispensaron 0,1 mL/pocillo de suspensiones con 10^9 UFC/mL de *Brucella* en PBS e, inmediatamente, las placas se incubaron a 37 °C, durante 48-72 h, para identificar la presencia o ausencia de turbidez en el medio. Los resultados se expresaron como positivo (+), intermedio (\pm) o negativo (-), en comparación con los pocillos control positivo y negativo existentes en la placa.

En base al resultado obtenido de utilización del ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) como fuente de carbono, se realizó una búsqueda bibliográfica de la anotación de dicha enzima en otras bacterias en UniProt (The UniProt Consortium, 2021) y se profundizó

en el estudio de esta ruta metabólica, mediante el análisis de la actividad de la enzima hidrolasa capaz de catabolizar el Neu5Ac, a partir de glicoconjugados. Para ello, se utilizó el Neuraminidase Assay Kit (Sigma-Aldrich), previa adaptación del protocolo para espectrofotometría (SmartSpec Plus, BioRad) en cubetas de 1 mL (Thermo Fisher Scientific). Brevemente, se mezclaron 0,2 mL de suspensiones con 10^3 , 10^9 y 10^{11} UFC/mL de Rev1 o Rev1 Δwzm con 0,8 mL de las soluciones de reacción del kit para dichas muestras o con el blanco; tras 20 min (M_{20}) y 50 min (M_{50}) de incubación a 37 °C, en oscuridad, se midieron los valores de DO a 570 nm (DO_{570}). Como control, se utilizaron 0,2 mL de la solución estándar del kit a concentraciones de 240 μ M, 120 μ M y 0 μ M (agua); con los valores DO_{570} proporcionados por estas suspensiones en la segunda lectura, se generó la recta patrón. Siguiendo las instrucciones del fabricante, la actividad neuraminidasa (en U/L) se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\Delta M_{\text{muestra}} - \Delta M_{\text{blanco}} - \Delta M_{\text{agua}}}{\text{pendiente de la recta patrón} \times 30}$$

en la que $\Delta M = M_{50} - M_{20}$, para cada caso.

A continuación, se estudió el crecimiento de *B. melitensis* 16M (que posee mayor tamaño colonial que Rev1) y Rev1 Δwzm en placas de BAB con el sustrato cromogénico comercial 5-bromo-4-cloro-3-indolil-*N*-acetil- α -D-Neu5Ac (X-Neu5Ac; Biosynth). Para ello, se prepararon placas con siete diluciones seriadas 1 : 2 de dicho compuesto desde 4,8 g/L hasta 0,001 g/L (Fujii et al., 1993). En cada una de estas placas, se sembraron por triplicado 0,1 mL de una suspensión con $\approx 10^3$ UFC/mL de la cepa correspondiente y, tras incubación de las placas a 37 °C durante 3 días (cepa 16M) o 5 días (Rev1 Δwzm), se procedió al recuento del número de UFC y evaluación de la coloración azul en las mismas.

Por último, se analizó el perfil bioquímico de las cepas *B. abortus* bv1 2308 y *B. melitensis* 16M, Rev1, 16M Δwzm y Rev1 Δwzm , frente a una batería de 24 sustratos contenidos en el kit GnA+B-ID System (Microgen) y se determinaron las siguientes reacciones: descarboxilación de lisina y de ornitina, reducción de sulfato, fermentación de glucosa, manitol y xilosa, actividad β -galactosidasa, reducción de nitratos a nitritos o a nitrógenos, producción de indol, hidrólisis de urea, producción de acetoina, uso de citrato como única fuente de carbono, desaminación de triptófano, proteólisis de gelatina, uso de malonato como única fuente de carbono, fermentación de inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, lactosa, arabinosa, adonitol, rafinosa y salicina y actividad arginina dihidrolasa. Las deter-

minaciones bioquímicas se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando el reactivo de cinc en polvo (Fisher Chemical) para evaluar la reducción de nitratos. Tras incubación a 37 °C, durante 48 h, los patrones de las cepas de *Brucella* (todas ellas oxidasas positivas) se compararon los reportados en el propio kit para otras bacterias gramnegativas de interés, como son *C. freundii*, *E. cloacae*, *E. coli*, *S. enterica*, *H. alvei*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y *Serratia liquefaciens* (indicando un resultado positivo para cada especie cuando se muestra ≥ 50 % de cepas reaccionantes). Además, se incluyeron las cepas *Ochrobactrum intermedium* (incubación 48 h, oxidasas positivas), *Corynebacterium freneyi* y *Aerococcus* sp. (incubación 24 h, oxidasas negativas), como bacterias contaminantes de interés en las muestras ovinas (ver apartado 8. de este capítulo).

7. Estudio de suplementos para favorecer el crecimiento de *B. abortus* bv1 y otras brucellae en BSM recién preparado

Con el propósito de buscar un suplemento que solucionara el problema de inhibición de *B. abortus* bv1 en los medios CM y BSM preparados en fresco, se estudió el efecto del extracto enriquecido derivado de cianobacterias Ficogenic Broth® (FB) y del polvo de carbón activado (Omya Clariana). El FB se seleccionó por ser un capaz de favorecer el desarrollo de organismos procariontes y eucariotes (Bioinspired Materials, 2021); por otra parte, el carbón activado tiene un efecto detoxificante y ha sido ocasionalmente utilizado en ciertos medios de cultivo (Álvarez y Guijarro, 2007; Casino et al., 2022; Daly y Stevenson, 1985; Pan y Van Staden, 1998). En ambos estudios, el crecimiento de la cepa *B. abortus* 2308 se comparó con el de los controles *B. melitensis* 16M y Rev1 Δ wzm y/o *B. ovis* PA (cepa suero-dependiente).

Para el primer estudio, el FB se esterilizó por filtración en 0,2 μ m (Sarstedt) y se empleó para preparar placas con los siguientes medios de cultivo: i) BAB con ocho diluciones 1 : 2 de FB desde un 20 % hasta un 0,2 % (BAB-FB); ii) BAB con un 5 % de FB y el suplemento antimicrobiano del BSM; iii) agar bacteriológico al 1,6 % (Pronadisa) con un 5 % de FB; y iv) agar bacteriológico con un 5 % de FB más el suplemento antimicrobiano del BSM. En dichas placas se sembraron, por triplicado, 0,1 mL de suspensiones con $\approx 10^3$ UFC/mL de las cepas 2308, 16M, Rev1 Δ wzm o BoPA. Tras 5 días de incubación a 37 °C, se determinó si existía inhibición del crecimiento de cada cepa en cada medio, mediante el recuento del número de UFC vs. BAB y BSM. Además, se analizaron los valores de DO₆₀₀ alcanzados por 2308, 16M y Rev1 Δ wzm en FB al 5 % en agua vs. los alcanzados en TSB, tras 16 h de incubación a 37 °C y 150 r.p.m.

Para el segundo estudio, se prepararon placas de BSM con siete concentraciones decrecientes 1 : 2 de carbón activado comprendidas entre 4 y 0,1 g/L; su preparación se realizó diluyendo este compuesto junto con el BAB en agua ultrapura antes del autoclavado. En estos medios recién preparados, con o sin 5 % de NBCS, se sembraron (0,1 mL, por triplicado) suspensiones con $\approx 10^4$ UFC/mL de las cepas 2308, 16M, 16M Δwzm , Rev1, Rev1 Δwzm o BoPA y, tras 7 días de incubación de las placas a 37 °C (en atmósfera suplementada con un 10 % de CO₂ para BoPA), se determinó el número de UFC obtenidas en cada medio vs. el obtenido en BSM y BAB (o BAB-S para BoPA).

8. Estudios de selectividad de CM, BSM y BruSIC

Tras determinar la productividad de los medios selectivos en condiciones de laboratorio (ver apartado 4., arriba), se analizó su selectividad (*i. e.*, capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos contaminantes habitualmente presentes en muestras veterinarias) utilizando una selección de 15 cepas bacterianas, procedentes de muestras animales obtenidas en campo, purificadas, caracterizadas y conservadas en la colección del IdAB. En concreto, con los medios BSM y CM se analizaron las bacterias gramnegativas *E. coli*, *C. freundii*, *E. cloacae*, *H. alvei*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*, *Proteus vulgaris* y *Serratia liquefaciens*; y las grampositivas *B. amyloliquefaciens*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Para determinar la selectividad del medio BruSIC, se seleccionaron ocho de estas cepas que habían mostrado una gran inhibición en BSM y CM, *i. e.*, *B. amyloliquefaciens*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*.

Con cada cepa seleccionada, se prepararon inóculos con 10¹⁰ UFC/mL en TSB (37 °C, 12 h, en agitación; ver apartado 1.), se realizaron siete diluciones decimales en PBS y las suspensiones que contenían entre 10¹⁰ y 10³ UFC/mL se sembró (0,1 mL, por triplicado) en placas de BSM, CM y/o BruSIC recién preparadas, y también en placas de BSM y CM almacenadas a 4 °C durante 2, 3, 4, 8 y 12 semanas. Tras incubación de las placas a 37 °C durante 14 días, se determinó el número de UFC viables en cada medio y en el control TSA. Los resultados se expresaron como la concentración más elevada a la cual se inhibía totalmente el crecimiento bacteriano en cada caso.

A continuación, se estudió la selectividad de los medios desarrollados en esta tesis para inhibir los contaminantes bacterianos y fúngicos existentes en muestras animales

obtenidas en campo. Para analizar la selectividad de BSM vs. CM, se utilizaron un total de 1.789 muestras de tejidos ovinos; y para *BruSIC* vs. BSM, se utilizaron 19 de estas muestras más otras 62 muestras de leche de ovejas y vacas procedentes de rebaños libres de *Brucella* de Navarra. Las muestras de tejidos ovinos sembradas consistieron en hisopos impregnados en semen, leche fluido vaginal, tejidos placentarios, órganos (bazo, hígado y pulmón) o contenido abomasal de fetos o de corderos muertos tras el nacimiento; o en 1 mL/placa de líquido amniótico o tejidos homogeneizados en PBS (*i. e.*, cotiledones, bazo, hígado, epidídimo, glándulas sexuales masculinas accesorias, útero, glándula mamaria y ganglios linfáticos pre-escapulares, craneales, iliacos, precrurales, testiculares y mamarrios; ver detalles en el apartado 2.2.2. del capítulo 3 de esta tesis). Todas estas muestras veterinarias se sembraron simultáneamente en BSM, CM, *BruSIC* y/o FM, utilizando BAB como control. Las bacterias contaminantes encontradas en alguno de los medio se transfirieron a BAB y se identificaron mediante espectrometría de masas (MS) con desorción/ionización láser asistida por matriz con detección de masas por tiempo de vuelo (MALDI-TOF) en el Servicio de la Universidad Complutense de Madrid (UCM), según el protocolo descrito en Pérez-Sancho et al., 2018.

9. Validación de BSM y CM para el aislamiento primario de *B. melitensis* y *B. ovis*, a partir de muestras ovinas obtenidas en campo

Tras comprobar que BSM proveía mejor nivel de detección (productividad) que CM para ciertas cepas de *Brucella* en condiciones de laboratorio, se determinó la sensibilidad de ambos medios selectivos para el aislamiento de *Brucella* en muestras ovinas reales. Para ello, se utilizaron un total de 1.789 muestras procedentes de ovinos muestreados y sacrificados a distintos intervalos PI con Rev1 Δ wzm ($n = 1.111$), 16M Δ wzm ($n = 391$), H38 ($n = 75$) o BoPA ($n = 212$). Las muestras de hisopos, líquidos y homogeneizados de órganos y ganglios linfáticos ovinos obtenidas (ver apartado 8.) se sembraron por duplicado en placas de BSM y CM; tras incubar las placas a 37 °C, durante 14 días (con un 10 % de CO₂ para BoPA), las colonias compatibles con *Brucella* se subcultivaron individualmente en el mismo medio, para su posterior identificación microbiológica y molecular. La identificación microbiológica se realizó utilizando la técnica de cristal violeta-oxalato descrita en el capítulo 1 de esta tesis (Alton et al., 1988) y la identificación molecular, mediante PCR-WZM con los cebadores F1-R4 y F7-R8 de wzm (ver capítulo 1, apartado 2.1. y Tablas 5 y 6) y una PCR seguida de la técnica de polimorfismos por longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) con los cebadores rpsLA y rpsLB (Cloeckaert et al., 2002). Brevemente, esta última técnica se realizó a una Ta de 55 °C e incubación (37 °C, 5 min) del producto

de PCR (10 µL) con 1 µL de enzima FastDigest BcnI/NciI (Thermo Fisher Scientific), 2 µL de búfer y 17 µL de agua MilliQ, lo que proporcionó amplificación de dos fragmentos (de 468 pb y 88 pb) para Rev1 y su derivado Rev1Δwzm o tres fragmentos (de 360 pb, 108 pb y 88 pb) para 16M y su derivado 16MΔwzm, estas últimas ocasionadas por la presencia de dos sitios de restricción CC'GGG en este fragmento del gen *rpsI* en 16M (detectada *in silico*) y una mutación en uno de ellos descrita en Rev1 (Cloeckaert et al., 2002).

Una vez confirmados los aislamientos de *Brucella*, se determinó el número de UFC/placa de cada muestra en cada medio selectivo y, con ello, se calculó:

$$\text{i) la productividad de BSM (\%)} = \frac{\text{N.º de muestras positivas en BSM}}{\text{N.º total de muestras positivas}} \times 100;$$

ii) el n.º de muestras que proporcionaron colonias contables (*i. e.*, 1-650 UFC/placa) en al menos uno de los dos medios;

iii) el n.º de UFC totales obtenidas en dichas placas contables para cada cepa, en cada medio;

$$\text{iv) la mejora del aislamiento en BSM (\%)} = \frac{\text{N.º de UFC en BSM} - \text{N.º de UFC en CM}}{\text{N.º de UFC en CM}} \times 100;$$

v) la categoría de infección de cada muestra, en cada placa, en base a la siguiente clasificación: 1 (1-5 UFC), 2 (6-25 UFC), 3 (26-125 UFC), 4 (126-650 UFC) y 5 (>650 UFC) (Barrio et al., 2009); y con ello, se calculó el n.º de placas en las que BSM aportó una mayor, igual o menor categoría de infección que CM.

10. Representación gráfica y tratamiento estadístico de los datos

La representación gráfica de los resultados y su análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, USA). El valor *p* se determinó mediante las pruebas de Chi-cuadrado, para la comparación de porcentajes y la *t* de Student para muestras pareadas o ANOVA de uno o dos factores seguido de la prueba LSD de Fisher, para la comparación de medias; en todos los casos, se consideraron significativos valores de $p \leq 0,05$ (intervalo de confianza del 95 %). Las figuras finales se editaron uniformemente con GNU Image Manipulation Program 2.10 (código abierto, www.gimp.org) y la maquetación se realizó utilizando los programas Adobe Illustrator e InDesign 2020 (San José, CA, USA).

Resultados

1. Crecimiento de *B. melitensis* en los medios de cultivo selectivos FM y CM

1.1. Los medios FM y CM son inhibitorios para *B. melitensis* y sus derivados sensibles a polimixina

La siembra de las cepas de *B. melitensis* 16M, 16M Δ wzm, Rev1 y Rev1 Δ wzm en los medios selectivos FM y CM evidenció la necesidad de un incremento de los tiempos de incubación para la obtención de colonias visibles. En concreto, Rev1 Δ wzm requirió 7 días de incubación en FM y CM para alcanzar un tamaño colonial similar al logrado por Rev1 en BAB al cabo de 5 días (1-1,2 mm de diámetro).

Además, el cultivo en FM y en CM redujo significativamente el n.º de colonias de las cuatro cepas *B. melitensis* incluidas en este estudio, en comparación con los crecimientos obtenidos en placas del control BAB, a excepción del normal crecimiento de Rev1 en CM (Fig. 35).

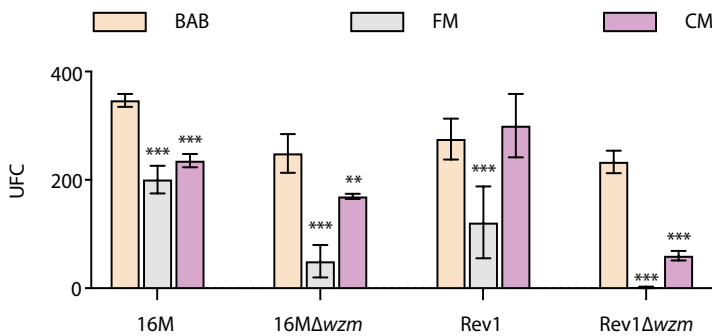


Fig. 35. Inhibición de *B. melitensis* en los medios selectivos FM y CM. Recuento del n.º de UFC (media \pm SD; n = 3) de 16M, 16M Δ wzm Rev1 y Rev1 Δ wzm crecidas en BAB, FM y CM tras 14 días de incubación a 37 °C. Prueba LSD de Fisher: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$ vs. BAB.

En consecuencia, se descartó el uso de FM para el cultivo de estas cepas y se procedió a analizar las causas de la inhibición de *B. melitensis* observada en CM.

1.2. La inhibición de Rev1 Δ wzm en CM se debe al efecto sinérgico entre vancomicina y colistina sobre esta cepa

Cuando se estudió el efecto de los cinco antimicrobianos presentes en CM frente al mutante más susceptible (Rev1 Δ wzm) y su parental Rev1, se comprobó que las concentraciones utilizadas de nitrofurantoína, nistatina y anfotericina B no ejercían actividad

inhibitoria alguna sobre estas cepas. Sin embargo, Rev1 Δ wzm resultó mucho más sensible que Rev1 tanto a vancomicina como a colistina (Tabla 19). En vista de estos resultados, se determinó la CMI y el índice FIC para la combinación de estos dos antibióticos, observándose una clara reducción de la CMI y un efecto sinérgico (FIC = 0,37) en Rev1 Δ wzm que contrastó con el efecto aditivo (FIC = 1) observado en Rev1 (Tabla 19).

Tabla 19. Actividad individual y combinada de los antimicrobianos del medio CM frente a Rev1 Δ wzm y su parental Rev1

Cepa	Antimicrobiano	Concentración ($\mu\text{g/mL}$) ¹		FIC	Actividad
		CMI/CMB ₅₀ -CMB ₉₀ ²	CMI combinada		
Rev1 Δ wzm	Vancomicina	320/640-640	40	0,37	Sinergia
	Colistina	46,9/46,9-93,8	11,7		
	Nitrofurantoína	160			
Rev1	Nistatina	>3200	ND	ND	ND
	Anfotericina B	>128			
	Vancomicina	640	320	1,00	Efecto aditivo
E. coli K12	Colistina	93,8/93,8-187,5	46,9		
	Nitrofurantoína	160			
	Nistatina	>3200	ND	ND	ND
E. coli K12	Anfotericina B	>128			
	Vancomicina	160	ND	ND	ND
	Colistina	1,5/2,9-5,9			

¹ UI/mL para la nistatina; ND: no determinado; ² Cuando los tres valores son iguales, se indica con una sola cifra.

2. Formulación y validación del nuevo medio BSM

2.1. Ajuste de las concentraciones de vancomicina y colistina para la formulación de BSM

En base a los valores de CMI/CMB obtenidos, se evaluó si reducir las concentraciones de vancomicina y colistina en placas de CM podría mejorar el crecimiento de Rev1 Δ wzm. Como se muestra en la Fig. 36A, únicamente se logró un recuento similar al obtenido en BAB con la combinación V₁₀-Col₄, por lo que estas fueron las concentraciones seleccionadas para formular el medio BSM en esta tesis.

Además, se confirmó la necesidad de suplementar BSM con NBCS para permitir el crecimiento de *Rev1Δwzm*; y, curiosamente, se observó que BSM permitía reducir a 5 días el periodo de incubación a 37 °C para el completo desarrollo colonial de *Rev1Δwzm*, en lugar de los 7 días requeridos en CM (Fig. 36B).

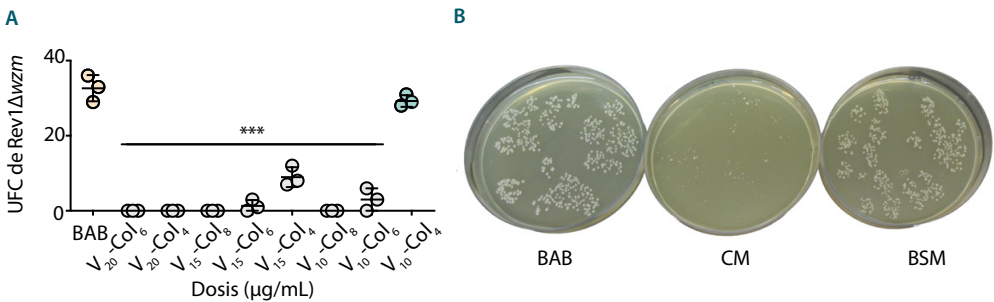


Fig. 36. Crecimiento de *Rev1Δwzm* en CM con distintas concentraciones de vancomicina y colistina y en el nuevo medio BSM vs. CM. A) Susceptibilidad del mutante en CM elaborado con las concentraciones de vancomicina (V) y colistina (Col) indicadas en el eje de abscisas; los resultados se expresan como media ± SD (n = 3) del n.º de UFC de *Rev1Δwzm* aisladas en 0,1 mL de una suspensión con $\approx 3,5 \times 10^2$ UFC/mL. Prueba LSD de Fisher: * $p \leq 0,001$ vs. el control BAB. B) Aspecto del desarrollo colonial de *Rev1Δwzm* en los medios BAB, CM y BSM, tras 5 días de incubación a 37 °C.**

2.2. BSM soluciona totalmente la inhibición de *B. melitensis* observada en FM y CM

Para determinar la productividad del nuevo medio BSM para el aislamiento de *B. melitensis*, las cepas 16M, 16MΔwzm, Rev1 y Rev1Δwzm se sembraron en FM, CM y BSM. Los porcentajes de supervivencia bacteriana se determinaron con respecto a los crecimientos obtenidos con cada cepa en BAB. De acuerdo con los resultados del estudio anterior (Fig. 35), los dos mutantes Δwzm y Rev1 mostraron mayor supervivencia en CM que en FM, con casi total inhibición de Rev1Δwzm en ambos medios selectivos. Además,

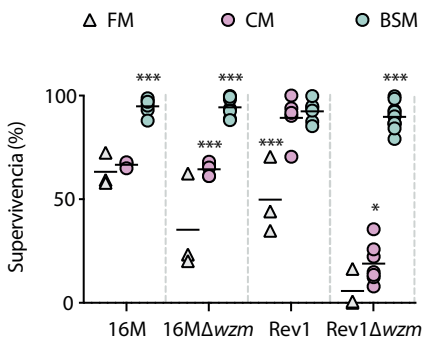


Fig. 37. Supervivencia de *B. melitensis* en el nuevo medio BSM. Porcentaje de supervivencia de 16M, 16MΔwzm, Rev1 y Rev1Δwzm obtenido en los medios selectivos FM, CM y BSM vs. el control BAB, tras la siembra (0,1 mL, por triplicado) en cada uno de ellos de suspensiones entre 10^9 y 10^3 UFC/mL. Cada símbolo representa la media de un triplicado; con cada cepa se realizaron al menos 3 (hasta 11) experimentos independientes; la línea horizontal indica la media de cada grupo. Prueba LSD de Fisher: * $p \leq 0,001$, * $p \leq 0,05$.**

se observó que BSM mejoraba significativamente la supervivencia de ambos mutantes Δwzm y la de 16M, permitiendo la detección de las cuatro cepas *B. melitensis* a los niveles del control BAB (Fig. 37). Estos resultados indicaron que BSM permitía mejorar significativamente la supervivencia de *B. melitensis* con respecto a FM y que BSM mejoraba o igualaba la productividad de CM para el aislamiento de estas cepas.

Adicionalmente, cuando las placas de los medios selectivos CM y BSM se incubaron con un 10 % de CO₂, se comprobó que se inhibía el crecimiento de 16M Δwzm (al igual que en BAB) y Rev1 Δwzm (resultados no mostrados).

2.3. BSM inhibe el desarrollo de bacterias contaminantes a los niveles de CM

El estudio de selectividad de BSM vs. CM para inhibir el crecimiento de bacterias habitualmente presentes en muestras veterinarias mostró que ambos medios impedían totalmente el crecimiento de inóculos con 10¹⁰-10⁸ UFC/mL de 12 de las 15 especies bacterianas analizadas, incluso tras 14 días de incubación (Tabla 20). Esta inhibición de

Tabla 20. Inhibición en BSM y CM de bacterias contaminantes habituales en muestras veterinarias

Cepa	Carga bacteriana (UFC/mL) totalmente inhibida en los medios selectivos para <i>Brucella</i> ¹	
	CM	BSM
<i>L. monocytogenes</i>		
<i>E. faecalis</i>		
<i>S. aureus</i>	10 ¹⁰	10 ¹⁰
<i>B. amyloliquefaciens</i>		
<i>S. pyogenes</i>		
<i>E. coli</i>		
<i>S. enterica</i>	10 ⁹	10 ⁹
<i>C. freundii</i>		
<i>P. aeruginosa</i>		
<i>K. pneumoniae</i>	10 ⁸ -10 ⁹	10 ⁸ -10 ⁹
<i>E. cloacae</i>		
<i>P. vulgaris</i>	10 ⁸	10 ⁸
<i>S. liquefaciens</i>		
<i>H. alvei</i>	<10 ³	<10 ³
<i>P. mirabilis</i>		

¹ Siembra en CM y BSM de suspensiones 1 : 10 en PBS que contenían entre 10¹⁰ UFC/mL y 10³ UFC/mL (0,1 mL/suspensión, por triplicado) y determinación de mayor concentración de bacterias que fue totalmente inhibida en cada medio selectivo vs. TSA.

bacterias contaminantes permaneció inalterada tras el almacenamiento de ambos medios a 4 °C durante 8-12 semanas; tan sólo se detectó una ligera pérdida progresiva de la inhibición de *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *P. vulgaris* (resultados no mostrados).

3. Validación de BSM con muestras animales obtenidas en campo

3.1. BSM mejora la productividad de CM para el aislamiento primario de Rev1Δwzm, 16MΔwzm y *B. ovis* PA en muestras ovinas obtenidas en campo

El cultivo por duplicado en BSM y CM de 1.789 muestras veterinarias procedentes de 163 ovinos permitió determinar la productividad de ambos medios selectivos para el aislamiento de distintas cepas de *Brucella*. Como resultado, se obtuvieron un total de 50 muestras positivas a 16MΔwzm, 50 a Rev1Δwzm, 28 a H38 y 106 a BoPA. En la Fig. 38A se representa que, del total de muestras cultivadas en ambos medios selectivos, BSM identificó *Brucella* en 34 muestras que resultaron negativas en CM y, a la inversa, 16 muestras detectadas en CM fueron negativas en BSM. Cuando estos datos se analizaron considerando cada cepa por separado, se observó que el medio BSM permitió identificar 16MΔwzm, Rev1Δwzm, H38 o BoPA en 14, 12, 1 o 7 muestras, respectivamente que, sin embargo, fueron negativas en CM. Estos datos, junto con los de crecimiento en CM, evidenciaron que la siembra en BSM conllevó un 100 % de productividad para Rev1Δwzm, un 80 % para 16MΔwzm, un 86 % para H38 y un 98 % para BoPA. Entre las muestras positivas, se seleccionaron un total de 159 muestras (i. e., 48 con Rev1Δwzm, 42 con 16MΔwzm y 69 con BoPA) con colonias bien individualizadas (<650 UFC/placa) y que, por lo tanto, permitieron calcular el n.º de UFC/placa en al menos uno de los dos medios selectivos. De la suma de los recuentos totales obtenidos para cada cepa se determinó que el empleo de BSM supone un incremento significativo ($p \leq 0,001$) del 78,2 % de colonias contables con respecto al empleo de CM para el aislamiento de Rev1Δwzm y del 37,2 % para el aislamiento de 16MΔwzm, mientras que este incremento en BSM resultó sólo de un 2 % para BoPA (Fig. 38B). Considerando los cultivos simultáneos en BSM y CM como muestras pareadas, se detectó un mayor ($p \leq 0,05$) n.º de UFC/placa de Rev1Δwzm y 16MΔwzm en BSM que en CM, mientras que ambos medios dieron resultados casi idénticos para el aislamiento de *B. ovis* PA (Fig. 38C). Además, la siembra en BSM implicó que 23/48 (47,9 %) muestras de Rev1Δwzm, 17/42 (40,5 %) muestras de 16MΔwzm y 18/69 (27,1 %) muestras de BoPA fueran clasificadas en un nivel de infección superior al identificado en CM, frente a una frecuencia del caso contrario en 2/48 (4,2 %), 11/42 (26,2 %) y 7/69 (10,1 %), respectivamente (Fig. 38D).

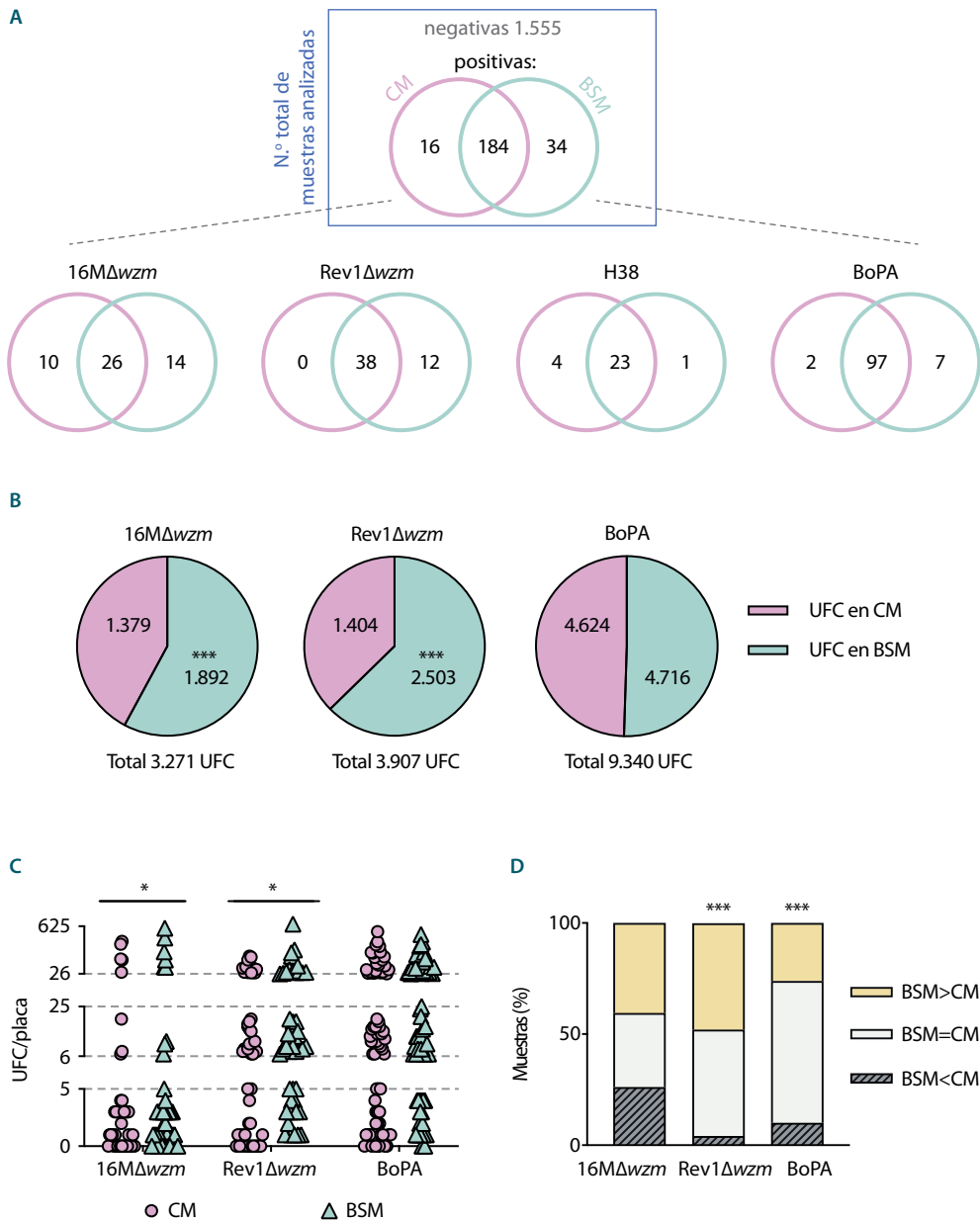


Fig. 38. Validación de la productividad de BSM con muestras veterinarias. A) Diagramas de Venn que representan el n.º total de muestras positivas (>1 UFC/placa) en CM y/o BSM. B) N.º total de UFC obtenidas en 159 muestras ovinas que presentaron colonias contables de 16MΔwzm (n = 42), Rev1Δwzm (n = 48) o *B. ovis* PA (n = 69) sembradas por duplicado en los medios selectivos BSM y CM, C) recuentos individuales en cada una de estas muestras y D) variación de la sensibilidad de BSM vs. CM calculada como el porcentaje de muestras para las que la siembra en BSM supuso un aumento (>), mantenimiento (=) o disminución (<) de la categoría de infección. Pruebas Chi-cuadrado o t de Student para muestras pareadas: *** $p \leq 0,001$, * $p \leq 0,05$.

3.2. BSM conserva la selectividad de CM en muestras ovinas reales

La capacidad de BSM para inhibir los microorganismos contaminantes presentes en muestras veterinarias reales se analizó con respecto a la misma propiedad en CM, utilizando BAB como control del nivel de contaminación natural de dichas muestras. Las 1.789 muestras ovinas de campo sembradas indicaron que ambos medios selectivos ofrecían un nivel similar de inhibición de los hongos y bacterias contaminantes presentes en ellas, en contraste con el abundante crecimiento observado en las placas del control BAB (Fig. 39).

Además, el cultivo de un número representativo de estas muestras en FM (n = 75) evidenció que BSM y CM poseían una capacidad inhibitoria similar a FM para muestras ovinas obtenidas en campo, ya que se encontraron un total de 58, 38 y 32 UFC de contaminantes en FM, BSM y CM, respectivamente, tan sólo en un 4 % de las placas de FM y un 5,3 % de las de BSM y CM. Las bacterias encontradas de manera ocasional se identificaron como *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Roseomonas mucosa*, *C. freneyi*, *C. xerosis*, *Aerococcus* sp. y *O. intermedium*.

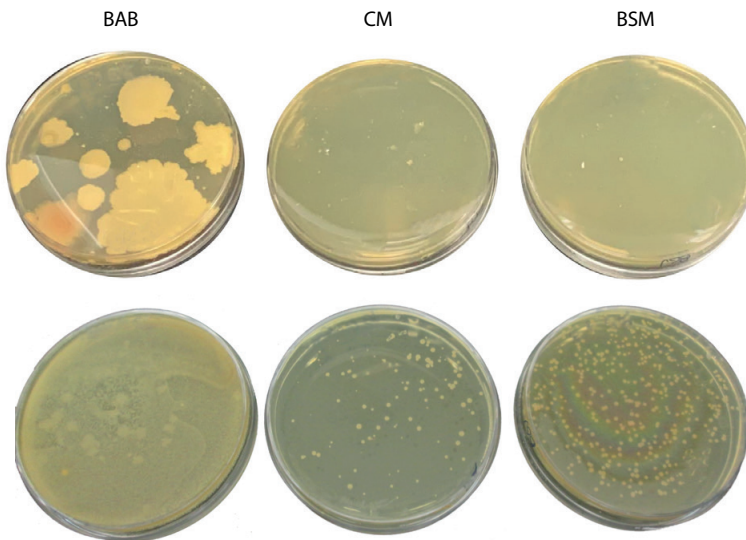


Fig. 39. Inhibición de microorganismos contaminantes de muestras ovinas reales obtenidas en campo y sembradas en los medios selectivos BSM y CM. Imágenes representativas de la inhibición en CM y BSM de microorganismos contaminantes vs. BAB en muestras ovinas de cotiledones (fila superior) o hisopos impregnados en tejidos infectados con Rev1 Δ wzm (fila inferior).

4. Estudio de características bioquímicas de *Brucella* de aplicación para el desarrollo de un medio de cultivo diferencial

4.1. Marcaje con indicadores de pH

El cultivo de bacterias típicamente presentes en muestras de campo y del mutante Rev1Δwzm en los medios TSA, BAB o BSM suplementados con indicadores de pH supuso, en todos los casos, un aumento del pH directamente dependiente de la densidad bacteriana. La incorporación de azul de bromotimol o rojo neutro al medio provocó que tanto las colonias como el medio circundante se tornaran de color azul o amarillo, respectivamente en función del indicador, a concentraciones de $\geq 10^4$ UFC/mL, mientras que este viraje resultó de menor intensidad en el caso de diluciones menos concentradas con crecimiento de colonias más aisladas (Fig. 40).

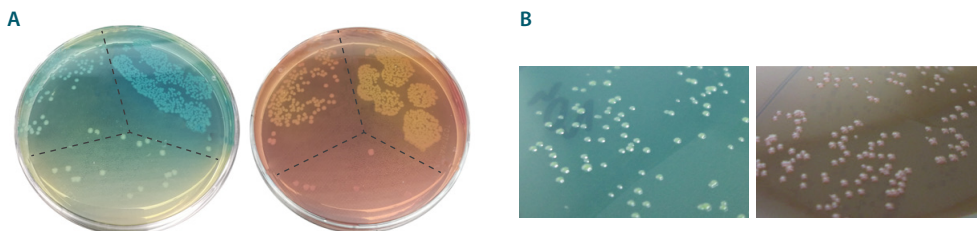


Fig. 40. Crecimiento bacteriano en distintos medios de cultivo con indicadores de pH. Ejemplos del viraje de color generado en función de la densidad de bacterias/placa, en medio con 0,02 g/L de los indicadores azul de bromotimol (amarillo a pH 6,0 con viraje a azul a pH 7,6) o rojo neutro (rojo a pH 6,8 con viraje a amarillo a pH 8,0). A) TSA + indicador en placas sembradas con 0,1 mL de 10^5 , 10^4 y 10^3 UFC/mL de *E. coli*, como ejemplo de bacteria contaminante o B) BAB + indicador con 10^3 UFC/mL de Rev1Δwzm.

4.2. Identificación de reacciones bioquímicas diferenciales de *Brucella* para marcaje cromogénico basado en hidrolasas

Con el objetivo de restringir el marcaje de color únicamente a la colonia, se realizó una primera selección de 16 enzimas con actividad hidrolasa en *B. melitensis*, según las anotaciones en los repositorios KEGG y Uniprot (Tabla 21), cuyo principal producto o compuesto análogo podría ser combinado con un cromóforo para la identificación diferencial de *Brucella* en un medio de cultivo selectivo. A continuación, se llevó a cabo una revisión de la utilización de sustratos como única fuente de carbono, que mostró diferencias tanto entre distintas especies como entre las cepas de cada una de ellas (Tabla 22); adicionalmente, de este estudio se obtuvo también información acerca de la susceptibilidad a diversos compuestos químicos que podrían estar presentes en los

Tabla 21. Selección de enzimas con actividad hidrolasa anotadas en UniProt para *B. melitensis* consideradas de interés para el desarrollo de un medio cromogénico

Enzima	N.º de acceso	Reacción catalítica	
		Sustrato (+ H ₂ O)	Productos
Adenina desaminasa	Q8YCA5	Adenina	Hipoxantina + amonio
Adenosil-homocisteinasa	Q8YE49	S-Adenosil-L-homocisteína	Adenosina + L-homocisteína
Arginasa	P0A2X9	L-Arginina	L-Ornitina + urea
Formiltetrahidrofolato deformilasa	Q8YCZ0	10-Formiltetrahidrofolato	Formato + tetrahidrofolato
Fosfoglicolato fosfatasa	Q8YH29	2-Fosfoglicolato	Glicolato + ortofosfato
Fructosa-1,6-bisfosfatasa	Q8YCV6	β-D-Fructosa 1,6-bisfosfato	β-D-Fructosa 6-fosfato + ortofosfato
Glutaminasa	Q8YBJ3	L-Glutamina	L-Glutamato + amonio
GTP-ciclohidrolasa I	Q8YH94	Guanosín trifosfato	7,8-Dihidrobiopterina 3'-trifosfato + formato
Guanina desaminasa	Q8YFF1	Guanina	Xantina + amonio
Hidroxiacilglutación hidrolasa	Q8YJF4	(R)-S-Lactoilglutación	Glutación + (R)-Lactato
Inositol monofosfatasa	Q8YIW3	Inositol fosfato	Mioinositol + ortofosfato
Pirofosfatasa	P64305	Xantosina/inosina trifosfato	Xantosina/inosina monofosfato + difosfato
S-formilglutación hidrolasa	Q8YEQ6	S-Formilglutación	Formato + glutación
Succinil-diaminopimelato desuccinilasa	Q8YDB0	N-Succinil-LL-2,6- diaminoheptanedioato	Succinato + LL-2,6- diaminoheptanedioato
Tiaminasa	Q8YEY9	4-Amino-5-aminometil-2-metilpirimidina	4-amino-5-hidroxiometil-2-metilpirimidina + amonio
Ureasa	Q8YF72	Urea	Amonio + CO ₂

medios de cultivo. De modo general, se obtuvieron resultados positivos con 18 de los 71 sustratos analizados, de los cuales sólo 9 fueron metabolizados indiscriminadamente por 16M, Rev1, 2308, S19 y sus respectivos mutantes Δwzm , ya que algunos de ellos resultaron exclusivos de *B. melitensis* (5/71) o *B. abortus* (4/71). No obstante, en muchos casos se observó una baja turbidez del medio debido al lento crecimiento de *Brucella*, con el consecuente registro de resultados intermedios.

Tabla 22. Patrón de utilización de sustratos y susceptibilidad química de *Brucella*

Compuesto	<i>B. melitensis</i>				<i>B. abortus</i>			
	16M	16M Δwzm	Rev1	Rev1 Δwzm	2308	2308 Δwzm	S19	S19 Δwzm
Neu5Ac	+	+	+	±	-	-	-	-
L-Serina	+	+	±	+	-	-	-	-
Ácido α -cetobutírico	+	±	+	±	-	-	-	-
Ácido propiónico	+	+	+	+	-	-	-	-
Inosina	±	±	±	-	-	-	-	-
α -D-Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	±
D-Fructosa	+	±	+	±	+	±	+	±
D-Galactosa	+	±	+	+	+	+	+	+
L-Fucosa	+	+	+	-	+	±	±	-
Ácido L-Glutámico	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido L-Láctico	+	±	+	±	+	+	+	+
L-Alanina	±	±	+	±	+	±	+	±
Ácido acético	±	±	+	±	+	+	+	±
Ácido bromosuccínico	-	±	+	±	+	+	-	-
Dextrina	±	-	-	-	+	±	+	±
Mioinositol	-	-	-	-	+	±	-	-
Piruvato de metilo	-	-	-	-	+	±	+	+
Ácido L-málico	-	-	-	-	+	+	+	+
pH 6	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5	+	±	+	±	+	+	+	+
NaCl 1 %	+	±	+	-	+	±	+	+
NaCl 4 %	-	-	-	-	+	-	-	-
Lactato sódico 1 %	+	+	+	±	+	+	+	+
Rifamicina SV	+	+	+	+	+	-	+	+
Vancomicina	+	+	+	+	+	+	+	+
Azul de tetrazolio	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido nalidíxico	+	+	+	+	+	+	+	+
Telurito de potasio	+	+	+	+	+	+	+	+
Aztreonam	+	+	+	+	+	+	+	+
Butirato de sodio	±	-	±	-	+	±	+	-
Troleandomicina	-	-	-	-	+	+	+	+

+ : resultado positivo, ± : resultado intermedio, - : resultado negativo. Se obtuvo un resultado negativo para todas las cepas con los sustratos: α -D-lactosa, β -metil-D-glucósido, 3-metilglucosa, ácido γ -aminobutírico, ácido α -cetoglutárico, ácido β -hidroxi-D,L-butírico, ácido α -hidroxibutírico, ácido acetoacético, ácido cítrico, ácido D-galacturónico, ácido D-glucónico lactona, ácido D-glucurónico, ácido D-málico, ácido D-sacárico, ácido fórmico, ácido L-aspartico, ácido L-piroglutámico, ácido múico, ácido *p*-hidroxifenilacético, ácido quínico, D-arabitol, D-aspartato, D-celobiosa, D-fructosa-6-P, D-fucosa, D-glucosa-6-P, D-maltosa, D-manitol, D-manosa, D-melibiosa, D-rafinosa, D-salicina, D-serina, D-sorbitol, D-trehalosa, D-turanosa, estaquirosa, ester de metil-D-lactato, gelatina, gentiobiosa, glicerol, glicil-L-prolina, glucuronamida, L-arginina, L-galactonato, L-histidina, L-ramnosa, N-acetil- β -D-manosamina, N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina, pectina, sacarosa, Tween 40; y con los compuestos químicos: NaCl al 8 %, D-serina, ácido fusídico, guanidina, HCl, lincomicina, cloruro de litio, minociclina, Niaproof 4, bromato de sodio y violeta de tetrazolio.

De entre todos los sustratos que permitieron el crecimiento bacteriano destacó el Neu5Ac, debido a que este compuesto puede obtenerse a partir de cadenas polisacáridicas por medio de actividad hidrolasa (Byers et al., 1996) y además está relacionado con la virulencia de *Brucella* (Castañeda-Roldán et al., 2004). En vista de su utilización por todas las cepas de *B. melitensis*, se seleccionaron Rev1 y su mutante para analizar si presentaban actividad neuraminidasa. Como resultado se comprobó que Rev1 y Rev1 Δ wzm presentaron un nivel creciente de actividad catalítica de esta enzima en función de la concentración bacteriana, alcanzando hasta 0,9 U/L con 10^{11} UFC/mL (Fig. 41A). Además, cuando se sembró Rev1 Δ wzm y 16M en medio BAB con el sustrato cromogénico X-Neu5Ac a concentraciones entre 0,001 g/L y 4,8 g/L, se obtuvo un buen crecimiento de ambas cepas y a partir de 0,6 g/L se observó un halo azulado alrededor de las colonias al visualizar la placa al trasluz (Fig. 41B).

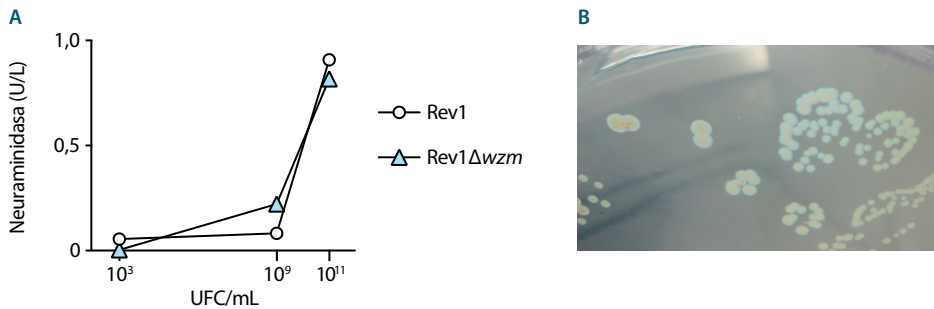


Fig. 41. Actividad neuraminidasa en *B. melitensis* Rev1 y Rev1 Δ wzm. A) Cuantificación de la actividad neuraminidasa (U/mL) con 10^3 , 10^9 o 10^{11} UFC/mL de Rev1 Δ wzm o Rev1 parental, utilizando el Neuraminidase Assay Kit (Sigma-Aldrich). B) Halo azulado observado alrededor de colonias de Rev1 Δ wzm mediante transiluminación, en placas de BAB suplementadas con 1,2 g/L de X-Neu5Ac (Biosynth) e incubadas a 37 °C, durante 5 días.

Finalmente, se definió el patrón bioquímico de *B. melitensis* 16M, Rev1 y Rev1 Δ wzm y *B. abortus* 2308 (Fig. 42), y se comparó con el de las bacterias contaminantes aisladas de muestras ovinas de campo (apartado 3.2.). *Brucella* proporcionó un resultado positivo para las actividades enzimáticas siguientes: i) lisina descarboxilasa, ii) reducción de nitratos a nitritos, iii) hidrólisis de urea, y iv) fermentación de arabinosa, mientras que estas reacciones fueron negativas para los contaminantes *O. intermedium* y *Aerococcus* sp. (actividades iii y iv), *C. freneyi* (actividades i, ii y iii), *C. freundii* (actividades i y iii), *K. pneumoniae* y *E. cloacae* (actividad i), *E. coli* y *H. alvei* (actividad iii), *P. aeruginosa* (actividad ii), y *P. vulgaris* y *P. mirabilis* (actividades i y iv). Sin embargo, 9 de las 13 bacterias contaminantes seleccionadas, entre las que se incluyen *O. intermedium* y *Aerococcus* sp. de origen ovino, utilizaron el citrato, sustrato con el que todas las brucellae analizadas fueron negativas.

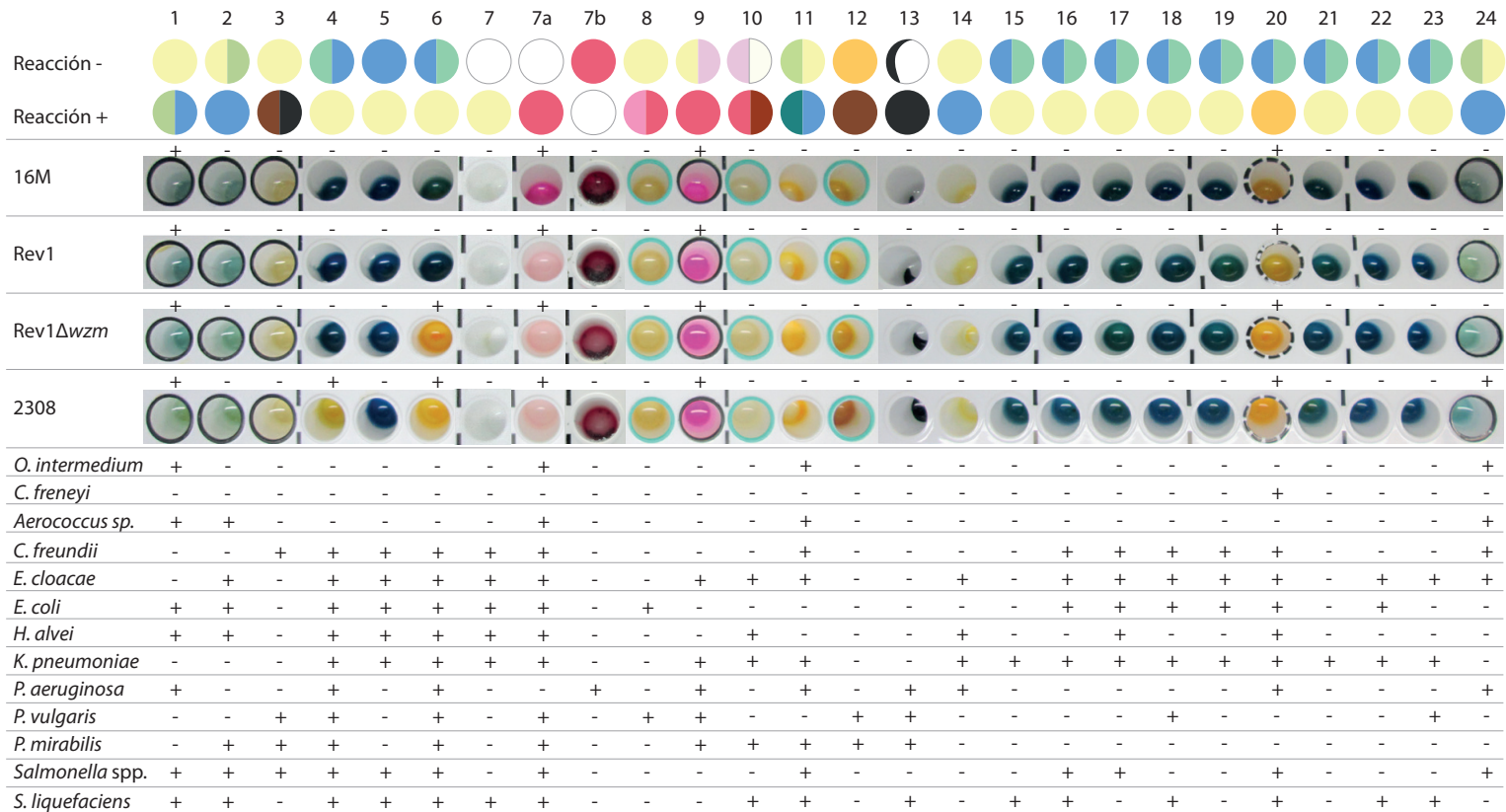


Fig. 42. Patrón bioquímico de *Brucella* spp. y bacterias ambientales. Resultados obtenidos con GnA+B-ID System (Microgen) para las cepas indicadas. Reacciones analizadas: 1: descarboxilación de lisina, 2: descarboxilación de ornitina, 3: reducción de sulfato, 4: fermentación de glucosa, 5: fermentación de manitol, 6: fermentación de xilosa, 7: actividad β-galactosidasa, reducción de nitratos a 7a: nitritos o a 7b: nitrógenos, 8: producción de indol, 9: hidrólisis de urea, 10: producción de acetoina, 11: uso de citrato como única fuente de carbono, 12: desaminación de triptófano, 13: proteólisis de gelatina, 14: uso de malonato como única fuente de carbono, fermentación de 15: inositol, 16: sorbitol, 17: ramnosa, 18: sacarosa, 19: lactosa, 20: arabinosa, 21: adonitol, 22: rafinosa, 23: salicina y 24: actividad arginina dihidrolasa.

5. BSM permite el crecimiento de otras brucellae como en BAB, pero inhibe el de *B. abortus* bv1

5.1. BSM y CM inhiben el crecimiento *B. abortus* bv1

Tras lograr la supervivencia de los mutantes atenuados de *B. melitensis* en BSM, se exploró la adecuación de este medio de cultivo en comparación con la de FM y CM para el aislamiento de otras brucellae (Fig. 43). Como resultado, *B. canis* y *B. suis* mostraron un buen crecimiento en los tres medios, permitiendo más de un 80 % de supervivencia vs. BAB, mientras que *B. ovis* PA creció en mayor porcentaje en BSM y CM (98 %) que en FM (42 %), medio en el que esta cepa precisó 12 días de incubación para alcanzar su recuento máximo. Inesperadamente, se observó una importante inhibición de las cepas de *B. abortus* bv1 en los tres medios, siendo más marcada en FM con RB51 (20 % de supervivencia) que con 2308 o S19 (59 % o 77 % de supervivencia, respectivamente) y casi total inhibición de 2308 y S19 (<1 % de supervivencia) en los medios BSM y CM. La incubación con un 10 % de CO₂ no compensó la inhibición observada de 2308 (datos no mostrados).

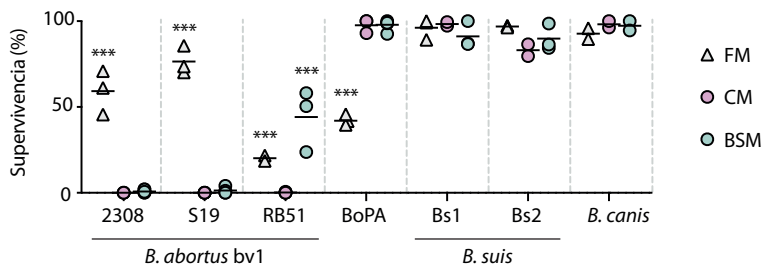


Fig. 43. Crecimiento de *B. abortus*, *B. ovis*, *B. suis* o *B. canis* en medios selectivos. Porcentaje de supervivencia de las cepas *B. abortus* bv1 2308, S19 y RB51, *B. ovis* PA (BoPA), *B. suis* bv1 1330 (Bs1), *B. suis* bv2 198 (Bs2) y *B. canis* RM6/66 en FM, CM y BSM vs. BAB (o BAB-S e incubación con un 10 % de CO₂ para BoPA). Suspensiones con diluciones decimales seriadas entre 10⁹ y 10³ UFC/mL se sembraron (0,1 mL, por triplicado) en cada medio y las placas se incubaron hasta 14 días a 37 °C. Cada símbolo representa un experimento independiente (al menos 2 y hasta 7) y la media de cada grupo se indica con una línea horizontal. Prueba LSD de Fisher: *** $p \leq 0,001$.

5.2. La inhibición de *B. abortus* bv1 en CM y BSM sólo se produce en medio recién preparado

Con el propósito de determinar si la inhibición observada con *B. abortus* 2308 era específica de la cepa de referencia utilizada o, por el contrario, era común a otras cepas

del biovar 1 y, al mismo tiempo, estudiar el efecto del almacenaje de las placas en dicha inhibición, se seleccionaron otras cepas 2308 de 3 orígenes distintos, más 5 cepas de *B. abortus* bv1 y una cepa bv3 de campo (denominadas Ba1 y Ba3; [Tabla 17](#)). Estas cepas se cultivaron en placas de BSM y CM utilizadas la misma semana de su preparación o tras su almacenaje a 4 °C, durante 8 semanas. Como se muestra en la [Fig. 44](#), todas las cepas de *B. abortus* bv1 proporcionaron menores ratios de supervivencia en las placas recién preparadas que en las utilizadas tras 8 semanas de almacenaje; por el contrario, la cepa Ba3 mostró igual supervivencia en placas con y sin almacenaje, siendo superior al 74 % en todos los casos.

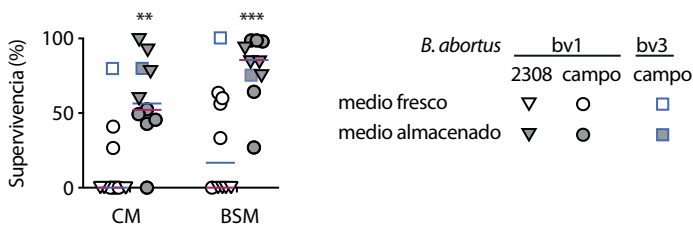


Fig. 44. Inhibición de *B. abortus* en medios selectivos recién preparados o almacenados. Porcentaje de supervivencia de distintas cepas de *B. abortus* (la cepa de referencia 2308 de 3 orígenes distintos, más 5 cepas bv1 y una cepa bv3 de campo) calculado tras la siembra (0,1 mL, por triplicado) en placas de CM, BSM y BAB, de suspensiones con diluciones decimales seriadas entre 10^9 y 10^3 UFC/mL. Las placas de CM y BSM se utilizaron la misma semana de su elaboración (medio fresco) o tras 8 semanas de almacenamiento a 4 °C (medio almacenado); cada símbolo representa la media (n = 3) de una cepa, la línea horizontal azul representa la media de todas las cepas analizadas (n = 9) y la línea roja, la media de las cepas bv1 (n = 8). Prueba LSD de Fisher: *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$ vs. medio fresco.

5.3. La inhibición de *B. abortus* bv1 en CM y BSM se debe a su susceptibilidad a la colistina y desaparece progresivamente con el tiempo de almacenaje de las placas previo a su uso

Para determinar si la inhibición de *B. abortus* bv1 en CM y BSM estaba relacionada con su susceptibilidad a polimixinas, se analizó la CMI de la colistina con las cepas de referencia 2308 (virulenta) y S19 (atenuada) en comparación con cepas de *B. melitensis*. Como resultado, la cepa virulenta mostró inhibición con bajas concentraciones de esta polimixina (CMI = 15,5 µg/mL), lo que supuso una susceptibilidad tres veces mayor que la del mutante Rev1Δwzm (46,9 µg/mL) y seis veces mayor que la de las cepas lisas *B. melitensis* 16M y Rev1; la cepa vacunal S19 resultó más resistente que la cepa virulenta ([Tabla 23](#)). Estos bajos valores de CMI de colistina observados se tradujeron en una gran inhibición del crecimiento de *B. abortus* 2308 en placas de medio sólido BAB-S-Col₄ recién preparado (utilizado en 1 semana, [Fig. 45](#)). A continuación, las placas

almacenadas a 4 °C durante 2 semanas o más permitieron un incremento significativo y progresivo de la supervivencia bacteriana, hasta alcanzar un 74 % de supervivencia media en placas almacenadas durante 4-8 semanas; en ningún caso se alcanzaron los niveles de crecimiento de 2308 en las placas del control en BAB.

Tabla 23. Susceptibilidad de distintas cepas de *B. melitensis* y *B. abortus* a la colistina

Parámetro ¹	Concentración de colistina (µg/mL)										
	<i>B. melitensis</i>					<i>B. abortus</i>					
	Rev1		16M			2308		S19		Control	
	WT	Δwzm	Δwzt	$\Delta\Delta$	WT	Δwzm	WT	Δwzm	WT	Δwzm	<i>E. coli</i> K12
CMI	93,8	46,9	46,9	46,9	93,8	46,9	15,5	3,9	31,25	3,9	1,5
CMB ₅₀	93,8	93,8	93,8	93,8	187,5	46,9	31,25	7,8	62,5	7,8	2,9
CMB ₉₀	187,5	93,8	93,8	93,8	187,5	93,8	62,5	7,8	62,5	7,8	5,9

¹ CMI: concentración mínima inhibitoria; CMB: concentración mínima bactericida para el 50 % (CMB₅₀) o el 90 % (CMB₉₀), a partir de cultivos con $\approx 1,5 \times 10^6$ UFC/mL en Müller-Hinton expuestos a diluciones seriadas 1 : 2 de colistina.

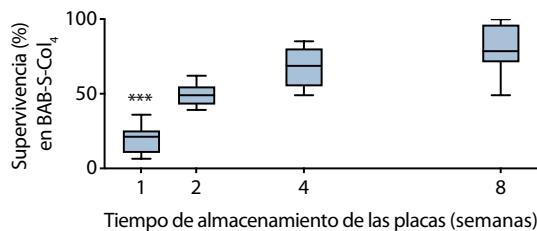


Fig. 45. Crecimiento de *B. abortus* en medio sólido suplementado con colistina, tras distintos periodos de almacenaje. Porcentaje de supervivencia de la cepa 2308 en BAB-S-Col₄ vs. BAB, tras la siembra (0,1 mL, por triplicado) de diluciones decimales seriadas entre 10⁹ y 10³ UFC/mL e incubación de las placas a 37 °C hasta 14 días; comparación entre placas utilizadas la misma semana de su preparación (1 semana) o tras su almacenamiento a 4 °C durante 2, 4 y 8 semanas. Las cajas representan los dos cuartiles centrales, la línea interior indica la mediana y los bigotes incluyen los percentiles de 10 a 90 (n = 6-9). Prueba LSD de Fisher: ****p* ≤ 0,001 vs. los otros grupos.

Curiosamente, cuando se analizó el crecimiento de 2308 en BSM con concentraciones reducidas de colistina (3, 2, 1 y 0,5 µg/mL), este medio fresco continuó siendo inhibitorio, incluso en ausencia de este antibiótico y en placas almacenadas durante 8 semanas, detectándose ≤ 1 UFC/placa (datos no mostrados).

5.4. El normal crecimiento de *B. abortus* bv1 en placas almacenadas de CM y BSM no se debe a la inactivación antibiótica por pérdida de agua ni a variaciones en el pH en el medio

La recuperación del crecimiento normal de *B. abortus* bv1 2308 en placas almacenadas durante 4-8 semanas no pareció deberse a un efecto de deshidratación, ya que se observó el mismo efecto en medio líquido (*i. e.*, la inhibición del crecimiento de 2308 en medio líquido fresco y normal crecimiento en medio líquido almacenado). En detalle, en el ensayo de microdilución mediante diluciones seriadas 1 : 2 del cóctel antimicrobiano de BSM recién rehidratado, la cepa 2308 mostró crecimiento por turbidez en las diluciones novena ($V_{0,04}$ - $Col_{0,02}$ - $Nitro_{0,02}$ - $Nista_{0,20}$ - $AnfoB_{0,01}$) en TSB y séptima ($V_{0,16}$ - $Col_{0,06}$ - $Nitro_{0,16}$ - $Nista_{1,56}$ - $AnfoB_{0,06}$) en TSB-S. Sin embargo, cuando el suplemento se conservó durante 4 semanas, 2308 creció con normalidad en presencia de los antibióticos a la concentración del medio BSM (V_{10} - Col_4 - $Nitro_{10}$ - $Nista_{100}$ - $AnfoB_4$); comparativamente, el control Rev1 exhibió un crecimiento normal en todos los casos, incluso con el suplemento recién preparado.

Asimismo, se comprobó que el pH de las placas de los medios CM o BSM se mantenía constante entre pH 7-7,5 a lo largo de 4 semanas de almacenaje a 4 °C.

6. Formulación del nuevo medio *BruSIC* para el aislamiento selectivo de *Brucella*, incluyendo *B. abortus* bv1 en placas recién preparadas

Con el propósito de buscar un suplemento que solventara el problema de inhibición de *B. abortus* bv1 en los medios CM y BSM utilizados en fresco, se estudió el crecimiento de distintas cepas de *Brucella* utilizando, bien el extracto enriquecido FB derivado de cianobacterias, o bien polvo de carbón activado como agente quelante detoxificante.

6.1. El suplemento Ficogenic Broth® (FB) inhibe el crecimiento de *B. abortus* bv1

El suplemento con FB al 20 %, 15 % o 10 % en BAB no permitió un adecuado crecimiento de *Brucella*, mientras que al 5 % las cepas analizadas crecieron con normalidad sobre el BAB. Sin embargo, en todos los casos, el uso de un 5 % de FB proporcionó una menor turbidez en agua que en TSB (Tabla 24). Cuando se utilizó esta concentración de FB con los antimicrobianos del medio selectivo BSM tanto en BAB como en agar (grupos BAB-AM y Agar-AM), no se obtuvo ninguna de 2308 ni de Rev1 Δwzm , por lo que este

compuesto se descartó como componente del nuevo medio selectivo.

Tabla 24. Estudio de crecimiento de *Brucella* con el extracto Ficogenic Broth® (FB)

Cepa	Crecimiento en medio sólido (UFC/0,1 mL) ¹								DO ₆₀₀ en caldo ²	
	Control	FB 20 %	FB 15 %	FB 10 %	FB ≤5 %	FB 5 %			TSB	FB 5 %
	BAB ³	BAB	BAB	BAB	BAB	Agar ⁴	BAB-AM ⁵	Agar-AM ⁶		
2308	223	0	ND	ND	ND	0	0	0	1,36	0,25
16M	91	ND	0	24	63	89	90	2	1,50	0,80
Rev1Δwzm	97	0	0	97	96	2	0	0	0,85	0,64
BoPA	195	0	ND	ND	+ ⁷	+ ⁷	ND	ND	ND	ND

¹ Recuentos bacterianos (UFC/0,1 mL) tras la siembra (0,1 mL, por triplicado) de ≈103 UFC/mL de las cepas indicadas en placas con el medio de cultivo indicado en cada columna e incubadas (37 °C, 5 días); ² valores de absorbancia (DO₆₀₀) de las cepas cultivadas (37 °C, 150 r.p.m., 16 h) en FB al 5 % en agua vs. en control TSB; ³ o BAB-S para BoPA; ⁴ agar bacteriológico al 1,6 %; ⁵ BAB suplementado con los antimicrobianos de BSM (AM); ⁶ agar suplementado con AM; ⁷ +: presencia de crecimiento tras siembra por agotamiento; ND: no determinado.

6.2. El carbón activado favorece el crecimiento de *B. abortus* bv1 y otras brucellae en BSM y permite reemplazar el uso de suero

La incorporación de 4, 3, 2 o 1 g/L de carbón activado en placas recién preparadas de BSM mostró una supervivencia del 74,5-100 % para 2308 y del 84,8-100 % para el mutante Rev1Δwzm. Asimismo, cuando se eliminó el suero bovino de la composición del BSM (BAB-AM) y se suplementó con dichas concentraciones de carbón, el porcentaje de supervivencia de 2308 y Rev1Δwzm fue superior al 86,9 % en todos los casos. Concentraciones ≤0,5 g/L de este suplemento no permitieron el aislamiento de 2308. Como se ilustra en la Fig. 46A, la preparación de placas frescas con BAB-AM suplementado con 1 g/L de carbón activado permitió el crecimiento de colonias de 2308 equivalentes en tamaño y número a las obtenidas en BAB. Además, en este medio, las dos cepas analizadas mostraron colonias visibles a los 3 y 4 días de incubación a 37 °C, respectivamente, permitiendo una identificación de *Brucella* más rápida que en BSM.

En medio BAB-AM suplementado con 4-1 g/L de carbón activado, tanto *B. ovis* PA (cepa suero-dependiente) como Rev1Δwzm (cepa inhibida en BAB-AM) mostraron una supervivencia del 86,7-100 %, indicando que el carbón activado puede reemplazar totalmente al suero de ternera en la preparación de medios de *Brucella*.

6.3. BSM suplementado con 1 g/L de carbón activado, pero no concentraciones superiores, inhibe el desarrollo de bacterias contaminantes a los niveles de BSM

Una vez comprobada la utilidad del carbón activado para el aislamiento de *B. abortus* bv1 y otras brucellae, se analizó la capacidad de estas preparaciones (*i. e.*, BSM y BAB-AM suplementados con 1-4 g/L de carbón activado) para inhibir el desarrollo de 8 especies bacterianas frecuentemente presentes en muestras veterinarias y adecuadamente inhibidas en BSM y CM (Tabla 20). Como resultado, los medios selectivos suplementados con 4 g/L de carbón lograron la inhibición total de 10^{10} UFC/mL de *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *S. aureus* y *B. amyloliquefaciens*, al igual que en CM y BSM en las mismas condiciones (*i. e.*, en placas recién preparadas e incubación de los cultivos a 37 °C, durante 14 días). Sin embargo, la inhibición de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *E. cloacae* (10^8 , 10^7 y 10^7 , respectivamente) fue ligeramente inferior a la observada en los otros medios selectivos, y *P. aeruginosa* creció incluso a concentraciones de 10^2 UFC/mL.

Para tratar de mejorar esta baja inhibición, se estudiaron concentraciones más bajas de carbón activado y, efectivamente, se observó que 3, 2 o 1 g/L de este compuesto eran capaces de reducir progresivamente el crecimiento de *P. aeruginosa*, hasta obtener inhibición total de 10^2 , 10^6 o 10^8 UFC/mL, respectivamente. Por lo tanto, el medio preparado con 1 g/L de carbón activado resultó ser tan selectivo como BSM y CM.

7. Validación del nuevo medio sólido de cultivo selectivo BruSIC

Considerando todos los resultados del apartado anterior, se seleccionó 1 g/L de carbón activado para formular, junto con BAB y la mezcla de antibióticos de BSM, el nuevo medio sólido denominado *Brucella* Selective Improved Culture (*BruSIC*; Tabla 18). Además de las ventajas de *BruSIC* mencionadas (*i. e.* crecimiento más rápido que en BSM y CM, tamaño colonial visible a los 3-4 días de incubación, productividad y selectividad, así como la posibilidad de prescindir totalmente del uso de suero de ternera en la formulación), el empleo de 1 g/L de carbón activado en *BruSIC* ofreció la ventaja adicional de permitir una fácil identificación de la morfología colonial de *Brucella* mediante visualización directa de las placas tanto sobre el fondo oscuro como desde la base por transiluminación (Fig. 46A).

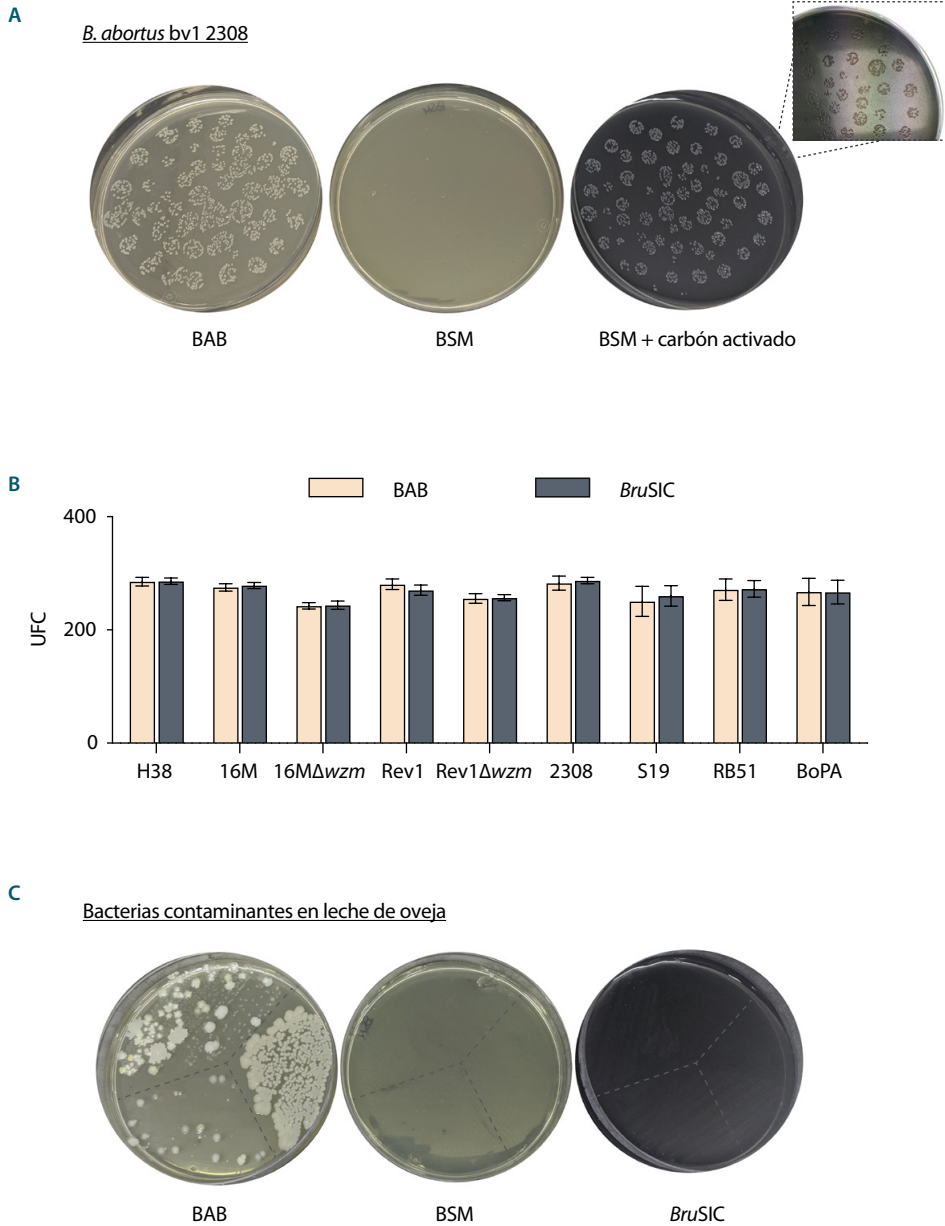


Fig. 46. Productividad y selectividad del nuevo medio BruSIC. A) Imagen representativa del desarrollo colonial de *B. abortus* bv1 cepa 2308 en placas recién preparadas de BAB, BSM y BruSIC, tras 3 días de incubación a 37 °C (imagen ampliada de BruSIC al trasluz, vista desde el fondo de la placa). B) Número de UFC/0,1 mL (media ± SD; n = 3) obtenido en BruSIC vs. BAB, tras 4 días de incubación a 37 °C (BAB-S e incubación en atmósfera con un 10 % de CO₂ para BoPA). C) Imagen representativa del crecimiento de microbiota acompañante a las muestras de leche de oveja cultivadas en BSM y BruSIC vs. BAB.

7.1. *BruSIC* permite el crecimiento de *B. abortus* bv1 y otras brucellae como en BAB, tanto en tamaño colonial como en número de UFC

Mediante siembra de suspensiones bacterianas seriadas, se comprobó que el medio *BruSIC* ofrecía una supervivencia máxima de *B. abortus* bv1 (cepas 2308, S19 y RB51), *B. melitensis* bv1 (cepas H38, 16M, Rev1, 16M Δ wzm y Rev1 Δ wzm) y *B. ovis* PA (Fig. 46B).

Además, *BruSIC* aceleró el crecimiento de todas estas cepas, obteniéndose el mismo tamaño colonial alcanzado en el medio control BAB (o BAB-S para *B. ovis* PA) con tan sólo 2-4 días de incubación a 37 °C (en atmósfera enriquecida con 10 % de CO₂ para *B. ovis* PA).

7.2. *BruSIC* inhibe los microorganismos contaminantes de muestras reales de ganado ovino y bovino

La siembra simultánea de un total de 81 muestras de leche y tejidos de ovejas y vacas en *BruSIC*, BSM y BAB control evidenció un grado de inhibición de contaminantes similar en ambos medios selectivos (Fig. 46C), que impidieron totalmente el desarrollo de microorganismos contaminantes en 70/81 (86,4 %) placas de BSM y 75/81 (92,6 %) placas de *BruSIC* (Tabla 25).

Tabla 25. Inhibición de microorganismos contaminantes en muestras veterinarias reales sembradas en los medios selectivos BSM y *BruSIC*

Tipo de muestra	N.º de muestras contaminadas ¹		
	BAB	BSM	<i>BruSIC</i>
Tejidos ovinos	19	2 ^a	0 ^a
Leche de oveja	42	9 ^a	6 ^a
Leche de vaca	20	0 ^a	0 ^a
Total	81	11^a	6^a

¹ Un total de 81 muestras de tejidos ovinos (1 mL/placa) o leche (hisopo impregnado) de ovejas y vacas se cultivaron simultáneamente en los medios selectivos BSM y *BruSIC* vs. BAB (control de contaminación); se consideraron contaminadas aquellas placas que permitieron el crecimiento de, al menos, 1 UFC/muestra; ^a prueba Chi-cuadrado: $p \leq 0,001$ vs. BAB.

Discusión

El diagnóstico bacteriológico constituye la prueba definitiva para confirmar la infección por *Brucella*. Para evitar que esta bacteria, de crecimiento lento, quede enmascarada por la rápida multiplicación de otros microorganismos ambientales y de la microbiota es esencial realizar el cultivo de muestras en medios selectivos; siendo los medios FM y CM los recomendados actualmente (OIE, 2022). El aislamiento de brucellae con distintos grados de virulencia en estos medios determinó una supervivencia dependiente tanto de la especie como de la cepa. Mientras que *B. canis* y *B. suis* mostraron un buen crecimiento, *B. ovis*, *B. abortus* y *B. melitensis* exhibieron un considerable grado de inhibición, de acuerdo con estudios anteriores en FM (De Miguel et al., 2011; Her et al., 2010; Longo et al., 2009; Marín, Jiménez de Bagüés, et al., 1996) y medio CM (Karagül y Ikiz, 2017). No obstante, cabe destacar la importancia de incubar las placas durante un periodo de tiempo prolongado, en nuestro caso de hasta 14 días, dado que la proliferación bacteriana se ralentiza en los medios selectivos (Alton et al., 1988); incubaciones limitadas a 4-7 días podrían implicar el reporte de una menor o incluso nula multiplicación, como en otros estudios con *B. ovis*, *B. suis* o RB51 en FM (De Miguel et al., 2011; Her et al., 2010; Hornsby et al., 2000). Además, RB51 destacó por su intensa inhibición no sólo en CM, sino también en FM; por lo que los resultados de seguridad realizados con esta cepa vacunal de *B. abortus* en este medio serían cuestionables (Elzer et al., 1998; Miranda et al., 2016). Asimismo, el mutante atenuado Rev1 Δ wzm sufrió una drástica restricción en los dos medios, aunque su crecimiento resultó significativamente superior en CM. Los datos obtenidos en este estudio inciden en la relevancia de realizar ensayos de supervivencia *in vitro* en los medios selectivos antes de llevar a cabo experimentación de campo con cepas vacunales, idealmente más atenuadas.

Dado el contraste entre el crecimiento de Rev1 y la inhibición de su mutante Δ wzm en CM, se comparó la susceptibilidad de estas cepas a los antibióticos que componen dicho medio y, en base a los resultados obtenidos, se redujo la concentración de vancomicina y colistina hasta lograr un correcto aislamiento del mutante. De hecho, se observó un efecto sinérgico entre estos antibióticos, probablemente debido a que la colistina incrementa la permeabilidad de la OM y permite un mayor acceso de la vancomicina (Roemhild et al., 2022). Este nuevo medio BSM, además de permitir el crecimiento de Rev1 Δ wzm, incrementó significativamente los recuentos obtenidos de su homólogo 16M Δ wzm, y también de 16M, de acuerdo con la mayor pérdida de viabilidad de la cepa virulenta en presencia de vancomicina en comparación con Rev1 (capítulo 1, Fig. 25).

Además de mejorar la supervivencia de *B. melitensis*, el crecimiento de *B. abortus* también incrementó de manera significativa en BSM, probablemente, como consecuencia de la reducción de la concentración antibiótica dada la mayor susceptibilidad que esta especie presentó a colistina y a polimixina B (capítulo 1, [Tabla 15](#)) (Guzmán-Verri et al., 2019; Jensen y Halling, 2010). En este sentido, han sido varios los medios selectivos desarrollados sin polimixinas para evitar la inhibición de *B. abortus* (Her et al., 2010; Hornsby et al., 2000). Sin embargo, el cultivo de las cepas de *B. abortus* bv1 en BSM proporcionó, al igual que en CM, una supervivencia muy reducida. Tal limitación del crecimiento resultó dependiente del tiempo transcurrido entre la elaboración y el empleo del medio. La cepa de referencia 2308 y otros aislados de *B. abortus* bv1 mostraron una gran inhibición en placas recién preparadas, que se mantuvo incubando con un 10 % de CO₂. De hecho, esta atmósfera provocó la inhibición de los mutantes Δwzm en BSM, ya que estas cepas rugosas son muy susceptibles al efecto combinado de las polimixinas y el CO₂ (capítulo 1, [Tabla 12](#)) (Jensen y Halling, 2010). Por lo tanto, al contrario de lo previamente propuesto (OIE, 2022), la incubación de medios selectivos con CO₂ no debe ser considerada una condición óptima para el cultivo de todas las brucellae.

La pérdida de estabilidad de las polimixinas y su degradación a lo largo del tiempo (Ezadi et al., 2018; He et al., 2010; Li et al., 2003; Orwa et al., 2002; Taylor et al., 1994) podría ser la causa del progresivo incremento en la supervivencia de *B. abortus* bv1 en placas almacenadas de BSM o CM. Además, se ha descrito que estas polimixinas presentan baja difusión a través del agar (Ezadi et al., 2018; Hindler y Humphries, 2013), así como una gran afinidad por compuestos tanto orgánicos como inorgánicos (Karvanen et al., 2017; Sharafi y Ardebili, 2019); por lo que el paso del tiempo podría estar provocando la adherencia del antibiótico al poliestireno de las placas. Aun así, la presencia de colistina junto con el resto de los componentes del medio BSM parece esencial, ya que 2308 no fue capaz de crecer en BSM con concentraciones menores de esta. En vista, además, de que la misma concentración de colistina en medio BAB-S provocó una inhibición parcial de $Rev1\Delta wzm$ (capítulo 1, [Tabla 12](#)), pero su crecimiento en BSM no mostró diferencias significativas respecto al control, parece indudable la participación de intrincados mecanismos compensatorios entre la colistina, el suero (Davis et al., 1971) y el resto de los compuestos del medio. De hecho, la combinación de antibióticos genera dinámicas complejas que ocasionan una respuesta fisiológica en la bacteria generalmente impredecible (Roemhild et al., 2022).

Las polimixinas exhiben múltiples cargas positivas por las cuales el carbón activado

—que funciona como agente reductor (Hoffman et al., 1983; Shejale et al., 2020)— presenta una gran afinidad, que además se acentúa en presencia de oxígeno (Casino et al., 2022). Se ha propuesto que el carbón activado interactúa también con las ROS que se generan por la actividad antibiótica (Kohanski et al., 2010; Lima et al., 2019) o durante la preparación de los medios de cultivo en atmósfera normal, y que estos radicales libres puede además degradar parcialmente la vancomicina y favorecer el crecimiento de grampositivas relativamente resistentes, como *E. faecalis* (Casino et al., 2022); efectivamente, el desarrollo de esta bacteria contaminante se observó al utilizar placas preparadas con más de 4 semanas de antelación. Con todo ello, la incorporación de carbón activado en el medio *BruSIC* explicaría la estabilización tanto de la vancomicina como de la colistina.

Debido a sus conocidas propiedades detoxificantes, el carbón activado ha sido incluido en algunos medios bacteriológicos (Álvarez y Guijarro, 2007; Daly y Stevenson, 1985; Pan y Van Staden, 1998). Su incorporación en el medio *BruSIC* ha supuesto asegurar el completo aislamiento de *Brucella* spp., incluyendo el de las cepas más exigentes, incrementar el desarrollo colonial invirtiendo tiempos de incubación más cortos y descartar el requerimiento de suplementar el medio con suero, con la consecuente reducción de manipulaciones y costes. Este reemplazo del suero por carbón activado en el medio *BruSIC* constituye un ejemplo de cómo la adición de compuestos a los medios selectivos puede promover el crecimiento de *Brucella*, como se ha reportado al suplementar con eritritol los medios Modified *Brucella* Selective (MBS) (Her et al., 2010), *Brucella* Medium (BM) (Karagül y Ikiz, 2018) y FM (Karagül, 2019). Además, la adición de carbón a 1 g/L en el medio de cultivo selectivo *BruSIC* generó placas ligeramente translúcidas, en las que las colonias de *Brucella* se mostraron claras y brillantes sobre el fondo negro, permitiendo asignar de un vistazo la categoría de infección en la muestra sembrada, y aportando a este medio un balance óptimo de productividad y selectividad.

Con el objetivo de garantizar el crecimiento de mutantes atenuados a partir de muestras de campo, se procedió a la validación del medio BSM mediante el cultivo de más de 1.700 muestras de ovino, confirmándose su adecuación para el aislamiento primario del candidato vacunal *Rev1Δwzm* y del mutante *16MΔwzm*. En comparación con el medio CM, el BSM aportó mayores recuentos para ambas cepas por lo que, dado que la infección en el hospedador definitivo se presenta experimentalmente en categorías (Barrio et al., 2009; Muñoz et al., 2008), el medio BSM permitió detectar los mutantes en niveles superiores, incluyendo la presencia de *Brucella* en muestras que habrían sido declaradas libres de infección en CM. En lo que respecta a su selectividad, el BSM

mantuvo la excelente inhibición de contaminaciones fúngicas y bacterianas lograda por el medio CM (De Miguel et al., 2011; De Nardi Júnior et al., 2015; Vicente et al., 2014), clave para conseguir un máximo aislamiento de *Brucella* (Karagül y Ikiz, 2017, 2018). Aunque estudios anteriores han reportado correcciones en la fórmula de CM para incrementar su selectividad, como añadir natamicina en el medio Modified CITA (mCITA) (Ledwaba et al., 2020), realizar una toma de muestras limpia, así como la vigilancia diaria de los cultivos (Karagül y Ikiz, 2017), es fundamental para prevenir contaminaciones y una práctica preferible a la inclusión de antibióticos adicionales que podrían contribuir al grave problema actual de la resistencia antibiótica (Larsson y Flach, 2021).

En los últimos 30 años, la aplicación de medios diferenciales cromogénicos —en los cuales se puede realizar directamente la identificación bacteriana sin confirmación molecular adicional— ha experimentado un auge de aplicación en la industria alimentaria y microbiología clínica humana (Perry, 2017), mientras que su empleo en la clínica veterinaria se limita a unos pocos ejemplos (Beehan y McKinnon, 2009; Boriollo et al., 2021; Hustá et al., 2020). La ventaja de estos sobre aquellos con marcaje colorimétrico mediante indicador de pH es clara, ya que los segundos provocan un cambio en el color del medio circundante y de las colonias, no sólo de *Brucella* (Her et al., 2010) como patógeno de interés, sino también de microorganismos acompañantes, de un modo directamente dependiente de la densidad bacteriana. Por lo tanto, la incorporación de cromógenos al medio selectivo BSM permitiría una identificación más rápida, para lo cual fue necesario profundizar primero en la huella bioquímica de *Brucella*.

Por un lado, el principal hallazgo que se desprendió del estudio de pruebas metabólicas fue la capacidad de *B. melitensis*, pero no de *B. abortus*, para utilizar el Neu5Ac como fuente de carbono. Este azúcar, conocido como ácido siálico, se encuentra típicamente formando el glicocálix de las células (Edgar, 2021) que recubren las mucosas de los mamíferos, y su empleo está limitado a ciertos patógenos bacterianos y fuertemente vinculado con la colonización del hospedador (Severi et al., 2021; Vimr, 1994, 2013). En *Brucella*, el Neu5Ac ha sido relacionado con la adherencia a células eucariotas (Bialer et al., 2020; Castañeda-Roldán et al., 2004; Rocha-Gracia et al., 2002). Sin embargo, la capacidad para utilizar este sustrato no implica necesariamente que la bacteria presente habilidad para obtenerlo a partir de moléculas más complejas mediante hidrólisis (Byers et al., 1996; Laville et al., 2019). De hecho, de las distintas enzimas implicadas en su metabolismo (Vimr, 2013), en *Brucella* solamente está anotada la epimerasa NanM (n.º Q8YBP3; The UniProt Consortium, 2021). Esta enzima cataliza la conversión entre las formas α y β del

compuesto para facilitar el acceso bacteriano al compuesto y atenuar la respuesta inmune del hospedador, ya que la liberación de α -Neu5Ac supone una señal de inflamación (Severi et al., 2008).

En este capítulo se describe por primera vez no sólo la utilización del Neu5Ac como sustrato, sino además la existencia de actividad enzimática de neuraminidasas en *B. melitensis*. Estas enzimas, también denominadas NanH o sialidasas, son consideradas un factor de virulencia dada su implicación en la patogenicidad (Almagro-Moreno y Boyd, 2009; Bowles y Gloster, 2021; Lichtensteiger y Vimr, 1997; Martínez-Moliner et al., 2012; Vimr, 1994). Las sialidasas han sido identificadas en un moderado número de géneros bacterianos (según recoge The UniProt Consortium, 2021), entre los que se encuentran *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Haemophilus*, *Mycoplasma*, *Pasteurella*, *Vibrio*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* y *Corynebacterium*, los cuales, a excepción de los cinco últimos, son poco habituales en muestras veterinarias. En base a esto, se analizó la adición del cromógeno X-Neu5Ac. En este sustrato, el cromóforo X (5-bromo-4-cloro-3-indolil) se libera del complejo por actividad neuraminidasa y se oxida perdiendo su solubilidad en agua y aportando color azul. Se trata de un compuesto que ha sido utilizado con frecuencia en estudios de distribución de sialidasas en tejido de mamíferos mediante cito e histoquímica (Koda et al., 2009; Minami et al., 2011, 2014, 2017; Saito et al., 2002; Suzuki, 2017); aunque se ha empleado puntualmente con bacterias en análisis de la microbiota (Laville et al., 2019), detección enzimática por SDS-PAGE en *V. cholera* (Candra, 2001) y caracterización del LPS de *Rhodobacter* (Krauss et al., 1988), no se han encontrado trabajos en la literatura que analicen la aplicación de dicha actividad enzimática para el cultivo diferencial. En este capítulo, la incorporación del sustrato cromogénico X-Neu5Ac en el medio de cultivo confirmó la capacidad neuraminidasa de *B. melitensis*, aportando un color azulado alrededor de las colonias. No obstante, esta coloración resultó demasiado tenue como para facilitar la identificación de *Brucella*, por lo que, en caso de aplicarse en la elaboración de un medio diferencial, convendría incrementar la reactividad del compuesto (Minami et al., 2014; Suzuki, 2017) y combinar dicha reacción con otros procesos bioquímicos, estrategia recomendada para aumentar la selectividad del medio (Orenga et al., 2009; Perry, 2017).

A este respecto, se realizó un estudio diferencial de diversas reacciones bioquímicas de *Brucella* spp. en comparación con bacterias contaminantes para incrementar la selectividad del medio, diferenciando incluso entre distintas especies. En particular, el aislado de *Ochrobactrum*, género frecuentemente confundido con *Brucella* (Leclercq

et al., 2020; Poonawala et al., 2018) dada su cercanía filogenética (Velasco et al., 1998), se mostró negativo para la ureasa y fermentación de arabinosa y positivo para la utilización de citrato, al contrario que *Brucella*. No obstante, es importante considerar que puede encontrarse disparidad bioquímica dentro de una misma especie, tal y como se confirmó analizando los resultados obtenidos con los de otros estudios con *B. melitensis* y *B. abortus* (Al Dahouk et al., 2010; Schurig et al., 1991), *O. intermedium* (Lebuhn et al., 2000; M. P. Ryan y Pembroke, 2020; Teyssier et al., 2005; Velasco et al., 1998), así como en otras especies de gramnegativas (Base de datos GnA+B-ID System, Microgen). En cualquier caso, la combinación de actividad neuraminidasa con otra propiedad bioquímica como, por ejemplo, la producción de nitritos a partir de nitratos, permitiría diferenciar *Brucella* de otros géneros como *Ochrobactrum*, *Corynebacterium* o *Pseudomonas*, limitando enormemente la posibilidad de una identificación preliminar errónea en el medio selectivo .

En conjunto, los resultados obtenidos en este capítulo recomiendan firmemente la utilización de los nuevos medios de cultivo selectivos BSM y *BruSIC* para incrementar el aislamiento de primario *Brucella* spp. en muestras de campo.

Bibliografía

- Al Dahouk, S., Scholz, H. C., Tomaso, H., Bahn, P., Göllner, C., Karges, W., Appel, B., Hensel, A., Neubauer, H. y Nöckler, K. (2010). Differential phenotyping of *Brucella* species using a newly developed semi-automated metabolic system. *BMC Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-269>
- Almagro-Moreno, S. y Boyd, E. F. (2009). Insights into the evolution of sialic acid catabolism among bacteria. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-118>
- Alton, G. G., Jones, L., Angus, R. y Verger, J. (1988). *Techniques for the brucellosis laboratory*. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Paris, France.
- Álvarez, B. y Guijarro, J. A. (2007). Recovery of *Flavobacterium psychrophilum* viable cells using a charcoal-based solid medium. *Letters in Applied Microbiology*, 44(5), 569-572. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02126.x>
- Barrio, M. B., Grilló, M. J., Muñoz, P. M., Jacques, I., González, D., De Miguel, M. J., Marín, C. M., Barberán, M., Letesson, J. J., Gorvel, J. P., Moriyón, I., Blasco, J. M. y Zygmunt, M. S. (2009). Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less effective than Rev 1 vaccine against *Brucella melitensis* infection of sheep. *Vaccine*, 27(11), 1741-1749. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.025>
- Beehan, D. P. y McKinnon, A. O. (2009). How to diagnose common equine reproductive tract bacterial pathogens using chromogenic agar. *AAEP Proceedings*, 55, 320-325.
- Bialer, M. G., Sycz, G., González, F. M., Ferrero, M. C., Baldi, P. C. y Zorreguieta, A. (2020). Adhesins of *Brucella*: Their roles in the interaction with the host. *Pathogens*, 9(11), 1-20. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110942>
- Bioinspired Materials. (2021). *Ficogenic Broth - European Union Intellectual Property Office (EUIPO) - Trademark Application n.º 018460300 (Registered)*.
- Boriollo, M. F. G., Moreira, B. S., Oliveira, M. C., Santos, T. O., Rufino, L. R. A. y Oliveira, N. M. S. (2021). Incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in diarrheic calves and its susceptibility profile to antimicrobials and *Eugenia uniflora* L. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 85(1), 18-26.
- Bowden, R. A., Verger, J. M., Grayon, M., Limet, J. N. y Dubray, G. (1993). Simultaneous expression of smooth and rough phase properties related to lipopolysaccharide in a strain of *Brucella melitensis*. *Journal of Medical Microbiology*, 39(5), 363-370. <https://doi.org/10.1099/00222615-39-5-363>
- Bowles, W. H. D. y Gloster, T. M. (2021). Sialidase and sialyltransferase inhibitors: Targeting pathogenicity and disease. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.705133>
- Brinley Morgan, W. J. (1960). Comparison of various media for the growth and isolation of *Brucella*. *Research in Veterinary Science*, 1(1), 47-52. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)35028-8](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)35028-8)
- Brodie, J. y Sinton, G. P. (1975). Fluid and solid media for isolation of *Brucella abortus*. *Journal of Hygiene*,

- 74(3), 359-367. <https://doi.org/10.1017/S0022172400046878>
- Brown, G. M., Ranger, C. R., y Kelley, D. J. (1971). Selective media for the isolation of *Brucella ovis*. *The Cornell veterinarian*, 61(2), 265–280.
- Byers, H. L., Homer, K. A. y Beighton, D. (1996). Utilization of sialic acid by viridans streptococci. *Journal of Dental Research*, 75(8), 1564-1571. <https://doi.org/10.1177/00220345960750080701>
- Candra, K. P. (2001). Enzymatic staining of sialidase and β -galactosidase in polyacrylamide gel using chromogenic and fluorogenic substrates. *Indonesian Journal of Agricultural Sciences*, 1, 76-80.
- Cardoso, P. G., Macedo, G. C., Azevedo, V. y Oliveira, S. C. (2006). *Brucella* spp. noncanonical LPS: Structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories*, 5, 1-11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-13>
- Casino, P., López, A., Peiró, S., Ríos, M., Ríos, S., Porta, A., Agustí, G., Asensio, D., Marqués, A. y Piqué, N. (2022). GVPC medium manufactured without oxygen improves the growth of *Legionella* spp. and exhibits enhanced selectivity properties. *Microbiol Spectrum*, 27-31. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02401-21>
- Castañeda-Roldán, E. I., Avelino-Flores, F., Dall'Agnol, M., Freer, E., Cedillo, L., Dornand, J. y Girón, J. A. (2004). Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cellular Microbiology*, 6(5), 435-445. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00372.x>
- Castaño-Zubieta, M. R., Rossetti, C. A., García-González, D. G., Maurizio, E., Hensel, M. E., Rice-Ficht, A. C., Ficht, T. A. y Arenas-Gamboa, Á. M. (2021). Evaluation of the safety profile of the vaccine candidate *Brucella melitensis* 16M Δ vjbR strain in goats. *Vaccine*, 39(3), 617-625. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.11.033>
- Cloekaert, A., Grayon, M. y Grépinet, O. (2002). Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP based on a mutation in the *rpsL* gene. *Vaccine*, 20(19-20), 2546-2550. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00159-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00159-7)
- Daly, J. G. y Stevenson, R. M. W. (1985). Charcoal agar, a new growth medium for the fish disease bacterium *Renibacterium salmoninarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(4), 868-871. <https://doi.org/10.1128/aem.50.4.868-871.1985>
- Davis, S. D., Iannetta, A. y Wedgwood, R. J. (1971). Paradoxical synergism and antagonism between serum and the antibacterial activity of colistin. *Journal of Infectious Diseases*, 123(4), 392-398. <https://doi.org/10.1093/infdis/123.4.392>
- De Miguel, M. J., Marín, C. M., Muñoz, P. M., Dieste, L., Grilló, M. J. y Blasco, J. M. (2011). Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(4), 1458-1463. <https://doi.org/10.1128/JCM.02301-10>
- De Nardi Júnior, G., Megid, J., Ferreira Vicente, A., Paganini Listoni, F. J., Morato Monteiro, F., Batista Lara, G. H., Garcia Motta, R., Mungai Chacur, M. G. y Garcia Ribeiro, M. (2015). Comparison of *Brucella* agar, CITA and Farrell media for selective isolation of *Brucella abortus* from semen

- of bovine bulls. *African Journal of Microbiology Research*, 9(9), 617-620. <https://doi.org/10.5897/ajmr2014.7252>
- Edgar, L. J. (2021). Engineering the Sialome. *ACS Chemical Biology*, 16(10), 1829-1840. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00273>
- Elzer, P. H., Edmonds, M. D., Hagius, S. D., Walker, J. V., Gilsdorf, M. J. y Davis, D. S. (1998). Safety of *Brucella abortus* strain RB51 in bison. *Journal of Wildlife Diseases*, 34(4), 825-829. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-34.4.825>
- EUCAST: European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. En *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID)*.
- Ewalt, D. R., Packer, R. A. y Harris, S. K. (1983). An improved selective medium for isolating *Brucella* species from bovine milk. *Procedures of International Symposium on Veterinary Laboratory Diagnosis*, 3, 577-558.
- Ezadi, F., Ardebili, A. y Mirnejad, R. (2018). Antimicrobial susceptibility testing for polymyxins: Challenges, issues, and recommendations. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(4). <https://doi.org/10.1128/JCM.01390-18>
- Farrell, I. D. (1974). The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Research in Veterinary Science*, 16(3), 280-286. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(18\)33726-3](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(18)33726-3)
- Farrell, I. D. y Robertson, L. (1972). A comparison of various selective media, including a new selective medium for the isolation of brucellae from milk. *Journal of Applied Bacteriology*, 35(4), 625-630. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1972.tb03744.x>
- Felsenfeld, O., Young, V., Loeffler, E., Ishihara, S. y Schroeder, W. (1951). A study of the nature of brucellosis in chickens. *Am J Vet Res*, 12(42), 48-54.
- Freer, E., Moreno, E., Moriyón, I., Pizarro-Cerdá, J., Weintraub, A. y 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. *Journal of Bacteriology*, 178(20), 5867-5876. <https://doi.org/10.1128/jb.178.20.5867-5876.1996>
- Freer, E., Pizarro-Cerdá, J., Weintraub, A., Bengoechea, J. A., Moriyón, I., Hultenby, K., Gorvel, J. P. y Moreno, E. (1999). The outer membrane of *Brucella ovis* shows increased permeability to hydrophobic probes and is more susceptible to cationic peptides than are the outer membranes of mutant rough *Brucella abortus* strains. *Infection and Immunity*, 67(11), 6181-6186. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.11.6181-6186.1999>
- Fujii, I., Iwabuchi, Y., Teshima, T., Shiba, T. y Kikuchi, M. (1993). X-Neu5Ac: A novel substrate for chromogenic assay of neuraminidase activity in bacterial expression systems. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 1(2), 147-149. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(00\)82112-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(00)82112-4)

- Guilloteau, L. A., Laroucau, K., Olivier, M., Grilló, M. J., Marín, C. M., Verger, J. M. y Blasco, J. M. (2006). Residual virulence and immunogenicity of CGV26 and CGV2631 *B. melitensis* Rev. 1 deletion mutant strains in sheep after subcutaneous or conjunctival vaccination. *Vaccine*, 24(17), 3461-3468. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.02.007>
- Guzmán-Verri, C., Suárez-Esquivel, M., Ruíz-Villalobos, N., Zygmunt, M. S., Gonnet, M., Campos, E., Viquez-Ruiz, E., Chacón-Díaz, C., Aragón-Aranda, B., Conde-Álvarez, R., Moriyón, I., Blasco, J. M., Muñoz, P. M., Baker, K. S., Thomson, N. R., Cloeckeaert, A. y Moreno, E. (2019). Genetic and phenotypic characterization of the etiological agent of canine orchiepididymitis smooth *Brucella* sp. BCCN84.3. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(JUN), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00175>
- He, J., Figueroa, D. A., Lim, T. P., Chow, D. S. y Tam, V. H. (2010). Stability of polymyxin B sulfate diluted in 0.9% sodium chloride injection and stored at 4 or 25°C. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67(14), 1191-1194. <https://doi.org/10.2146/ajhp090472>
- Hensel, M. E., Garcia-Gonzalez, D. G., Chaki, S. P., Hartwig, A., Gordy, P. W., Bowen, R., Ficht, T. A. y Arenas-Gamboa, A. M. (2020). Vaccine candidate *Brucella melitensis* 16M Δ vjbR is safe in a pregnant sheep model and confers protection. *mSphere*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/msphere.00120-20>
- Her, M., Cho, D. H., Kang, S. Il, Cho, Y. S., Hwang, I. Y., Bae, Y. C., Yoon, H., Heo, Y. R., Jung, S. C. y Yoo, H. (2010). The development of a selective medium for the *Brucella abortus* strains and its comparison with the currently recommended and used medium. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 67(1), 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.12.013>
- Hindler, J. A. y Humphries, R. M. (2013). Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(6), 1678-1684. <https://doi.org/10.1128/JCM.03385-12>
- Hoffman, P. S., Pine, L. y Bell, S. (1983). Production of superoxide and hydrogen peroxide in medium used to culture *Legionella pneumophila*: Catalytic decomposition by charcoal. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(3), 784-791. <https://doi.org/10.1128/aem.45.3.784-791.1983>
- Hornsby, R. L., Jensen, A. E., Olsen, S. C. y Thoen, C. O. (2000). Selective media for isolation of *Brucella abortus* strain RB51. *Veterinary Microbiology*, 73(1), 51-60. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00149-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00149-8)
- Huddleson, I. F. (1920). Studies in infectious abortions: IV: The isolation of *Bacterium abortus* from milk. *Mich. Agric. Exp. Htn Tec. Rep.*, 49, 25.
- Hustá, M., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F. y Goossens, E. (2020). A comparative study on the use of selective media for the enumeration of *Clostridium perfringens* in poultry faeces. *Anaerobe*, 63. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102205>
- Jensen, A. E. y Halling, S. M. (2010). Effect of polymyxin B and environmental conditions on isolation of *Brucella* species and the vaccine strain RB51. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious*

- Diseases*, 33(2), 121-131. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2008.08.005>
- Jiménez de Bagüés, M. P., Barberán, M., Marín, C. M. y Blasco, J. M. (1995). The *Brucella abortus* RB51 vaccine does not confer protection against *Brucella ovis* in rams. *Vaccine*, 13(3), 301-304. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(95\)93317-3](https://doi.org/10.1016/0264-410X(95)93317-3)
- Jones, L. M. y Morgan, W. J. B. (1958). A preliminary report on a selective medium for the culture of *Brucella*, including fastidious types. *Bulletin of the World Health Organization*, 19(1), 200-203.
- Kanehisa, M. y Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Karagül, M. S. (2019). Evaluation of adding erythritol to Farrell medium for primary isolation of the *Brucella melitensis* strains. *Kocatepe Veterinary Journal*, 12(1), 1-1. <https://doi.org/10.30607/kvj.494891>
- Karagül, M. S. y Ikiz, S. (2017). Comparison of the isolation and inhibition abilities of selective media used for *Brucella* spp. isolation. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 41(6), 781-786. <https://doi.org/10.3906/vet-1701-50>
- Karagül, M. S. y Ikiz, S. (2018). The evaluation of *Brucella* spp. isolation rates in ruminant abortion cases by using different selective media. *Macedonian Veterinary Review*, 41(2), 177-186. <https://doi.org/10.2478/macvetrev-2018-0024>
- Karvanen, M., Malmberg, C., Lagerbäck, P., Friberg, L. E. y Cars, O. (2017). Colistin is extensively lost during standard *in vitro* experimental conditions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(11), 1-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.00857-17>
- Kerrinnes, T., Young, B. M., Leon, C., Roux, C. M., Tran, L., Atluri, V. L., Winter, M. G., y Tsolis, R. M. (2015). Phospholipase A1 modulates the cell envelope phospholipid content of *Brucella melitensis*, contributing to polymyxin resistance and pathogenicity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(11), 6717-6724. <https://doi.org/10.1128/AAC.00792-15>
- Koda, T., Kijimoto-Ochiai, S., Uemura, S. y Inokuchi, J. ichi. (2009). Specific expression of Neu2 type B in mouse thymus and the existence of a membrane-bound form in COS cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 387(4), 729-735. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.07.100>
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J. y Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423-435. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>
- Krauss, J. H., Reuter, G., Schauer, R., Weckesser, J. y Mayer, H. (1988). Sialic acid-containing lipopolysaccharides in purple nonsulfur bacteria. *Archives of Microbiology*, 150(6), 584-589. <https://doi.org/10.1007/BF00408254>
- Kuzdas, C. D. y Morse, E. V. (1953). A selective medium for the isolation of brucellae from contaminated materials. *Journal of Bacteriology*, 66(4), 502-504. <https://doi.org/10.1128/jb.66.4.502-504.1953>
- Larsson, D. G. J. y Flach, C. F. (2021). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 1. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>

- Laville, E., Perrier, J., Bejar, N., Maresca, M., Esque, J., Tauzin, A. S., Bouhajja, E., Leclerc, M., Drula, E., Henrissat, B., Berdah, S., Di Pasquale, E., Robe, P. y Potocki-Veronese, G. (2019). Investigating host microbiota relationships through functional metagenomics. *Frontiers in Microbiology*, 10(JUN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01286>
- Lebuhn, M., Achouak, W., Schloter, M., Berge, O., Meier, H., Barakat, M., Hartmann, A. y Heulin, T. (2000). Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), 2207-2223. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-6-2207>
- Leclercq, S. O., Cloeckaert, A. y Zygmunt, M. S. (2020). Taxonomic organization of the family *Brucellaceae* based on a phylogenomic approach. *Frontiers in Microbiology*, 10(January), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03083>
- Ledwaba, M. B., Ndumnego, O. C., Matle, I., Gelaw, A. K. y Van Heerden, H. (2020). Investigating selective media for optimal isolation of *Brucella* spp. in South Africa. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 87(1), 1-9. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v87i1.1792>
- Li, J., Milne, R. W., Nation, R. L., Turnidge, J. D. y Coulthard, K. (2003). Stability of colistin and colistin methanesulfonate in aqueous media and plasma as determined by high-performance liquid chromatography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(4), 1364-1370. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1364-1370.2003>
- Lichtensteiger, C. A. y Vimr, E. R. (1997). Neuraminidase (sialidase) activity of *Haemophilus parasuis*. *FEMS Microbiology Letters*, 152(2), 269-274. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00209-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00209-7)
- Lima, M. R., Ferreira, G. F., Nunes Neto, W. R., Monteiro, J. D. M., Santos, Á. R. C., Tavares, P. B., Denadai, Â. M. L., Bomfim, M. R. Q., Dos Santos, V. L., Marques, S. G. y De Souza Monteiro, A. (2019). Evaluation of the interaction between polymyxin B and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cells: Reactive oxygen species induction and zeta potential. *BMC Microbiology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1485-8>
- Longo, M., Mallardo, K., Montagnaro, S., De Martino, L., Gallo, S., Fusco, G., Galiero, G., Guarino, A., Pagnini, U. y Iovane, G. (2009). Shedding of *Brucella abortus* rough mutant strain RB51 in milk of water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Preventive Veterinary Medicine*, 90(1-2), 113-118. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.03.007>
- Mair, N. S. (1955). A selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from herd samples of milk. *Monthly bulletin of the Ministry of Health and the Public Health Laboratory Service*, 14(184), 91.
- Marín, C. M., Alabart, J. L. y Blasco, J. M. (1996). Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *Brucella abortus*, *B. melitensis*, and *B. ovis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(2), 426-428. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.2.426-428.1996>
- Marín, C. M., Jiménez de Bagüés, M. P., Barberán, M. y Blasco, J. M. (1996). Comparison of two selective

- media for the isolation of *Brucella melitensis* from naturally infected sheep and goats. *Veterinary Record*, 138(17), 409-411. <https://doi.org/10.1136/vr.138.17.409>
- Martínez-Moliner, V., Soler-Llorens, P., Moleres, J., Garmendia, J. y Aragon, V. (2012). Distribution of genes involved in sialic acid utilization in strains of *Haemophilus parasuis*. *Microbiology*, 158(8), 2117-2124. <https://doi.org/10.1099/mic.0.056994-0>
- Martínez de Tejada, G., Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E. y Moriyón, I. (1995). The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infection and Immunity*, 63(8), 3054-3061. <https://doi.org/10.1128/iai.63.8.3054-3061>
- Mateu-de-Antonio, E. M. y Martín, M. (1995). *In vitro* efficacy of several antimicrobial combinations against *Brucella canis* and *Brucella melitensis* strains isolated from dogs. *Veterinary Microbiology*, 45(1), 1-10. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)00122-D](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)00122-D)
- Minami, A., Meguro, Y., Ishibashi, S., Ishii, A., Shiratori, M., Sai, S., Horii, Y., Shimizu, H., Fukumoto, H., Shimba, S., Taguchi, R., Takahashi, T., Otsubo, T., Ikeda, K. y Suzuki, T. (2017). Rapid regulation of sialidase activity in response to neural activity and sialic acid removal during memory processing in rat hippocampus. *Journal of Biological Chemistry*, 292(14), 5645-5654. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.764357>
- Minami, A., Otsubo, T., Ieno, D., Ikeda, K., Kanazawa, H., Shimizu, K., Ohata, K., Yokochi, T., Horii, Y., Fukumoto, H., Taguchi, R., Takahashi, T., Oku, N. y Suzuki, T. (2014). Visualization of sialidase activity in mammalian tissues and cancer detection with a novel fluorescent sialidase substrate. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081941>
- Minami, A., Shimizu, H., Meguro, Y., Shibata, N., Kanazawa, H., Ikeda, K. y Suzuki, T. (2011). Imaging of sialidase activity in rat brain sections by a highly sensitive fluorescent histochemical method. *NeuroImage*, 58(1), 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.06.017>
- Miranda, K. L., Poester, F. P., Dorneles, E. M. S., Resende, T. M., Vaz, A. K., Ferraz, S. M. y Lage, A. P. (2016). *Brucella abortus* RB51 in milk of vaccinated adult cattle. *Acta Tropica*, 160, 58-61. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.04.012>
- Monreal, D., Grilló, M. J., González, D., Marín, C. M., De Miguel, M. J., López-Goñi, I., Blasco, J. M., Cloeckert, A. y Moriyón, I. (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. *Infection and immunity*, 71(6), 3261-3271. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3261-3271.2003>
- Morris, E. J. (1956). A selective medium for *Brucella* spp. *J Gen Microbiol*, 15(3), 629-631. <https://doi.org/10.1128/jb.72.5.677-680.1956>
- Muñoz, P.M., DeMiguel, M.J., Grilló, M.J., Marín, C.M., Barberán, M. y Blasco, J.M. (2008). Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. *Vaccine*, 26(21), 2562-2569. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.030>

- OIE. (2022). Chapter 3.1.4: Brucellosis (Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). En *Office International of Epizootics, World Organisation for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. (8th ed.). World Organisation for Animal Health.
- Orenga, S., James, A. L., Manafi, M., Perry, J. D. y Pincus, D. H. (2009). Enzymatic substrates in microbiology. *Journal of Microbiological Methods*, 79(2), 139-155. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.08.001>
- Orwa, J. A., Govaerts, C., Gevers, K., Roets, E., Van Schepdael, A. y Hoogmartens, J. (2002). Study of the stability of polymyxins B1, E1 and E2 in aqueous solution using liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29(1-2), 203-212. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00016-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00016-X)
- Palmer, M. V., Olsen, S. C., y Chevillat, N. F. (1997). Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. *American journal of veterinary research*, 58(5), 472-477.
- Pan, M. J. y Van Staden, J. (1998). The use of charcoal in *in vitro* culture - A review. *Plant Growth Regulation*, 26(3), 155-163. <https://doi.org/10.1023/A:1006119015972>
- Pérez-Sancho, M., Adone, R., García-Seco, T., Tarantino, M., Diez-Guerrier, A., Drumo, R., Francia, M., Domínguez, L., Pasquali, P. y Álvarez, J. (2014). Evaluation of the immunogenicity and safety of *Brucella melitensis* B115 vaccination in pregnant sheep. *Vaccine*, 32(16), 1877-1881. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.01.070>
- Pérez-Sancho, M., Cerdá, I., Fernández-Bravo, A., Domínguez, L., Figueras, M. J., Fernández-Garayzábal, J. F. y Vela, A. I. (2018). Limited performance of MALDI-TOF for identification of fish *Aeromonas* isolates at species level. *Journal of Fish Diseases*, 41(10), 1485-1493. <https://doi.org/10.1111/jfd.12837>
- Perry, J. D. (2017). A decade of development of chromogenic culture media for clinical microbiology in an era of molecular diagnostics. *Clinical microbiology Reviews*, 30(2), 449-479. <https://doi.org/10.1128/CMR.00097-16>
- Poonawala, H., Conner, T. M. y Peaper, D. R. (2018). The brief case: Misidentification of *Brucella melitensis* as *Ochrobactrum anthropi* by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *J Clin Microbiol.*, 56(6), 1-5.
- Poveda Urkixo, I. (2022). *Estudios de patogénesis placentaria por Brucella y caracterización molecular de Brucella suis bv 2*. Tesis Doctoral, Universidad Pública de Navarra, España.
- Renoux, G. (1954). A selective medium for isolation of *Brucella melitensis*. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, 87(3), 325-333.
- Rocha-Gracia, R. D. C., Castañeda-Roldán, E. I., Giono-Cerezo, S. y Girón, J. A. (2002). *Brucella* sp. bind to sialic acid residues on human and animal red blood cells. *FEMS Microbiology Letters*, 213(2), 219-224. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00817-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00817-0)
- Roemhild, R., Bollenbach, T. y Andersson, D. I. (2022). The physiology and genetics of bacterial responses to antibiotic combinations. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00700-5>

- Ryan, M. P. y Pembroke, J. T. (2020). The genus *Ochrobactrum* as major opportunistic pathogens. En *Microorganisms* (Vol. 8, Número 11, pp. 1-30). Microorganisms. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111797>
- Ryan, W. (1967). A selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from milk. *Monthly Bulletin of the Ministry of Health and the Public Health Laboratory Service*, 26, 33-38.
- Saito, M., Hagita, H., Iwabuchi, Y., Fujii, I., Ikeda, K. y Ito, M. (2002). Fluorescent cytochemical detection of sialidase activity using 5-bromo-4-chloroindol-3-yl- α -D-N-acetylneuraminic acid as the substrate. *Histochemistry and Cell Biology*, 117(5), 453-458. <https://doi.org/10.1007/s00418-002-0399-x>
- Schurig, G. G., Roop, R. M., Bagchi, T., Boyle, S., Buhrman, D. y Sriranganathan, N. (1991). Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology*, 28(2), 171-188. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(91\)90091-S](https://doi.org/10.1016/0378-1135(91)90091-S)
- Schurig, G. G., Sriranganathan, N. y Corbel, M. J. (2002). Brucellosis vaccines: Past, present and future. *Veterinary Microbiology*, 90(1-4), 479-496. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00255-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00255-9)
- Severi, E., Müller, A., Potts, J. R., Leech, A., Williamson, D., Wilson, K. S. y Thomas, G. H. (2008). Sialic acid mutarotation is catalyzed by the *Escherichia coli* β -propeller protein YjHT. *Journal of Biological Chemistry*, 283(8), 4841-4849. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707822200>
- Severi, E., Rudden, M., Bell, A., Palmer, T., Juge, N. y Thomas, G. H. (2021). Multiple evolutionary origins reflect the importance of sialic acid transporters in the colonization potential of bacterial pathogens and commensals. *Microbial Genomics*, 7(6), 614. <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000614>
- Sharafi, T. y Ardebili, A. (2019). Plastic binding feature of polymyxins: The effect on MIC susceptibility measurements. *Infection and Drug Resistance*, 12, 2649-2653. <https://doi.org/10.2147/IDR.S219130>
- Shejale, K. P., Yadav, D., Patil, H., Saxena, S. y Shukla, S. (2020). Evaluation of techniques for the remediation of antibiotic-contaminated water using activated carbon. *Molecular Systems Design and Engineering*, 5(4), 743-756. <https://doi.org/10.1039/c9me00167k>
- Sola-Landa, A., Pizarro-Cerdá, J., Grilló, M. J., Moreno, E., Moriyón, I., Blasco, J. M., Gorvel, J. P. y López-Goñi, I. (1998). A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Molecular Microbiology*, 29(1), 125-138. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00913.x>
- Suzuki, T. (2017). Imaging of sialidase activity and its clinical application. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40(12), 2015-2023. <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00592>
- Taylor, R. B., Richards, R. M. E., Low, A. S. y Hardie, L. (1994). Chemical stability of polymyxin B in aqueous solution. *International Journal of Pharmaceutics*, 102(1-3), 201-206. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)90056-6)
- Teyssier, C., Marchandin, H., Jean-Pierre, H., Diego, I., Darbas, H., Jeannot, J. L., Gouby, A. y Jumas-Bilak, E. (2005). Molecular and phenotypic features for identification of the opportunistic pathogens *Ochrobactrum* spp. *Journal of Medical Microbiology*, 54(10), 945-953.

<https://doi.org/10.1099/jmm.0.46116-0>

- Thayer, J. D. y Martin, J. E. (1966). Improved medium selective for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. *Public health reports*, 81(6), 559-562. <https://doi.org/10.2307/4592771>
- The UniProt Consortium. (2021). UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D480-D489. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA1100>
- Velasco, J., Romero, C., Leiva, J. y Díaz, R. (1998). Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(3), 759-768.
- Verger, J. M., Grayon, M., Zundel, E., Lechopier, P. y Olivier-Bernardin, V. (1995). Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against a *Brucella melitensis* experimental infection in pregnant ewes. *Vaccine*, 13(2), 191-196. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(95\)93135-V](https://doi.org/10.1016/0264-410X(95)93135-V)
- Vicente, A. F., Antunes, J. M. A. P., Lara, G. H. B., Mioni, M. S. R., Allendorf, S. D., Peres, M. G., Appolinário, C. M., Listoni, F. J. P., Ribeiro, M. G. y Megid, J. (2014). Evaluation of three formulations of culture media for isolation of *Brucella* spp. regarding their ability to inhibit the growth of contaminating organisms. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/702072>
- Vimr, E. R. (1994). Microbial sialidases: Does bigger always mean better? *Trends in Microbiology*, 2(8), 271-277. [https://doi.org/10.1016/0966-842X\(94\)90003-5](https://doi.org/10.1016/0966-842X(94)90003-5)
- Vimr, E. R. (2013). Unified theory of bacterial sialometabolism: How and why bacteria metabolize host sialic acids. *ISRN Microbiology*, 2013(Figure 1), 1-26. <https://doi.org/10.1155/2013/816713>
- Wang, Z., Niu, J. R., Wang, S., Lv, Y. y Wu, Q. (2013). *In vivo* differences in the virulence, pathogenicity, and induced protective immunity of *wboA* mutants from genetically different parent *Brucella* spp. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(2), 174-180. <https://doi.org/10.1128/CVI.00573-12>
- Wang, Z., Niu, J. R., Wang, X. L., Wu, T. L., Cheng, J., Lu, L. y Wu, Q. M. (2014). Evaluation of a *Brucella melitensis* mutant deficient in O-polysaccharide export system ATP-binding protein as a rough vaccine candidate. *Microbes and Infection*, 16(8), 633-639. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.06.013>
- Zabalza Baranguá, A. (2017). *Desarrollo de vacunas marcadas con GFP frente a la brucelosis ovina y tests diagnósticos asociados*. Tesis doctoral, Universidad Pública de Navarra, España.

Capítulo 3

Seguridad del candidato vacunal Rev1 Δ wzm y
respuesta serológica en corderos

Introducción

La brucelosis de los pequeños rumiantes está causada principalmente por *B. melitensis*, en los que produce abortos y alteraciones reproductivas que conllevan grandes pérdidas económicas en todo el mundo (Dadar et al., 2021). Además, estos animales representan una importante fuente de contagio para el ser humano en las regiones afectadas (Garin-Bastuji et al., 1998). Para prevenir esta situación, la vacunación de los animales domésticos es una herramienta esencial y la única estrategia viable en zonas con alta prevalencia y/o con escasos recursos económicos y humanos. Hasta el momento, la única vacuna recomendada frente a la brucelosis ovina y caprina es la cepa atenuada *B. melitensis* Rev1; sin embargo, esta cepa presenta una serie de inconvenientes, entre los que destaca su virulencia y persistente reacción serológica en animales adultos, que limita su uso a corderos de 3-6 meses de edad, a dosis de $1-2 \times 10^9$ UFC por vía SC o conjuntival. No obstante, esta aproximación presenta serias dificultades prácticas para ser implementada en países que no cuentan con los medios y servicios de vigilancia adecuados, prefiriéndose, en su lugar, la vacunación masiva (Blasco, 1997; Blasco et al., 2016; European Commission, 2001; OIE, 2022) con una cepa más segura (AgResults y GALVmed, 2016). En este contexto, grupos de investigación de todo el mundo han desarrollado diversas alternativas vacunales, consistentes tanto en cepas atenuadas como en composiciones subcelulares y vacunas basadas en ADN (Heidary et al., 2022). Entre ellas, el grupo de brucelosis del IdAB-CSIC ha apostado por la cepa atenuada Rev1 Δ wzm descrita en el capítulo 1 de esta tesis. Las propiedades biológicas de esta cepa en los distintos modelos murinos (Mena-Bueno et al., 2022) la convierten en un firme candidato vacunal para ser evaluado en seguridad, eficacia y respuesta inmune en su hospedador definitivo.

La evaluación de un nuevo candidato vacunal en especies ganaderas requiere de tres aproximaciones diagnósticas: cultivo bacteriológico, detección/confirmación molecular y estudios serológicos (Di Bonaventura et al., 2021). Las dos primeras técnicas han sido tratadas en los capítulos 1 y 2 de esta tesis; para estudiar la respuesta serológica subsiguiente a la infección, existen diversas técnicas serológicas que pueden realizarse con distintos tipos de antígeno y ofrecen diferente sensibilidad/especificidad (Alonso-Urmeneta et al., 1998; Ducrotoy et al., 2018). Entre las técnicas utilizadas en brucelosis ovina, destacan la aglutinación con Rosa de Bengala (RBT) y la fijación de complemento (CFT) como pruebas de cribado y confirmatoria, respectivamente (OIE, 2022), además de otras técnicas como los distintos tipos de ELISA e inmunodifusión en gel, tanto con antígenos lisos como rugosos.

La actual vacuna Rev1, además de los problemas de seguridad que presenta (*i. e.*, abortos y excreción bacteriana en animales gestantes, transmisión al ser humano y resistencia a los tratamientos con estreptomicina; OIE, 2022), induce reacciones serológicas indistinguibles de las producidas por las cepas virulentas, incluso durante largos periodos de tiempo. Esto ocasiona el denominado problema DIVA que dificulta la aplicación de una estrategia de control basada en la vacunación y el sacrificio de los animales infectados (Blasco et al., 2016).

Además de la atenuación e inmunogenicidad mostradas en modelo murino, el mutante Rev1 Δ wzm desarrollado en esta tesis posee la ventaja de ser una cepa rugosa que acumula internamente un O-PS no unido al R-LPS; esta particularidad le podría conferir propiedades inmunogénicas en su hospedador natural superiores a las de otros mutantes rugosos e incluso a las de su homólogo 16M Δ wzm (Zabalza Baranguá, 2017), a la vez que una menor interferencia serológica que la generada por Rev1. En este tercer capítulo, se ha realizado un estudio de seguridad y respuesta inmune en corderos con el candidato vacunal Rev1 Δ wzm (capítulo 1) en comparación con 16M Δ wzm, utilizando el medio de cultivo selectivo BSM desarrollado en el capítulo 2.

homogenizado, se realizaron tres diluciones decimales seriadas, mezclando 0,5 mL de suspensión bacteriana con 4,5 mL de PBS, y se confirmó que la última dilución poseía una $DO_{600} = 0,106 \pm 0,008$ que, en nuestras condiciones experimentales, se corresponde con 5×10^8 UFC/mL; en el caso de obtener menor DO_{600} , se añadió más masa bacteriana de otras placas a la suspensión madre y se repitió la operación las veces necesarias hasta obtener la suspensión madre deseada (5×10^{11} UFC/mL). A continuación, se preparó una dilución 1 : 5 de la suspensión madre en PBS (mezclando 1,8 mL de suspensión madre con 7,2 mL de PBS) seguida de una dilución 1 : 10 (mezclando los 9 mL de la suspensión anterior con 81 mL de PBS) para obtener 90 mL de un inóculo final con $\approx 1 \times 10^{10}$ UFC/mL. Para comprobar que dicho inóculo poseía la concentración deseada, se realizó una dilución decimal en PBS (0,5 mL de suspensión en 4,5 mL de PBS) y se midió su absorbancia $DO_{600} = 0,225 \pm 0,025$ que, en nuestras condiciones, se corresponde con 1×10^9 UFC/mL de *Rev1Δwzm* y *16MΔwzm*. Para su transporte y administración en ganado ovino, la suspensión final se dispensó en viales de vidrio borosilicato de 20 mL (poniendo 13 mL/vial) que se sellaron con tapones de silicona y arandelas de aluminio fijadas con una crimpadora de viales (Wheaton, USA); el transporte de los viales se realizó en contenedores de bioseguridad de triple envase Biopack-2 (Air Sea Containers, UK) autorizados para sustancias infecciosas de Categoría A y Clase 6.2. El n.º exacto de bacterias viables contenidas en cada inóculo, así como la pureza y homogeneidad colonial, se determinó retrospectivamente, tanto antes como después de las inoculaciones en ovinos, siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 1.

2. Estudios en ganado ovino

2.1. Animales utilizados y consideraciones éticas y de bioseguridad

Se utilizaron un total de 36 ovinos (21 machos y 15 hembras) de raza Churra, con 3-4 meses de edad, adquiridos 2 meses antes de comenzar el estudio de una ganadería de Castilla y León declarada oficialmente indemne de *B. melitensis* (con certificado M4, según RD 2611/1996). Antes de comenzar el estudio, todos los animales se analizaron serológicamente para descartar infecciones por *B. ovis*, *B. melitensis* y otras infecciones reproductivas como las producidas por *Chlamydia psittaci*, *Salmonella Abortusovis*, *Coxiella burnetii*, *Toxoplasma gondii*, *Mycoplasma agalactiae* y el virus de la enfermedad de Border. Estas pruebas se realizaron en el Laboratorio de Calidad Agroalimentaria de Navarra (LCA) mediante las técnicas acreditadas para cada enfermedad infecciosa. Los animales se alojaron en las instalaciones BSL2 de la granja experimental de la

Universidad Complutense de Madrid (UCM; ES-281200000147) ubicada en el término municipal de Rascafría, Comunidad de Madrid. Los 36 animales presentaban un peso y un desarrollo corporal homogéneos, por lo que se asignaron aleatoriamente en distintos grupos experimentales ($n = 12$), cada uno de ellos alojado en un corral independiente separado mediante vallas (Fig. 48). La aplicación de punto final humanitario no fue necesaria, puesto que no se observaron signos de sufrimiento en ninguno de los animales.



Fig. 48. Grupo experimental de corderos de raza Churra inoculados en esta tesis. Imagen de los corderos alojados en la granja de Rascafría (Comunidad de Madrid) durante los estudios de seguridad y respuesta inmune, tras la vacunación con Rev1 Δ wzm o 16M Δ wzm.

Todos los protocolos se realizaron bajo Standard Operating Procedures (SOP); las manipulaciones fueron realizadas por personal acreditado para las funciones de experimentación animal A, B, C o D en ganado ovino del RD 53/2013 y provisto de los debidos equipos de protección individual (RD 773/1997; RD 664/1997); las manipulaciones de animales se realizaron siguiendo las recomendaciones de FELASA (Rehbinder et al., 2000) y ARRIVE (Percie du Sert et al., 2020). Los protocolos de experimentación animal fueron evaluados y aprobados por los comités de ética y bioseguridad de la UCM (código OH(CEA)-UCM-32-2018), la CIOMG (códigos B/ES/18/31 y A/ES/20/83) y, finalmente, autorizados por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS; códigos 194/PIV para Productos Inmunológicos Veterinarios y 432/ECV para Ensayos Clínicos Veterinarios) y el Gobierno de la Comunidad de Madrid (código PROEX 187/18).

2.2. Diseño experimental

2.2.1. Inoculaciones

Como se muestra en la Fig. 49, tres grupos de 12 corderos fueron inoculados por vía SC con $2-5 \times 10^{10}$ UFC/animal de Rev1 Δ wzm o 16M Δ wzm o con PBS (Barrio et al., 2009). Para ello, se inyectaron 4 mL/animal del correspondiente inóculo en la región axilar izquierda, empleando una aguja de 21G acoplada a una jeringa de 5 mL (ambas Novico Médica); se comprobó la correcta inoculación en cada animal, mediante palpación de la zona.

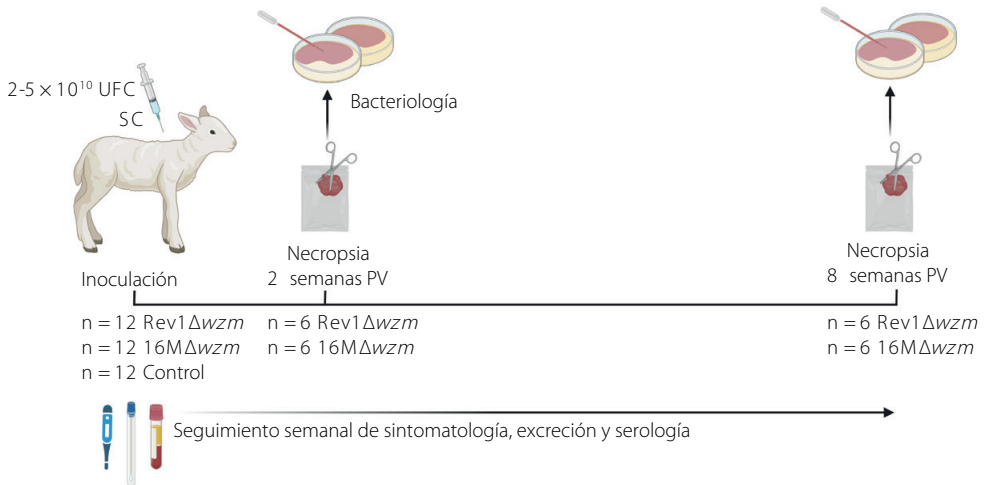


Fig. 49. Diseño experimental para la evaluación de la seguridad y respuesta inmune en corderos vacunados con Rev1Δwzm o 16MΔwzm. Un total de 36 corderos (n = 12) de raza Churra con 3-4 meses de edad fueron inoculados con 2-5 × 10¹⁰ UFC/animal o con PBS, por vía SC. En ellos, se evaluaron parámetros clínicos y serológicos, a lo largo del estudio. La mitad de los animales de cada grupo se sacrificaron a las 2 semanas PI y la otra mitad, a las 8 semanas PI, para proceder a las necropsias regladas y toma de muestras de órganos y ganglios linfáticos con fines bacteriológicos.

2.2.2. Seguimiento clínico y toma de muestras

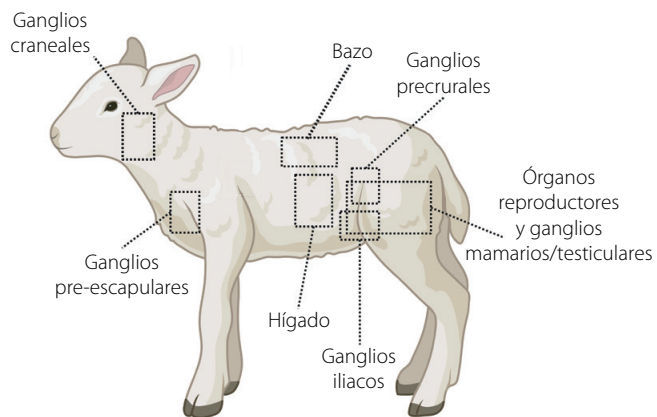
Se monitorizó la valoración clínica de todos los animales del estudio, mediante observación del comportamiento, inspección clínica general, palpación del punto de inoculación y toma de temperatura rectal (considerando fiebre >40,3 °C; Piccione et al., 2007). Dicha valoración se realizó tanto en el momento de las inoculaciones, como después, diariamente durante la primera semana PI y semanalmente hasta el final del experimento (European Pharmacopoeia, 2016). Además, en cumplimiento de las exigencias de la AEMPS, para descartar excreción de los candidatos vacunales al medio ambiente, los días 2, 6, 19, 33 y 40 PI se tomaron hisopos con medio de transporte Amies (Sarstedt) impregnados en secreciones nasales, conjuntivales, prepuciales o vaginales, orina, recto y de tres puntos del suelo elegidos al azar.

Asimismo, se tomaron muestras de sangre el día de la vacunación y, después, semanalmente a lo largo de todo el estudio, para realizar el seguimiento serológico de los animales. Dichas muestras se obtuvieron por punción en la vena yugular con una aguja de 18G (Novico Médica) acoplada a un tubo de vacío sin anticoagulante Venojet® (Terumo). El suero se obtuvo mediante coagulación a T_{amb} durante 2 h, eliminación del coágulo y

centrifugación ($2.500 \times g$, 10 min). Las muestras de suero obtenidas se conservaron individualmente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis, antes de 3 meses.

La mitad de los animales de cada grupo ($n = 6$) se sacrificaron a las 2 semanas PI y la otra mitad, a las 8 semanas PI, para realizar las necropsias regladas y la toma de muestras de órganos y ganglios linfáticos para bacteriología (Fig. 50). Los animales sacrificados fueron 2 machos y 4 hembras de cada grupo o 3 machos y 3 hembras del grupo Rev1 Δ wzm sacrificado a 8 semanas PI; los sacrificios se realizaron mediante anestesia intravenosa con 0,2 mg/kg de xilacina y 5 mg/kg de ketamina (Laboratorios Esteve), seguida de 6 mL/50 kg del cóctel eutanásico T61 (embutramida, yoduro de mebenzonio y clorhidrato de tetracaína; MSD Animal Health). Como se representa en la Fig. 50, las muestras obtenidas fueron: ganglios linfáticos (*i. e.*, retrofaríngeos, submaxilares y parotídeos —procesados juntos como craneales—, pre-escapulares, precrurales, ilíacos y testiculares o mamarios), bazo, hígado, epidídimos y glándulas masculinas accesorias (*i. e.*, próstata, glándulas bulbouretrales, vesículas seminales y ampollas de los conductos deferentes, procesadas juntas) o útero y mama, como en estudios anteriores (Barrio et al., 2009; Muñoz et al., 2008). Además, cuando se detectó, se tomó un hisopo impregnado en el tejido subcutáneo del punto de inoculación. Las muestras se desgrasaron inmediatamente después de su obtención y se introdujeron individualmente en bolsas de plástico con cierre hermético y debidamente rotuladas, que se conservaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento en las instalaciones del IdAB. En todos los casos, se anotaron las posibles lesiones macroscópicas observadas.

Fig. 50. Muestras de corderos recogidas para estudios bacteriológicos. Se realizaron necropsias regladas y toma de muestras de órganos y ganglios linfáticos de corderos, tras 2 y 8 semanas de la inoculación con Rev1 Δ wzm o 16M Δ wzm. Las muestras recogidas fueron bazo, hígado, útero y mama o epidídimos y glándulas masculinas accesorias, y ganglios linfáticos craneales, pre-escapulares, precrurales, ilíacos, mamarios o testiculares, así como hisopos impregnados en el punto de inoculación (cuando se detectó).



3. Técnicas de diagnóstico

3.1. Detección de *Brucella* por qPCR

Los hisopos impregnados en secreciones nasales, conjuntivales, prepuciales, vaginales, orina, heces y muestras ambientales se introdujeron en 1 mL de PBS para extracción de ADN y posterior análisis por qPCR de la IS711, ya que se trata de una secuencia de inserción específica de *Brucella*, conservada y presente en número variable, según la especie (Pérez-Sancho et al., 2013). Esta técnica se realizó en el Servicio de Diagnóstico de VISAVET-UCM, realizando a extracción de ADN en un equipo automatizado MagMAX con el Pathogen RNA/DNA Kit (Applied Biosystems); y la qPCR con los cebadores y metodología descritos (Bounaadja et al., 2009; Pérez-Sancho et al., 2013) y siguiendo los SOP del laboratorio para brucelosis de referencia de la UE (EURL Brucellosis, 2019). El límite de detección de la técnica se determinó por duplicado, utilizando diluciones decimales seriadas entre 10^2 y 10^9 UFC/mL de los dos mutantes en PBS. La validación de los resultados requirió la ausencia de señal de amplificación en los controles negativos, Ct = 37 para el control positivo de extracción y Ct = 33 ± 3 para el control positivo de qPCR.

3.2. Bacteriología

3.2.1. Procesado de muestras de tejidos ovinos

Una vez en el laboratorio BSL3 del IdAB, las muestras de tejidos obtenidas durante las necropsias de los corderos se desinfectaron externamente mediante flameado con etanol 96 % (VWR Chemicals) y se introdujeron en bolsas Stomacher80® estériles (Seward Medical) para su posterior homogeneización en PBS, siguiendo los procedimientos descritos (Muñoz et al., 2008). Brevemente, cada muestra se introdujo en una bolsa Stomacher80® estéril (Seward Medical), se cortó en pequeñas porciones con ayuda de unas tijeras quirúrgicas de punta roma, previamente esterilizadas mediante flameado para cada muestra, y se diluyó en el mínimo volumen de PBS (según el peso y consistencia del tejido) para su homogeneización durante 1 min en un mezclador de paletas Stomacher80® Biomaster (Seward Medical).

3.2.2. Cultivo en los medios selectivos

Los hisopos con muestras de fosas nasales, conjuntiva, orina, recto, prepucio y vagina tomados a lo largo del estudio se cultivaron por duplicado, mediante siembra masiva en placas de los medios selectivos CM y BSM descritos en el capítulo 2 de esta tesis. Los homogeneizados de tejidos ovinos se sembraron del mismo modo, a partir de 1 mL/placa repartido con ayuda de un hisopo estéril (Fisherbrand); se conservó 1 mL de cada homogeneizado, en criotubos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, por si fuera preciso en futuras determinaciones. Todas las placas se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 14 días, examinándolas a las 24 h (para descartar la presencia de bacterias de crecimiento rápido) y tras 7, 10 y 14 días de incubación, para la identificación de colonias con morfología compatible con *Brucella* (OIE, 2022). De cada placa, se repicaron individualmente todas o un número representativo (según el nivel de infección) de las colonias sospechosas de *Brucella* y se incubaron ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 24-48 h) en el mismo medio de su aislamiento, para su purificación y posterior identificación molecular por PCR y bioquímica, según se describe en el siguiente apartado.

3.2.3. Identificación molecular y bioquímica

Las colonias sospechosas de *Rev1 Δ wzm* o *16M Δ wzm* se confirmaron mediante la PCR *F1-R4 wzm* descrita en el capítulo 1 (Tablas 5 y 6) para detectar la delección en *wzm*, seguida de la PCR-RFLP descrita en el capítulo 2 con los cebadores *rpsLA* y *rpsLB* (Cloekaert et al., 2002) para diferenciar entre los mutantes obtenidos en 16M y en

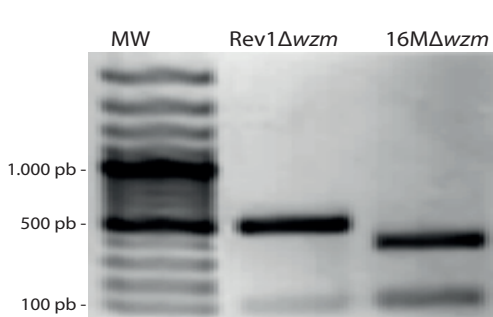


Fig. 51. Diferenciación molecular entre *Rev1 Δ wzm* y *16M Δ wzm*. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los productos de PCR-RFLP del gen *rpsL* que permite diferenciar *Rev1 Δ wzm* (468 pb y 88 pb) y *16M Δ wzm* (360 pb, 108 pb y 88 pb). MW: marcador de peso molecular.

Rev1, como se muestra en la Fig. 51. Las colonias identificadas como *Brucella* por PCR se sometieron a la prueba de cristal violeta-oxalato sobre cultivos en BAB con al menos 300 UFC. Para ello, se prepararon inóculos con $\approx 10^3$ UFC/mL (ver capítulo 1) que se sembraron (0,1 mL, por triplicado) en placas de BAB y, tras su incubación estándar, se procedió a la tinción por inundación de las mismas con una suspensión de cristal violeta-oxalato (Alton et al., 1988).

3.2.4. Interpretación de los resultados bacteriológicos

Tras confirmar la presencia de *Brucella*, una muestra se consideró infectada cuando se aisló al menos 1 UFC. Las categorías de infección se establecieron en función del n.º de UFC/placa, de acuerdo con los siguientes criterios: categoría 1, entre 1-5 UFC; categoría 2, entre 6-25 UFC; categoría 3, entre 26-125 UFC; categoría 4, entre 126-650 UFC; y categoría 5, más de 650 UFC. Para cada muestra, se consideró la categoría de infección encontrada en el medio de cultivo que aportó mayor recuento. Con estos datos, se determinó la distribución de la infección por el organismo de los corderos sacrificados a 2 y 8 semanas PI, mediante: i) el n.º y porcentaje de animales infectados, ii) el n.º y porcentaje de muestras infectadas, iii), la categoría de infección en cada muestra; y iv) el índice de infección media para cada animal, según se describe en Barrio et al., 2009. En detalle, este índice se calculó como el sumatorio de la categoría asignada a cada muestra dividido entre el n.º máximo posible; por ejemplo, si en un animal se encuentran 4/10 muestras infectadas con categoría 3 (de las 5 categorías existentes), el índice de infección media sería: $12/50 = 0,24$.

3.3. Respuesta serológica

El seguimiento serológico se llevó a cabo mediante las pruebas recomendadas de RBT como test de cribado y CFT como test confirmatorio frente al LPS liso (S-LPS; OIE, 2022) y un ELISA indirecto frente al LPS rugoso (R-LPS; OIE, 2018) (Ingenasa; ELISA-R/LPS) de *Brucella*. En cada caso, los resultados se expresaron como el porcentaje de corderos positivos a lo largo del tiempo y los títulos individuales de CFT-S/LPS. Para evitar sesgos experimentales, la evolución de la respuesta serológica se representó con los sueros de los 6 animales de cada grupo vacunado que llegaron hasta el final del experimento.

3.3.1. Pruebas frente a S-LPS

La técnica de RBT se realizó mezclando 50 µL de suero con 50 µL del antígeno cedido por el LCSA previamente atemperado a T_{amb} y, tras 4 min de agitación circular suave, se determinó la presencia o ausencia de aglutinación. Como controles positivo y negativo, se utilizó el suero de un animal infectado con Rev1 y el de un animal no vacunado, respectivamente (colección del IdAB). Si bien esta técnica es muy sensible (OIE, 2022), por tratarse de mutantes con R-LPS, se realizó el test de RBT modificado (RBTm). Esta prueba se llevó a cabo según se describe para el RBT estándar, pero mezclando 75 µL de suero con 25 µL del anti-

geno (Blasco et al., 1994). Los sueros positivos en RBT se analizaron mediante CFT-S/LPS, siguiendo el protocolo de microtitulación recomendado (OIE, 2022), bajo la técnica acreditada del LCA (Navarra). Además del porcentaje de animales reaccionantes en CFT-S/LPS, se determinaron los títulos individuales alcanzados por cada animal en cada tiempo analizado, como: 1/4: 20 UIFC/mL, 1/8: 40 UIFC/mL, 1/16: 80 UIFC/mL, 1/32: 160 UIFC/mL, 1/64: 320 UIFC/mL, 1/128: 640 UIFC/mL y 1/256: 1280 UIFC/mL.

3.3.2. Pruebas frente a R-LPS

La detección de anticuerpos frente al R-LPS se realizó utilizando el ELISA indirecto comercial INgezim *Brucella ovis* (n.º R.13.B0.K1; Ingenasa), siguiendo las instrucciones del fabricante. Dicho test utiliza placas de 96 pocillos tapizadas con extracto salino caliente (HS) de *B. ovis* (OIE, 2018) como antígeno y un mAb específico de IgG de rumiantes; la interpretación de los resultados se realizó en base a un valor umbral calculado como la DO_{450} del control positivo interno $\times 0,38$. Las muestras con valores en el umbral del punto de corte $\pm 10\%$ fueron consideradas dudosas y, por lo tanto, repetidas para confirmar el resultado.

4. Representación gráfica y análisis estadístico de los resultados

La presentación de los resultados y su análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, USA). El valor p se determinó mediante las pruebas de Chi-cuadrado o ANOVA de uno o dos factores, seguido de la prueba LSD de Fisher con un intervalo de confianza del 95 %, en base a la clasificación de los datos. Las ilustraciones se crearon utilizando la herramienta de diseño científico BioRender (<https://biorender.com>). Las figuras finales se editaron de manera uniforme con GNU Image Manipulation Program 2.10 código abierto, (www.gimp.org) y la maquetación se realizó utilizando los programas Adobe Illustrator e InDesign 2020 (San José, CA, USA).

Resultados

1. La inoculación con Rev1 Δ wzm o 16M Δ wzm no causa reacciones adversas en animales jóvenes ni excreción al medio ambiente

Los corderos de este estudio se inocularon SC con una dosis final de 5×10^{10} UFC de Rev1 Δ wzm o 2×10^{10} UFC de 16M Δ wzm. Todos ellos mostraron ausencia de signos de enfermedad tras la inoculación, con temperatura corporal normal, excepto algún animal que presentó una ligera febrícula (40,4-40,5 °C) de forma puntual, tanto en los grupos vacunados como en el grupo control, sin diferencias significativas entre ellos (Fig. 52).

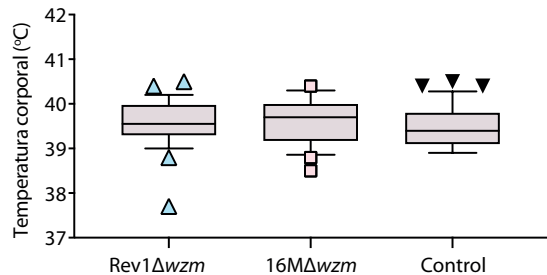


Fig. 52. Temperatura rectal en corderos inoculados con Rev1 Δ wzm, 16M Δ wzm o PBS (control). Diagrama de cajas elaborado con todas las mediciones (°C) obtenidas a lo largo del estudio, para cada grupo (n = 12); las cajas incluyen los dos cuartiles centrales (valores 25-75 %), la línea interior indica la mediana, los bigotes incluyen los percentiles 10-90 % y los símbolos, los valores atípicos. Prueba LSD de Fisher: $p > 0,05$.

La posible excreción de los mutantes se evaluó en un total de 560 hisopos impregnados en secreciones nasales, conjuntivales, prepuciales, vaginales, recto, orina o suelo, que se sometieron a qPCR de la IS711 y cultivo en CM y BSM; sólo 6 de estas muestras proporcionaron alguna señal de amplificación en qPCR, con valores de Ct $>38,5$, siendo todas ellas negativas en los medios de cultivo selectivo. La qPCR se validó con concen-

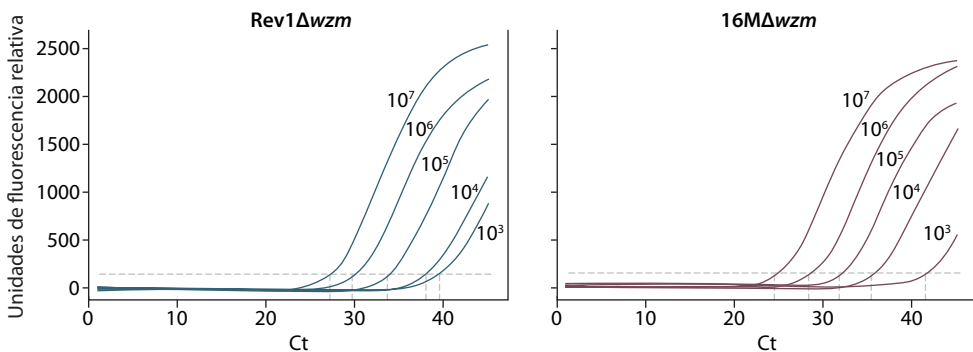


Fig. 53. Determinación del límite de detección de Rev1 Δ wzm o 16M Δ wzm por qPCR de la IS711. Curvas de amplificación (Unidades de fluorescencia relativa) conforme al n.º de ciclos (Ct) de la qPCR, utilizando diluciones decimales seriadas (10^3 - 10^7 UCF/mL) de Rev1 Δ wzm o 16M Δ wzm.

traciones conocidas de los mutantes (Fig. 53), estableciendo como límite de detección valores de Ct >38,5 (10^4 - 10^3 UFC/mL) para la identificación específica de Rev1 Δ wzm y 16M Δ wzm. Ambos métodos, molecular y microbiológico, indicaron la ausencia de excreción detectable de los mutantes inoculados en los corderos.

2. 16M Δ wzm se distribuye por el organismo más que Rev1 Δ wzm, sin infectar ninguno de ellos al aparato reproductor

El cultivo de muestras de órganos y ganglios linfáticos en los medios selectivos CM y BSM, a las 2 semanas PI (n = 6), permitió determinar la distribución de Rev1wzm y 16M Δ wzm en el organismo de los corderos. Como se muestra en la Tabla 26, se confirmó el aislamiento de la cepa inoculada en todos los animales de ambos grupos experimentales. Las infecciones por Rev1 Δ wzm prácticamente se restringieron a los ganglios linfáticos que drenan la zona de inoculación, detectándose en los ganglios pre-escapulares (diana de la infección) de 4/6 corderos, uno de ellos también infectado en los ganglios de la cabeza; los 2 corderos que resultaron negativos en los ganglios diana, vieron limitada la presencia del mutante al punto de inoculación. Sin embargo, 16M Δ wzm se encontró

Tabla 26. Distribución de Rev1 Δ wzm y 16M Δ wzm en corderos inoculados con 2.5×10^{10} UFC por vía SC y analizados (n = 6) a las 2 semanas PI

Tejido ¹	N.º de corderos positivos/totales analizados (%) Categorías de infección	
	Rev1 Δ wzm	16M Δ wzm
Punto de inoculación	2/6 (33 %) Categoría 4,5	3/6 (50 %) Categoría 5, 5, 3 ^a
Ganglios linfáticos	Pre-escapulares	4/6 (67 %) Categoría 2, 3, 3, 5
	Craneales	1/6 (17 %) Categoría 1
	Precrurales	1/6 (17 %) Categoría 1
	Ilíacos	0/6 (0)
Órganos	Bazo	0/6 (0)
	Hígado	1/6 (17 %) Categoría 1
TOTAL:	6/6 (100 %)	6/6 (100 %)

¹ Los hisopos impregnados en el tejido del punto de inoculación sólo se sembraron cuando dicho tejido se encontró engrosado en la necropsia; no mostradas las muestras de útero y ganglios mamarios o epidídimo, glándulas masculinas accesorias y ganglios testiculares, por haberse encontrado libres de infección. ^a Prueba Chi-cuadrado: $p \leq 0,05$ Rev1 Δ wzm vs. 16M Δ wzm.

algo más distribuido por el sistema linfático, con colonización del bazo en el 67 % de los animales, aunque a niveles muy bajos (categoría 1). En todos los casos, los órganos y ganglios del aparato reproductor permanecieron libres de infección. Las únicas muestras que mostraron niveles de infección altos (categorías 3-5) fueron el punto de inoculación y ganglio pre-escapular, siendo estos niveles significativamente superiores ($p \leq 0,05$) con $16M\Delta wzm$ que con $Rev1\Delta wzm$.

A excepción del engrosamiento de los puntos de inoculación procesados para bacteriología, no se observaron lesiones macroscópicas compatibles con *Brucella*.

3. $Rev1\Delta wzm$ y $16M\Delta wzm$ persisten en el organismo de los corderos durante menos de 8 semanas

El cultivo bacteriológico de las muestras obtenidas a las 8 semanas PI evidenció una rápida resolución de las infecciones por $Rev1\Delta wzm$ y $16M\Delta wzm$, ya que solamente un animal de cada grupo mostró *Brucella* (Fig. 54), encontrándose la bacteria únicamente en el ganglio pre-escapular al más bajo nivel de infección. A este tiempo, ambos grupos proporcionaron un índice de infección media de $0,004 \pm 0,009$ y, al igual que a 2 semanas PI, ningún animal mostró lesiones asociadas a la infección, encontrándose los puntos de inoculación totalmente resueltos a 8 semanas PI.

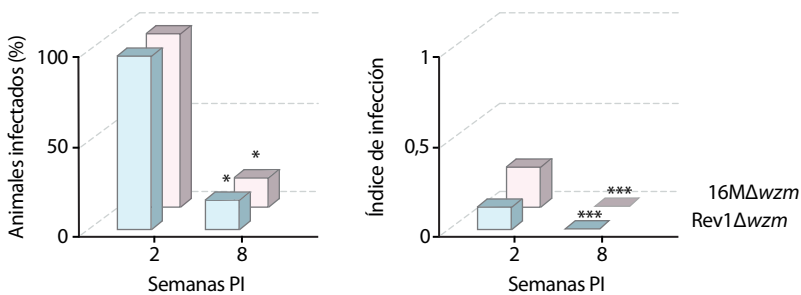


Fig. 54. Cinética de la infección en corderos inoculados con $Rev1\Delta wzm$ o $16M\Delta wzm$. Porcentaje de animales infectados (panel izdo.) e Índice de infección media (panel dcho.), tras 2 y 8 semanas desde la administración SC de $2-5 \times 10^{10}$ UFC/cordero. Prueba Chi-cuadrado o LSD de Fisher: *** $p \leq 0,001$, * $p \leq 0,05$.

4. Rev1Δwzm y 16MΔwzm generan una sólida respuesta serológica frente al R-LPS con mínima interferencia frente al S-LPS

Antes de la vacunación, todos los animales resultaron negativos en los análisis serológicos realizados frente a *Brucella* y otras infecciones reproductivas. A continuación, dado que no se observaron diferencias significativas entre hembras y machos (3 hembras y 3 machos inoculados con Rev1Δwzm; y 4 hembras y 2 machos, con 16MΔwzm), los resultados se presentan de manera conjunta en la Fig. 55. Todos los corderos fueron positivos en el ELISA-R/LPS, excepto uno que había sido inoculado con 16MΔwzm y que sí reaccionó en RBTm entre 1-5 semanas PI, mostrando un incremento progresivo del porcentaje de reaccionantes desde la primera semana PI hasta alcanzar un máximo de 5/6 animales positivos (83,3 %) simultáneamente a las 4-5 semanas PI; este porcentaje se mantuvo hasta las 8 semanas PI en el grupo Rev1Δwzm y fue algo menor (50 % positivos) en el grupo 16MΔwzm.

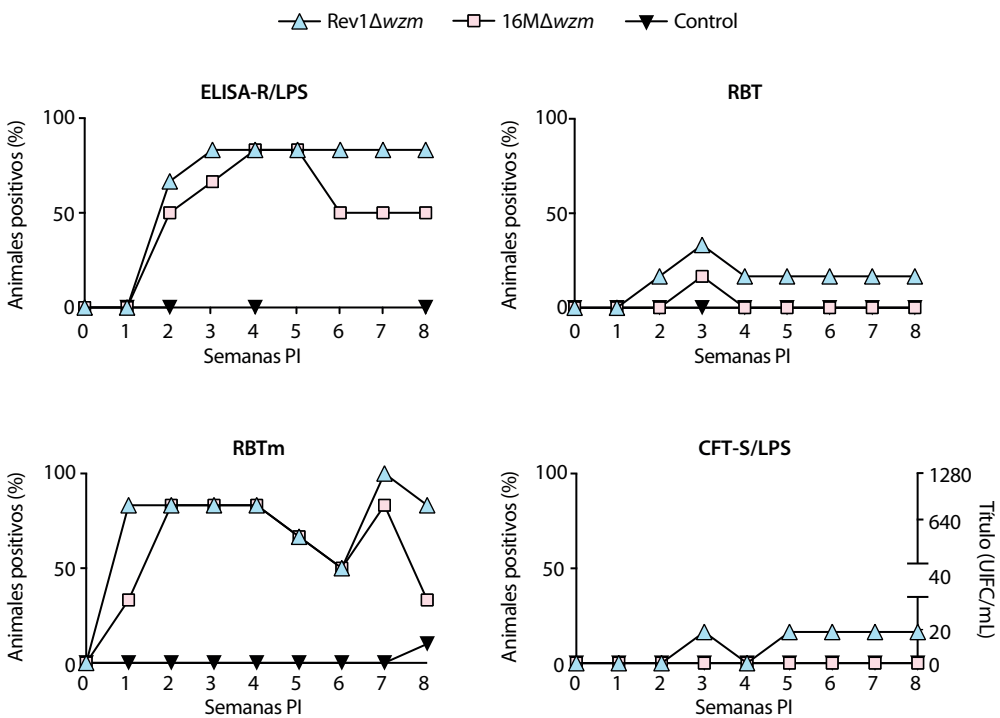


Fig. 55. Cinética de la respuesta serológica en corderos inoculados con Rev1Δwzm o 16MΔwzm. Porcentaje de corderos positivos en las pruebas ELISA-R/LPS, RBT, RBTm y CFT-S/LPS, y títulos medios en CFT-S/LPS, durante 8 semanas PI con Rev1Δwzm (n = 6), 16MΔwzm (n = 6) o PBS (n = 12), por vía SC.

En RBT, tan sólo 2/6 corderos inoculados con Rev1 Δ wzm (33,3 %) y 1/6 de los inoculados con 16M Δ wzm (16,7 %) desarrollaron anticuerpos detectables con el método estándar, mostrando dichos picos máximos de positividad a las 3 semanas PI; además, sólo un cordero del grupo Rev1 Δ wzm fue RBT positivo de forma persistente durante las 8 semanas del estudio

(Fig. 56). Para incrementar la sensibilidad de la técnica, se sometieron los sueros a la prueba de RBTm, obteniendo una respuesta más prematura (1 semana PI), más persistente y en más animales [*i. e.*, 5/6 (83,3 %) de reaccionantes en cada grupo] que con el método estándar; a continuación, se observó una disminución progresiva del porcentaje de reaccionantes en ambos grupos, hasta alcanzar un 50 % a las 6 semanas PI, seguida de un repunte de animales positivos a las 7 semanas PI que debe considerarse inespecífico, puesto que también se observó en el grupo PBS. Los sueros positivos o dudosos en RBTm (17 de Rev1 Δ wzm y 8 de 16M Δ wzm) se analizaron en CFT-S/LPS, como prueba confirmatoria. En el grupo Rev1 Δ wzm, tan sólo 2 animales reaccionaron en CFT-S/LPS, uno de ellos de forma puntual a las 3 semanas PI, y el otro entre las 5 y 8 semanas PI, en ambos casos con títulos muy bajos (20 UIFC/mL); en el grupo 16M Δ wzm todos los animales fueron negativos en esta prueba.

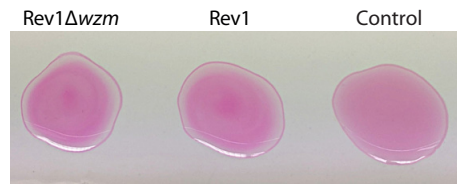


Fig. 56. Aglutinación en RBT estándar. Izquierda: suero de un cordero inoculado con Rev1 Δ wzm; centro: control positivo (cordero inoculado con Rev1); derecha: control negativo (cordero no infectado).

Discusión

La vacunación de los pequeños rumiantes es fundamental (Blasco et al., 2016) para prevenir las considerables repercusiones de salud pública y económicas asociadas a la brucelosis (Ghanbari et al., 2020). Para determinar la aplicabilidad de nuevos candidatos vacunales desprovistos de los inconvenientes de la actual vacuna Rev1 (OIE, 2022) fue necesario comenzar por el estudio de su seguridad en machos y hembras jóvenes.

En este capítulo, se describe el estudio de inoculación de corderos con el mutante Rev1 Δ wzm, así como con su homólogo 16M Δ wzm, con una dosis alta de 2-5 10¹⁰ UFC, diez veces superior a la utilizada con Rev1 en estos animales, según lo recomendado para cepas rugosas (Barrio et al., 2009). A esta dosis ninguno de los dos mutantes provocó signos de enfermedad en los animales ni tampoco excreción bacteriana al medio ambiente; y, en ambos grupos, solamente la mitad de los corderos mostró una reacción local leve y transitoria en la zona inoculada, conforme a lo reportado para otros mutantes R de *B. melitensis* (Barrio et al., 2009).

Mientras que la vacunación de animales jóvenes con Rev1 por vía SC provoca una infección ampliamente diseminada por el organismo, con aislamiento bacteriano a 2 semanas PI en bazo y ganglios pre-escapulares, craneales, iliacos, precurales e, incluso, testiculares y mamarios (Barrio et al., 2009; Guilloteau et al., 2006; Muñoz et al., 2008), los mutantes Rev1 Δ wzm y 16M Δ wzm no infectaron los ganglios linfáticos mamarios y testiculares —a diferencia de lo reportado para el mutante por transposición Bm16MRwzm (Barrio et al., 2009)—. A falta de otros experimentos en animales adultos más susceptibles, este resultado de inocuidad en el sistema reproductor sugiere que Rev1 Δ wzm y 16M Δ wzm podrían proporcionar una mayor seguridad que Rev1.

En particular, la presencia de Rev1 Δ wzm se restringió a la zona de inoculación y los ganglios pre-escapulares (diana de la infección) y craneales, a excepción de un animal con cultivo positivo de los ganglios precurales, con niveles medios de infección reducidos. Comparativamente, 16M Δ wzm mostró un mayor nivel de infección en la zona de inoculación y un patrón de distribución de mayor alcance con detección bacteriana adicional en bazo, hígado y ganglios iliacos. De hecho, la dispersión de esta cepa, exceptuando su ausencia en ganglios mamarios o testiculares, se asemejó a la descrita para el mutante Bm16MRwzm (Barrio et al., 2009).

En lo que respecta a la persistencia de las cepas inoculadas, la infección tanto Rev1 Δ wzm como de 16M Δ wzm estuvo virtualmente resuelta al cabo de 8 semanas PI, ya que al final del experimento se detectaron <3 UFC/placa de BSM en la muestra de ganglios pre-escapulares de un único animal de cada grupo. Análogamente, el mutante Bm16MRwzm se encontró en uno o dos corderos hasta transcurridos 60 o 90 días, respectivamente, desde la inoculación (Barrio et al., 2009); sin embargo, se desconoce la intensidad de la infección. El hecho de que la eliminación de Rev1 Δ wzm y 16M Δ wzm resultara similar a la observada con Rev1 (Barrio et al., 2009; Guilloteau et al., 2006; Muñoz et al., 2008) podría implicar una protección comparable en el hospedador definitivo.

Dado que *Brucella* es un patógeno intracelular extracelular facultativo (Gorvel y Moreno, 2002), desencadena una respuesta inmune tanto celular como mediada por anticuerpos, los cuales se miden típicamente en suero para uso diagnóstico y caracterización del LPS (Ducrotoy et al., 2016). Al igual que con los mutantes R H38 Δ wbkF (Muñoz et al., 2022), BmH38RwbkF, BmH38Rper y Bm16MRwa** (Barrio et al., 2009), la vacunación en ovino de hembras y machos jóvenes con Rev1 Δ wzm o 16M Δ wzm provocó una fuerte respuesta anti-R-LPS desde la primera semana PI, detectada mediante ELISA indirecto; esta respuesta fue superior a la generada por Rev1 (Barrio et al., 2009). Además, a diferencia del grupo 16M Δ wzm, en el que uno de los corderos no reaccionó a ELISA-R/LPS y se observó una disminución en la sexta semana PI, en todos los corderos inoculados con Rev1 Δ wzm se detectaron anticuerpos anti-R-LPS y la respuesta se mantuvo en el 83,3 % del rebaño hasta el final del experimento. Se ha demostrado que estos anticuerpos juegan un importante papel en la protección frente a la infección virulenta por *B. ovis* (Bowden et al., 2000), por lo que la vacunación con 16M Δ wzm y, especialmente, con Rev1wzm parece presentar un gran potencial para el control de esta enfermedad.

Aunque la inmunidad celular es crítica en la protección frente a la infección por cepas S, los anticuerpos anti-S-LPS de la respuesta humoral también participan en la eficacia *in vivo* (Barrio et al., 2009; Osman et al., 2018); de hecho, el O-PS es el antígeno inmunodominante (Ducrotoy et al., 2016). La inoculación con Rev1 por vía SC provoca una intensa respuesta en corderos en las pruebas anti-S-LPS (Muñoz et al., 2008; Salih-Alj Debbarh et al., 1996) que, si bien presenta una tendencia decreciente, puede llegar a mantenerse hasta en un 80 % de los animales durante más de 6 meses PI, requiriendo de la vía subconjuntival para reducir la persistencia de anticuerpos en <20 % a 3-4 meses (Jacques et al., 2007; Muñoz et al., 2022). Por su parte, los mutantes Rev1 Δ wzm y 16M Δ wzm generaron por vía SC una reacción mínima en las pruebas de RB, con máximo de 33,3 %

y 16,7 %, respectivamente, de positivos simultáneos a las 3 semanas PI, y CFT-S/LPS, en la que sólo dos corderos vacunados con Rev1 Δ wzm resultaron positivos con títulos bajos. La menor reactividad del test CFT-S/LPS podría deberse a que este solamente reconoce las IgG1, y no las IgG2 e IgG3, mientras que las tres subclases parecen reaccionar en la prueba RBT (Ducrotoy et al., 2016). En cualquiera de los casos, el porcentaje de sueros reaccionantes de Rev1 Δ wzm o 16M Δ wzm resultó también menor al reportado para el mutante Bm16MRwzm, con el que la mitad de los animales resultaron positivos a RBT y CFT-S/LPS en las dos semanas siguientes a la inoculación (Barrio et al., 2009). Mediante la prueba de RBTm, corregida para incrementar la sensibilidad (Blasco et al., 1994), se detectó que todos los animales vacunados con Rev1 Δ wzm o 16M Δ wzm habían generado respuesta anti-S-LPS entre la primera y sexta semana del estudio, mientras que todos los sueros de dicho periodo del grupo sin vacunar mostraron ausencia de aglutinación. Aunque no se puede descartar que las reacciones positivas anti-S-LPS se deban a un reconocimiento del complejo *core*-lípidos A, dicho epítipo estaría accesible en los antígenos utilizados en las técnicas de inmunoensayo (Blasco et al., 2016) y no así en RBT y CFT-S/LPS. El hecho de que estos mutantes puedan generar anticuerpos anti-S-LPS pero estos sean apenas identificables en las pruebas diagnósticas oficiales (OIE, 2022) supondría una ventaja sobre otros mutantes rugosos sin O-PS que no despiertan dicha respuesta, como es el caso de H38 Δ wbkF (Muñoz et al., 2022), en la eficacia frente a la infección por *B. melitensis*.

En base a los resultados obtenidos, la interferencia serológica en animales jóvenes tras la vacunación por vía SC con los mutantes Rev1wzm y 16M Δ wzm y bacterias virulentas de *B. melitensis* sería mínima o incluso inexistente, no obstante, el problema DIVA continua presente con *B. ovis*. Sin embargo, si idealmente se llegara a alcanzar la erradicación de la enfermedad aplicando masivamente una vacuna segura, no se requeriría la identificación individual de animales vacunados; la cual, además, resulta poco realista en numerosas partes del mundo (Blasco et al., 2016). Pese a ello, se podría evitar toda interferencia en el diagnóstico serológico mediante la aplicación y mejora de estrategias, como el marcaje con la proteína recombinante GFP (Chacón-Díaz et al., 2021; Zabalza-Baranguá et al., 2018) o el desarrollo de un test diagnóstico específico adaptado a las particularidades antigénicas (capítulo 1) de la cepa vacunal.

Con todo ello, los distintos patrones de distribución de la infección y cinética de la respuesta inmune generados en corderos con diversos mutantes rugosos insisten en el relevante papel que desempeña no sólo la mutación y el modo en que se desarrolla, sino la cepa parental. Además, los mutantes Rev1 Δ wzm y 16M Δ wzm se postulan como poten-

ciales candidatos vacunales que proporcionan mayor seguridad y con menor interferencia serológica que Rev1 en animales jóvenes, cuya inocuidad y eficacia debe ser estudiada en los distintos estados fisiológicos del hospedador natural.

Bibliografía

- AgResults y GALVmed. (2016). *Brucellosis Vaccine Prize*. <https://brucellosisvaccine.org/>
- Alonso-Urmeneta, B., Marín, C., Aragón, V., Blasco, J. M., Díaz, R., & Moriyón, I. (1998). Evaluation of lipopolysaccharides and polysaccharides of different epitopic structures in the indirect enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of brucellosis in small ruminants and cattle. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 5(6), 749–754. <https://doi.org/10.1128/CDLI.5.6.749-754.1998>
- Alton, G. G., Jones, L., Angus, R. y Verger, J. (1988). *Techniques for the brucellosis laboratory*. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Paris, France.
- Barrio, M. B., Grilló, M. J., Muñoz, P. M., Jacques, I., González, D., De Miguel, M. J., Marín, C. M., Barberán, M., Letesson, J. J., Gorvel, J. P., Moriyón, I., Blasco, J. M. y Zygmunt, M. S. (2009). Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less effective than Rev 1 vaccine against *Brucella melitensis* infection of sheep. *Vaccine*, 27(11), 1741-1749. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.025>
- Blasco, J. M., Garin-Bastuji, B., Marín, C., Gerbier, G., Fanlo, J., Jiménez de Bagués, M. y Cau, C. (1994). Efficacy of different Rose Bengal and complement fixation antigens for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *Vet Rec.*, 134, 415-420. <https://doi.org/10.1136/vr.134.16.415>
- Blasco J. M. (1997). A review of the use of *B. melitensis* Rev 1 vaccine in adult sheep and goats. *Preventive veterinary medicine*, 31(3-4), 275–283. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(96\)01110-5](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(96)01110-5)
- Blasco, J. M., Moreno, E. y Moriyón, I. (2016). Brucellosis vaccines and vaccine candidates. En *Veterinary vaccines for developing countries*. Roma: FAO (pp. 1-33).
- Bounaadja, L., Albert, D., Chénais, B., Hénault, S., Zygmunt, M. S., Poliak, S. y Garin-Bastuji, B. (2009). Real-time PCR for identification of *Brucella* spp.: A comparative study of IS711, *bcs*p31 and *per* target genes. *Veterinary Microbiology*, 137(1-2), 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.023>
- Bowden, R. A., Estein, S. M., Zygmunt, M. S., Dubray, G. y Cloeckaert, A. (2000). Identification of protective outer membrane antigens of *Brucella ovis* by passive immunization of mice with monoclonal antibodies. *Microbes and Infection*, 2(5), 481-488. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00317-8)
- Chacón-Díaz, C., Zabalza-Baranguá, A., San Román, B., Blasco, J.-M., Iriarte, M., Salas-Alfaro, D., Hernández-Mora, G., Barquero-Calvo, E., Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E., Grilló, M.-J. y Moreno, E. (2021). *Brucella abortus* S19 GFP-tagged vaccine allows the serological identification of vaccinated cattle. *PloS one*, 16(11), e0260288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260288>
- Cloeckaert, A., Grayon, M. y Grépinet, O. (2002). Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP based on a mutation in the *rpsL* gene. *Vaccine*, 20(19-20), 2546-2550. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00159-7](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00159-7)
- Dadar, M., Tiwari, R., Sharun, K. y Dhama, K. (2021). Importance of brucellosis control programs

- of livestock on the improvement of one health. En *Veterinary Quarterly* (Vol. 41, Número 1, pp. 137-151). *Vet Q*. <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1894501>
- De Miguel, M. J., Marín, C. M., Muñoz, P. M., Dieste, L., Grilló, M. J. y Blasco, J. M. (2011). Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(4), 1458-1463. <https://doi.org/10.1128/JCM.02301-10>
- Di Bonaventura, G., Angeletti, S., Ianni, A., Petitti, T. y Gherardi, G. (2021). Microbiological laboratory diagnosis of human brucellosis: An overview. *Pathogens*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/pathogens10121623>
- Ducrotoy, M. J., Conde-Álvarez, R., Blasco, J. M. y Moriyón, I. (2016). A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 171, 81-102. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.002>
- España, Ministerio de la Presidencia. (1996). *Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales*. *Boletín Oficial del Estado*, 307 (pp. 38115-38133).
- España, Ministerio de la Presidencia. (1997). *Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo*. *Boletín Oficial del Estado*, 124 (pp. 16100-16111).
- España, Ministerio de la Presidencia. (1997). *Real Decreto 773/1997, de 30 de mayo, sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud relativas a la utilización por los trabajadores de equipos de protección individual*. *Boletín Oficial del Estado*, 140 (pp. 1-17).
- EURL (Reference Laboratory) for Brucellosis. (2019). Standard Operating Procedure *Brucella* real time PCR. (pp. 1-5)
- European Commission - Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. (2001). *Brucellosis in Sheep and Goats (Brucella melitensis)*.
- European Pharmacopoeia. (2016). Brucellosis Vaccine (Live) (*Brucella melitensis* Rev.1 Strain) for Veterinary Use. En *Ed. 9.0* (pp. 1024-1025).
- Garin-Bastuji, B., Blasco, J. M., Grayon, M. y Verger, J. M. (1998). *Brucella melitensis* infection in sheep: Present and future. *Veterinary Research*, 29(3-4), 255-274. [https://doi.org/10.1016/S0928-4249\(98\)80027-8](https://doi.org/10.1016/S0928-4249(98)80027-8)
- Ghanbari, M. K., Gorji, H. A., Behzadifar, M., Sane, N., Mehedi, N. y Bragazzi, N. L. (2020). One health approach to tackle brucellosis: A systematic review. En *Tropical Medicine and Health* (Vol. 48, Número 1). *Trop Med Health*. <https://doi.org/10.1186/s41182-020-00272-1>
- Gorvel, J. P. y Moreno, E. (2002). *Brucella* intracellular life: From invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology*, 90(1-4), 281-297. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00214-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00214-6)
- Guilloteau, L. A., Laroucau, K., Olivier, M., Grilló, M. J., Marín, C. M., Verger, J. M. y Blasco, J. M. (2006). Residual virulence and immunogenicity of CGV26 and CGV2631 *B. melitensis* Rev. 1 deletion

- mutant strains in sheep after subcutaneous or conjunctival vaccination. *Vaccine*, 24(17), 3461-3468. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.02.007>
- Heidary, M., Dashtbin, S., Ghanavati, R., Mahdizade Ari, M., Bostanghadiri, N., Darbandi, A., Navidifar, T., y Talebi, M. (2022). Evaluation of brucellosis vaccines: A comprehensive review. *Frontiers in veterinary science*, 9, 925773. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.925773>
- Jacques, I., Verger, J. M., Laroucau, K., Grayon, M., Vizcaino, N., Peix, A., Cortade, F., Carreras, F. y Guilloteau, L. A. (2007). Immunological responses and protective efficacy against *Brucella melitensis* induced by bp26 and omp31 *B. melitensis* Rev.1 deletion mutants in sheep. *Vaccine*, 25(5), 794-805. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.09.051>
- Mena-Bueno, S., Poveda-Urkixo, I., Irazoki, O., Palacios, L., Cava, F., Zabalza-Baranguá, A., y Grilló, M. J. (2022). *Brucella melitensis* Wzm/Wzt System: Changes in the bacterial envelope lead to improved Rev1 Δ wzm vaccine properties. *Frontiers in microbiology*, 13, 908495. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.908495>
- Muñoz, P. M., Álvarez, R. C., Barranco, S. A., Miguel, M. J. De, Ripa, A. Z., Aranda, B. A., Bescós, M. S., Gómez, E. M., Iriarte, M., Vizcaíno, N., Moriyón, I. y Blasco, J. M. (2022). A *Brucella melitensis* H38 Δ wbkF rough mutant protects against *Brucella ovis* in rams. *Veterinary Research*, 53(16), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13567-022-01034-z>
- Muñoz, P. M., De Miguel, M. J., Grilló, M. J., Marín, C. M., Barberán, M. y Blasco, J. M. (2008). Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. *Vaccine*, 26(21), 2562-2569. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.030>
- OIE. (2018). Chapter 3.8.7: Ovine epididymitis (*Brucella ovis*). En *Office International of Epizooties, World Organisation for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. (8th ed.). World Organisation for Animal Health.
- OIE. (2022). Chapter 3.1.4: Brucellosis (Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). En *Office International of Epizooties, World Organisation for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. (8th ed.). World Organisation for Animal Health.
- Osman, A. Y., Saharee, A. A., Jesse, F. F. y Kadir, A. A. (2018). Comparative experimental study of *Brucella melitensis* and its lipopolysaccharide in mouse model infected via subcutaneous route of exposure. *Microbial Pathogenesis*, 116, 318-327. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.007>
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., ... Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*, 18(7), e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
- Pérez-Sancho, M., García-Seco, T., Arrogante, L., García, N., Martínez, I., Diez-Guerrier, A., Perales, A.,

- Goyache, J., Domínguez, L. y Álvarez, J. (2013). Development and evaluation of an IS711-based loop mediated isothermal amplification method (LAMP) for detection of *Brucella* spp. on clinical samples. *Research in Veterinary Science*, 95(2), 489-494. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.05.002>
- Piccione, G., Borruso, M., Fazio, F., Giannetto, C. y Caola, G. (2007). Physiological parameters in lambs during the first 30 days postpartum. *Small Ruminant Research*, 72(1), 57-60. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.04.002>
- Rehbinder, C., Alenius, S., Bures, J., De las Heras, M., Greko, C., Kroon, P. S. y Gutzwille, A. (2000). FELASA recommendations for the health monitoring of experimental units of calves, sheep and goats - Report of the federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Animal Health. *Laboratory Animals*, 34(4), 329-350. <https://doi.org/10.1258/002367700780387723>
- Salih-Alj Debbarh, H., Cloeckaert, A., Bézard, G., Dubray, G. y Zygmunt, M. S. (1996). Enzyme-linked immunosorbent assay with partially purified cytosoluble 28-kilodalton protein for serological differentiation between *Brucella melitensis*-infected and *B. melitensis* Rev.1-vaccinated sheep. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 3(3), 305-308. <https://doi.org/10.1128/cdli.3.3.305-308.1996>
- Zabalza-Baranguá, A., San-Román, B., Chacón-Díaz, C., De Miguel, M. J., Muñoz, P. M., Iriarte, M., Blasco, J. M. y Grilló, M. J. (2018). GFP tagging of *Brucella melitensis* Rev1 allows the identification of vaccinated sheep. *Transboundary and Emerging Diseases*, October, 1-12. <https://doi.org/10.1111/tbed.13053>
- Zabalza Baranguá, A. (2017). *Desarrollo de vacunas marcadas con GFP frente a la brucelosis ovina y tests diagnósticos asociados*. Tesis doctoral, Universidad Pública de Navarra, España.

Discusión general y conclusiones

Discusión general y trabajos futuros

La brucelosis es una zoonosis ampliamente extendida en todo el mundo que representa a día de hoy una importante amenaza a la salud pública (Libera et al., 2022), dada su incidencia en animales de ganado especialmente grave en países económicamente menos desarrollados. La estrategia preferible para lograr su control consiste en la vacunación de los animales. En pequeños rumiantes, la vacuna actualmente recomendada frente a la infección virulenta por *B. melitensis*, a saber, la cepa viva atenuada Rev1, aún presenta diversos inconvenientes (OIE, 2022) que instan a la comunidad científica a la búsqueda de otras cepas más seguras (AgResults y GALVmed, 2016). El mutante atenuado Rev1 Δ wzm, desarrollado y evaluado en la presente tesis doctoral, ha mostrado unas propiedades biológicas tanto *in vitro* como *in vivo* en modelo murino y ovino que lo sitúan en una prometedora posición para alcanzar dicho objetivo.

El candidato vacunal Rev1 Δ wzm surge como resultado de estudiar el impacto provocado por bloquear la síntesis de cada uno o los dos componentes del sistema Wzm/Wzt, impidiendo así el transporte del antígeno inmunodominante O-PS en distintas especies y cepas de *Brucella*. Para ello se construyeron mediante delección en fase los mutantes Δ wzm/ Δ wzt en Rev1 y Δ wzm en *B. abortus* S19 y 2308 y se analizaron en comparación con el mutante Δ wzm en 16M (Zabalza Baranguá, 2017).

El desarrollo de la misma mutación Δ wzm en distintas parentales confirmó la hipótesis de que el *background* condiciona las características de los mutantes derivados (Barrio et al., 2009; González et al., 2008) de un modo no predecible. En los múltiples estudios realizados se observaron diferencias entre ellos en la transcripción de genes de biosíntesis de O-PS y glucanos cíclicos periplasmáticos, susceptibilidad antibiótica y a diversos tipos de estrés, pruebas bioquímicas, cargas de membrana y composición del EPS asociado, conformación de la pared celular, susceptibilidad a factores solubles del sistema inmune, antigenicidad y, finalmente, activación de la respuesta inmune, evidenciada por unos patrones variables de multiplicación, protección y formación de anticuerpos en ratones o corderos. En particular, la resolución de la infección de Rev1 Δ wzm en el bazo de ratones BALB/c (3-4 semanas PI) resultó casi cuatro veces más rápida que la de su parental atenuada Rev1, eliminada entre 9 y 15 semanas (Grilló et al., 2012; Mancilla et al., 2013), a sus dosis óptimas. Esta persistencia fue mucho más reducida que la de su homólogo 16M Δ wzm (10-12 semanas) (Zabalza Baranguá, 2017) y proporcionalmente diferente a la del mutante S19 Δ wzm (7-9 semanas), realizado también sobre una cepa atenuada (Grilló

et al., 2012). Además, mientras que las cuatro cepas parentales provocan una esplenomegalia más o menos transitoria (Grilló et al., 2012; Zabalza Baranguá, 2017), tal efecto inmunológico solamente se encontró tras la inoculación con el mutante *Rev1Δwzm*. En relación con ello, esta cepa evidenció mediante WB y test serológicos una mayor formación en corderos de Ig anti-S-LPS y anti-R-LPS que *16MΔwzm*, las cuales participaron en la inhibición *in vitro* de *B. ovis* PA.

Con respecto a la cepa parental, además de la menor persistencia en ratón, en los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ se identificaron una serie de compensaciones y cambios pleiotrópicos derivados. La exposición de un R-LPS en la superficie bacteriana y acumulación citoplasmática de O-PS con bloqueo del bactoprenol en los mutantes *Rev1Δwzm*, *Rev1Δwzt* y *Rev1ΔwzmΔwzt* se tradujo en diferencias antigénicas con respecto a *Rev1*, observadas tanto a nivel de transcripción como en la menor reactividad anti-O-PS en WB y formación de anticuerpos detectables en las pruebas diagnósticas RB y CFT. Además, los tres mutantes exhibieron una mayor susceptibilidad a polimixinas, gluco péptidos y aminoglucósidos, a diversos tipos de estrés ambiental y a factores humorales de la respuesta inmune innata, probablemente debido a cambios en la permeabilidad de la membrana y una mayor accesibilidad a las dianas (Hancock, 1981; Martínez de Tejada et al., 1995). Efectivamente, se confirmaron modificaciones en la envuelta celular tales como diferencias de cargas y topología de OM, y remodelación de la pared con menor cantidad de PG. Estas diferencias pueden conllevar una implicación práctica que ha de ser considerada en el manejo de las bacterias como, por ejemplo, el mayor enturbiamiento del caldo de cultivo por liberación de *blebs* en los mutantes R supuso la necesidad de ajustar los inóculos de ovino a una DO_{600} más elevada ($\approx 0,225$) para conseguir la misma concentración bacteriana (10^9 UFC/mL) que con su parental S ($\approx 0,170$).

Aunque las propiedades *in vitro* de los mutantes *Rev1 Δwzm/Δwzt* fueron similares, a excepción de la sobreexpresión del componente no mutado del sistema *Wzm/Wzt* que fue detectada solamente en *Rev1Δwzm*, sí se obtuvieron diferencias *in vivo* en modelo murino. En el caso de que posteriores estudios de proteómica puedan confirmar la síntesis de cada componente del transportador en ausencia del otro y el mantenimiento de la sobreexpresión de *wzt* a nivel de proteína (Fig. 57), la mayor inmunogenicidad de esta cepa en ratones parece contribuir a reforzar el supuesto de que la proteína *Wzt* desempeña un importante papel en la estimulación de inmunidad (Wang et al., 2014). Podría suceder que el O-PS interno expuesto por los mutantes Δwzt o $\Delta wzm\Delta wzt$, al no estar potencialmente unido a la proteína *Wzt*, resultara hapténico y no tuviera la capacidad

de generar anticuerpos por sí mismo, a diferencia de la presentación antigénica que podría estar sucediendo en los mutantes Δwzm con su O-PS ligado —y quizá también incluyendo modificaciones a consecuencia del reconocimiento del residuo terminal, considerado un potencial epítipo (Duncombe et al., 2022)— a la proteína Wzt en la cara citoplasmática de la membrana interna. Tal determinación podría realizarse comprobando mediante WB si los sueros de animales inoculados con $Rev1\Delta wzt$ o $Rev1\Delta wzm\Delta wzt$ pueden desencadenar la formación del mismo nivel de anticuerpos observados con $Rev1\Delta wzm$. De hecho, este mutante mostró en modelo murino una eficacia igual a la de $Rev1$ frente a la infección virulenta por *B. melitensis* e incluso superior frente a *B. ovis*, probablemente debida a la exposición de epítopos R-LPS en su superficie; este antígeno, además, generó en corderos una respuesta detectable mediante ELISA-R/LPS mayor que la de su parental (Barrio et al., 2009). Este resultado, a falta de llevar a cabo más estudios en ovino, desmiente la afirmación de que los mutantes R no puedan alcanzar un balance de atenuación-protección superior al de las vacunas S clásicas (Blasco et al., 2016).

Si bien $Rev1\Delta wzm$ no ofreció protección cruzada frente a *B. abortus*, eficacia que tampoco proporcionaron los mutantes $S19\Delta wzm$ y $2308\Delta wzm$, resultaría interesante la aplicación de sus propiedades de atenuación y activación del sistema inmune en el desarrollo de una vacuna para ganado bovino; esta estrategia incluiría el diseño mediante técnicas moleculares de ingeniería genética de un chasis bacteriano en el que reemplazar los genes de biosíntesis de O-PS de *B. melitensis* por sus ortólogos en *B. abortus*.

Los resultados obtenidos en este trabajo cumplen el objetivo principal de encontrar un candidato vacunal eficaz en pequeños rumiantes y más seguro que $Rev1$, además de

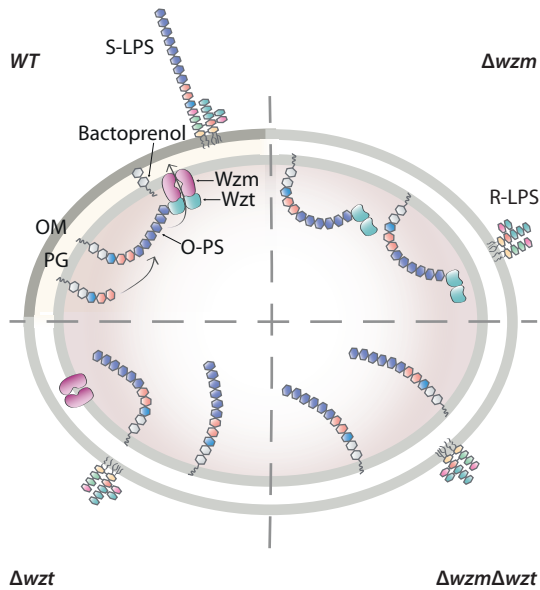


Fig. 57. Comparativa de la arquitectura bacteriana entre parental y mutantes en el sistema Wzm/Wzt. Representación gráfica de la hipótesis de la localización del O-PS y proteínas del sistema transportador en base al resultado de sobreexpresión del gen *wzt* en los mutantes Δwzm .

proporcionar una mayor comprensión del sistema Wzm/Wzt trasladable a otras bacterias gramnegativas. El candidato vacunal Rev1 Δ wzm ha demostrado solventar varios de los inconvenientes de Rev1 (Schurig et al., 2002). Es más susceptible a la estreptomycin y otros antibióticos, lo cual es particularmente relevante para el tratamiento de la enfermedad en humanos, sin contribuir a la generación de resistencias antimicrobianas (Larsson y Flach, 2021). Este hecho, junto a su gran atenuación en modelo murino y susceptibilidad a factores ambientales, sugiere que la infección en humanos con esta cepa resulte trivial. Finalmente, antes de determinar si es más segura cuando se administra en ovejas gestantes, se estudió de manera preliminar el efecto de la vacunación con Rev1 Δ wzm en animales jóvenes con el propósito de no comprometer el bienestar animal en estados fisiológicos más susceptibles. En ellos, el mutante se encontró mínimamente disperso por el organismo, restringido a las zonas circundantes a la de inoculación, y sin afección del sistema reproductor ni ganglios linfáticos asociados. Comparativamente, el mutante 16M Δ wzm, que tampoco alcanzó estos tejidos, se encontró algo más distribuido. Con ambas cepas, el porcentaje de corderos positivos en los test de RB y CFT fue muy reducido; sin embargo, la inoculación con Rev1 Δ wzm suscitó anticuerpos anti-S-LPS en un mayor número de animales que, a nivel individual, parecieron presentar títulos más altos de estos tal y como se observó mediante WB. Esta diferencia en la producción de anticuerpos podría estar relacionada con los cambios de composición y entrecruzamiento de pared celular observados entre ambos mutantes que, en el caso de 16M Δ wzm, podrían dificultar el acceso de la respuesta inmune del hospedador al O-PS citoplasmático, lo cual podría a su vez explicar la mayor persistencia de este mutante en el modelo murino. En cualquier caso, la interferencia serológica de estos mutantes con bacterias virulentas en estas pruebas oficiales anti-S-LPS (OIE, 2022) será previsiblemente mínima. No obstante, las particularidades del O-PS interno detectadas mediante WB en Rev1 Δ wzm podrían aplicarse para el desarrollo de un test específico (Adone et al., 2008; Ducrotoy et al., 2018) que permita identificar, idealmente en un único ensayo, si el animal se encuentra infectado o vacunado.

Al igual que las diferencias de atenuación *in vitro* de los mutantes se pudieron asociar con la atenuación *in vivo*, los datos de multiplicación bacteriana observados en modelo murino de infección esplénica y en modelo ovino con animales jóvenes de 3-4 meses sugieren la existencia de una relación entre ambos modelos. El patrón decreciente de persistencia de Rev1 en bazo de ratón (Grilló et al., 2012; Mancilla et al., 2013), 16M Δ wzm (Zabalza Baranguá, 2017) y Rev1 Δ wzm se correspondió con una menor distribución de Rev1 (Barrio et al., 2009; Guilloteau et al., 2006; Muñoz et al., 2008) y de cada uno de los

mutantes por el organismo de corderos; sin embargo, las diferencias de persistencia en ratón no son extrapolables a su eliminación en corderos, similar para las tres cepas. Por lo tanto, estos resultados refuerzan la afirmación de que el grado de atenuación en ratón puede predecir el nivel de colonización de tejidos en corderos (Barrio et al., 2009).

En la literatura aparecen descritos diversos ensayos que realizan el cultivo de muestras animales con varias especies de *Brucella* en medios selectivos. En particular, se ha reportado la siembra de muestras de pequeños rumiantes inoculados con cepas virulentas de *B. melitensis*, Rev1 o mutantes atenuados derivados en FM (Barrio et al., 2009; Castaño-Zubieta et al., 2021; Hensel et al., 2020; Jiménez de Bagüés et al., 1989; Kahl-McDonagh et al., 2006; Mazlan et al., 2021; Muñoz et al., 2008; Zundel et al., 1992), en FM modificado —según Verger et al., 1995— (Guilloteau et al., 2006) y en Thayer-Martin modificado —según Marín et al., 1996— (Barrio et al., 2009; Guilloteau et al., 2006; Muñoz et al., 2008). El hecho de que estos medios presenten sensibilidad variable en función de la cepa a aislar y, además, que todos ellos incluyan concentraciones elevadas de polimixinas debe ser considerado a la hora de comparar resultados independientes. De hecho, los estudios llevados a cabo en este trabajo resaltan la trascendencia de efectuar una determinación previa del crecimiento de la cepa de interés. Se comprobó que la cepa virulenta 16M y los mutantes R sufrieron una inhibición, especialmente intensa en el caso de los segundos, en los medios recomendados FM y CM (OIE, 2022) y que Rev1 proporcionó significativamente menos recuentos en FM. Como consecuencia, a falta de poner a punto un suplemento cromogénico para la identificación diferencial, en este trabajo se han desarrollado los nuevos medios selectivos BSM y BruSIC, recomendándose la aplicación conjunta de estos con CM en la siembra de muestras de campo para incrementar el aislamiento primario de brucellae.

Con todo ello los resultados de atenuación *in vitro*, eficacia en modelo murino y seguridad en corderos obtenidos en esta tesis justifican y hacen pertinente proceder a la realización de ensayos adicionales, tales como el estudio de seguridad en ovino con hembras y machos adultos, en animales gestantes y, eventualmente, la protección en el hospedador definitivo del candidato vacunal Rev1 Δ wzm.

Bibliografía

- Adone, R., Francia, M. y Ciuchini, F. (2008). Evaluation of *Brucella melitensis* B115 as rough-phenotype vaccine against *B. melitensis* and *B. ovis* infections. *Vaccine*, 26(38), 4913-4917. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.030>
- AgResults y GALVmed. (2016). *Brucellosis Vaccine Prize*. <https://brucellosisvaccine.org/>
- Barrio, M. B., Grilló, M. J., Muñoz, P. M., Jacques, I., González, D., De Miguel, M. J., Marín, C. M., Barberán, M., Letesson, J. J., Gorvel, J. P., Moriyón, I., Blasco, J. M. y Zygmunt, M. S. (2009). Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less effective than Rev 1 vaccine against *Brucella melitensis* infection of sheep. *Vaccine*, 27(11), 1741-1749. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.025>
- Blasco, J. M., Moreno, E. y Moriyón, I. (2016). Brucellosis vaccines and vaccine candidates. En *Veterinary vaccines for developing countries*. Roma: FAO (pp. 1-33).
- Castaño-Zubieta, M. R., Rossetti, C. A., García-González, D. G., Maurizio, E., Hensel, M. E., Rice-Ficht, A. C., Ficht, T. A. y Arenas-Gamboa, Á. M. (2021). Evaluation of the safety profile of the vaccine candidate *Brucella melitensis* 16MΔvjbR strain in goats. *Vaccine*, 39(3), 617-625. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.11.033>
- Ducrotoy, M. J., Muñoz, P. M., Conde-Álvarez, R., Blasco, J. M. y Moriyón, I. (2018). A systematic review of current immunological tests for the diagnosis of cattle brucellosis. *Preventive Veterinary Medicine*, 151(February 2017), 57-72. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.01.005>
- Duncombe, L., Howells, L., Haughey, A., Taylor, A. V., Kaveh, D., Erdenliğ Gürbilek, S., Dell, A., Hitchen, P. G., Haslam, S. M., Mandal, S. S., Ganesh, N. V., Bundle, D. R., & McGiven, J. (2022). The Tip of *Brucella* O-Polysaccharide is a potent epitope in response to brucellosis infection and enables short synthetic antigens to be superior diagnostic reagents. *Microorganisms*, 10(4), 708. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040708>
- González, D., Grilló, M. J., De Miguel, M. J., Ali, T., Arce-Gorvel, V., Delrue, R. M., Conde-Alvarez, R., Muñoz, P. M., López-Goñi, I., Iriarte, M., Marín, C. M., Weintraub, A., Widmalm, G., Zygmunt, M., Letesson, J. J., Gorvel, J. P., Blasco, J. M. y Moriyón, I. (2008). Brucellosis vaccines: Assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *PLoS one*, 3(7), e2760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002760>
- Grilló, M. J., Blasco, J. M., Gorvel, J., Moriyón, I. y Moreno, E. (2012). What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Veterinary Research*, 43(1), 1-35. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-29>
- Grilló, M. J., San Román Aberasturi, B., Palacios Chaves, L., Mena Bueno, S. y Zabalza Baranguá, A. (2017). *A modified Brucella vaccine strain for the treatment of brucellosis* (WO/2019/101993-

- International patent application N.º PCT/EP2018/082539).
- Guilloteau, L. A., Laroucau, K., Olivier, M., Grilló, M. J., Marín, C. M., Verger, J. M. y Blasco, J. M. (2006). Residual virulence and immunogenicity of CGV26 and CGV2631 *B. melitensis* Rev. 1 deletion mutant strains in sheep after subcutaneous or conjunctival vaccination. *Vaccine*, 24(17), 3461-3468. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.02.007>
- Hancock, R. E. (1981). Aminoglycoside uptake and mode of action - with special reference to streptomycin and gentamicin. II. Effects of aminoglycosides on cells. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 8(4), 249-276. <https://doi.org/Doi.10.1093/Jac/8.4.249>
- Hensel, M. E., Garcia-Gonzalez, D. G., Chaki, S. P., Hartwig, A., Gordy, P. W., Bowen, R., Ficht, T. A. y Arenas-Gamboa, A. M. (2020). Vaccine candidate *Brucella melitensis* 16MΔvjbR is safe in a pregnant sheep model and confers protection. *mSphere*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/msphere.00120-20>
- Jiménez de Bagüés, M. P., Marín, C. M., Barberán, M. y Blasco, J. M. (1989). Responses of ewes to *B. melitensis* Rev1 vaccine administered by subcutaneous or conjunctival routes at different stages of pregnancy. *Annales de recherches vétérinaires. Annals of veterinary research*, 20(2), 205-213.
- Kahl-McDonagh, M. M., Elzer, P. H., Hagius, S. D., Walker, J. V., Perry, Q. L., Seabury, C. M., den Hartigh, A. B., Tsolis, R. M., Adams, L. G., Davis, D. S. y Ficht, T. A. (2006). Evaluation of novel *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants for safety and efficacy in the goat model of brucellosis. *Vaccine*, 24(24), 5169-5177. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.04.005>
- Larsson, D. G. J. y Flach, C.-F. (2021). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 1. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Libera, K., Konieczny, K., Grabska, J., Szopka, W., Augustyniak, A. y Pomorska-Mól, M. (2022). Selected livestock-associated zoonoses as a growing challenge for public health. *Infectious Disease Reports*, 14(1), 63-81. <https://doi.org/10.3390/idr14010008>
- Mancilla, M., Grilló, M. J., De Miguel, M. J., López-Goñi, I., San-Román, B., Zabalza-Baranguá, A. y Moriyón, I. (2013). Deletion of the GI-2 integrase and the *wbkA* flanking transposase improves the stability of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine. *Veterinary Research*, 44(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-105>
- Marín, C. M., Jiménez de Bagüés, M. P., Barberán, M. y Blasco, J. M. (1996). Comparison of two selective media for the isolation of *Brucella melitensis* from naturally infected sheep and goats. *Veterinary Record*, 138(17), 409-411. <https://doi.org/10.1136/vr.138.17.409>
- Martínez de Tejada, G., Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E. y Moriyón, I. (1995). The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infection and Immunity*, 63(8), 3054-3061. <https://doi.org/10.1128/iai.63.8.3054-3061>
- Mazlan, M., Khairani-Bejo, S., Hamzah, H., Nasruddin, N. S., Salleh, A. y Zamri-Saad, M. (2021). Pathological

- changes, distribution and detection of *Brucella melitensis* in foetuses of experimentally-infected does. *Veterinary Quarterly*, 41(1), 36-49. <https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1867328>
- Muñoz, P. M., De Miguel, M. J., Grilló, M. J., Marín, C. M., Barberán, M. y Blasco, J. M. (2008). Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. *Vaccine*, 26(21), 2562-2569. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.030>
- OIE. (2022). Chapter 3.1.4: Brucellosis (Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). En *Office International of Epizootics, World Organisation for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. (8th ed.). World Organisation for Animal Health.
- Schurig, G. G., Sriranganathan, N. y Corbel, M. J. (2002). Brucellosis vaccines: Past, present and future. *Veterinary Microbiology*, 90(1-4), 479-496. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00255-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00255-9)
- Verger, J. M., Grayon, M., Zundel, E., Lechopier, P. y Olivier-Bernardin, V. (1995). Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against a *Brucella melitensis* experimental infection in pregnant ewes. *Vaccine*, 13(2), 191-196. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(95\)93135-V](https://doi.org/10.1016/0264-410X(95)93135-V)
- Wang, X., Yan, G. M., Zhang, R., Lang, X. L., Yang, Y. L., Li, X. Y., Chen, S., Qian, J. y Wang, X. L. (2014). Immunogenic response induced by *wzm* and *wzt* gene deletion mutants from *Brucella abortus* S19. *Molecular Medicine Reports*, 9(2), 653-658. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1810>
- Zabalza Baranguá, A. (2017). *Desarrollo de vacunas marcadas con GFP frente a la brucelosis ovina y tests diagnósticos asociados*. Tesis doctoral, Universidad Pública de Navarra, España.
- Zundel, E., Verger, J. M., Grayon, M. y Michel, R. (1992). Conjunctival vaccination of pregnant ewes and goats with *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine: Safety and serological responses. *Annales de Recherches Veterinaires*, 23(2), 177-188.

Conclusiones

1. Las cepas *Brucella melitensis* Rev1 y 16M parentales presentan diferencias transcripcionales en genes de biosíntesis del LPS (región *wbk*) y de glucanos cíclicos (genes *cgs/cgt*) entre ellas y entre sus mutantes Δwzm y/o Δwzt , que pueden conllevar cambios en la antigenicidad del O-PS y explicar, al menos en parte, las diferencias de inmunogenicidad y eficacia vacunal observadas entre los mutantes Rev1 Δwzm y Rev1 Δwzt en el modelo murino. En particular, entre cepas parentales, Rev1 presenta menor expresión que 16M de los genes *wbkA*, *wbkD*, *wbkE*, *wbkF*, *cgs* y *cgt*, además de una sobreexpresión de *gmd*; entre mutantes en el sistema Wzm/Wzt, la inactivación de *wzm* conlleva una sobreexpresión del gen *wzt* que no ocurre a la inversa en Rev1 Δwzt . Además, las delecciones Δwzm y/o Δwzt en *B. melitensis* conllevan un incremento de la expresión de *wbkB* y *wbkC*, más marcado en el gen *wbkB* de Rev1 Δwzm .
2. En esta tesis se describe por primera vez la composición del PG de *Brucella*, caracterizado en *B. melitensis* por residuos de NAcGlc y ácido NAcMur unidos por cadenas peptídicas con sustituciones de Gly. El bloqueo del sistema transportador de O-PS en los mutantes $\Delta wzm/\Delta wzt$ conlleva el secuestro de moléculas de bactoprenol ancladas a la cara citoplasmática de la membrana interna, y la consecuente remodelación la envuelta bacteriana con respecto a su parental. Además de los cambios de OM atribuibles al R-LPS, dicha remodelación ha quedado evidenciada por cambios en propiedades asociadas con la pared celular, como la susceptibilidad al estrés osmótico y a antibióticos β - y no β -lactámicos.
3. Los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ son mucho más susceptibles *in vitro* que su parental Rev1 a los antibióticos utilizados para el tratamiento de la brucelosis humana, destacando la susceptibilidad a la estreptomina. A falta de disponer de estudios *in vivo*, este aspecto supone una gran ventaja del candidato vacunal Rev1 Δwzm con respecto a Rev1, en caso de que el mutante fuera infeccioso para el ser humano.
4. La susceptibilidad de los mutantes Rev1 $\Delta wzm/\Delta wzt$ a los péptidos catiónicos y otros factores solubles del sistema inmune innato presentes en el suero ovino convencional va acompañada de una gran atenuación en el modelo murino de persistencia esplénica, mostrando total eliminación de la infección antes de 4 semanas PI; este dato contrasta con la persistencia esplénica superior a 12 semanas PI tanto de la cepa vacunal Rev1 como del mutante 16M Δwzm .

5. Rev1 Δ wzm destaca como un excelente candidato vacunal en los modelos murinos preclínicos de brucelosis experimental por inducir, a la dosis óptima, un particular balance de citoquinas asociado a una esplenomegalia transitoria que no se da en ningún otro mutante equivalente y una eficacia vacunal superior para prevenir las infecciones virulentas por *B. melitensis* y *B. ovis*.

6. Los tres mutantes Rev1 Δ wzm/ Δ wzt son altamente susceptibles a polimixinas, particularmente cuando se incuban en atmósfera con 10 % de CO₂. Estas propiedades condicionan de forma decisiva el cultivo de los mutantes en los medios selectivos FM y CM recomendados para el primo-aislamiento de *Brucella* a partir de muestras animales. De hecho, el cultivo en FM inhibe el crecimiento no sólo de los mutantes Rev1 Δ wzm y 16M Δ wzm, sino también de las cepas *B. melitensis* 16M y Rev1, *B. abortus* 2308, S19 y RB51 y *B. ovis* PA; y todas ellas, a excepción de Rev1 y *B. ovis* PA, también sufren una limitación de crecimiento en el medio CM.

7. Los antibióticos vancomicina y colistina presentes en el medio CM son responsables de la inhibición del crecimiento de Rev1 Δ wzm, mostrando una actividad sinérgica. El medio de cultivo selectivo BSM, desarrollado en esta tesis reduciendo la concentración de ambos antibióticos, resuelve dicha inhibición y la de otras cepas de *B. melitensis* a la vez que retiene la capacidad inhibitoria para los microorganismos contaminantes presentes en las muestras veterinarias.

8. Tanto CM como BSM inhiben el crecimiento de *B. abortus* bv1 por su elevada susceptibilidad a colistina cuando se utilizan placas recién preparadas; efecto inhibitorio que disminuye progresivamente durante el almacenaje de las placas, hasta desaparecer tras 4 semanas a 4 °C. El reemplazo de suero bovino por carbón activado en el nuevo medio selectivo BruSIC ha permitido solventar este problema, a la vez que se mantiene la selectividad de CM y BSM. Además, BruSIC favorece el crecimiento de *Brucella*, permitiendo acortar los tiempos de incubación y el crecimiento de cepas suero-dependientes, como *B. ovis* PA. Asimismo, la ausencia de suero bovino en BruSIC ofrece la ventaja adicional de abaratar costes, simplificar la preparación del medio y evitar el uso de compuestos de origen animal.

9. El candidato vacunal Rev1 Δ wzm es seguro, estable e inmunogénico cuando se administra en corderos. La infección por este mutante se limita al sistema linfático y se elimina antes de 8 semanas. La respuesta serológica anti-R-LPS y anti-S-LPS desencadenada por la vacunación genera una mínima interferencia en las pruebas diagnósticas recomen-

dadas para el control de la brucelosis ovina y caprina, con menos de un 17 % de animales positivos frente al S-LPS a las 3 semanas post-vacunación. Estos resultados recomiendan proseguir con la evaluación de Rev1 Δ wzm en ganado ovino adulto, especialmente para determinar la seguridad de la vacunación en ovejas gestantes.

Publicaciones

Los resultados derivados del capítulo 1 de esta tesis doctoral han sido presentados públicamente en el concurso «Tesis en 3 minutos» celebrado por el Campus Iberus en el año 2020 y como póster en el XIV Congreso Internacional de Vaccine (organizado por la editorial Elsevier). Además, los estudios de este capítulo más otros realizados en trofoblastos y en ratonas y ovejas gestantes han sido publicados en la revista científica *Frontiers in Microbiology* (último factor de impacto SCI de 6,064 e indexada en el área de Microbiología en el cuartil Q1) bajo el título *Brucella melitensis Wzm/Wzt system: Changes in the bacterial envelope lead to improved Rev1Δwzm vaccine properties* (Mena-Bueno et al., 2022; <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.908495>).

Los resultados derivados del capítulo 2 han sido presentados en el Congreso Internacional 2nd *Conference on Microbiology* de la Federation of European Microbiological Societies (FEMS) bajo la modalidad de póster y publicados en la revista científica *Microbiology Spectrum* (último factor de impacto de 9,043 e indexada en las áreas de Microbiología y Enfermedades infecciosas en el cuartil Q1) bajo el título *BruSIC: A novel selective medium for the primary isolation of Brucella in veterinary samples* (Mena-Bueno et al., 2022; <https://doi.org/10.1128/spectrum.01759-22>).

Los resultados derivados del capítulo 3 más otros resultados de esta tesis no contemplados en las dos publicaciones mencionadas, junto a otra información generada en el grupo de Sanidad Animal del IdAB sobre la utilidad vacunal de los mutantes *Rev1Δwzm* y *16MΔwzm* en ganado ovino, bien han sido publicados en la revista científica *Vaccine* (último factor de impacto de 4,169 e indexada en las áreas de Inmunología y microbiología y Enfermedades infecciosas en el cuartil Q1) bajo el título *Vaccine properties of Brucella melitensis 16MΔwzm and reactivation of placental infection in pregnant sheep*. (Zabalza-Baranguá et al., 2023; <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.01.017>), bien forman parte de otro artículo científico que se encuentra actualmente en estado de redacción final.

Asimismo, parte de los resultados de esta tesis han sido objeto de redacción de la patente n.º WO/2019/101993 - PCT/EP2018/082539 titulada *A modified Brucella vaccine strain for the treatment of brucellosis*, solicitada en Europea con fecha de prioridad el

24/11/2017 y extendida a los países del Tratado de cooperación en materia de patentes (PCT). Esta patente está licenciada a la *spin-off* del CSIC Brucella GreenVac S.L.

Además, la cepa Rev1 Δ wzm es uno de los candidatos vacunales en el Brucellosis Vaccine Prize promovido por AgResults e implementado por Galvmed (<https://brucellosisvaccine.org>). Además, la cepa Rev1 Δ wzm es uno de los candidatos vacunales en el Brucellosis Vaccine Prize promovido por AgResults e implementado por Galvmed (<https://brucellosisvaccine.org>).



Brucella melitensis Wzm/Wzt System: Changes in the Bacterial Envelope Lead to Improved Rev1 Δwzm Vaccine Properties

Sara Mena-Bueno^{1,2}, Irati Poveda-Urkixo¹, Oihane Irazoki³, Leyre Palacios¹, Felipe Cava³, Ana Zabalza-Baranguá¹ and María Jesús Grilló^{1*}

¹ Animal Health Department, Instituto de Agrobiotecnología (IdAB, CSIC-Gobierno de Navarra), Pamplona, Spain, ² Agronomy, Biotechnology and Food Department, Universidad Pública de Navarra (UPNA), Pamplona, Spain, ³ Laboratory for Molecular Infection Medicine Sweden, Department of Molecular Biology, Umeå Centre for Microbial Research, Umeå University, Umeå, Sweden

OPEN ACCESS

Edited by:

Roy Martin Roop II,
East Carolina University, United States

Reviewed by:

Jerod Skyberg,
University of Missouri, United States
David O'Callaghan,
Université de Montpellier, France

*Correspondence:

María Jesús Grilló
mj.grillo@csic.es

Specialty section:

This article was submitted to
Infectious Agents and Disease,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 30 March 2022

Accepted: 26 May 2022

Published: 04 July 2022

Citation:

Mena-Bueno S, Poveda-Urkixo I,
Irazoki O, Palacios L, Cava F,
Zabalza-Baranguá A and Grilló MJ
(2022) *Brucella melitensis* Wzm/Wzt
System: Changes in the Bacterial
Envelope Lead to Improved
Rev1 Δwzm Vaccine Properties.
Front. Microbiol. 13:908495.
doi: 10.3389/fmicb.2022.908495

The lipopolysaccharide (LPS) O-polysaccharide (O-PS) is the main virulence factor in *Brucella*. After synthesis in the cytoplasmic membrane, O-PS is exported to the periplasm by the Wzm/Wzt system, where it is assembled into a LPS. This translocation also engages a bactoprenol carrier required for further biosynthesis pathways, such as cell wall biogenesis. Targeting O-PS export by blockage holds great potential for vaccine development, but little is known about the biological implications of each Wzm/Wzt moiety. To improve this knowledge and to elucidate its potential application as a vaccine, we constructed and studied *wzm/wzt* single- and double-deletion mutants, using the attenuated strain *Brucella melitensis* Rev1 as the parental strain. This allowed us to describe the composition of *Brucella* peptidoglycan for the first time. We observed that these mutants lack external O-PS yet trigger changes in genetic transcription and in phenotypic properties associated with the outer membrane and cell wall. The three mutants are highly attenuated; unexpectedly, Rev1 Δwzm also excels as an immunogenic and effective vaccine against *B. melitensis* and *Brucella ovis* in mice, revealing that low persistence is not at odds with efficacy. Rev1 Δwzm is attenuated in BeWo trophoblasts, does not infect mouse placentas, and is safe in pregnant ewes. Overall, these attributes and the minimal serological interference induced in sheep make Rev1 Δwzm a highly promising vaccine candidate.

Keywords: lipopolysaccharide, Wzm/Wzt system, Rev1 Δwzm vaccine, *Brucella* envelope, pregnant sheep, pregnant mice

INTRODUCTION

Brucellosis is one of the most relevant zoonosis worldwide and is caused by bacteria of the genus *Brucella*. These pathogens infect a wide range of domestic and wild animals. *Brucella melitensis* infects predominantly small ruminants and is also the most frequent *Brucella* species in humans in endemic regions. To date, there are no safe vaccines for humans, and antibiotic treatments are onerous with frequent relapses so that the most rational strategy is to control and eradicate animal infections (Blasco, 1997). In small ruminants, Rev1 is the only vaccine recommended (OIE, 2018). However, although

attenuated, Rev1 can be pathogenic for animals (for instance, it induces abortions in pregnant ewes; Blasco, 1997) and can infect humans (Spink et al., 1962; Blasco and Díaz, 1993). Thus, finding a safer alternative vaccine is a priority worldwide.¹ To this end, much research effort has focused on lipopolysaccharide (LPS) modifications and, more specifically, on removing the N-formyl-perosamine homopolymer O-polysaccharide (O-PS) (Zhao et al., 2018). Besides being a main virulence factor, O-PS is the immunodominant antigen in *Brucella* (Spink and Anderson, 1954), which is necessary to elicit a protective adaptive immune-response (Montaraz et al., 1986; Grilló et al., 2006b).

Pathways involved in O-PS biosynthesis have been explored as potential targets for vaccine developments (Whitfield, 1995; Schurig et al., 2002; Moriyón et al., 2004; González et al., 2008). In *Brucella*, this molecule is formed in the inner side of the cytoplasmic membrane. It is then translocated to the periplasm by an ATP-binding cassette (ABC) transport system that comprises two essential proteins, Wzt and Wzm, whereby the hydrophilic ATP-binding Wzt is coupled by a unique interface (Bi et al., 2018) to the transmembrane ring-shaped Wzm (Cuthbertson et al., 2007; Mohammad et al., 2016; Caffalette and Zimmer, 2021). This system is broadly conserved among gram-negative bacteria (Whitfield, 1995; Lerouge et al., 2001; Hug and Feldman, 2011; Caffalette et al., 2020), whereby Wzm is strongly conserved, while Wzt has a C-terminal domain (C-Wzt), with a unique structural element that determines the specificity of the O-PS transporter (Izquierdo et al., 2003; Cuthbertson et al., 2005, 2007). Truncation of *wzm/wzt* genes leads to rough (R) mutants carrying O-PS molecules unlinked to the R-LPS rather than smooth (S)-LPS; however, little is known about the effect of each component on *Brucella*. O-PS export further involves the undecaprenol pyro-phosphate (also known as bactoprenol), which is a universal lipid carrier to which sugar precursors attach to initiate O-PS synthesis and export the whole complex to the periplasm (Valvano, 2003). Once O-PS is linked to the LPS, the bactoprenol needs to be released back to the inner membrane, where it can participate other polymerization pathways, such as peptidoglycan (PG) recycling (Valvano, 2015; Vassen, 2018). Thus, we hypothesized that *wzm/wzt* truncation and blockage of the O-PS export could alter other bacterial structures and/or functions.

Most *B. melitensis* R mutants were developed from the 16M or H38 virulent strain (Godfroid et al., 2000; González et al., 2008; Wang Z. et al., 2014). However, the background of the parental strain can be crucial for the biological properties of the R derivatives (Barrio et al., 2009). In this work, we built the *wzm/wzt* single- and double-mutants from a *B. melitensis* Rev1 attenuated strain, with the objective of understanding how to increase the structural and functional impact derived from disrupting the O-PS export. For this, we analyzed transcriptional changes and features associated with envelope remodeling of Rev1 Wzm/Wzt mutants vs. 16MΔwzm (Zabalza Baranguá, 2017), using state-of-the-art techniques, including transmission electron microscopy (TEM) and ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS), as well

as *in vivo* experiments in laboratory animals (mice) and in the natural host most susceptible to *B. melitensis* infection (pregnant ewes).

RESULTS AND DISCUSSION

Deletion of *wzm* and/or *wzt* Induces *wbkB* and *wbkC* Transcriptional Upregulation, but Only Rev1Δwzm Induces a Marked *wzt* Upregulation

After assessing the expected genotypes by sequencing for the Rev1Δwzm, Rev1Δwzt, and Rev1ΔwzmΔwzt mutants (Figure 1A; Supplementary Figures 1, 2, Supplementary Table 3), we studied variations by qRT-PCR (Supplementary Table 4) for the relative expression of the genes *wzm/wzt*, *wbk*, and *wbo* O-PS biosynthesis clusters (Godfroid et al., 2000; González et al., 2008), as well as for *cgs* and *cgt*, which code for the synthesis and export to the periplasm of cyclic glucans. Of note, these sugars, together with the LPS, are envelope components involved in *Brucella* virulence (Haag et al., 2010; Guidolin et al., 2015). No transcription of *wzm* and/or *wzt* was detectable in the corresponding single- or double-deletion mutants (Figure 1B). As both genes are sequentially located in the chromosome (Godfroid et al., 2000), it is generally assumed that *wzm/wzt* mutations should cause an analogous effect and that the deletion of *wzm* would hinder *wzt* expression. Strikingly, however, Rev1Δwzm showed significant ($p < 0.001$) overexpression of *wzt*, but Rev1Δwzt showed unchanged expression of *wzm* (e.g., similar to the parental). In agreement with this, the *in silico* study revealed that the start codon of *wzt* overlaps the stop codon by one nucleotide. This overlap suggests the existence of a multiple reading frame, a feature conserved across microbial genomes and a common regulation mechanism (Johnson and Chisholm, 2004). Additionally, it has been proposed that these two genes could constitute a sole operon for other gram-negative bacteria (Rocchetta and Lam, 1997; Goldberg, 1999). Thus, it seems reasonable that a deletion upstream of *wzm* not only maintains but also alters the expression of *wzt*. In sum, we demonstrate that *wzm* deletion allows the transcription of *wzt* and causes its overexpression in Rev1Δwzm.

Additionally, the three Rev1 *wzm/wzt* mutants showed enhanced expression ($p < 0.05$) of *wbkB* and *wbkC* with respect to Rev1 (note that *wbkB* encodes an enzyme of unconfirmed function, and, *wbkC*, a formyltransferase; Godfroid et al., 2000). This finding opens the possibility of antigenic changes in the nascent O-PS, although shortening would not be expected, as no signs of repressed expression were detected. Comparatively, 16Mwzm showed not only overexpression of these three genes (e.g., *wbkB*, *wbkC*, and *wzt*) but also upregulation of *gmd* vs. the 16M parental strain, and this was not reproduced in Rev1wzm. With respect to the parental strains, Rev1 showed significant upregulation of *gmd* and downregulation of *wbkA*, *wbkD*, *wbkE*, *wbkF*, *cgs*, and *cgt* genes. Of note, *cgs* and *cgt* encode for cyclic glucans, which are involved in evading host immune response (Briones et al., 2001; Arellano-Reynoso et al., 2005;

¹<https://brucellosisvaccine.org>

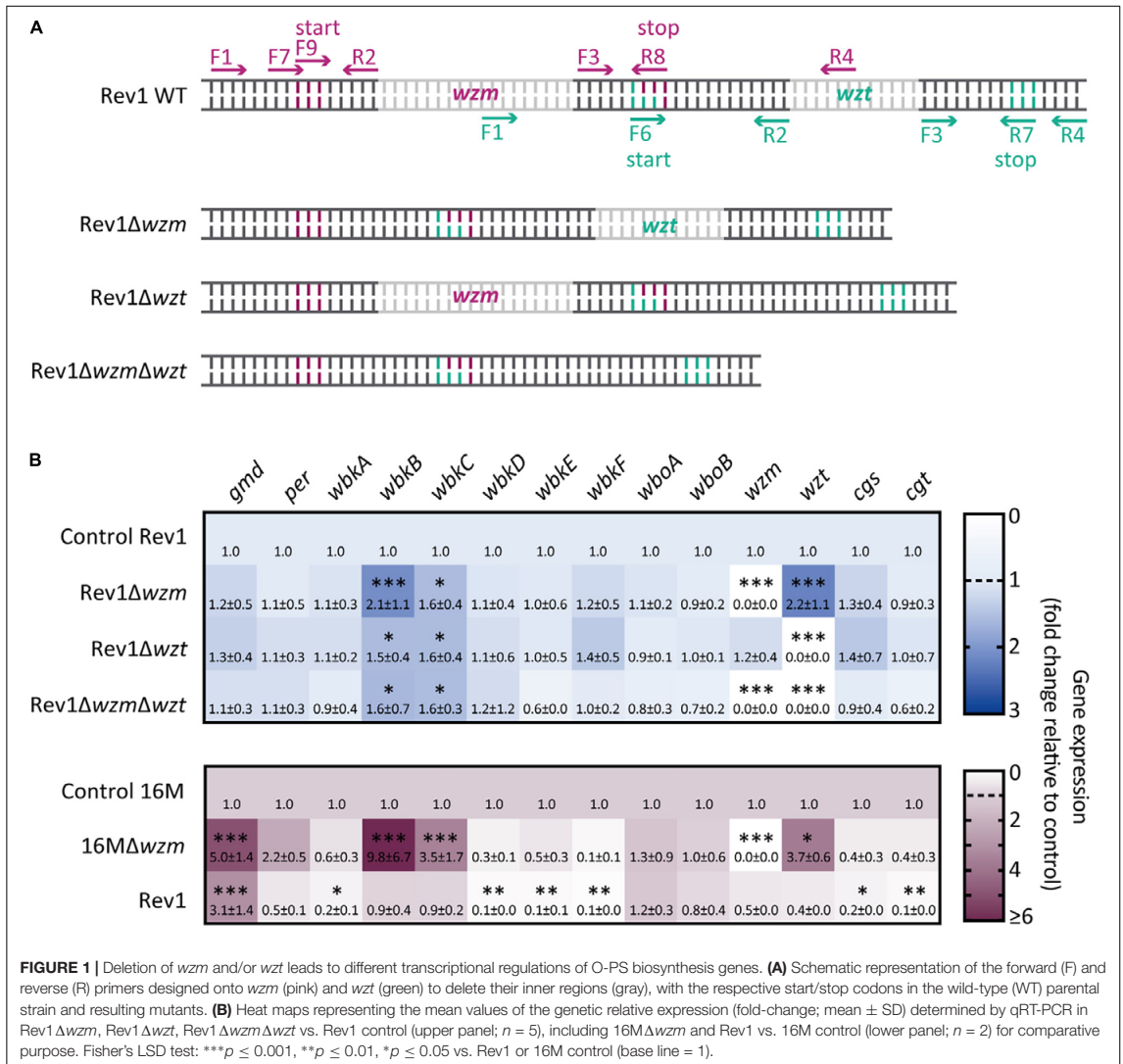


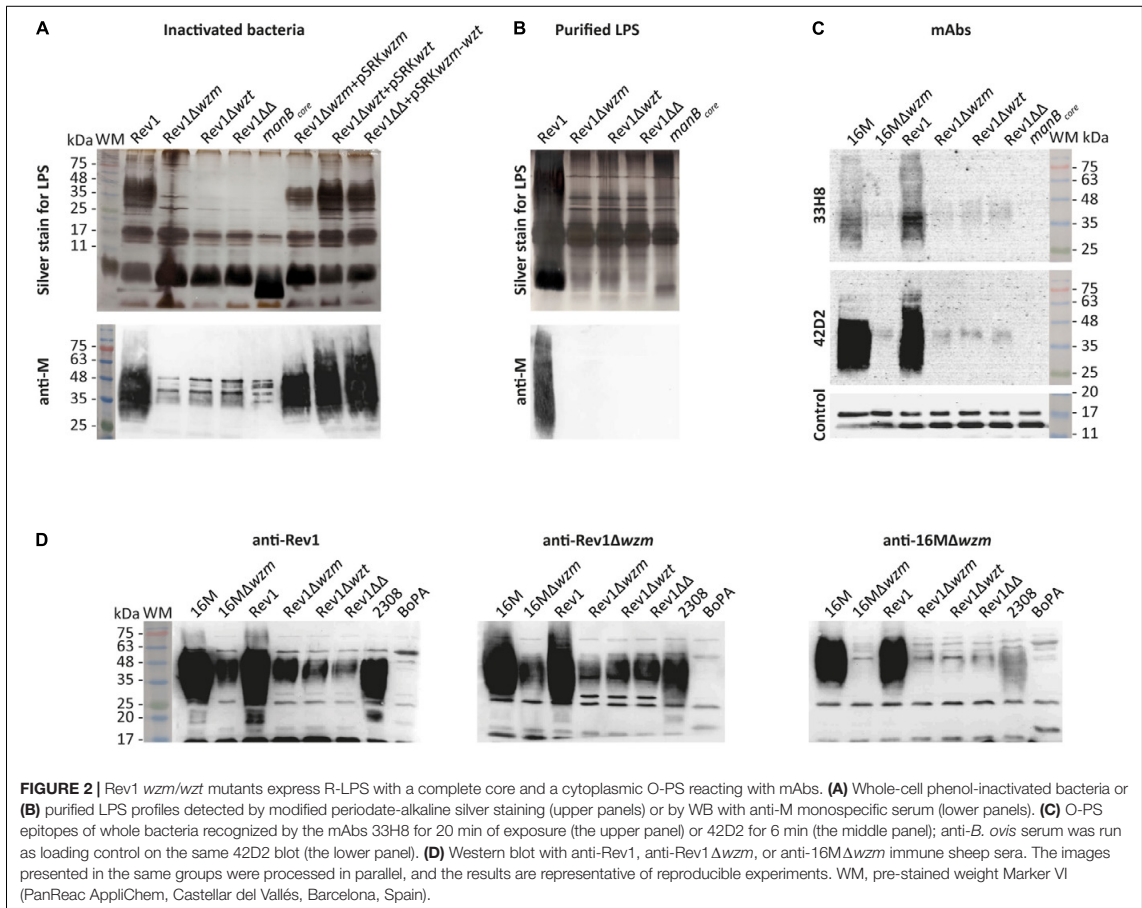
FIGURE 1 | Deletion of *wzm* and/or *wzt* leads to different transcriptional regulations of O-PS biosynthesis genes. **(A)** Schematic representation of the forward (F) and reverse (R) primers designed onto *wzm* (pink) and *wzt* (green) to delete their inner regions (gray), with the respective start/stop codons in the wild-type (WT) parental strain and resulting mutants. **(B)** Heat maps representing the mean values of the genetic relative expression (fold-change; mean \pm SD) determined by qRT-PCR in Rev1 Δwzm , Rev1 Δwzt , Rev1 $\Delta wzm\Delta wzt$ vs. Rev1 control (upper panel; $n = 5$), including 16M Δwzm and Rev1 vs. 16M control (lower panel; $n = 2$) for comparative purpose. Fisher's LSD test: *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$ vs. Rev1 or 16M control (base line = 1).

Haag et al., 2010; Roset et al., 2014), osmotic resistance (Roset et al., 2014), and oxidative and detergent pressure resistance (Mirabella et al., 2013). Thus, this result is consistent with the attenuation of Rev1.

The Cytoplasmic O-Polysaccharide of Rev1 *wzm/wzt* Mutants Shows Antigenic Features

In standard tests for *Brucella* typing (Alton et al., 1988), the three mutants showed the expected R-LPS phenotype, the typical small colonial size of Rev1 (Grilló et al., 2000) and Rev1 inhibition by penicillin G (P₅) and safranin O (Saf₁₀₀)

(Supplementary Table 5). The complete core and the presence of O-PS in *wzm/wzt* mutants were evidenced by alkaline silver staining and Western blot with anti-M monospecific serum, respectively, in whole-cell inactivated bacteria (Figure 2A). We confirmed that the O-PS was not exposed at the mutant outer membrane (OM), since it was not detected using purified LPS samples (Figure 2B), as reported for other gram-negative bacteria (Guo et al., 2017; Moosavian et al., 2020). Using an anti-M monospecific serum for Western blotting (Figure 2A) revealed a faint, smeared band at 35–48 kDa in Rev1 mutants that were absent in BmH38RmanB_{core} (control) and were very strong (25–75 kDa) in Rev1 and complemented strains. Further analysis with anti-C/Y 33H8 and 42D2mAbs showed O-PS in



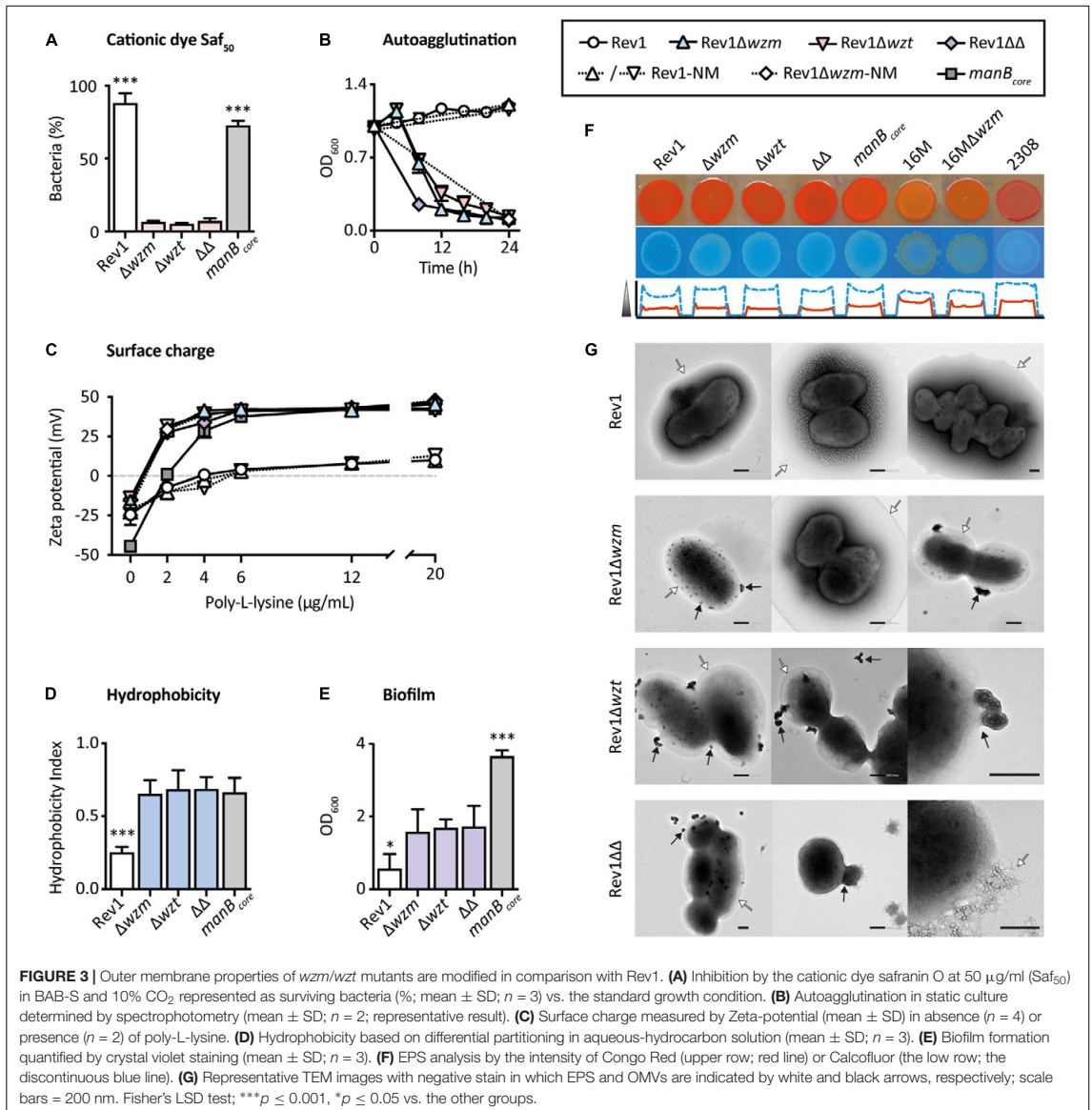
wzm/wzt mutants but at lower reactivity than in Rev1 and 16M (Figure 2C). As O-PS biosynthesis was not downregulated, differences in reactivity could be due to low amounts of O-PS in the mutants. This hypothesis is compatible with a capture of bactoprenol by the nascent non-translocated O-PS (Rocchetta and Lam, 1997), making it unavailable for further biosynthesis. Both *B. melitensis* S-LPS strains were less reactive with 33H8 than with 42D2 (which is evident even after extended exposure time), and Rev1 systematically exhibited stronger signals with 33H8 than with 16M (Figure 2C), evidencing different O-PS epitope compositions.

Rev1 mutants reacted strongly with sera from sheep infected with Rev1 Δwzm , showing a ≈ 35 –48 kDa O-PS-smear band as well as a distinct band at ≈ 29 kDa, which was also detected (faintly) by anti-Rev1 but not by anti-16M Δwzm sheep sera (Figure 2D). This 29 kDa band was absent in 16M parental and mutant strains but observed in Rev1 by a Western blot with heat-treated anti-Rev1 Δwzm serum (data not shown). This result suggests the presence of an Omp that is unlinked in Rev1 and covalently bound to PG in

16M, as reported for *Brucella abortus* Omp2b and Omp25 (Godessart et al., 2021).

Rev1 *wzm/wzt* Mutants Exhibit High Sensitivity to Antibiotics and Cationic Dyes

The presence of 10% CO₂ inhibited the growth of 16M Δwzm , as previously reported (Zabalza Baranguá, 2017), but not the growth of the Rev1 mutants. Also, the Rev1 mutants were more susceptible than Rev1 to streptomycin (Str_{2.5}), polymyxin B (Px_{B1.5}), and colistin (Col₄), with no differences between mutants (Supplementary Table 6). Regarding the susceptibility to the antibiotics of choice for treating human brucellosis (Ariza et al., 1986), the three mutants were more susceptible than Rev1 to streptomycin and rifampicin in MIC and MBC₉₀; furthermore, a synergistic effect with doxycycline was detected in a solid medium, particularly for streptomycin ($p \leq 0.001$), leading to almost complete inhibition of mutant growth (Supplementary Table 7). These results suggest that, in case of accidental human



inoculation, conventional treatment would be successful, in contrast to that reported for Rev1 (Blasco and Díaz, 1993; Grilló et al., 2006a).

The inhibition observed with Saf₁₀₀, a basic monovalent cationic dye largely adsorbed by hydrophobic surfaces (Atun et al., 1998) as described for crystal violet-oxalate (Popescu and Doyle, 1996), could represent changes in the OM and cell walls (Jankowski et al., 2005). Thus, we quantified the susceptibility of the mutants to a lower concentration of this dye (Saf₅₀), which gave only a 6% viability of mutants, in contrast to ($p \leq 0.001$) the

87.8% of Rev1 parental strains (Figure 3A). Rev1 survival could be explained by the hydrophilic hindrance of the S-LPS (Nikaido and Vaara, 1985; Godfroid et al., 2000) and/or by buffering of the free radicals generated by this dye by CO₂ (Jankowski et al., 2005). However, since BmH38R*manB*_{core} survived (72.5%) more than *wzm/wzt* mutants, safranin O susceptibility suggests that the OM undergoes a particular reorganization, resulting in more exposed lipid A and core moieties in the mutants (Vaara, 1992; Perevoshchikova et al., 2009; Clifton et al., 2016; Fontana et al., 2016).

Blocking O-Polysaccharide Transport Causes Pleiotropic Changes Associated With the Outer Membrane and Cell Wall

Lipopolysaccharide biosynthesis is generally related to other cellular components involved in bacterial integrity (Morè et al., 2019). For instance, R-LPS and O-PS deficiencies have been associated with interrelated properties, such as spontaneous autoagglutination (Caro-Hernández et al., 2007), adhesion to solid layers (Nakao et al., 2012), increased hydrophobicity,

and negative surface charge (González et al., 2008). Indeed, surface adhesion is dependent on the bacterial charge and the hydrophobic nature of the substrate, e.g., polystyrene (Fletcher and Loeb, 1979). Accordingly, these properties were found in the three mutants (Figures 3B–E).

Extracellular polymeric substances (EPS) are heterogeneous components typical of biofilm and stain differently by Congo Red or by Calcofluor (Wood, 1980). We found that both dyes bound moderately to Rev1 and its mutants, but only minimally to 16M and 16M Δwzm (Figure 3F); these differences seem to be

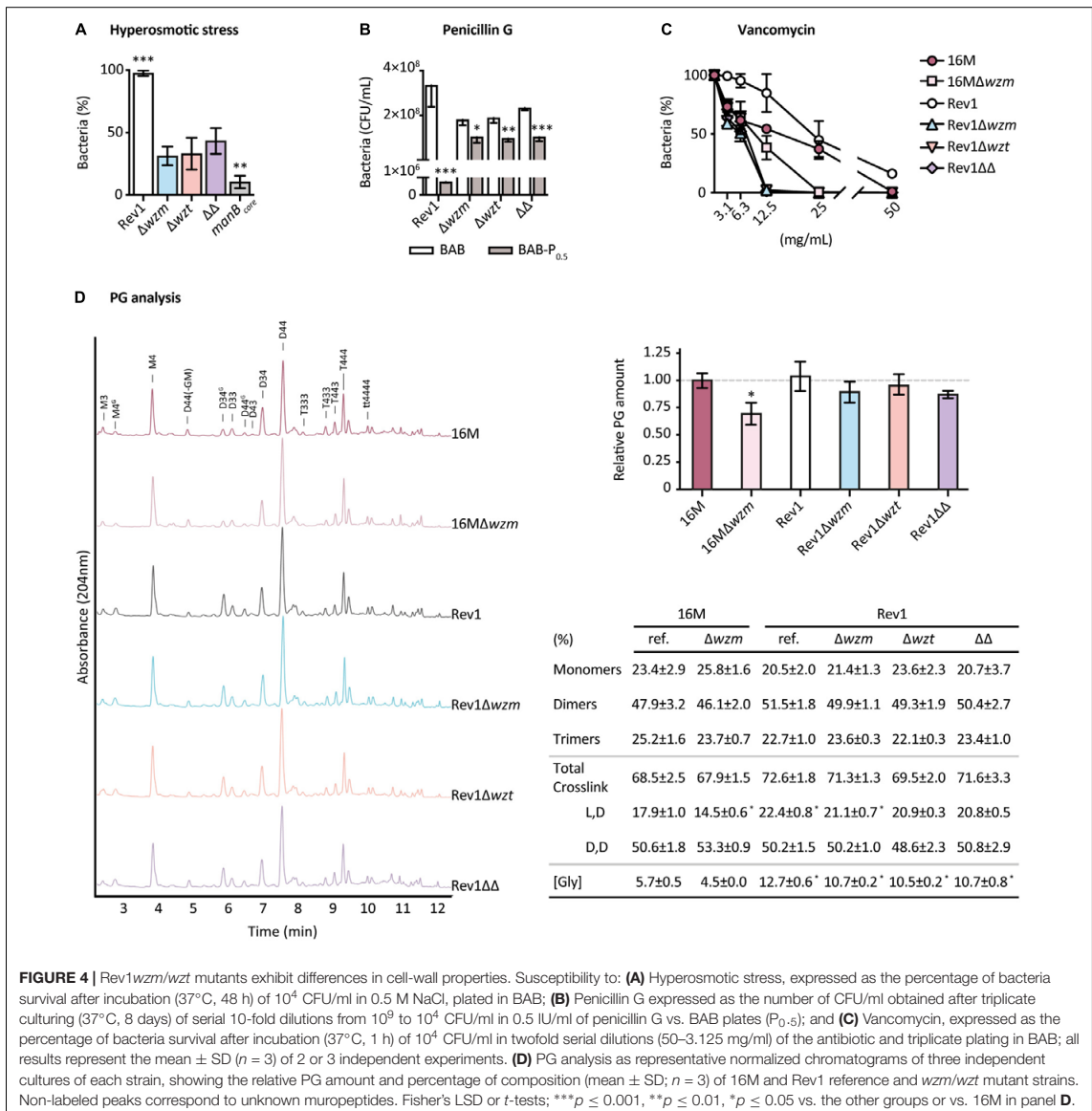


FIGURE 4 | Rev1wzm/wzt mutants exhibit differences in cell-wall properties. Susceptibility to: **(A)** Hyperosmotic stress, expressed as the percentage of bacteria survival after incubation (37°C, 48 h) of 10⁴ CFU/ml in 0.5 M NaCl, plated in BAB; **(B)** Penicillin G expressed as the number of CFU/ml obtained after triplicate culturing (37°C, 8 days) of serial 10-fold dilutions from 10⁹ to 10⁴ CFU/ml in 0.5 IU/ml of penicillin G vs. BAB plates (P_{0.5}); and **(C)** Vancomycin, expressed as the percentage of bacteria survival after incubation (37°C, 1 h) of 10⁴ CFU/ml in twofold serial dilutions (50–3.125 mg/ml) of the antibiotic and triplicate plating in BAB; all results represent the mean ± SD (*n* = 3) of 2 or 3 independent experiments. **(D)** PG analysis as representative normalized chromatograms of three independent cultures of each strain, showing the relative PG amount and percentage of composition (mean ± SD; *n* = 3) of 16M and Rev1 reference and wzm/wzt mutant strains. Non-labeled peaks correspond to unknown mucopeptides. Fisher's LSD or *t*-tests; ****p* ≤ 0.001, ***p* ≤ 0.01, **p* ≤ 0.05 vs. the other groups or vs. 16M in panel D.

associated with the nature of the parental strain, as revealed by BmH38RmanB_{core} and *B. abortus*2308 controls, and have been previously related to host preference and virulence (Uzureau et al., 2007). Although the acquisition of fine images of the native EPS is a major challenge due to its low contrast and tendency to collapse (Dohnalkova et al., 2011), we successfully detected the presence of EPS in Rev1 and its mutants by transmission electron microscopy (TEM), which revealed it to be a globular structure surrounding both fibrous and hydrated shapes (Figure 3G).

Other interesting structures promoting adhesiveness to solid surfaces in *Brucella* are the OM vesicles (OMVs), commonly called blebs (Godefroid et al., 2010). Blebs are nanovesicles released from the OM whose composition (Gamazo and Moriyón, 1987; Avila-Calderón et al., 2020; Ruiz-Palma et al., 2021) and amount (Solanki et al., 2021) have been associated with the lack of O-PS, and they are overproduced in strains that auto-agglutinate (Godefroid et al., 2010). As shown by TEM (Figure 3G), the mutants showed abundant OMVs as outward bulges protruding from the surface or as already detached vesicles, while the OM maintained its integrity. In stark contrast, we did not find even a single OMV in Rev1. These structural changes could indicate a rearrangement of cell envelope components.

The OM and the cell wall are covalently linked (Godessart et al., 2021), and their consistency is directly responsible for bacterial osmotic protection (Morè et al., 2019). In our studies, all strains grew well in sucrose hyperosmotic and hypoosmotic conditions; however, fewer than 50% of *wzm/wzt* mutants, and 10% of BmH38RmanB_{core} survived in a hyperosmotic 5-M NaCl medium, while the growth of Rev1 was unaltered (Figure 4A), highlighting the importance of the selected osmolyte to be used (Cheung et al., 2009; Shabala et al., 2009; Pilizota and Shaevitz, 2013; Schuster et al., 2020). Even though EPS is involved in protecting against osmotic stress and antimicrobials (Dohnalkova et al., 2011), its presence did not mitigate NaCl stress in Rev1 *wzm/wzt* mutants.

Susceptibility to penicillin G can provide information about cell wall rearrangements, since this β -lactam targets the penicillin-binding proteins (PBPs) involved in PG assembly (Kohanski et al., 2010), leading to the inhibition of PG transpeptidation and subsequent cell-wall destabilization (Wolter and Lister, 2013). We observed a total inhibition at P₅ of 10⁹ CFU/ml for Rev1 as well as for its derivatives (Supplementary Table 5). Thus, we next sought to determine whether using lower concentrations could detect differences between Rev1 and its derivatives. All strains were significantly inhibited in a solid medium at P_{0.5}, but, surprisingly, the mutants were less inhibited than Rev1 (Figure 4B) and also showed higher MBC₉₀ (0.84 vs. 42 IU/ml). As target modification is relatively unlikely, the increased resistance of mutants could be due: (i) to PBP being shielded—by its own substrate (Lepage et al., 1995) and/or by other cell products or structures (Livermore, 1987); or (ii) to reduced PBP activity, leading to PG remodeling (Peters et al., 2018; Morè et al., 2019). To further elucidate the PG structure, we studied the susceptibility of the mutants to vancomycin, a non- β -lactam glycopeptide that hinders PG assembly by blocking its precursors (Kohanski et al., 2010). Rev1

wzm/wzt mutants were more susceptible than the parental Rev1, showing total inhibition at 12.5 mg/ml (Figure 4C); this could indicate changes in the amount and/or composition of the PG that, in absence of the S-LPS building machinery in the periplasm, could facilitate vancomycin activity.

We therefore analyzed the PG of *B. melitensis* 16M and Rev1 and their derivatives by UPLC-MS (Figure 4D). For PG quantification, Rev1 *wzm/wzt* mutants presented lower amounts of PG (10–15% less) than the parental lines; reduction was even more remarkable (30%) for 16M Δwzm vs. 16 M, in line with previous studies (Kreutzer et al., 1977). The fact that these mutants showed decreased PG confirms the hypothesis that truncating the Wzm/Wzt system impairs cell wall biogenesis, presumably due to sequestering the complex bactoprenol–O-PS when the transport is blocked. Furthermore, it would explain the higher susceptibility of the mutants to vancomycin. For the PG structure, we report for the first time the basic PG building block in *B. melitensis*, consisting of GlcNAc–MurNAc–L-Ala–D-Glu–mDAP–D-Ala–D-Ala, which is similar to that of other gram-negative bacteria (Vassen, 2018). *B. melitensis* PG included the presence of glycine (Gly) rather than Ala at Position 4 of the stem in a relatively small percentage of the mucopeptides. For PG composition, we observed significant differences ($p \leq 0.05$) between Rev1 and 16M parentals, as well as a general increase of L,D-crosslink and Gly in Rev1, suggesting a more active incorporation of glycine by L,D-transpeptidases (Ldts) than in 16M. Interestingly, 16M Δwzm had a significant reduction ($p \leq 0.05$) of the L,D-crosslink vs. 16M, a trend also observed for Rev1 *wzm/wzt* mutants vs. Rev1. These compensations underscore the essential, versatile, and functional coupling of LPS, OM, and cell wall biosynthesis, and strongly suggest that a block of O-PS transport causes pleiotropic effects on *Brucella*.

Rev1 *wzm/wzt* Mutants Are Highly Attenuated in BALB/c Mice, Highlighting the Immunity Induced by Rev1 Δwzm

Resistance of virulent *Brucella* to soluble factors of the host immune system is essential for their survival *in vivo*. We therefore used *in vitro* models of susceptibility to polymyxins as antimicrobial cationic polypeptides, targeting the LPS phosphate groups (Martínez de Tejada et al., 1995), as well as to normal sheep serum as a source of complement. As previously reported (Stranahan and Arenas-Gamboa, 2021), R-LPS mutants were highly inhibited by PxB, Col, and serum complements (Figures 5A,B). Moreover, sera from Rev1 Δwzm -immunized sheep showed a marked killing effect on *Brucella ovis* rather than on *B. melitensis* (Figure 5C), a finding that could be explained by the natural absence of O-PS in *B. ovis* that makes their OM proteins more readily accessible to antibodies (Monreal et al., 2003).

In the BALB/c mice, the three mutants evidenced extreme attenuation. The vaccinated mice had high levels of spleen colonization at 1 week post-inoculation (PI) but were completely cleared of the mutants by 3–4 weeks (Figure 5D), in contrast to the longer persistence of Rev1 (Supplementary Figure 1). Furthermore, we reproducibly observed a peak

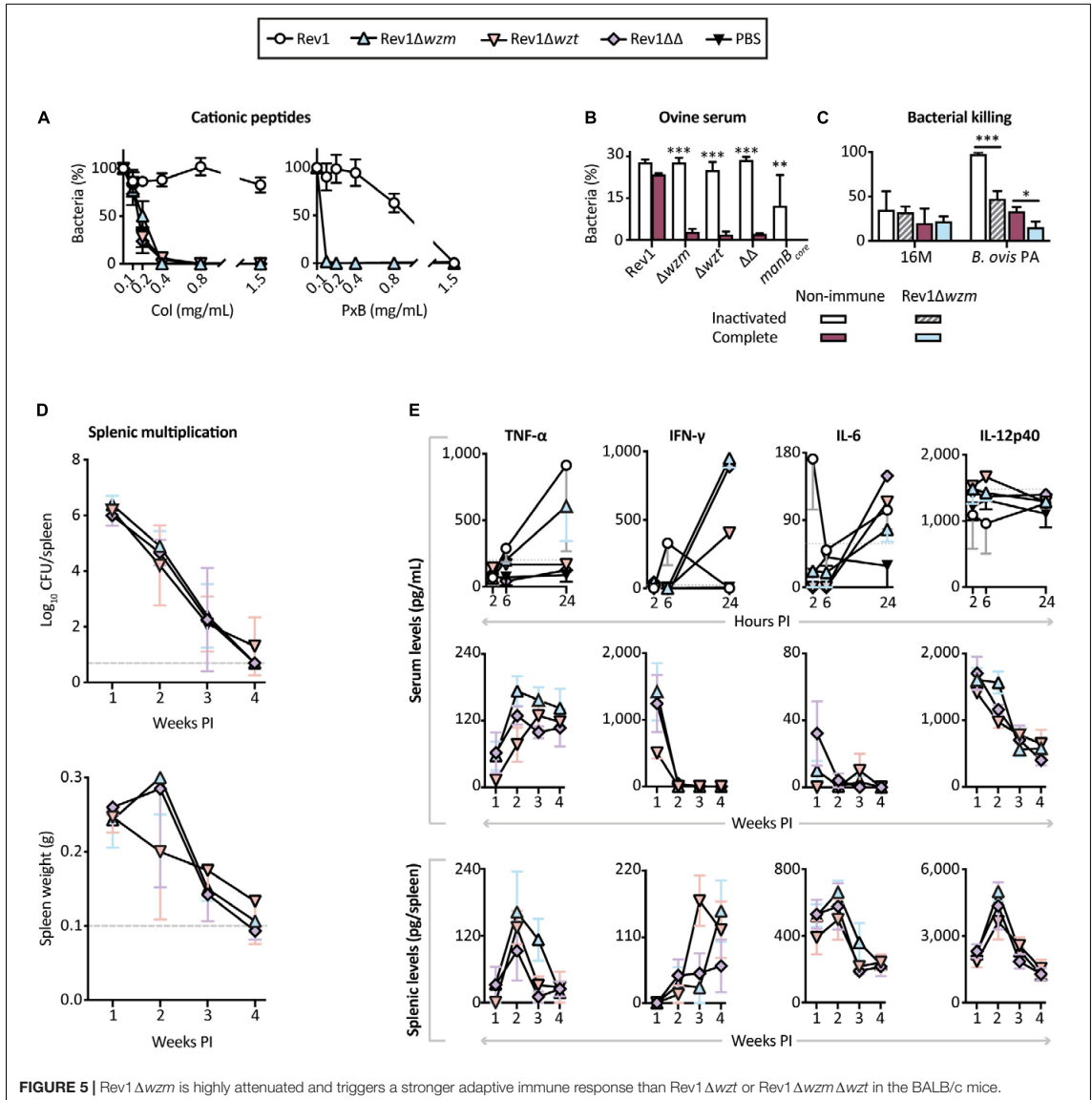


FIGURE 5 | Rev1 Δwzm is highly attenuated and triggers a stronger adaptive immune response than Rev1 Δwzt or Rev1 $\Delta wzm \Delta wzt$ in the BALB/c mice. Susceptibility is shown for: **(A)** Polymyxin B (PxB) or colistin (Col), as models of cationic bactericidal peptides of the innate immune system (mean \pm SD; $n = 2$); and **(B)** complement-mediated killing by conventional non-immune ovine serum, either complement complete or heat inactivated (mean \pm SD; $n = 2$). **(C)** Bacterial killing activity of sera from sheep immunized with Rev1 Δwzm against *B. melitensis* 16M and *B. ovis* PA (BoPA) virulent strains (mean \pm SD; $n = 4$). **(D)** Kinetics of spleen infections and weights (mean \pm SD; $n = 3$ at 1 and 4 weeks PI, $n = 4$ at 2 and 3 weeks PI) of the BALB/c mice inoculated IP with 10^8 CFU/mouse of the correspondent mutant; the dashed lines indicate the detection limit (\log_{10} 5 CFU/spleen = 0.70) and normal splenic weight (0.1 g) in the BALB/c mice. **(E)** Cytokine profiles in blood sera and splenocytes supernatants from the same mice at selected intervals; sera collected at 2, 6, and 24 h PI ($n = 5$) were processed as pools, including two independent experiments for Rev1 Δwzm , Rev1, and PBS groups; dotted lines represent PBS's maximum value; blood sera and splenocytes supernatants collected at 1, 2, 3, and 4 weeks PI were processed individually for each necropsied group (mean \pm SEM). Fisher's LSD test; *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$ immune vs. non-immune sera for a given strain.

of splenomegaly at 2 weeks PI in the mice vaccinated with Rev1 Δwzm , a less pronounced peak in the mice vaccinated with Rev1 $\Delta wzm \Delta wzt$, and no peak in those vaccinated

with Rev1 Δwzt (Supplementary Figure 1). This inflammatory response could be associated with an enhanced adaptive immune response mediated by cytokines, which are crucial in protective

immunity against *Brucella* (Grilló et al., 2012; Sancho et al., 2014). We next analyzed cytokine production in both blood and spleen supernatants at early (≤ 24 h) and late (≤ 4 weeks) PI intervals (Figure 5E). Notably, the Rev1Δwzm mice displayed high serum levels of circulating TNF- α and IFN- γ at 24 h PI, and of TNF- α and IL-12 at 2 weeks PI; likewise, the peak of splenomegaly at 2 weeks PI correlated with high levels of proinflammatory TNF- α , IL-6, and IL-12 in these spleens, and a peak of IFN- γ at 4 weeks PI, which was delayed with respect to that described for Rev1 (Sancho et al., 2014). This cytokine relation triggered by Rev1Δwzm plays a critical role in limiting intracellular replication and quick clearance of the mutant as well as in triggering a protective Th1 immune response (Baldwin and Goenka, 2006; Dorneles et al., 2015; Jain-Gupta et al., 2019). Thus, we demonstrate that Rev1Δwzm does not require long-lasting persistence to induce protective immunity, in contrast to what is generally accepted for *Brucella*, where Rev1 immunogenicity is dependent on its persistence in mice spleens (Bosserey and Plommet, 1990; Grilló et al., 2000; Moriyón et al., 2004; Barrio et al., 2009; OIE, 2018).

Rev1Δwzm Is as Effective as Rev1 Against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis* in BALB/c Mice

On the basis of its immunogenicity, we studied whether the splenomegaly induced by Rev1Δwzm and the subsequent adaptive immune responses were dose dependent (Supplementary Figure 1). Immunization with 10^6 to 10^8 CFU/mouse of Rev1Δwzm induced equivalent spleen infections, but only 10^8 CFU achieved a homogeneous intragroup infection and splenomegaly, similar to that induced by Rev1 in standard conditions. This confirmed that the immune response to Rev1Δwzm was dose dependent.

Efficacy studies on mice use intraperitoneal (IP) or subcutaneous (SC) vaccinations as screening or more exigent models for R-*Brucella* strains, using Rev1 in standard conditions and PBS as efficacy and non-vaccinated controls, respectively (González et al., 2008). Accordingly, we used both routes to evaluate Rev1 wzm/wzt mutants in the BALB/c mice. Against a *B. melitensis* H38 (S-LPS) challenge, Rev1Δwzm was as protective as Rev1, while Rev1Δwzt failed by the SC route and Rev1ΔwzmΔwzt induced heterogeneous responses (Figure 6A). Against a *B. ovis* PA (R-LPS) challenge, Rev1Δwzm administered *via* SC was also as effective as Rev1, and IP improved the protection conferred by the standard Rev1 vaccine control (Figure 6B).

Differences in the immunogenic properties of Rev1 wzm/wzt mutants could be attributable to a differential presence of Wzm or Wzt, supporting the hypothesis that Wzt has a crucial role in conferring immunity (Wang et al., 2014b). Indeed, we detected wzt overexpressed in Rev1Δwzm. Although the overlap of the start/stop codons could lead to a coupled translation of both proteins, an increase at the translational level could be relevant to O-PS antigenicity. Since Wzt is incorporated into the cytoplasm when Wzm is missing (Singh et al., 2013; Mohammad et al., 2016), the accumulation of nascent O-PS

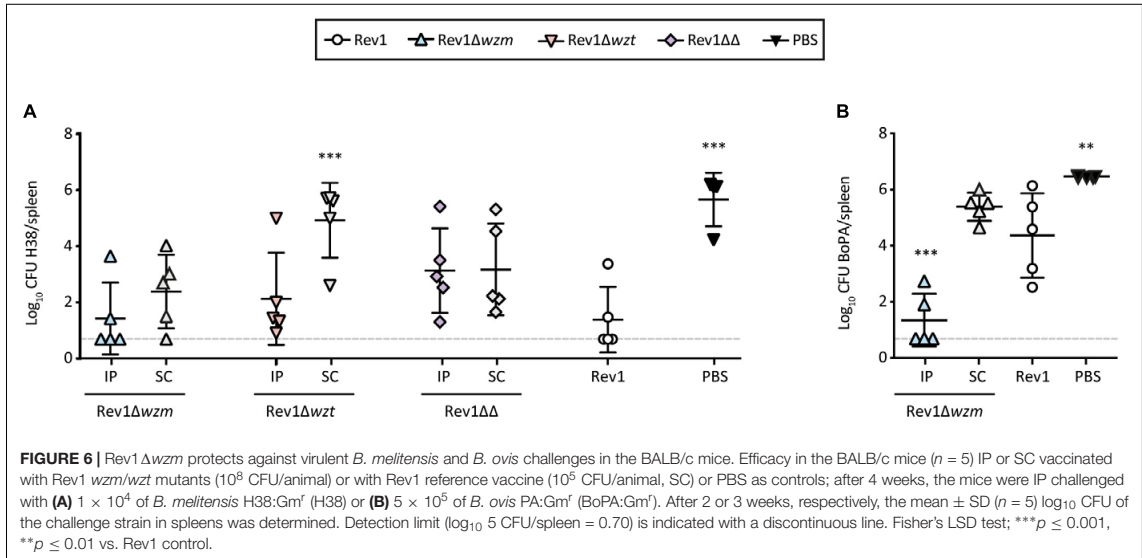
molecules in Rev1Δwzm, presumably attached to the cytoplasmic membrane by the lipid carrier, might have positive feedback on Wzt molecules. Additionally, as Wzt is responsible for O-PS terminal recognition (Valvano, 2003, 2015; Clarke et al., 2004; Cuthbertson et al., 2005, 2007; Hagelueken et al., 2015; Williams et al., 2017; Bi and Zimmer, 2020), its binding to the O-PS could be necessary to provide the antigen with its final conformation and thus with its immunogenic properties.

Rev1Δwzm Has a Similar Growth Pattern as Rev1 and Is Stable After *in vitro* and *in vivo* Subculturing

Having selected Rev1Δwzm as a promising vaccine candidate, we sought possible *in vitro* defects that could affect the bacterial viability and/or scale-up production properties. We determined that Rev1Δwzm resembled the growth curve of Rev1 yet provided higher turbidity and larger particle size (Figures 7A,B), probably due to the presence of OMVs protruding from the mutant, as evidenced by TEM (Figure 3G). Additionally, Rev1Δwzm had a similar susceptibility as Rev1 to desiccation, detergents, oxidative stress, and acidic environment (Figures 7C–F), as well as to lyophilization. These environmental susceptibilities of Rev1 (which have not previously been reported) and its mutant agreed with the detected downregulation of cyclic glucan genes as compared to the virulent strain 16M (Figure 1B). Furthermore, we detected unaltered genotypical [wzm deletion and GI-2/wbk regions integrity (Mancilla et al., 2013)] and phenotypical (including inner O-PS production) features after 20 *in vitro* passages as well as after 5 consecutive passages in mice spleens. In contrast, Rev1 viability was significantly reduced after 15 *in vitro* passages, supporting the recommendation of minimizing *in vitro* propagation for quality control (Grilló et al., 2012). These described results (data not shown) suggested that Rev1Δwzm is not likely to have antigenic drift.

Rev1Δwzm Is Attenuated in BeWo Cells and Safe in Pregnant Mice

Brucella infection, including Rev1 (Jiménez de Bagüés et al., 1989), targets the reproductive tract, starting in trophoblast giant cells, disseminating to placenta and fetuses and ending in spontaneous abortion. As preclinical models, we studied the ability of Rev1Δwzm to infect BeWo cells (a trophoblast-derived, choriocarcinoma cell line) and mouse placentas/fetuses as compared to the ability of Rev1. In BeWo cells, Rev1Δwzm was more adherent but was internalized less efficiently after adherence and replicated less than Rev1 (Figure 8A). In turn, Rev1Δwzm was not found in mouse placentas/fetuses, even after inoculation at a 10-fold higher dose than Rev1, although both strains resulted in similar spleen infections (Figure 8B). Histologically, Rev1Δwzm enabled normal placentas with minimal neutrophilic infiltration and normal fetus viability, differing from Rev1 by its marked macroscopic edema, destruction of placental epithelium, and leukocyte infiltration in yolk sac. This mouse model has been successfully used as screening of pathogenicity (Grilló et al., 2012; Poveda-Urkixo et al., 2022), indicating that Rev1Δwzm might be safer than



Rev1 in pregnant animals and justifying further experiments in the natural host.

Rev1 Δwzm Is Safe in Pregnant Ewes and Their Offsprings, and Induces Minimal Serological Interference

All ewes vaccinated with a high dose of Rev1 Δwzm at mid-pregnancy ($n = 6$) showed normal clinical parameters, mild and transient local reactions at the inoculation site, with no shedding the mutant through vagina or milk, during pregnancy or lactation, and had normal parturitions at 144 ± 3.3 days of pregnancy. Likewise, at necropsy, the mutant was not found in any ewe or offspring. These results contrasted with those reported for Rev1 (i.e., shedding by vagina during pregnancy, bacteria in placentas at parturition and in milk, placental necrosis, abortions, and vertical transmission to lambs) (Jiménez de Bagüés et al., 1989; Blasco, 1997; Hensel et al., 2020).

Serologically, all ewes reacted in ELISA-R/LPS after vaccination and turned negative before 8 weeks PI; a 66.7% also reacted in RBT (16.7% CFT positive), a percentage that decreased progressively until turning all ewes negative before 5 weeks PI (Figure 8C). These reactions were significantly less interferent than those reported for Rev1 (Barrio et al., 2009).

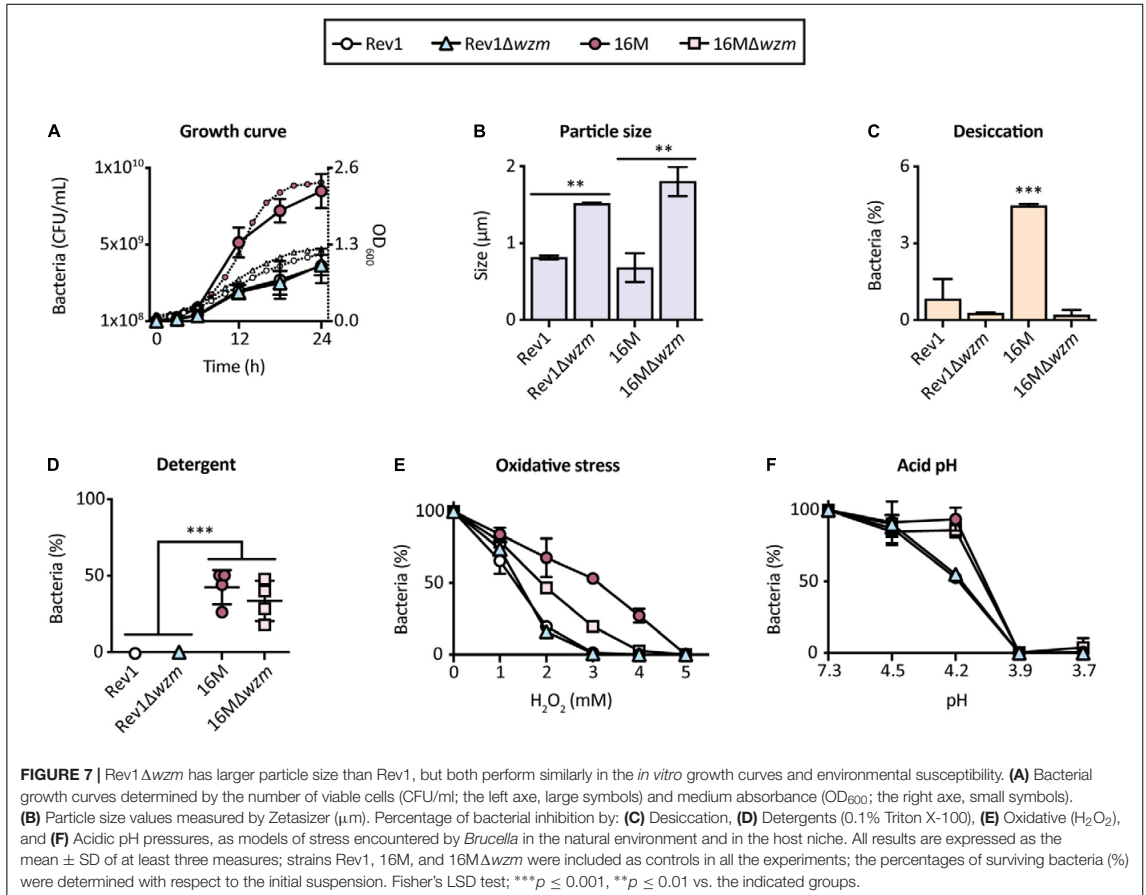
The Impact of the Rev1 Background on Rev1 Δwzm Vaccine Properties Was Unpredictable

It is commonly assumed that vaccine candidates should retain some residual virulence to be efficient (Grilló et al., 2000). Indeed, just those 16M wzm mutants that show an attenuation pattern similar to Rev1 are as protective as Rev1 against a *B. melitensis* virulent challenge (Zabalza Baranguá, 2017), while 16M Δwzt is

less persistent and less protective than Rev1 (Wang Z. et al., 2014). On this basis, the high attenuation of Rev1 Δwzm (but not Rev1 Δwzt) triggered a splenomegaly associated with a particular Th1 cytokine balance, as well as to a protective efficacy against virulent challenges. Besides the genetic and phenotypic divergences described between the Rev1 and 16M parentals related to virulence attenuation (Issa and Ashhab, 2016; Salmon-Divon et al., 2018, 2019; Kornspan et al., 2020), we have now described additional differences in genetic transcription, antigenicity evidenced by Western blot, and susceptibility to antibiotics and environmental stress factors. Indeed, when wzm/wzt mutations were applied to other brucellae (Wang et al., 2014a; Grilló et al., 2017; Aragón-Aranda et al., 2020; Lalsiamthara et al., 2020), neither mutant was as immunogenic as Rev1 Δwzm . All these findings demonstrate the relevance of the background in vaccine properties, as well as the unpredictable efficacy results obtained with Rev1 Δwzm .

CONCLUSION

The Wzm/Wzt system is broadly conserved among gram-negative bacteria, and its inactivation in Rev1 not only restrains the export, quantity, and availability of O-PS but also triggers phenotypic changes of the OM and cell wall. Despite similarities *in vitro*, deletion of Wzm or Wzt transporter moieties elicited different immune responses and efficacies against *Brucella*-virulent infections. Indeed, Rev1 Δwzm displays superior vaccine properties: attenuation, immunogenicity, efficacy against a virulent infection in mice, safety in pregnant mice, high susceptibility to diverse stresses and antimicrobials, and safety and minimal serological interference in pregnant ewes. These results (summarized in Supplementary Figure 2) thus highlight



a new concept that is essential in vaccine development, i.e., that a low persistence is not at odds with efficacy.

MATERIALS AND METHODS

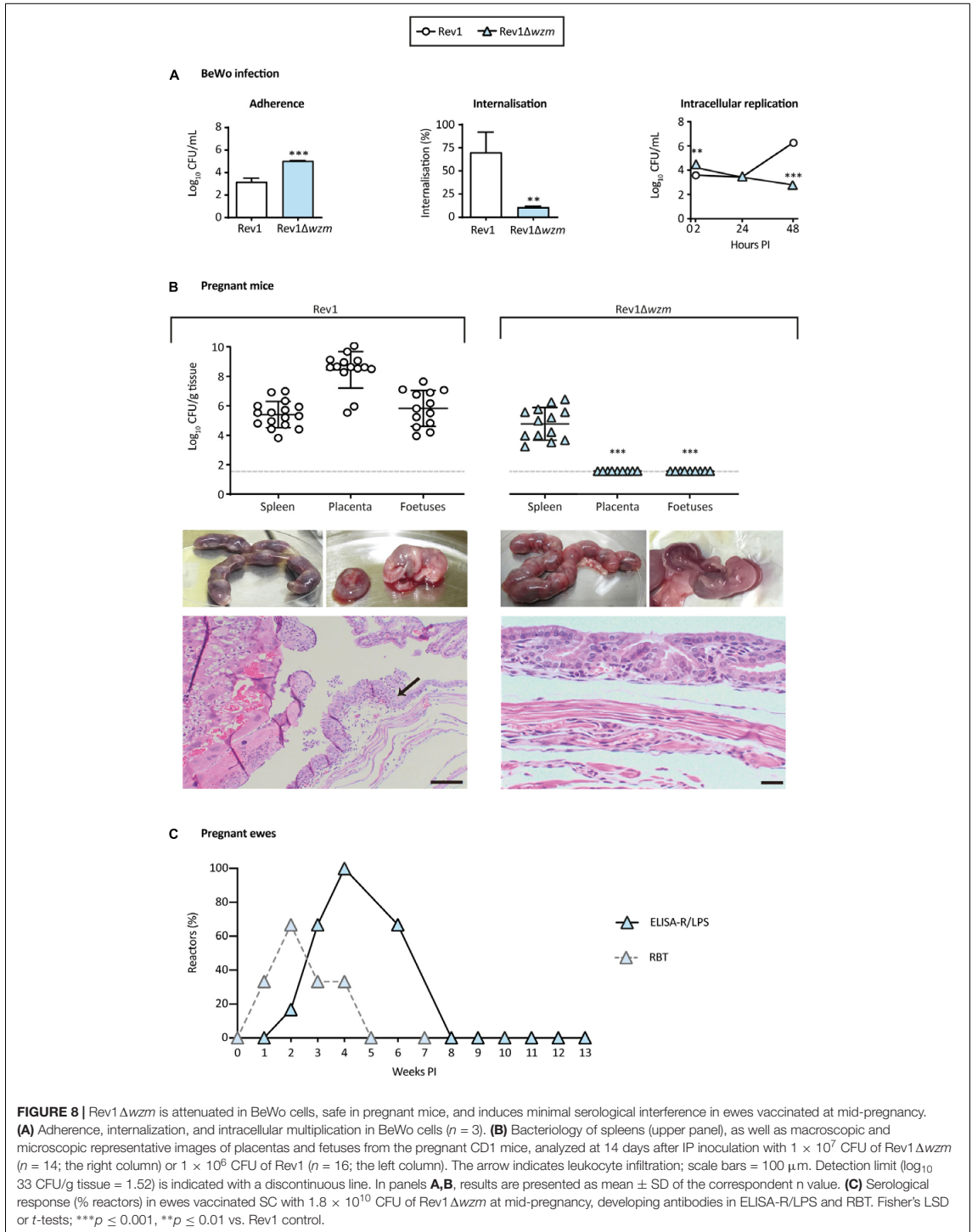
Strains and Culture Conditions

Bacterial strains (**Supplementary Table 1**) were stored at -20°C in 10% skimmed milk with 3% lactose (PanReac AppliChem, Castellar del Vallés, Barcelona, Spain) and routinely cultured at 37°C in normal atmosphere (air), using Trypticase Soy Broth (TSB; Condalab) at 150 rpm, or in plates of TSB supplemented with 1.5% bacteriological agar (TSA; Pronadisa) for *Escherichia coli* strains, or Blood Agar Base No. 2 (BAB; Oxoid) for *Brucella* spp., either plain or supplemented with 5% newborn calf serum (S; Gibco), 5% sucrose (Suc₅; VWR Chemicals, Radnor, PA, United States), and/or antibiotics (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, United States), such as kanamycin (50 μg/ml; Km₅₀), polymyxin B (1.5 μg/ml; PxB_{1.5}), colistin (4 μg/ml; Col₄), gentamycin (15 μg/ml; Gm₁₅), streptomycin

(2.5 μg/ml; Str_{2.5}), doxycycline (0.02 μg/ml; Dx_{0.02}), rifampicin (0.4 μg/ml; Rf_{0.4}), and penicillin G at (5 IU/ml; P₅) or (0.5 IU/ml; P_{0.5}), as needed. Suspensions were adjusted by spectrophotometry (SmartSpec Plus; Bio-Rad, Hercules, CA, United States) in sterile TSB or PBS (pH, 7.2; VWR Chemicals, Radnor, PA, United States), as described elsewhere (González et al., 2008). The exact number of viable counts was determined retrospectively by serial dilutions in PBS and plating (0.1 ml, done in triplicate).

Sequence Analysis and DNA Manipulation

In silico studies were performed with BLAST (Altschul et al., 1990), NCBI (Sayers et al., 2022), and KEGG (Kanehisa and Goto, 2000) databases. PCR primers (**Supplementary Table 2**) were synthesized by Sigma-Aldrich Quimica SL (Madrid, Spain). Vector sequences were obtained from Addgene (Kamens, 2015). Vector or chromosomal DNA purifications were performed by *miniprep* with E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I (Omega Bio-tek, Norcross, Georgia) or DNeasyUltraClean Microbial



Kit (Qiagen, Düsseldorf, Germany). Single-colony DNA was extracted by boiling and centrifugation. PCR products were purified using the ATP Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (ATP Biotech Inc., Taipei, China). DNA was quantified with a NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) and sequenced by STAB VIDA (Caparica, Portugal).

Construction and Complementation of Single and Double wzm/wzt Rev1 Mutants

In-frame deletion mutants were obtained as previously described (Conde-Álvarez et al., 2012), using the suicide plasmids pJQKm Δwzm (Zabalza Baranguá, 2017) and/or pJQKm Δwzt . The latter was constructed using 16M genomic DNA and the designed primers (Supplementary Table 2) to amplify 198 bp upstream and wzt 1-66 codons with F1-R2, and wzt 209–253 codons and 193 bp downstream with F3-R4 wzt . These fragments were fused by overlap PCR with F1-R4 wzt , cloned in pCR2.1 (TOPO[®]TA Cloning, ThermoFisher Scientific) and sequenced. After using pCR2.1 Δwzt to transform *E. coli* TOP10F⁺, Δwzt was subcloned into pJQKm (Quandt and Hynes, 1993; Scupham and Triplett, 1997) *Bam*HI and *Xba*I sites. Clones were screened by PCR (Supplementary Table 2), and representative non-mutated (NM) ones from each mutagenesis were kept as controls. For complementation, transconjugants, including the pSRK vector with wzm (Zabalza Baranguá, 2017), wzt or $wzm-wzt$ (subcloning of BMEI1415 or BMEI1415-BMEI1416 into *Spe*I and *Xho*I sites) were selected in Km₅₀ plates and, for pSRK $wzm-wzt$, 0.1-mM IPTG (Invitrogen, Waltham, MA, United States), and checked by PCR.

Transcriptional Analysis

Genetic expression was analyzed from five independent extractions of Rev1 and derivatives, or 2 of 16M and 16M Δwzm for comparative purposes. Total RNA from exponential cultures was extracted by lysozyme (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, United States), proteinase K (Merck, Darmstadt, Germany), Zwittergent (Merck, Darmstadt, Germany), RNeasy Mini kit (Qiagen, Düsseldorf, Germany), and DNase [Ambion, Austin, TX, United States (ThermoFisher)] treatments, and its quality checked with Gel Loading Buffer II [Ambion, Austin, TX, United States (ThermoFisher)], in an agarose gel by confirming that the intensity ratio of 23S:16S proteins was 2:1, obtaining the cDNA with PrimeScript RT kit (Takara, Saint-Germain-en-Laye, France). The qRT-PCR was performed with SYBR Premix Ex Taq (Takara, Saint-Germain-en-Laye, France) in duplicate in an AriaMx real-time PCR system (Agilent) using 96-well microplates (Axygen, New York, NY, United States) as follows: 10 min at 95°C, 45 cycles of 15 s at 95°C, and 1 min at 60°C. Primers (Supplementary Table 4) efficiency (0.9–1.1) was assessed as $10^{(-1/\text{slope of Ct vs. DNA dilutions})-1}$. Data were analyzed with Agilent AriaMx v. 1.2 software (Santa Clara, CA, United States) and relative transcription normalized by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method using *IF-1* gene and representing the fold-change over Rev1 or 16M controls.

Characterization of Rev1 wzm/wzt Mutants

Conventional *Brucella* biotyping was performed following the standard protocols (Alton et al., 1988). Briefly, the mutants were submitted to tests of catalase, oxidase, urease, agglutination with acriflavine, agglutination with anti-A/anti-M/anti-R monospecific sera, lysis by bacteriophages Tb, Wb, Iz, and R/C, susceptibility to thionine, fuchsin, and safranin O dyes. Also, we analyzed purity and homogeneity of colony size and the LPS phase by the crystal violet-oxalate test (Grilló et al., 2000). The *in vitro* growth curves were assessed by duplicate as turbidity and CFU/ml from suspensions adjusted to OD₆₀₀ = 0.1 (TSB, 37°C, 150 rpm) at the selected intervals.

MIC/MBC₉₀ to the selected antibiotics were determined in the cation-adjusted Müller–Hinton medium (M-H; BD) by the standard broth microdilutions method (EUCAST: European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, 2003), using Rev1 and *E. coli* K12 as controls. Susceptibility to Dx₀₋₀₂, Gm₀₋₁₂₅, Rf₀₋₄, Str₂₋₅, Px_{B1-5}, Col₄, P₀₋₅, and Saf₅₀ was quantified by seeding suspensions between 10⁹ and 10⁴ CFU/ml by triplicate in BAB or BAB-S plates incubated (37°C, 8 days) under normal air or 10% CO₂ atmosphere. Results were expressed as the% of bacterial survival vs. the standard culture (BAB, air). Resistance to vancomycin (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, United States) was determined by incubating a suspension of 10⁴ CFU/ml in PBS with twofold serial dilutions (50–3.125 mg/ml) of the antibiotic (37°C, 1 h, 100 μ L each, by duplicate) and plating in BAB to determine the% of surviving bacteria vs. control.

Analyses of the R-LPS and internal O-PS were performed with $\approx 10^{10}$ CFU/ml of whole bacteria inactivated by 0.5% phenol (72 h, 37°C, 150 rpm) or purified LPS by an extraction kit (Intron Biotechnology, Seongnam, South Korea's) in SDS-PAGE and further modified periodate-alkaline silver staining or WB (Tsai and Frasch, 1982; Monreal et al., 2003). The latter was revealed with primary antibodies: (i) mAbs (1:2,000) anti-C/Y 33H8 or 42D2 (batch No. 051119 or 300502, Ingenasa), (ii) anti-M monospecific polyclonal rabbit serum (1:100; IdAB collection), or (iii) anti-*B. ovis*, Rev1, Rev1 Δwzm (either normal or heat treated 1 h, 56°C) or 16M Δwzm sera from sheep experimentally infected (1:400; IdAB collection); and secondary HRP-conjugated antibodies: (i) an anti-mouse at 1:3,000 (Bio-Rad, Hercules, CA, United States cat. No. 170-6516), (ii) an anti-rabbit at 1:2,500 (Bio-Rad, Hercules, CA, United States cat. No. 170-6515), or (iii) protein G at 1:1,000 (Pierce cat. No. 21193), all diluted in 1% milk PBST. The images were acquired with ECL Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, United States) in a ChemiDocSyngene with GeneSnap 7 (Frederick, MD, United States) or Bio-Rad with Quantity One (Hercules, CA, United States) software. Brightness and contrast adjustments were applied uniformly using GNU Image Manipulation Program v. 2.10 (open source²).

To assess the lack of spontaneous mechanisms of dissociation described for Rev1 (Mancilla et al., 2013), the integrity of GI-2 and *wbk* regions was determined after serial subcultures in BAB under normal or 10% CO₂ atmospheres by conventional

²www.gimp.org

PCR with the primers presented in **Supplementary Table 2**; the amplified products were 353 bp (P1–P3) and 1,016 bp (P5–P7) in case of gene integrity, or 586 bp (P1–P2) and ≈1,400 bp (P5–P6) in case of excision.

Study of Envelope-Related Properties

Autoagglutination was assessed by OD₆₀₀ readings as described (Caro-Hernández et al., 2007) in at least two independent experiments. Bacterial particle size and surface charge of phenol-inactivated bacteria (37°C, 150 rpm, 24 h) adjusted to OD₆₀₀ = 0.2 (7,000 × g, 4°C, 15 min) were measured in CsCl/HEPES as elsewhere (González et al., 2008) in absence or presence of poly-L-lysine (P6516; Sigma-Aldrich, San Luis, MO, United States) in a Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical, Malvern, United Kingdom) at 25°C, using the ZS-XPLORER v. 2.01 software (United Kingdom).

Hydrophobicity was determined by measuring bacterial adherence, using a hydrocarbons method (Rosenberg et al., 1980), modified to avoid cell degradation due to xylene toxicity (Czerwonka et al., 2016). Phenol-inactivated cultures were centrifuged (6,000 × g, 4°C, 10 min) and washed with a PUM buffer; then, 2 mL adjusted to OD₄₇₀ = 1 was mixed with an equal volume of xylene (PanReac AppliChem, Castellar del Vallés, Barcelona, Spain) by triplicate. After a vortex (5 s)-incubation (37°C, 10 min)-vortex (30 s)-incubation (room temperature; RT, 2 h) step, the absorbance of the low phase was measured to determine the hydrophobicity index as: $1 - (OD_{470}/1)$.

Biofilm formation was studied by bacterial adhesion to polystyrene, cellular viability, and Calcofluor and Congo Red assays. Briefly, 200 μL with 5×10^8 CFU/ml in TSB was incubated (37°C, 3 weeks) in 96-well plates (Sarstedt) by triplicate and, after PBS washings, was stained with crystal violet (PanReac AppliChem, Castellar del Vallés, Barcelona, Spain; 0.05% in water, RT, 15 min). The stain was washed with distilled water and dissolved in ethanol (Merck, Darmstadt, Germany) to measure adhesion as OD₆₀₀. The viability of the attached bacteria was assessed by swabbing and culturing in BAB. EPS production was evaluated by seeding 20 μL of 10^9 CFU/ml in BAB with 0.1% Calcofluor White M2R (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, United States) or 4% Congo Red (Merck, Darmstadt, Germany); after 3 weeks, at 37°C, the intensity of Calcofluor's fluorescence measured in a UV transilluminator (UVP) and color shift to intense red/black were visualized and quantified with ImageJ/Fiji v. 2.1 software (Schindelin et al., 2012).

The osmotic resistance was studied by incubating (37°C, 48 h) 10^4 CFU/ml in TSB: water (1:5; hypoosmotic) or in 0.5 M NaCl (Dong et al., 2015) or 0.34-M Suc (Roset et al., 2006) (VWR Chemicals, Radnor, PA, United States; hyperosmotic) by triplicate. The CFU/ml was determined in BAB to calculate the % of bacterial survival vs. the initial suspension in two independent experiments.

Susceptibility to Environmental Factors

Tolerance to desiccation was studied by keeping (RT, 6 days) a suspension (200 μL/well, 10^9 CFU/ml, TSB) completely dried by evaporation into 12-well plates (Sarstedt) by triplicate and rehydrating the pellet in PBS to determine the viable

CFU/ml in BAB. Susceptibility to detergents was firstly evaluated with SDS (Merck, Darmstadt, Germany), since this surfactant inactivated all the *Brucella* tested at 0.06%; bacterial suspensions (10^4 CFU/ml, 100 μL, by triplicate) were cultured in BAB with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, United States). Oxidative stress and acid pH resistances were analyzed by incubating (37°C, 1 h) a 10^4 CFU/ml suspension in TSB with an equal volume (100 μL) of H₂O₂ at increasing concentrations up to 5 mM or with acidified TSB at a final pH from 7.3 to 2.3 by duplicate. Results were expressed as bacteria (%) vs. control.

Transmission Electron Microscopy

Massive *Brucella* cultures (37°C, 24 h) were harvested, washed (7,000 × g, 10 min) two times with sterile Sorenson's phosphate buffer pH 7.4 (Kuo, 2007) and fixed (4°C, overnight) with 2.5% glutaraldehyde (Grade I, 70%; Sigma-Aldrich San, Luis, MO, United States) and 2% paraformaldehyde (powder, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, United States) in a buffer. Samples were adsorbed (1:200 dilution, 3 μL, 1 min) in hydrophilized carbon-coated copper grids (glow discharge 5 mA, 20 s, Leica EM ACE200). After negative staining (1% uranyl acetate, 10 s, two times), representative images were acquired (JEOL JEM 1400 Plus).

Ultra-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

Peptidoglycan was purified from three biological replicas normalized to OD₆₀₀ = 1 and analyzed, using 16M as control, as described elsewhere (Desmarais et al., 2013; Alvarez et al., 2016, 2020) on a Waters UPLC system (Waters Corporation, Milford, MA, United States) equipped with an ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 mm × 150 mm (Waters, United States) and a dual wavelength absorbance detector. Muropeptide identity was confirmed by MS/MS analysis, using Xevo G2-XS QT of system (Waters Corporation, Milford, MA, United States). Quantification of muropeptides was based on their relative abundances normalized to the total amount of PG. Unidentified muropeptides and minor peaks with a relative abundance lower than 0.5% were excluded from further analysis.

Susceptibility to Soluble Factors of the Immune System

Susceptibility to polymyxins B and E (colistin) as a model of cationic peptides and to normal ovine serum (IdAB collection) as a source of complement after 18 h of incubation was determined by duplicate as reported (Martínez de Tejada et al., 1995; González et al., 2008). Likewise, the *in vitro* bacterial killing properties of serum from sheep immunized with Rev1Δwzm (IdAB collection) were studied against *B. melitensis* 16M (S-LPS) or *B. ovis* PA (R-LPS) virulent strains; normal sheep serum and PBS or PBS-S for *B. ovis* PA were used as controls to determine survival (%) in two independent experiments.

BeWo Cells Studies

Bacterial adhesion, internalization, and intracellular multiplication in the BeWo (ATCC CCL-98; Sigma-Aldrich,

San Luis, MO, United States) trophoblast-like cell line were determined as described previously (Castañeda-Roldán et al., 2004; Salcedo et al., 2013; Poveda-Urkixo et al., 2022). Briefly, 5×10^4 cells/well were cultured in 12-well microtiter plates (Sarstedt) with an enriched F-12K medium (Kaighn's Modification) supplemented with 10% of inactivated FBS and 2-mM L-glutamine (Glutamax 100 \times) (Gibco). The cells were infected at an MOI of 100, and, after 30 min of incubation, the adhered bacteria were killed with Gm₅₀ (1.5-h exposure). After cells lysis with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, United States), the number of CFU/ml was determined in both treated (intracellular) and untreated (total) wells by plating in BAB to calculate (i) adhesion as \log_{10} CFU/ml = total CFU-intracellular CFU; (ii) % of internalization = (intracellular CFU/total CFU) \times 100; and (iii) intracellular multiplication as \log_{10} CFU/ml found at 2, 24, and 48 h.

Animal Experiments

Biosafety and Ethics Statements

Brucella and GMOs were used in the registered BSL3 facilities (code A/ES/15/I-05) of the Instituto de Agrobiotecnología (IdAB), previous authorization of the Spanish Consejo Interministerial de Organismos Modificados Genéticamente (CIOMG) (A/ES/16/39). BALB/c 7-week-old female or CD1 4-week-old male and female mice were purchased from Charles River (Elbeuf, France) and accommodated for 2 weeks in the authorized IdAB animal facilities (ES/31-2016-000002-CR-SU-US) before experimental proceedings. The animals were kept in biosafety cages with water and food *ad libitum* and manipulations carried out following FELASA (Reh binder et al., 2000) and ARRIVE (Percie du Sert et al., 2020) guidelines. Procedures were based on brucellosis standards (Grilló et al., 2012) and authorized by Gobierno de Navarra (PI-025-14) in compliance with the current Spanish (RD 53/2013; ECC/566/2015) and European (Directive UE 2010/63) legislations. Churra ewes were purchased from *B. melitensis* and *B. ovis* free herds of Castilla y León, Spain, and kept in the authorized BSL2 and BSL3 facilities of the Universidad Complutense de Madrid (UCM; ES/281200000147 and ES/280790000154). Before starting the experiment, all ewes were serologically assessed as free from the main reproductive infections (i.e., *Chlamydia abortus*, *Coxiellaburnetii*, *Salmonella Abortusovis*, *Toxoplasma gondii*, and Maedi-Visna). The GMOs and animal experiments were evaluated by the ethics and biosecurity committee of UCM [OH (CEA)-UCM-32-2018], CIOMG (B/ES/18/31; A/ES/20/83), and Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS; 194/PIV and 432/ECV). Eventual authorizations were granted by Gobierno de la Comunidad de Madrid (PROEX 187/18). Note that the use of *Brucella* Gm^R strains is no longer under restricted use since 2014, as it does not compromise the control of disease in humans or animals (Smith et al., 2015).

Spleen Infection and Cytokine Profiles in Mice

In general, the mice were inoculated IP or SC with 0.1 ml of bacterial suspension and killed by cervical dislocation at selected intervals to determine the number of viable CFU/spleen (expressed as \log_{10} CFU/spleen), and the spleens weight

(grams/spleen), as reported (Grilló et al., 2006b). The mice inoculated with Rev1 in standard conditions (10^5 CFU, IP or SC) or with PBS were used as controls.

A dose-response experiment was performed in the BALB/c mice inoculated IP with 10^5 , 10^6 , 10^7 or 10^8 CFU/mouse of Rev1 Δwzm , and the spleen counts/weights ($n = 5$) were determined at 2 weeks PI. Thereafter, with the two selected doses (10^6 and 10^8 CFU/mouse), we performed an experiment of persistence by determining the spleen counts and weights at 1, 2, 4, and/or 6 weeks PI.

For the three mutants, the kinetics of infection, weights, and cytokines in spleens were studied in groups of 14 BALB/c mice IP, inoculated with 10^8 CFU/animal (selected as optimal dose) and weekly killed ($n = 3$ at 1 and 4 weeks PI; $n = 4$ at 2 and 3 weeks PI). For cytokines, individual supernatants were obtained (1,000 \times g, 10 min) in Hanks balanced salt solution (Gibco) treated (1 h, 4°C) with 1% CHAPS (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, United States) and filtrated (0.20 μ m, Millipore). Moreover, blood samples were collected at 2, 6, and 24 h PI ($n = 5$) by retro-orbital plexus puncture in mice anesthetized (ISOFLO, Eucuphar) and processed as a pool (by mixing equal volume of serum from each mouse) by analyzing each pool in duplicate; Rev1 Δwzm , Rev1, and PBS groups ($n = 5$) were analyzed in two independent experiments. Similarly, the blood samples were obtained one time a week directly prior to each necropsy and processed individually ($n = 5$). Sera samples and splenocytes supernatants were used to determine IL-6, IL-12p40, TNF- α , and IFN- γ using commercial ELISA kits (BD OptEIA) in two technical replicates/sample. The results were expressed as pg/spleen and pg/ml of serum.

The *in vivo* stability of Rev1 Δwzm was evaluated after 5 serial passages in the mice (Schurig et al., 1991). Groups of 3 CD1 mice were inoculated IP at 10^8 CFU/animal and necropsied at 3 days PI to determine the CFU/spleens. The bacteria recovered in each passage were subcultured to prepare the inocula of the next one. The genetic and phenotypic stability of the bacteria recovered from the last passage was assessed as described for the *in vitro* stability.

Vaccine Efficacy Studies

The efficacy of Rev1 wzm/wzt mutants to protect against *B. melitensis* or *B. ovis* virulent infections was analyzed in the BALB/c mice ($n = 5$), as reported (González et al., 2008; Soler-Lloréns et al., 2014). The mice ($n = 5$) were vaccinated IP or SC with 10^8 CFU of the mutant and, 4 weeks later, were challenged IP with 10^4 CFU of *B. melitensis* H38:Gm or with 5×10^5 CFU of *B. ovis* PA:Gm. Additional groups ($n = 5$) of Rev1 in standard conditions (10^5 CFU/animal, SC) and PBS were included as controls. The \log_{10} CFU/spleen of the challenge strain was determined in BAB-Gm₁₅, or in BAB-S-Gm₁₅ with incubation in 10% CO₂ at 2 or 3 weeks after challenging with H38 or *B. ovis* PA, respectively.

Safety in Pregnant Mice

Pregnancies were synchronized in the CD1 mice by light/darkness control and naturally mating for 2 days. On the day of pregnancy 4.5 ± 1 , the mice were inoculated

IP with 1×10^7 CFU/mouse of Rev1Δwzm ($n = 14$), or 1×10^6 CFU/mouse of Rev1 ($n = 16$) as control; 14 days later, all were necropsied to individually collect spleens, placentas, and fetuses. The CFU/g was determined by plating serial 10-fold PBS dilutions in BAB, applying external ethanol to avoid fetus-placenta cross contamination. For histopathological studies, placental tissues were fixed with 10% neutral buffered formaldehyde and stained with hematoxylin-eosin (H-E) (PanReac AppliChem, Castellar del Vallés, Barcelona, Spain).

Safety in Pregnant Ewes

Churra ewes ($n = 6$) were SC vaccinated on the day of gestation 75 ± 2 (DG75) with 1.8×10^{10} CFU of Rev1Δwzm, including a PBS group of pregnant ewes ($n = 4$) as control. Clinical symptoms, rectal temperature, and local reactions were assessed during the first 2 weeks PI. Vaginal shedding was weekly monitored along the pregnancy by double-swab sampling and at parturition by collecting cotyledons and milk. The swabs were analyzed by (i) direct DNA extract and qRT-PCR of the IS711 (Pérez-Sancho et al., 2013) and (ii) duplicate culturing in a CITA-selective medium (De Miguel et al., 2011) standard or modified by halving vancomycin and colistin concentrations, and incubation at 37°C for 7–14 days; presumptive colonies were confirmed by over-colony PCR with F1-R4wzm (Supplementary Table 2). Cotyledons homogenized in sterile PBS (1:10, w/v) and the milk samples were cultured (1 ml/plate) in these media. Within 4 weeks after delivery, all ewes and lambs were necropsied to determine bacterial presence in organs (spleen, liver, uterus, and mammary gland) and lymph nodes (pre-scapular, parotid, retropharyngeal, submaxillary, crural, iliac, and supra-mammary) by homogenization. Serological responses were weekly monitored in serum by an INgezim *B. ovis* kit (ELISA-R/LPS; Ingenasa), standard Rose Bengal test (RBT), and those reacting in RBT by S-LPS Complement Fixation test (CFT) at the officially accredited Laboratorio de Calidad Agroalimentaria de Navarra (Villava, Navarra, Spain), as recommended (OIE, 2018).

Statistical Analysis

Statistical analysis and graphical representations were performed with GraphPad Prism 8 software (Inc., San Diego, CA, United States). *P*-values were determined by unpaired two-tailed Student's *t*-test or by one- or two-way ANOVA, followed by Fisher's least significant difference (LSD) test, with 95% confidence intervals, according to data classification. For PG analysis, only variations higher than 10% were considered as significant. The final figures were assembled using Adobe Illustrator 2020 (San José, CA, United States).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in this study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

Mice studies were reviewed and approved by Comité de Ética, Experimentación Animal y Bioseguridad (CEEAB) of Public University of Navarra (UPNA), Comité de Ética de CSIC, and the competent authority of Navarra Government; and sheep experiments were approved by the Ethics and Biosecurity Committee of Universidad Complutense de Madrid (UCM) and the competent authority of Comunidad de Madrid.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MG conceived, led, and supervised the study. SM-B designed and performed experiments. IP-U performed experiments in cells and pregnant mice. SM-B and MG carried out other mice experiments, and wrote the draft and the final manuscript. SM-B, IP-U, and MG participated in the sheep assay. SM-B, AZ-B, and LP contributed to mutants' construction and to design some *in vitro* experiments. OI and FC performed UPLC-MS, and analyzed and discussed the results. SM-B, IP-U, AZ-B, and MG analyzed, discussed, and interpreted all results. All the authors revised and approved the final document for publication.

FUNDING

This work was funded by Agencia Estatal de Investigación of the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (AGL2014-58795-C4-2-R and RTI2018-098658-B-C21), Gobierno de Navarra (PT040-2018 and PT007-2019) projects. SM-B contracts were granted by the FEDER 2016–2018 program of Garantía Juvenil and by an UPNA pre-doctoral fellowship 2018–2022. IP-U Doctorados Industriales contract was cofounded by Gobierno de Navarra and CSIC. Research in the FC lab was supported by The Swedish Research Council (VR), The Knut and Alice Wallenberg Foundation (KAW), The Laboratory of Molecular Infection Medicine Sweden (MIMS), and The Kempe Foundation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the technical support provided by Itziar Alkorta, Ricardo Andrade, and Loli Martín (SGIker, Universidad del País Vasco, Spain), the NED research group of VISAVET (Universidad Complutense de Madrid, Spain), Montse Barberán (Universidad de Zaragoza, Spain), Manuel Barrón (Laboratorio de Calidad Alimentaria de Navarra, Villava, Spain), and Goizeder Almagro (IdAB-CSIC staff). We also thank John Wild for the English revision of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.908495/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Alton, G. G., Jones, L., Angus, R., and Verger, J. (1988). *Techniques for the Brucellosis Laboratory*. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Alvarez, L., Cordier, B., van Teeffelen, S., and Cava, F. (2020). Analysis of Gram-negative bacteria peptidoglycan by ultra-performance liquid chromatography. *Bio-Protocol* 10, 1–14. doi: 10.21769/bioprotoc.3780
- Alvarez, L., Hernandez, S. B., De Pedro, M. A., and Cava, F. (2016). Ultra-sensitive, high-resolution liquid chromatography methods for the high-throughput quantitative analysis of bacterial cell wall chemistry and structure. *Methods Mol. Biol.* 1440, 11–27. doi: 10.1007/978-1-4939-3676-2_2
- Aragón-Aranda, B., De Miguel, M. J., Lázaro-Antón, L., Salvador-Bescós, M., Zúñiga-Ripa, A., Moriyón, I., et al. (2020). Development of attenuated live vaccine candidates against swine brucellosis in a non-zoonotic *B. suis* biovar 2 background. *Vet. Res.* 51:8. doi: 10.1186/s13567-020-00815-8
- Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A. E., Ugalde, R., et al. (2005). Cyclic β -1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. *Nat. Immunol.* 6, 618–25. doi: 10.1038/ni1202
- Ariza, J., Bosch, J., Gudiol, F., Liñares, J., Viladrich, P. F., and Martín, R. (1986). Relevance of *in vitro* antimicrobial susceptibility of *Brucella melitensis* to relapse rate in human brucellosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30, 958–60. doi: 10.1128/AAC.30.6.958
- Atun, G., Hissarli, G., and Tunçay, M. (1998). Adsorption of safranin-O on hydrophilic and hydrophobic glass surfaces. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 143, 27–33. doi: 10.1016/S0927-7757(98)00494-4
- Avila-Calderón, E. D., Medina-Chávez, O., Flores-Romo, L., Hernández-Hernández, J. M., Donis-Maturano, L., López-Merino, A., et al. (2020). Outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* modulate immune response and induce cytoskeleton rearrangement in peripheral blood mononuclear cells. *Front. Microbiol.* 11:1–18. doi: 10.3389/fmicb.2020.556795
- Baldwin, C. L., and Goenka, R. (2006). Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? *Crit. Rev. Immunol.* 26, 407–42. doi: 10.1615/CritRevImmunol.v26.i5.30
- Barrio, M. B., Grilló, M. J., Muñoz, P. M., Jacques, I., González, D., De Miguel, M. J., et al. (2009). Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less effective than Rev 1 vaccine against *Brucella melitensis* infection of sheep. *Vaccine* 27, 1741–9. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.01.025
- Bi, Y., and Zimmer, J. (2020). Structure and ligand-binding properties of the O antigen ABC transporter carbohydrate-binding domain. *Structure* 28, 252.e–8.e. doi: 10.1016/j.str.2019.11.020
- Bi, Y., Mann, E., Whitfield, C., and Zimmer, J. (2018). Architecture of a channel-forming O-antigen polysaccharide ABC transporter. *Nature* 553, 361–5. doi: 10.1038/nature25190
- 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. doi: 10.1016/s0167-5877(96)01110-5
- Blasco, J. M., and Díaz, R. (1993). *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine as a cause of human brucellosis. *Lancet* 342:805. doi: 10.1016/0140-6736(93)91571-3
- Bosseray, N., and Plommet, M. (1990). *Brucella suis* S2, *Brucella melitensis* Rev. 1 and *Brucella abortus* S19 living vaccines: residual virulence and immunity induced against three *Brucella* species challenge strains in mice. *Vaccine* 8, 462–8. doi: 10.1016/0264-410X(90)90247-J
- Briones, G., Inón de Iannino, N., Roset, M., Vigiocco, A., Silva Paulo, P., and Ugalde, R. A. (2001). *Brucella abortus* cyclic β -1,2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect. Immun.* 69, 4528–35. doi: 10.1128/IAI.69.7.4528-4535.2001
- Caffalette, C. A., and Zimmer, J. (2021). Cryo-EM structure of the full-length Wzm/Wzt ABC transporter required for lipid-linked O antigen transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 118, 1–10. doi: 10.1073/pnas.2016144118
- Caffalette, C. A., Kuklewicz, J., Spellmon, N., and Zimmer, J. (2020). Biosynthesis and export of bacterial glycolipids. *Annu. Rev. Biochem.* 89, 741–68. doi: 10.1146/annurev-biochem-011520-104707
- Caro-Hernández, P., Fernández-Lago, L., De Miguel, M. J., Martín-Martín, A. I., Cloeckert, A., Grilló, M. J., et al. (2007). Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. *Infect. Immun.* 75, 4050–61. doi: 10.1128/IAI.00486-07
- Castañeda-Roldán, E. I., Avelino-Flores, F., Dall'Agno, M., Freer, E., Cedillo, L., Dornand, J., et al. (2004). Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues. *Cell. Microbiol.* 6, 435–45. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00372.x
- Cheung, C., Lee, J., Lee, J., and Shevchuk, O. (2009). The effect of ionic (NaCl) and non-ionic (sucrose) osmotic stress on the expression of β -galactosidase in wild type *E. coli* BW25993 and in the isogenic BW25993 Δ lacI mutant. *J. Exp. Microbiol. Immunol.* 13, 1–6.
- Clarke, B. R., Cuthbertson, L., and Whitfield, C. (2004). Nonreducing terminal modifications determine the chain length of polymannose O antigens of *Escherichia coli* and couple chain termination to polymer export via an ATP-binding cassette transporter. *J. Biol. Chem.* 279, 35709–18. doi: 10.1074/jbc.M404738200
- Clifton, L. A., Ciesielski, F., Skoda, M. W. A., Paracini, N., Holt, S. A., and Lakey, J. H. (2016). The effect of lipopolysaccharide core oligosaccharide size on the electrostatic binding of antimicrobial proteins to models of the Gram-negative bacterial outer membrane. *Langmuir* 32, 3485–94. doi: 10.1021/acs.langmuir.6b00240
- 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 Pathog.* 8:e1002675. doi: 10.1371/journal.ppat.1002675
- Cuthbertson, L., Kimber, M. S., and Whitfield, C. (2007). Substrate binding by a bacterial ABC transporter involved in polysaccharide export. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 19529–34. doi: 10.1073/pnas.0705709104
- Cuthbertson, L., Powers, J., and Whitfield, C. (2005). The C-terminal domain of the nucleotide-binding domain protein Wzt determines substrate specificity in the ATP-binding cassette transporter for the lipopolysaccharide O-antigens in *Escherichia coli* serotypes O8 and O9a. *J. Biol. Chem.* 280, 30310–9. doi: 10.1074/jbc.M504371200
- Czerwonka, G., Guzy, A., Kaluza, K., Grosicka, M., Dańczuk, M., Lechowicz, I., et al. (2016). The role of *Proteus mirabilis* cell wall features in biofilm formation. *Arch. Microbiol.* 198, 877–84. doi: 10.1007/s00203-016-1249-x
- De Miguel, M. J., Marín, C. M., Muñoz, P. M., Dieste, L., Grilló, M. J., and Blasco, J. M. (2011). Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1458–63. doi: 10.1128/JCM.02301-10
- Desmarais, S. M., De Pedro, M. A., Cava, F., and Huang, K. C. (2013). Peptidoglycan at its peaks: how chromatographic analyses can reveal bacterial cell wall structure and assembly. *Mol. Microbiol.* 89, 1–13. doi: 10.1111/mmi.12266
- Dohnalkova, A. C., Marshall, M. J., Arey, B. W., Williams, K. H., Buck, E. C., and Fredrickson, J. K. (2011). Imaging hydrated microbial extracellular polymers: comparative analysis by electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1254–62. doi: 10.1128/AEM.02001-10
- Dong, H., Liu, W., Peng, X., and Wu, Q. (2015). The effects of RegM on stress responses in *Brucella melitensis*. *Curr. Microbiol.* 70, 730–4. doi: 10.1007/s00284-015-0782-1
- Dorneles, E. M. S., Teixeira-Carvalho, A., Araújo, M. S. S., Sriranganathan, N., and Lage, A. P. (2015). Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination. *Vaccine* 33, 3659–66. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.05.057
- EUCAST: European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. (2003). *Determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of Antibacterial Agents by Broth Dilution*. Central Hospital Växjö: EUCAST.
- Fletcher, M., and Loeb, G. I. (1979). Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine *Pseudomonas* to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 67–72. doi: 10.1128/aem.37.1.67-72.1979
- Fontana, C., Conde-Álvarez, R., Stähle, J., Holst, O., Iriarte, M., Zhao, Y., et al. (2016). Structural studies of lipopolysaccharide-defective mutants from *Brucella melitensis* identify a core oligosaccharide critical in virulence. *J. Biol. Chem.* 291, 7727–41. doi: 10.1074/jbc.M115.701540

- Gamazo, C., and Moriyón, I. (1987). Release of outer membrane fragments by exponentially growing *Brucella melitensis* cells. *Infect. Immun.* 55, 609–15. doi: 10.1128/iai.55.3.609-615.1987
- Godefroid, M., Svensson, M. V., Cambier, P., Uzureau, S., Mirabella, A., De Bolle, X., et al. (2010). *Brucella melitensis* 16M produces a mannan and other extracellular matrix components typical of a biofilm. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59, 364–77. doi: 10.1111/j.1574-695X.2010.00689.x
- Godessart, P., Lannoy, A., Dieu, M., Van der Verren, S. E., Soumillon, P., Collet, J. F., et al. (2021). β -barrels covalently link peptidoglycan and the outer membrane in the α -proteobacterium *Brucella abortus*. *Nat. Microbiol.* 6, 27–33. doi: 10.1038/s41564-020-00799-3
- Godfried, F., Cloeckaert, A., Taminiau, B., Danese, I., Tibor, A., De Bolle, X., et al. (2000). Genetic organisation of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of *Brucella melitensis* 16M (*wbk*). *Res. Microbiol.* 151, 655–68. doi: 10.1016/s0923-2508(00)90130-x
- Goldberg, J. B. (1999). *Genetics of Bacterial Polysaccharides*, 1st Edn. Boca Raton, FL: CRC Press LLC, doi: 10.1201/9781420074413
- González, D., Grilló, M. J., De Miguel, M. J., 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. doi: 10.1371/journal.pone.0002760
- Grilló, M. J., Blasco, J. M., Gorvel, J., Moriyón, I., and Moreno, E. (2012). What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Vet. Res.* 43, 1–35. doi: 10.1186/1297-9716-43-29
- Grilló, M. J., Bossery, N., and Blasco, J. M. (2000). *In vitro* markers and biological activity in mice of seed lot strains and commercial *Brucella melitensis* Rev 1 and *Brucella abortus* B19 vaccines. *Biologicals* 28, 119–27. doi: 10.1006/biol.2000.0249
- Grilló, M. J., Manterola, L., De Miguel, M. J., Muñoz, P. M., Blasco, J. M., Moriyón, I., et al. (2006b). 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. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.12.038
- Grilló, M. J., De Miguel, M. J., Muñoz, P. M., Marín, C. M., Ariza, J., and Blasco, J. M. (2006a). Efficacy of several antibiotic combinations against *Brucella melitensis* Rev 1 experimental infection in BALB/c mice. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 622–6. doi: 10.1093/jac/dkl289
- Grilló, M. J., San Román Aberasturi, B., Palacios Chaves, L., Mena Bueno, S., and Zabalza Baranguá, A. (2017). *A Modified Brucella Vaccine Strain for the Treatment of Brucellosis*. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Guidolin, L. S., Morrone Seijo, S. M., Guaimas, F. F., Comerdi, D. J., and Ciocchinia, A. E. (2015). Interaction network and localization of *Brucella abortus* membrane proteins involved in the synthesis, transport, and succinylation of cyclic β -1,2-glucans. *J. Bacteriol.* 197, 1640–8. doi: 10.1128/JB.00068-15
- Guo, R., Jiao, Y., Li, Z., Zhu, S., Fei, X., Geng, S., et al. (2017). Safety, protective immunity, and DIVA capability of a rough mutant *Salmonella Pullorum* vaccine candidate in broilers. *Front. Microbiol.* 8:1–10. doi: 10.3389/fmicb.2017.00547
- Haag, A. F., Myka, K. K., Arnold, M. F., Caro-Hernández, P., and Ferguson, G. P. (2010). Importance of lipopolysaccharide and cyclic β -1,2-glucans in *Brucella*-mammalian infections. *Int. J. Microbiol.* 2010, 1–12. doi: 10.1155/2010/124509
- Hagelueken, G., Clarke, B. R., Huang, H., Tuukkanen, A., Danciu, I., Svergun, D. I., et al. (2015). A coiled-coil domain acts as a molecular ruler to regulate O-antigen chain length in lipopolysaccharide. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 50–6. doi: 10.1038/nsmb.2935
- Hensel, M. E., Garcia-Gonzalez, D. G., Chaki, S. P., Hartwig, A., Gordy, P. W., Bowen, R., et al. (2020). Vaccine candidate *Brucella melitensis* 16M Δ vjbR is safe in a pregnant sheep model and confers protection. *mSphere* 5:20. doi: 10.1128/msphere.00120-20
- Hug, I., and Feldman, M. F. (2011). Analogies and homologies in lipopolysaccharide and glycoprotein biosynthesis in bacteria. *Glycobiology* 21, 138–51. doi: 10.1093/glycob/cwq148
- Issa, M. N., and Ashhab, Y. (2016). Identification of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine-strain genetic markers: towards understanding the molecular mechanism behind virulence attenuation. *Vaccine* 34, 4884–91. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.08.059
- Izquierdo, L., Merino, S., Regué, M., Rodríguez, F., and Tomás, J. M. (2003). Synthesis of a *Klebsiella pneumoniae* O-antigen heteropolysaccharide (O12) requires an ABC 2 transporter. *J. Bacteriol.* 185, 1634–41. doi: 10.1128/JB.185.5.1634-1641.2003
- Jain-Gupta, N., Waldrop, S. G., Tempenny, N. M., Witonsky, S. G., Boyle, S. M., and Sriranganathan, N. (2019). Rough *Brucella neotomae* provides protection against *Brucella suis* challenge in mice. *Vet. Microbiol.* 239:108447. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.108447
- Jankowski, A., Jankowski, S., Mirończyk, A., and Niedbach, J. (2005). The action of photosensitizers and serum in a bactericidal process. II. The effects of dyes: hypericin, eosin Y and saphranine O. *Polish J. Microbiol.* 54, 323–30.
- Jiménez de Bagüés, M. P., Marín, C. M., Barberán, M., and Blasco, J. M. (1989). Responses of ewes to *B. melitensis* Rev1 vaccine administered by subcutaneous or conjunctival routes at different stages of pregnancy. *Ann. Rech. Vet.* 20, 205–13.
- Johnson, Z. I., and Chisholm, S. W. (2004). Properties of overlapping genes are conserved across microbial genomes. *Genome Res.* 14, 2268–72. doi: 10.1101/gr.2433104
- Kamens, J. (2015). The Addgene repository: an international nonprofit plasmid and data resource. *Nucleic Acids Res.* 43, D1152–7. doi: 10.1093/nar/gku893
- Kanehisa, M., and Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 28, 27–30. doi: 10.1093/nar/28.1.27
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., and Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 423–35. doi: 10.1038/nrmicro2333
- Kornspan, D., Lubkovskaia, R., Mathur, S., Yeheskel, A., and Salmon-Divon, M. (2020). Genomic analysis of natural rough *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine strains: identification and characterization of mutations in key genes associated with bacterial lps biosynthesis and virulence. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–15. doi: 10.3390/ijms21249341
- Kreutzer, D. L., Scheffel, J. W., Draper, L. R., and Robertson, D. C. (1977). Mitogenic activity of cell wall components from smooth and rough strains of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 15, 842–5. doi: 10.1128/iai.15.3.842-845.1977
- Kuo, J. (2007). *Electron Microscopy: Methods and Protocols*, 2nd Edn. Totowa, NJ: Humana Press Inc, doi: 10.1007/978-1-62703-776-1
- Lalsiamthara, J., Kaur, G., Gogia, N., Ali, S. A., Goswami, T. K., and Chaudhuri, P. (2020). *Brucella abortus* S19 *rfbD* mutant is highly attenuated, DIVA enable and confers protection against virulent challenge in mice. *Biologicals* 63, 62–7. doi: 10.1016/j.biologicals.2019.11.005
- Lepage, S., Lakaye, B., Galleni, M., Thamm, I., Crine, M., Gros Lambert, S., et al. (1995). Saturation of penicillin-binding protein 1 by β -lactam antibiotics in growing cells of *Bacillus licheniformis*. *Mol. Microbiol.* 16, 365–72. doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02308.x
- Lerouge, I., Laeremans, T., Verreth, C., Vanderleyden, J., Van Soom, C., Tobin, A., et al. (2001). Identification of an ATP-binding cassette transporter for export of the O-antigen across the inner membrane in *Rhizobium etli* based on the genetic, functional, and structural analysis of an LPS mutant deficient in O-antigen. *J. Biol. Chem.* 276, 17190–8. doi: 10.1074/jbc.M101129200
- Livermore, D. M. (1987). Mechanisms of resistance to cephalosporin antibiotics. *Drugs* 34, 64–88. doi: 10.2165/00003495-198700342-00007
- Mancilla, M., Grilló, M. J., De Miguel, M. J., López-Goñi, I., San-Román, B., Zabalza-Baranguá, A., et al. (2013). Deletion of the GI-2 integrase and the *wbkA* flanking transposase improves the stability of *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine. *Vet. Res.* 44, 1–12. doi: 10.1186/1297-9716-44-105
- 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. doi: 10.1128/iai.63.8.3054-3061
- Mirabella, A., Terwagne, M., Zygmunt, M. S., Cloeckaert, A., De Bolle, X., and Letesson, J. J. (2013). *Brucella melitensis* MucR, an orthologue of *Sinorhizobium meliloti* MucR, is involved in resistance to oxidative, detergent, and saline stresses and cell envelope modifications. *J. Bacteriol.* 195, 453–65. doi: 10.1128/JB.01336-12
- Mohammad, M. M., Tomita, N., Ohta, M., and Movileanu, L. (2016). The transmembrane domain of a bicomponent ABC transporter exhibits channel-forming activity. *ACS Chem. Biol.* 11, 2506–18. doi: 10.1021/acscchembio.6b00383
- Monreal, D., Grilló, M. J., González, D., Marín, C. M., De Miguel, M. J., 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. doi: 10.1128/IAI.71.6.3261-3271.2003
- Montaraz, J. A., Winter, A. J., Hunter, D. M., Sowa, B. A., Wu, A. M., and Adams, L. G. (1986). Protection against *Brucella abortus* in mice with O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 51, 961–3. doi: 10.1128/iai.51.3.961-963.1986
- Moosavian, M., Emam, N., Pletzer, D., and Savari, M. (2020). Rough-type and loss of the LPS due to *lpx* genes deletions are associated with colistin resistance in multidrug-resistant clinical *Escherichia coli* isolates not harbouring *mcr* genes. *PLoS One* 15:1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0233518
- Morè, N., Martorana, A. M., Biboy, J., Otten, C., Winkle, M., Gurnani Serrano, C. K., et al. (2019). Peptidoglycan remodeling enables *Escherichia coli* to survive severe outer membrane assembly defect. *MBio* 10, e2729–2718.
- 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. doi: 10.1051/vetres:2003037
- Nakao, R., Ramstedt, M., Wai, S. N., and Uhlin, B. E. (2012). Enhanced biofilm formation by *Escherichia coli* LPS mutants defective in Hep biosynthesis. *PLoS One* 7:1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0051241
- Nikaido, H., and Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *N.Y. State J. Med.* 49, 1–32. doi: 10.1128/mr.49.1.1-32.1985
- OIE (2018). “Chapter 3.1.4: Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) (Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*)” in *Office International of Epizootics, World Organisation for Animal Health. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. (Paris: World Organisation for Animal Health).
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., et al. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 18:e3000410. doi: 10.1371/journal.pbio.3000410
- Perevoshchikova, I. V., Sorochkina, A. I., Zorov, D. B., and Antonenko, Y. N. (2009). Safranin O as a fluorescent probe for mitochondrial membrane potential studied on the single particle level and in suspension. *Biochem* 74, 663–71. doi: 10.1134/s000629790906011x
- Pérez-Sancho, M., García-Seco, T., Arrogante, L., García, N., Martínez, I., Diez-Guerrero, A., et al. (2013). Development and evaluation of an IS711-based loop mediated isothermal amplification method (LAMP) for detection of *Brucella* spp. on clinical samples. *Res. Vet. Sci.* 95, 489–94. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.05.002
- Peters, K., Pazos, M., Edo, Z., Hugonnet, J. E., Martorana, A. M., Polissi, A., et al. (2018). Copper inhibits peptidoglycan LD-transpeptidases suppressing β -lactam resistance due to bypass of penicillin-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, 10786–91. doi: 10.1073/pnas.1809285115
- Pilizota, T., and Shaevitz, J. W. (2013). Plasmolysis and cell shape depend on solute outer-membrane permeability during hyperosmotic shock in *E. coli*. *Biophys. J.* 104, 2733–42. doi: 10.1016/j.bpj.2013.05.011
- Popescu, A., and Doyle, R. (1996). The Gram stain after more than a century. *Biotech. Histochem.* 71, 145–51. doi: 10.1016/S0246-0343(10)19912-2
- Poveda-Urkio, I., Ramirez, G. A., and Grilló, M.-J. (2022). Kinetics of placental infection by different smooth *Brucella* strains in mice. *Pathogens* 11, 1–17. doi: 10.3390/PATHOGENS11030279
- Quandt, J., and Hynes, M. F. (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene* 127, 15–21. doi: 10.1016/0378-1119(93)90611-6
- Rehbinder, C., Alenius, S., Bures, J., De las Heras, M., Greko, C., Kroon, P. S., et al. (2000). FELASA recommendations for the health monitoring of experimental units of calves, sheep and goats - Report of the federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Animal Health. *Lab. Anim.* 34, 329–50. doi: 10.1258/002367700780387723
- Rocchetta, H. L., and Lam, J. S. (1997). Identification and functional characterization of an ABC transport system involved in polysaccharide export of A-band lipopolysaccharide in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 179, 4713–24. doi: 10.1128/jb.179.15.4713-4724.1997
- Rosenberg, M., Gutnick, D., and Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 29–33. doi: 10.1111/j.1574-6968.1980.tb05599.x
- Roset, M. S., Ciochini, A. E., Ugalde, R. A., and Iñón de Iannino, N. (2006). The *Brucella abortus* cyclic β -1,2-glucan virulence factor is substituted with O-ester-linked succinyl residues. *J. Bacteriol.* 188, 5003–13. doi: 10.1128/JB.00086-06
- Roset, M. S., Ibañez, A. E., De Souza Filho, J. A., Spera, J. M., Minatel, L., Oliveira, S. C., et al. (2014). *Brucella* cyclic B-1,2-glucan plays a critical role in the induction of splenomegaly in mice. *PLoS One* 9:1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0101279
- Ruiz-Palma, M., del, S., Avila-Calderón, E. D., Aguilera-Arreola, M. G., López-Merino, A., Ruiz, E. A., et al. (2021). Comparative proteomic analysis of outer membrane vesicles from *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella canis* and *Brucella neotomae*. *Arch. Microbiol.* 203, 1611–26. doi: 10.1007/s00203-020-02170-w
- Salcedo, S. P., Chevrier, N., Lacerda, T. L. S., Ben Amara, A., Gerart, S., Gorvel, V. A., et al. (2013). Pathogenic brucellae replicate in human trophoblasts. *J. Infect. Dis.* 207, 1075–83. doi: 10.1093/infdis/jit007
- Salmon-Divon, M., Yeheskel, A., and Kornspan, D. (2018). Genomic analysis of the original Elberg *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine strain reveals insights into virulence attenuation. *Lab. Anim.* 9, 1436–48. doi: 10.1080/21505594.2018.1511677
- Salmon-Divon, M., Zahavi, T., and Kornspan, D. (2019). Transcriptomic analysis of the *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine strain in an acidic environment: insights into virulence attenuation. *Front. Microbiol.* 10:1–12. doi: 10.3389/fmicb.2019.00250
- Sancho, P., Tejedor, C., Sidhu-Muñoz, R. S., Fernández-Lago, L., and Vizcaino, N. (2014). Evaluation in mice of *Brucella ovis* attenuated mutants for use as live vaccines against *B. ovis* infection. *Vet. Res.* 45, 1–10. doi: 10.1186/1297-9716-45-61
- Sayers, E. W., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D. C., et al. (2022). Database resources of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). *Nucleic Acids Res.* 50, D20–6. doi: 10.1093/nar/gkab112
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–82. doi: 10.1038/nmeth.2019
- Schurig, G. G., Roop, R. M., Bagchi, T., Boyle, S., Buhrman, D., and Sriranganathan, N. (1991). Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* 28, 171–88. doi: 10.1016/0378-1135(91)90091-S
- Schurig, G. G., Sriranganathan, N., and Corbel, M. J. (2002). Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet. Microbiol.* 90, 479–96. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00255-9
- Schuster, C. F., Wiedemann, D. M., Kirsebom, F. C. M., Santiago, M., Walker, S., and Gründling, A. (2020). High-throughput transposon sequencing highlights the cell wall as an important barrier for osmotic stress in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and underlines a tailored response to different osmotic stressors. *Mol. Microbiol.* 113, 699–717. doi: 10.1111/mmi.14433
- 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. doi: 10.1016/s0378-1119(97)00453-8
- Shabala, L., Bowman, J., Brown, J., Ross, T., McMeekin, T., and Shabala, S. (2009). Ion transport and osmotic adjustment in *Escherichia coli* in response to ionic and non-ionic osmotic. *Environ. Microbiol.* 11, 137–48. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01748.x
- Singh, D. R., Mohammad, M. M., Patowary, S., Stoneman, M. R., Oliver, J. A., Movileanu, L., et al. (2013). Determination of the quaternary structure of a bacterial ATP-binding cassette (ABC) transporter in living cells. *Integr. Biol.* 5, 312–23. doi: 10.1039/C2IB20218B
- Smith, J., Gangadharan, D., and Weyant, R. (2015). Review of restricted experiment requests, division of select agents and toxins, centers for disease control and prevention, 2006–2013. *Health Secur.* 13, 307–16. doi: 10.1089/hs.2015.0021
- Solanki, K. S., Varshney, R., Qureshi, S., Thomas, P., Singh, R., Agrawal, A., et al. (2021). Non-infectious outer membrane vesicles derived from *Brucella abortus* S19 Δ per as an alternative acellular vaccine protects mice against virulent challenge. *Int. Immunopharmacol.* 90:107148. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107148
- Soler-Lloréns, P., Gil-Ramírez, Y., Zabalza-Baranguá, A., Iriarte, M., Conde-Álvarez, R., Zúñiga-Ripa, A., et al. (2014). Mutants in the lipopolysaccharide of *Brucella ovis* are attenuated and protect against *B. ovis* infection in mice. *Vet. Res.* 45, 1–11. doi: 10.1186/s13567-014-0072-0

- Spink, W. W., and Anderson, D. (1954). Experimental studies on the significance of endotoxin in the pathogenesis of brucellosis. *J. Clin. Invest.* 33, 540–8. doi: 10.1172/JCI102924
- Spink, W. W., Hall, J. W., Finstad, J., and Mallet, E. (1962). Immunization with viable *Brucella* organisms. Results of a safety test in humans. *Bull. World Health Organ.* 26, 409–19.
- Stranahan, L. W., and Arenas-Gamboa, A. M. (2021). When the going gets rough: the significance of *Brucella* lipopolysaccharide phenotype in host-pathogen interactions. *Front. Microbiol.* 12:713157. doi: 10.3389/fmicb.2021.713157
- Tsai, C. M., and Frasch, C. E. (1982). A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 119, 115–9. doi: 10.1016/0003-2697(82)90673-X
- Uzureau, S., Godefroid, M., Deschamps, C., Lemaire, J., De Bolle, X., and Letesson, J. J. (2007). Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*. *J. Bacteriol.* 189, 6035–47. doi: 10.1128/JB.00265-07
- Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.* 56, 395–411. doi: 10.1093/jac/dkq040
- Valvano, M. A. (2003). Export of O-specific lipopolysaccharide. *Front. Biosci.* 8:452–71. doi: 10.2741/1079
- Valvano, M. A. (2015). “Chapter 4. Genetics and biosynthesis of lipopolysaccharide,” in *Molecular Medical Microbiology*, 2nd Edn. (Amsterdam: Elsevier Ltd), 55–89. doi: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00004-4
- Vassen, V. (2018). *Polarity of Envelope Growth and Heterogeneity of the Outer Membrane of Brucella Abortus*. Ph. D. Thesis. Namur: University of Namur.
- Wang, X., Wang, L., Lu, T., Yang, Y., Chen, S., Zhang, R., et al. (2014a). Effects of partial deletion of the *wzm* and *wzt* genes on lipopolysaccharide synthesis and virulence of *Brucella abortus* S19. *Mol. Med. Rep.* 9, 2521–7. doi: 10.3892/mmr.2014.2104
- Wang, X., Yan, G. M., Zhang, R., Lang, X. L., Yang, Y. L., Li, X. Y., et al. (2014b). Immunogenic response induced by *wzm* and *wzt* gene deletion mutants from *Brucella abortus* S19. *Mol. Med. Rep.* 9, 653–8. doi: 10.3892/mmr.2013.1810
- Wang, Z., Niu, J. R., Wang, X. L., Wu, T. L., Cheng, J., Lu, L., et al. (2014). Evaluation of a *Brucella melitensis* mutant deficient in O-polysaccharide export system ATP-binding protein as a rough vaccine candidate. *Microbes Infect.* 16, 633–9. doi: 10.1016/j.micinf.2014.06.013
- Whitfield, C. (1995). Biosynthesis of lipopolysaccharide O antigens. *Trends Microbiol.* 3, 178–85. doi: 10.1016/s0966-842x(00)88917-9
- Williams, D. M., Ovchinnikova, O. G., Koizumi, A., Mainprize, I. L., Kimber, M. S., Lowary, T. L., et al. (2017). Single polysaccharide assembly protein that integrates polymerization, termination, and chain-length quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 114, E1215–23. doi: 10.1073/pnas.1613609114
- Wolter, D. J., and Lister, P. D. (2013). Mechanisms of β -lactam resistance among *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Pharm. Des.* 19, 209–22. doi: 10.2174/1381612811306020209
- Wood, P. J. (1980). Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 85, 271–87. doi: 10.1016/S0008-6215(00)84676-5
- Zabalza Baranguá, A. (2017). *Desarrollo De Vacunas Marcadas con GFP Frente a la Brucelosis Ovina y Tests Diagnósticos Asociados*. Ph. D. Thesis. Navarre: Public University of Navarre.
- Zhao, Y., Arce-Gorvel, V., Conde-Álvarez, R., Moriyón, I., and Gorvel, J. P. (2018). Vaccine development targeting lipopolysaccharide structure modification. *Microbes Infect.* 20, 455–60. doi: 10.1016/j.micinf.2017.11.006

Conflict of Interest: We would like to state that Rev1 Δwzm is protected by the patent WO/2019/101993 (PCT/EP2018/082539) belonging to CSIC and UPNA.

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher’s Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Mena-Bueno, Poveda-Urkixo, Irazoki, Palacios, Cava, Zabalza-Baranguá and Grilló. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



BruSIC: a novel selective medium for the primary isolation of *Brucella* in veterinary samples

✉ Sara Mena-Bueno,^{a,b} Irati Poveda-Urkixo,^a Daniel Asensio,^c Iñaki Echarte,^a Ana Zabalza-Baranguá,^a ✉ María Jesús Grilló^a

^aInstituto de Agrobiotecnología (CSIC-Gobierno de Navarra), Mutilva Baja, Spain

^bUniversidad Pública de Navarra, Mutilva Baja, Spain

^cReactivos para Diagnóstico, S.L. Josep Tura, Sentmenat, Spain

ABSTRACT Brucellosis, a re-emerging zoonotic infection, threatens animal welfare and public health with serious economic consequences. A definitive diagnosis requires *Brucella* isolation by culturing field specimens in specific media. This study aimed to (i) assess the effectivity of recommended Farrell's médium (FM) and CITA medium (CM) for the isolation of four *Brucella melitensis* strains (16M, Rev1, and the 16M Δ wzm and Rev1 Δ wzm in-frame deletion mutants) with variable susceptibility to polymyxins; (ii) develop a *Brucella* selective medium (BSM) suitable for these strains; (iii) test BSM, FM, and CM with other *Brucella* species; and (iv) develop an improved selective culture medium (*BruSIC*) for all brucellae, including *B. abortus* bv1. The four *B. melitensis* strains were strongly inhibited in FM and (except Rev1) CM. Since Rev1 Δ wzm's CM inhibition was due to a synergistic effect of colistin and vancomycin, we formulated BSM with half the concentrations of both antibiotics, achieving a similar growth of *B. melitensis* to blood agar base (BAB) and an inhibition of contaminant microorganisms comparable to CM; CM performance was surpassed by BSM for the primary isolation of *B. melitensis* when tested in 1,789 real sheep samples. For other brucellae, BSM and CM were more inhibitory than FM for *B. abortus* bv1 when using plates immediately after preparation but not after ≥ 4 weeks of storage. To address this, we developed the improved solid medium *BruSIC* by replacing the calf serum in BSM with activated charcoal. *BruSIC* yielded faster colony growth than BSM and CM and similar CFU numbers than BAB (including for *B. ovis* in BAB-Serum) and inhibited accompanying microorganisms in sheep and cow samples as effectively as BSM.

IMPORTANCE Farrell's medium (FM) and CITA medium (CM), recommended for *Brucella* isolation in animal samples, are inhibitory for certain strains. A reformulated *Brucella* selective medium (BSM), containing half the CM vancomycin and colistin concentrations, improved the isolation of *B. melitensis*, but not *Brucella abortus* bv1. A novel *Brucella* selective culture medium (*BruSIC*), in which calf serum is replaced by activated charcoal, retains the selectivity and improves the productivity of BSM and CM. *BruSIC* allows the growth of all brucellae faster than in CM or BSM, and at CFU number equivalent to BAB supplemented by calf serum, including *B. abortus* bv1 and the serum-dependent *Brucella ovis*. Due to its performance and reduced cost, *BruSIC* represents an added-value alternative to the existing selective culture media for these bacteria.

KEYWORDS *Brucella*, primary isolation, selective culture media, veterinary samples, activated charcoal, calf serum

Brucellosis is a worldwide zoonosis whose etiological agents are bacteria of the genus *Brucella*, the most relevant species being *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. ovis*, *B. suis* and *B. canis*. In livestock, the disease is characterized by abortion, sterility, and other reproductive disorders and is transmitted to animals and humans by bacterial shedding in placental and vaginal discharges, milk, and semen. The isolation of the pathogen from

Editor Max Maurin, UJF Grenoble and CHU Grenoble

Copyright © 2022 Mena-Bueno et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to María Jesús Grilló, mj.grillo@csic.es.

The authors declare no conflict of interest.

Received 26 May 2022

Accepted 6 October 2022

field samples is the gold standard test to confirm *Brucella* infection, but the primary isolation of slow-growing *Brucella* colonies is frequently hindered by fast-growing microorganisms from the environment and animal microbiota (1). Thus, selective culture media are a necessary tool to inhibit contaminant microorganisms and allow the isolation of *Brucella* from veterinary samples.

Among the available selective solid media (2–14), Farrell's medium (FM) is widely recommended and applied, since it strongly inhibits fast-growing bacteria and its translucence facilitates the identification of *Brucella* morphology. However, FM contains nalidixic acid and bacitracin, which severely inhibit some *Brucella* strains (15–18), a drawback that has led to the formulation of modified FM (16) and CITA medium (CM) (17). Therefore, duplicate culturing in both FM and CM plates is currently the recommended method for the primary isolation of *Brucella* (1, 19). Nevertheless, susceptibility to polymyxins B (in FM) or E (colistin in CM) has been widely associated with attenuated *Brucella* mutants with exposed anionic phosphate groups of the lipid A lipopolysaccharide (LPS), such as rough LPS (R-LPS) mutants (20–28). In our laboratory, PCR overlapping was used to obtain two R-LPS vaccine candidates (Rev1 Δ wzm and 16M Δ wzm) with high susceptibility to polymyxins (27) to be investigated for safety and efficacy in the natural host.

Before starting studies in sheep, we first tested the performance of FM and CM for the isolation of the polymyxin-susceptible mutants *B. melitensis* 16M Δ wzm and Rev1 Δ wzm, as well as the respective parental 16M and Rev1. The high level of inhibition observed prompted us to formulate a *Brucella* selective medium (BSM), which was tested in 1,789 veterinary samples. The new solid medium inhibited contaminant microorganisms as effectively as CM and surpassed CM performance in the detection of both attenuated *B. melitensis* mutants. Unexpectedly, we also observed that BSM and CM were highly inhibitory against *B. abortus* bv1 strains, although only when using recently prepared plates and not after more than a month of storage. To overcome this inhibition, we further modified the BSM and developed a definitive *Brucella* selective improved culture (BruSIC) medium, which increased the detection level of all the *Brucella* strains with restricted growth in FM, CM, and/or BSM. The new BruSIC medium matched the other selective media in inhibiting accompanying contaminant microorganisms. Due to its performance and reduced cost, BruSIC represents an added-value alternative to the existing selective culture media for these bacteria.

RESULTS

Growth of different *B. melitensis* strains in the recommended standard selective culture media. (i) **CM improves the growth of *B. melitensis* with respect to FM but inhibits the growth of 16M, 16M Δ wzm, and Rev1 Δ wzm.** First, we assessed the growth of 16M, Rev1, and their in-frame deletion mutants, 16M Δ wzm and Rev1 Δ wzm, susceptible to polymyxins (Table 1) in FM and CM versus Blood Agar Base No. 2 (BAB). As expected, the four *B. melitensis* strains tested, in particular the two rough mutants, were highly inhibited in FM versus BAB ($P \leq 0.001$) (Fig. 1A). Also, the number of CFU detected was significantly higher in CM than in FM, but only Rev1 grew in CM at the levels of BAB.

(ii) **The inhibition of Rev1 Δ wzm in CM is due to the synergistic interaction between vancomycin and colistin.** After observing the strong inhibition of Rev1 Δ wzm in CM, we selected this mutant to investigate the activity of the three antibiotics contained in this medium, i.e., vancomycin, colistin, and nitrofurantoin. The MIC and MBC values indicated that only vancomycin and colistin inhibited Rev1 Δ wzm more than the parental strain; their activity against the mutant was synergistic, as opposed to additive for Rev1 (Table 2). We then sought to establish the optimal concentration of both antibiotics for Rev1 Δ wzm growth by monitoring the number of CFU in CM plates containing different amounts of vancomycin and colistin versus BAB. As shown in Fig. 1B, 10 μ g/mL of vancomycin combined with 4 μ g/mL of colistin yielded similar growth to that in BAB, and these concentrations were therefore used in the reformulated *Brucella* selective medium (BSM) (Table 3).

TABLE 1 *Brucella* strains used in this study^a

Strain	Characteristics	Origin
H38	<i>B. melitensis</i> bv1 virulent strain; S-LPS	IdAB-CSIC
16M	<i>B. melitensis</i> bv1 reference virulent strain; S-LPS	IdAB-CSIC
16M Δ wzm	16M in-frame deletion mutant in <i>wzm</i> ; R-LPS; polymyxin susceptible; internal O-PS	IdAB-CSIC
Rev1	<i>B. melitensis</i> bv1 reference vaccine strain; S-LPS	IdAB-CSIC
Rev1 Δ wzm	Rev1 in-frame deletion mutant in <i>wzm</i> ; R-LPS; polymyxin susceptible; internal O-PS	IdAB-CSIC
BoPA	<i>B. ovis</i> PA reference virulent strain; R-LPS	IdAB-CSIC
<i>B. canis</i>	<i>B. canis</i> RM6/66 virulent strain; R-LPS	IdAB-CSIC
2308	<i>B. abortus</i> bv1 reference virulent strain; S-LPS	IdAB-CSIC
S19	<i>B. abortus</i> bv1 reference vaccine strain; S-LPS	IdAB-CSIC
<i>B. abortus</i> bv1	<i>B. abortus</i> bv1 field isolates ($n = 5$) and 2308 from different origins ($n = 3$)	LCSA and IdAB-CSIC
<i>B. abortus</i> bv3	<i>B. abortus</i> bv3 field isolate; S-LPS	LCSA
RB51	<i>B. abortus</i> bv1 commercial vaccine strain; R-LPS	LCSA
<i>B. suis</i> bv1	<i>B. suis</i> bv1 1330 reference virulent strain; S-LPS	LCSA
<i>B. suis</i> bv2	<i>B. suis</i> bv2 field isolate; S-LPS	LCSA

^aS-LPS, smooth lipopolysaccharide; R-LPS, rough lipopolysaccharide; IdAB-CSIC, Instituto de Agrobiotecnología (CSIC-Gobierno de Navarra); LCSA, Laboratorio Central de Sanidad Animal–National Reference Laboratory of Brucellosis (Santa Fe, Granada, Spain).

Performance of BSM for the isolation of *B. melitensis*. (i) **BSM improves the growth of 16M, 16M Δ wzm, and Rev1 Δ wzm versus FM and CM.** To assess the performance of BSM, we determined the survival of different *B. melitensis* strains in this medium versus BAB, using FM and CM as reference media. As shown in Fig. 2A, BSM enabled the growth of all these *B. melitensis* strains at the levels of BAB, improving ($P \leq 0.001$) the growth observed in the other two selective media, except for Rev1, which grew similarly in both BSM and CM. In detail, BSM yielded >90% recovery of 16M, 16M Δ wzm, and Rev1 Δ wzm in contrast to the 67, 65, and 19% bacterial survival in CM, respectively. Moreover, BSM allowed faster bacterial growth than CM, as Rev1 Δ wzm reached the same homogeneous colonial size (1 to 1.2 mm in diameter) in BSM as in BAB at 5 days of incubation compared to the 7 days of culture required to yield visible colonies in CM (Fig. 2B).

(ii) **BSM inhibits the growth of contaminant microorganisms as effectively as CM and FM.** The ability of BSM to inhibit contaminant microorganisms was determined with a collection of 15 bacterial species recruited from field veterinary samples (Table 4). Like CM, BSM totally inhibited the growth of 12 contaminant microorganisms at concentrations as high as 10^8 to 10^{10} CFU/mL, even after 14 days of incubation. Long storage of both selective media plates for 8 weeks at 4°C caused a progressive loss of inhibition for *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus vulgaris*.

Also, a total of 1,789 field sheep samples (swabs and tissue homogenates in phosphate-buffered saline [PBS]) were cultured in BSM, CM, and/or FM using BAB as a control. The results indicated that BSM was as inhibitory as FM and CM for accompanying

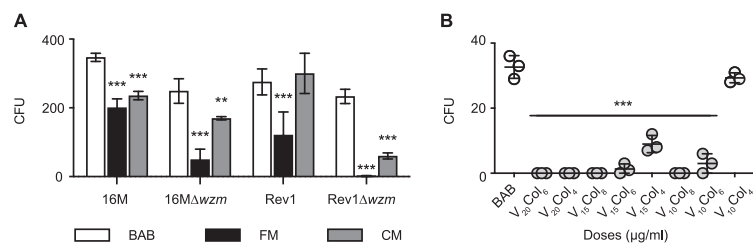


FIG 1 Growth of *B. melitensis* strains in selective Farrell's medium (FM) and CITA culture medium (CM). (A) Number of CFU counted in Blood Agar Base No. 2 (BAB; control), FM, and CM by triplicate seeding 100 μ L of a suspension containing ≈ 300 CFU of the corresponding *Brucella* strain, and plates incubation at 37°C for 14 days. The results are presented as mean numbers of CFU \pm the SD ($n = 3$). (B) Number of CFU of Rev1 Δ wzm in BAB and CM modified with different concentrations of vancomycin (V) and colistin (Co) (means \pm the SD; $n = 3$). A Fisher least significant difference (LSD) test was performed (***, $P \leq 0.001$; **, $P \leq 0.01$) versus the BAB control.

TABLE 2 Susceptibility of Rev1 Δ wzm and Rev1 to the antibiotics of CM

Strain	Antibiotic	Antimicrobial activity			
		Individual MIC/ MBC ₉₀ (μ g/mL)	Combined MIC (μ g/mL)	Σ FIC ^a	Effect ^b
Rev1 Δ wzm	Vancomycin	320/640	40	0.37	Sinergy
	Colistin	46.9/93.8	11.7	0.37	Sinergy
	Nitrofurantoin	160/160	ND	ND	ND
Rev1	Vancomycin	640/640	320	1.00	Additive
	Colistin	93.8/187.5	46.9	1.00	Additive
	Nitrofurantoin	160/160	ND	ND	ND

^aFIC, fractional inhibitory concentration index.

^b Σ FIC < 0.5: synergy, Σ FIC = 0.5–1: additive. ND, not determined.

bacteria and fungi. In fact, we only detected contamination in 5.3% of BSM or CM and 4% of FM plates. The microorganisms occasionally found were identified by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) as *Aerococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Roseomonas mucosa*, *Corynebacterium freneyi*, *Corynebacterium xerosis*, and *Ochrobactrum intermedium*.

(iii) BSM improves the primary isolation of 16M Δ wzm and Rev1 Δ wzm in comparison to CM. The performance of BSM versus CM was assessed by duplicate culture of the 1,789 field samples from sheep inoculated with 16M Δ wzm (391 samples), Rev1 Δ wzm (1,111 samples), H38 (75 samples), or *B. ovis* PA (212 samples). The two culture media provided similar total numbers of CFU for *B. ovis* (4,716 in BSM versus 4,611 in CM) and H38 (1,644 in BSM versus 1,626 in CM), but BSM improved the detection of Rev1 Δ wzm and 16M Δ wzm in comparison with CM (Table 5 and Fig. 3). As shown in Table 5, the mutants were found in a total of 100 samples, which were positive in at least one culture medium; 90 were positive in BSM and 74 in CM, 64 being positive in both media. A total of 90/100 samples provided from 1 to 650 CFU/plate, the results being readily quantifiable; 80 of the samples were positive in BSM and 64 in CM. Moreover, subtracting the number of samples positive in BSM from the number of samples positive in both media (Table 5) revealed that 26/90 (28.9%) samples (12 of Rev1 Δ wzm and 14 of 16M Δ wzm) would have been assumed negative if using only CM. In fact, BSM allowed the growth of more CFU/plate than CM ($P \leq 0.05$) when comparing paired individual samples (Fig. 3A), which was also demonstrated ($P \leq 0.001$) by the total number of CFU in BSM versus CM (Fig. 3B); this difference indicates that BSM improved the productivity of CM by 78.2% for Rev1 Δ wzm and 37.2% for

TABLE 3 Composition of FM, CM, and the novel *Brucella* selective medium (BSM) and BruSIC selective solid media

Component	FM	CM	BSM	BruSIC
Base ^a	BAB	BAB	BAB	BAB
Supplement ^b	5% NBCS	5% NBCS	5% NBCS	1 g/L activated charcoal
Antimicrobials	FM lyophilized supplement ^c	Drugs individually weighed and properly diluted ^d	New lyophilized supplement ^e	New lyophilized supplement
Antibiotics	V ₂₀ Px ₅ Nx ₅ Bac ₂₅	V ₂₀ in ultrapure water Col _{7.5} in ultrapure water Nitro ₁₀ in DMF	V ₁₀ Col ₄ Nitro ₁₀	V ₁₀ Col ₄ Nitro ₁₀
Antifungals	Nysta ₁₀₀ Cyclo ₁₀₀	Nysta ₁₀₀ in methanol AmphoB ₄ in DMSO	Nysta ₁₀₀ AmphoB ₄	Nysta ₁₀₀ AmphoB ₄

^aBAB, Blood Agar Base No. 2, at 40 g/L diluted in ultrapure water.

^b5% NBCS (newborn calf serum) at 50 mL/L or activated charcoal powder at 1 g/L.

^cFM lyophilized antimicrobial supplement (commercial) were diluted in ultrapure water and contained V₂₀ (20 mg/L of vancomycin), Px₅ (5,000 IU/L of polymyxin B), Nx₅ (5 mg/L of nalidixic acid), Bac₂₅ (25,000 IU/L of bacitracin), Cyclo₁₀₀ (100 mg/L of cycloheximide), and Nysta₁₀₀ (100,000 IU/L of nystatin).

^dCM antimicrobials were individually weighed and diluted in the corresponding solvent to obtain V₂₀ and Col_{7.5} (7.5 mg/L of colistin), both diluted in ultrapure water, Nitro₁₀ (10 mg/L of nitrofurantoin diluted in *N,N*-dimethylformamide [DMF]), AmphoB₄ (4 mg/L of amphotericin B diluted in dimethyl sulfoxide [DMSO]), and Nysta₁₀₀ (100,000 IU/L of nystatin diluted in methanol).

^eBSM and BruSIC lyophilized antimicrobial supplement (prepared for this study) were diluted in ultrapure water and contained V₁₀ (10 mg/L), Col₄ (4 mg/L), Nitro₁₀, Nysta₁₀₀, and AmphoB₄. For references to all products, see Materials and Methods.

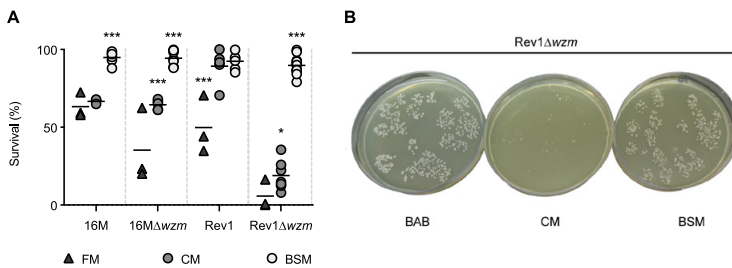


FIG 2 Growth of *B. melitensis* strains in FM, CM, and BSM. (A) Survival (%) versus BAB in each selective culture medium. Each symbol represents an independent experiment, and the horizontal bars indicate the mean value of the group. (B) Colonial size of Rev1Δwzm in BAB, CM, and BSM plates after 5 days of incubation at 37°C. A Fisher LSD test was performed (***, $P \leq 0.001$; *, $P \leq 0.05$) versus other culture media for a given strain.

16MΔwzm. Furthermore, 40/90 (44.4%) samples were classified in a higher category of infection in BSM than in CM, i.e., 23/48 (47.9%) of Rev1Δwzm samples and 17/42 (40.5%) of 16MΔwzm samples (Fig. 3C).

Development of the BruSIC medium to improve the isolation of different *Brucella* species. (i) BSM and CM inhibit the growth of *B. abortus* bv1 when freshly prepared, but not after 4 weeks of storage. After improving *B. melitensis* isolation in BSM, we compared the suitability of this medium for the growth of *B. abortus*, *B. ovis*, *B. suis*, and *B. canis* versus FM and CM (Fig. 4A). Except for *B. abortus*, the survival of all strains in BSM was similar to or better than in FM or CM. In fact, all three media improved the CFU recovery of *B. suis* and *B. canis* by >80% versus BAB, whereas the growth of *B. ovis* PA was higher in BSM and CM (98%) than in FM (41.9%). Strain *B. ovis* PA required at least 12 days of incubation to yield the total CFU, since only <3 CFU/plate of *B. ovis* PA were found at 1 week of incubation in FM.

Unexpectedly, *B. abortus* 2308, S19 and RB51 suffered a significant inhibition of growth in the three selective media versus BAB (Fig. 4A). The inhibition was more marked for RB51 than for strains 2308 and S19 in FM, complete for strains 2308 and S19 in BSM and CM, and RB51 grew better in BSM than in CM or FM. After performing repeated independent experiments to confirm these findings, we observed that inhibition of strain 2308 also occurred in a 10% CO₂ incubation atmosphere (not shown), but not in BSM and CM plates stored at 4°C and used 8 weeks after preparation. To verify this result, we cultured eight additional *B. abortus* bv1 strains and one bv3 field strain (Table 1) in both BSM and CM, which were used either fresh (≤ 1 week after

TABLE 4 Inhibition of bacterial contaminants isolated from real veterinary samples in BSM and CM

Strain	Bacterial (CFU/mL) ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	1×10^{10}
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1×10^{10}
<i>Enterococcus faecalis</i>	1×10^{10}
<i>Staphylococcus aureus</i>	1×10^{10}
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1×10^{10}
<i>Citrobacter freundii</i>	1×10^9
<i>Escherichia coli</i>	1×10^9
<i>Salmonella enterica</i>	1×10^9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$10^8 - 10^9$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$10^8 - 10^9$
<i>Enterobacter cloacae</i>	$10^8 - 10^9$
<i>Proteus vulgaris</i>	1×10^8
<i>Proteus mirabilis</i>	NI
<i>Serratia liquefaciens</i>	NI
<i>Hafnia alvei</i>	NI

^aBacterial concentration totally inhibited in both BSM and CM. NI, no inhibition at 1×10^3 CFU/mL.

TABLE 5 Duplicate culturing in BSM and CM of field samples from sheep at different status or free of infection, after experimental inoculation with *B. melitensis* 16M Δ wzm or Rev1 Δ wzm mutants

Strain	No. of samples								
	Cultured in both media	Positive ^a				Showing 1 to 650 CFU/plate ^b			
		BSM	CM	In both media	In at least one medium ^c	BSM	CM	In both media	In at least one medium ^c
Rev1 Δ wzm	1,111	50	38	38	50	48	36	36	48
16M Δ wzm	391	40	36	26	50	32	28	18	42
Total	1,502	90	74	64	100	80	64	54	90

^aSamples with at least 1 CFU/plate.^bExcluding positive samples yielding >650 CFU/plate.^cTotal number of positive samples for each *Brucella* strain.

preparation) or long-stored (≥ 8 weeks after preparation) (Fig. 4B). Interestingly, while *B. abortus* bv3 exhibited >74% survival in both media regardless of plate storage time, all *B. abortus* bv1 strains were significantly more inhibited in fresh versus long-stored plates, more markedly in CM than in BSM (Fig. 4B).

To understand the reasons for this inhibition, we determined whether the BSM antibiotics were inactivated after 4 weeks of storage in the absence of water loss. For this, we compared the growth of strain 2308 in a liquid medium (tryptic soy broth [TSB]) supplemented with the BSM antibiotics, either freshly prepared or after 1 month of storage. The results showed the same loss of inhibition for strain 2308 as in BSM plates (data not shown). Likewise, the pH values (7 to 7.5) of BSM and CM plates did not change during the 4-week storage period studied. Subsequently, considering the high susceptibility to polymyxin B reported for some *B. abortus* strains (29), we studied the MIC of colistin for strain 2308, determining that it was 15.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. This value was considerably lower than that obtained for Rev1 Δ wzm (46.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$), which explains at least partially the observed inhibition. To shed more light on this finding, we examined the effect of plate storage on colistin activity, confirming that strain 2308 was inhibited in fresh BAB-S supplemented with 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of this antibiotic, but its survival increased weekly during storage (Fig. 4C). Nevertheless, we also observed that reduced doses or even total removal of colistin from BSM did not prevent strain 2308 inhibition in fresh plates (not shown), suggesting a possible interaction of the antibiotic and/or the strain with other antibiotics or components of BSM.

(ii) The replacement of BSM serum by activated charcoal in BruSIC allows normal growth of *B. abortus* bv1 and promotes early development of *Brucella* colonies.

To understand whether the inhibition of *B. abortus* 2308 was due to charge instability, we studied the effect of replacing BSM serum with activated charcoal, as

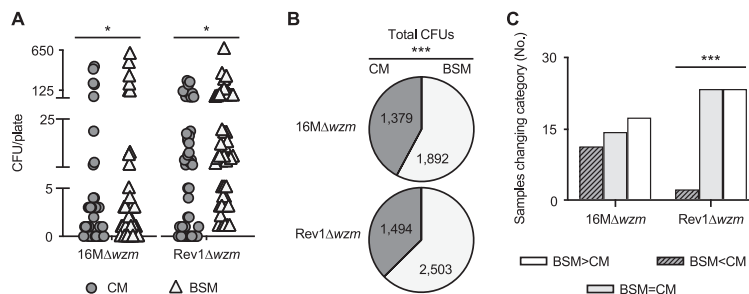


FIG 3 Performance of BSM versus CM for the isolation of *B. melitensis* 16M Δ wzm and Rev1 Δ wzm mutants from sheep samples cultured in duplicate in both selective media. A total of 90 plates containing ≤ 650 CFU/plate of 16M Δ wzm ($n = 42$) or Rev1 Δ wzm ($n = 48$) was selected for comparison purposes. (A) Individual counts per plate. (B) Total number of CFU. (C) Numbers of samples in which BSM increased (>), maintained (=), or reduced (<) the infection category. A paired *t* test (panel A) or a chi-squared test (panels B and C) was performed (***, $P \leq 0.001$; *, $P \leq 0.05$) between selective culture media for a given strain.

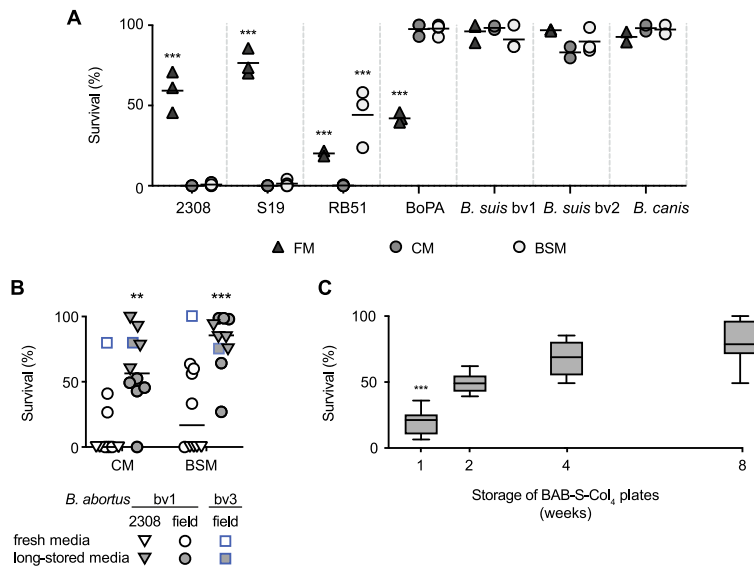


FIG 4 Survival of *Brucella* strains in selective culture media. (A) Survival of *B. abortus*, *B. ovis* PA, *B. suis*, and *B. canis* strains in FM, CM, and BSM versus the BAB control (or BAB-S for BoPA). Each symbol represents an independent experiment, and the horizontal bars are the mean values of the group. (B) Strains of *B. abortus* bv1 2308 from different origins (triangles; $n = 4$) or field isolates (circles; $n = 5$) and a bv3 field isolate (squares) grown in CM and BSM versus the BAB control, using either fresh media (within 1-week of preparation) or after long-term storage (8 weeks at 4°C). Each symbol represents one strain (by triplicate counting), and the horizontal bars are the mean value of the group ($n = 10$). (C) *B. abortus* bv1 2308 in BAB-S supplemented with 4 mg/L of colistin (BAB-S-Col₄) versus the BAB control and used at different intervals from 1 to 8 weeks after storage at 4°C. Boxes represent the two central quartiles, the 10th to 90th percentile and the median of 6 to 9 replicates. A Fisher LSD test was performed (***, $P \leq 0.001$; **, $P \leq 0.01$) versus other media or experimental conditions for a given strain.

reported for other bacteria (30), since the negative surface of this component can interact with the cationic nature of polymyxins (31). In the presence of 1 to 4 g/L of activated charcoal, but not at lower concentrations, *B. abortus* 2308 grew at the levels of BAB. Accordingly, we selected 1 g/L for the new *BruSIC* medium (Table 3), since this concentration also allowed a clear identification of the *Brucella* morphology through mildly translucent blackish plates. We systematically found a similar number of strain 2308 CFU in fresh *BruSIC* and in BAB, with a successful inhibition of veterinary sample contaminant microorganisms in the former (Fig. 5A).

After solving the problem of *B. abortus* bv1 inhibition by the use of activated charcoal, we verified that *BruSIC* performed as effectively as BAB for the isolation of brucellae previously inhibited in other selective media, i.e., *B. abortus* 2308, S19, and RB51; *B. ovis* PA; and *B. melitensis* H38, 16M, Rev1, 16M Δ wzm, and Rev1 Δ wzm (Fig. 5B). Moreover, *B. abortus*, *B. melitensis*, and *B. ovis* colonies grew faster in *BruSIC* than in BSM, providing a homogeneous size as in BAB at 2 to 4 days post-incubation. Interestingly, *BruSIC* allowed the normal growth of *B. ovis* PA, proving that activated charcoal can be a functional substitute for serum in *Brucella* selective media.

Besides inhibiting the bacterial contaminants as effectively as BSM, *BruSIC* successfully inhibited ($P \leq 0.001$ versus BAB) the microorganisms from 61 ovine and 20 bovine field samples (tissues or milk) at an equivalent level to BSM (6/81 versus 11/81 contaminated plates; Table 6).

DISCUSSION

Before starting safety experiments on *Brucella* infection in the natural host, the suitability of the selective culture media must be assessed to avoid biased results, such as

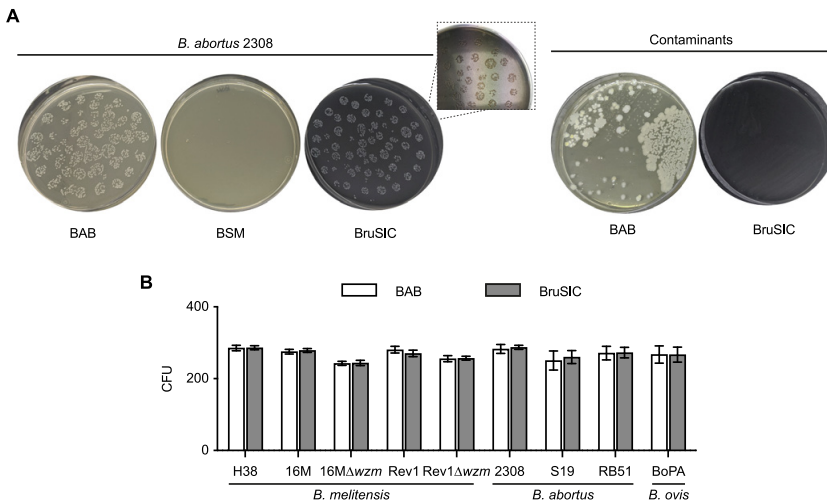


FIG 5 Productivity of *BruSIC* for the isolation of different *Brucella* strains showing inhibition in other selective media. (A) Representative images of *B. abortus* bv1 strain 2308 grown in fresh BAB, BSM, and *BruSIC* plates after 3 days of incubation (left) and successful inhibition of contaminant microorganisms from sheep milk samples in *BruSIC* versus BAB (right). (B) Numbers of CFU determined by plating (100 μ L, triplicate) in *BruSIC* versus BAB (or BAB-S for BoPA) after 4 days of incubation. The results represent the mean CFU \pm the SD ($n = 3$) counted in each culture medium.

false negatives or misclassified levels of infection. Accordingly, the initial aim of this study was to evaluate the growth of two *B. melitensis* R-LPS mutants in the recommended selective culture media FM and CM (1) due to their high susceptibility to polymyxins B and E (27, 28), which are present in FM and CM, respectively. As hypothesized, both FM and CM significantly inhibited the growth of both *B. melitensis* rough mutants, particularly Rev1 Δ wzm. It was also found that the inhibition of Rev1 Δ wzm in CM was related not only to colistin susceptibility but also to a synergistic effect between this polymyxin and vancomycin. As previously suggested, the synergy was probably due to vancomycin having increased access in the presence of colistin (32). The inhibitory effect of colistin against *B. abortus* bv1 disappeared progressively during storage of CM, attributable to their degradation in the presence of oxygen (31).

Besides the expected inhibition of 16M, Rev1, and *B. ovis* PA in FM (17, 18), we found that the virulent reference strain *B. melitensis* 16M was also inhibited in CM. Since this can influence the accuracy of results in natural hosts, CM should be modified, as has been done with FM for use in sheep (33). Overall, the different degrees of inhibition observed for *B. melitensis*, *B. abortus*, and *B. ovis* strains were in line with previous studies with FM (15, 17, 19, 34) or CM (35). All of these findings highlight the importance of medium composition when isolating a particular *Brucella* strain, even within the same species. The results prompted us to formulate BSM with half the doses of colistin and vancomycin found in CM, as shown in Table 3.

A validation experiment using a total of 1,789 sheep samples revealed that BSM selectivity matched that of CM, successfully inhibiting both fungal and bacterial contaminants, in agreement with previous reports (17, 19, 35–38). Although medium formulation is a key factor for the maximum isolation of *Brucella* from veterinary samples, other strategies—such as clean sampling and tracing the cultures on a daily basis (35), external disinfection of organ/lymph node samples, or the use of two combined culture media (1)—are also recommended practices. In addition, BSM improved the primary isolation of attenuated *B. melitensis* mutants, providing a higher number of CFU compared to CM in experimental conditions and allowing colony detection in sheep samples that otherwise would have been recorded as free of infection or misclassified in a lower category.

TABLE 6 Inhibition of contaminant microorganisms in BSM and *BruSIC* selective media using cultures of highly contaminated real veterinary samples

Sample	No. of contaminated plates ^a		
	BAB	BSM	<i>BruSIC</i>
Sheep tissues	19*	2	0
Sheep milk	42*	9	6
Cow milk	20*	0	0
Total	81*	11	6

^aSamples with at least 1 CFU/plate. *, $P \leq 0.001$ (Chi-square test) versus selective media. No significant differences were found between BSM and *BruSIC*.

Since significant inhibition of *B. abortus* bv1 in CM has not been reported before, we investigated its cause. On the one hand, we confirmed the previously described high susceptibility of *B. abortus* to colistin (29). Indeed, various studies focusing on polymyxin stability have reported physicochemical modifications and degradation over time (39–43). Also, these polycations are known to adhere to organic and inorganic materials, such as polystyrene plates (44, 45), as well as to exhibit slow diffusion through agar (43, 46). Furthermore, unpredictable compensatory mechanisms may be activated, involving interactions between medium components and bacterial dynamics (32). For example, the serum may exert a paradoxical effect on colistin activity, either synergistic or antagonistic, depending on the bacterial strain (47). However, susceptibility to colistin was not the only cause of inhibition, which was still observed after the reduction in concentration or even total removal. Interestingly, we found that *B. abortus* inhibition was directly related to the interval between the preparation and the use of CM and BSM plates. This finding may explain, at least partially, why this issue has not been reported previously. The consequences of storage should therefore be taken into consideration in procedures for primary isolation of *Brucella*, not only for the determination of field strains but also the evaluation of vaccine candidates.

To solve the problem of *B. abortus* bv1 inhibition, we designed the new *BruSIC* medium containing activated charcoal, whose key role as a radical and peroxide scavenger has been proposed in *Legionella* media, such as BCYE and GVPC (31, 48). In addition to a higher recovery of CFU, the activated charcoal promoted a faster growth of *Brucella* colonies in *BruSIC*, avoiding false-negative results arising from insufficient incubation, as described for *B. ovis* or *B. suis* cultures in FM (17, 19). Another previously proposed strategy to promote *Brucella* growth in selective culture media is the addition of enrichment components such as erythritol (34, 49). Interestingly, we observed that the substitution of calf serum by activated charcoal in *BruSIC* allowed the successful isolation of more demanding *Brucella* strains, such as *B. ovis* PA. It also resulted in a less costly medium, requiring less manipulation, and did not impair the straightforward identification of *Brucella* colonies. In addition, the use of activated charcoal (of plant origin) instead of calf serum (animal source) represents a sustainable alternative, promoting animal welfare and reducing diagnostic costs, an essential factor in brucellosis control.

This is not the first attempt to modify CM formulation to improve its productivity (38). However, by reducing the antibiotic concentration and incorporating activated charcoal in *BruSIC*, our strategy is preferable to the inclusion of alternative and/or additional antibiotics in selective media, as proposed in other studies (34, 38). The presence of multiple antimicrobials in selective culture media is a source of undetermined interactions among the components, favoring the emergence of resistant pathogens (50). Moreover, at the selected concentration of activated charcoal (1 g/L), *BruSIC* was as inhibitory as CM and BSM for microorganisms usually present in veterinary samples. It was also sufficiently translucent for bacteria to be visualized through the bottom of the plate and with the help of backlighting. Moreover, the bright *Brucella* colonies stood out clearly from the black background, allowing the category of infection of the

sample to be assigned at a glance. Higher concentrations of activated charcoal were considered unsuitable, since they allowed the growth of contaminant microorganisms and impaired the translucence for *Brucella* colony identification. These facts, together with the faster growth of all brucellae colonies in BruSIC than in FM, CM, and BSM, indicate that BruSIC can be highly recommended as an alternative medium (34, 37, 49). Activated charcoal has been occasionally used in bacterial culture due to its detoxifying properties (30, 51, 52), but to our knowledge it has never been applied for the identification of *Brucella*. The presence of activated charcoal in BruSIC had a positive action that could explain not only the stabilization of charges affecting antibiotic activity but also a detoxifying effect, allowing the growth of *B. ovis* PA in the absence of calf serum. Indeed, it has been suggested that activated charcoal can interact with reactive oxygen species secondarily generated by antibiotics or during medium preparation in a normal atmosphere, as well as with the positive charges of polymyxins and/or vancomycin, especially in the presence of oxygen (31). These free radicals could also partially degrade vancomycin, promoting the growth of the mildly resistant Gram-positive *E. faecalis* (31). Hence, the addition of activated charcoal would explain the stabilization of both colistin and vancomycin, which we observed exerted a synergistic effect against the R-LPS mutant.

Altogether, our results strongly support the use of BruSIC as a stable selective medium able to promote a faster growth of *Brucella*, including serum-dependent species, for primary isolation from veterinary field samples. In order to validate BruSIC, additional studies are being conducted in animal samples (organ tissues and milk) previously contaminated with brucellae in a blind manner, as well as in real field samples obtained from different animal species infected with *Brucella*.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria, medium preparation, and culture conditions. The *Brucella* strains and contaminant microorganisms used here are listed in Tables 1 and 4, respectively. All bacteria were stored at -20°C in 10% skimmed milk supplemented with 3% lactose (both PanReac AppliChem, Barcelona, Spain). Routine culturing was performed in Blood Agar Base No. 2 (BAB; catalog no. CM0271; Oxoid, Ltd., Hampshire, UK) for *Brucella* and in TSA prepared with trypticase soy broth (TSB; Condalab, Madrid, Spain) supplemented with 1.5% bacteriological agar (Pronadisa, Madrid, Spain) for contaminant bacteria. Liquid cultures were performed in TSB at 150 rpm and 37°C . When required, media were supplemented with 5% newborn calf serum (NBCS; Gibco, Auckland, New Zealand; BAB-S), activated charcoal powder (Omya Clariana, Spain), and/or the antimicrobial agents (all from Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) vancomycin (catalog no. V2002), colistin (catalog no. C1511), nitrofurantoin (catalog no. N7878), nystatin (catalog no. N3503), and amphotericin B (catalog no. A4888).

FM and CM were prepared in BAB-S, as described previously (17). FM was prepared with a commercially available lyophilized antimicrobial supplement (Oxoid, Ltd., catalog no. SR0083A, or Condalab, Madrid, Spain, catalog no. 6017) according to the manufacturer's instructions. For CM preparation, each antimicrobial agent was individually weighed and diluted at the desired concentrations in the appropriate solvent (Table 3), i.e., vancomycin and colistin in ultrapure water, nystatin in methanol (VWR Chemicals), nitrofurantoin in *N,N*-dimethylformamide (DMF; Sigma-Aldrich), and amphotericin B in dimethyl sulfoxide (DMSO; VWR Chemicals). BSM and BruSIC were prepared either with the antimicrobials prepared as for CM or, when available, with a lyophilized antimicrobial supplement specifically prepared for this work, and reconstituted in ultrapure water (10 mL/vial, 1 vial/500 mL of medium).

Bacterial suspensions were prepared in sterile phosphate-buffered saline solution (PBS [pH 7.2]; components from VWR Chemicals, Leuven, Belgium) by spectrophotometry adjustment (SmartSpec Plus Spectrophotometer, Bio-Rad, Hercules, CA) to 10^9 CFU/mL, as described elsewhere (53). The exact number of CFU/mL was determined retrospectively by six serial 10-fold dilutions in PBS (from 10^9 to 10^3 CFU/mL), plating (100 μL , in microdrops, triplicate) of the last two dilutions (containing $\approx 10^4$ and 10^3 CFU/mL, respectively), and incubation of plates at 37°C in normal air or under 10% CO_2 atmosphere, for 7 days in BAB and BAB-S or up to 14 days in selective culture media. Plates containing ≈ 100 CFU/100 μL (lower and upper limits of 30 to 300 CFU/100 μL) were used to calculate the mean CFU/mL \pm the standard deviations (SD; $n = 3$) or the numbers of CFU/100 μL . When indicated, the percentage of bacterial survival in the corresponding culture medium was determined versus BAB (or BAB-S for *B. ovis* PA) by seeding (as before) each of the seven 10-fold serial diluted bacterial suspensions, and incubation of plates at 37°C in a normal atmosphere (or 10% CO_2 , for *B. ovis* PA). Each experiment was performed at least twice independently.

Susceptibility of *B. melitensis* strains to FM and CM and to antibiotics. The inhibition of *B. melitensis* 16M, 16M Δ wzm, Rev1, and Rev1 Δ wzm strains was assessed by culturing (37°C , 7 days) ≈ 300 CFU/100 μL in triplicate in FM, CM, and the BAB control. The mean number of CFU \pm the SD ($n = 3$) for each bacterial strain in each culture medium was calculated as detailed above.

To determine the inhibition induced by the antibiotics in CM, individually and combined, we used the standard microdilution broth method, as described previously (27, 54), and chequerboard titration (55). Briefly, 2-fold serial dilutions of vancomycin (0.625 to 640 $\mu\text{g}/\text{mL}$), colistin (0.25 to 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and nitrofurantoin (0.625 to 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were prepared in cation-adjusted Müller-Hinton medium (M-H; BD, Heidelberg, Germany), immediately dispensed (100 $\mu\text{L}/\text{well}$) in 96-well polystyrene plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and mixed with an equal volume of bacterial suspension adjusted to optical density at 750 nm of 0.109 ($\approx 1.5 \times 10^9$ CFU/mL) and diluted 1:100 in M-H. Each concentration was analyzed in duplicate, and plain M-H wells with or without bacteria were used as controls. The minimum inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC_{90}) were determined after incubation (at 37°C for 48 to 72 h). The fractional inhibitory concentration index (ΣFIC) of the combined antibiotics was calculated as follows: $\Sigma\text{FIC} = (\text{MIC of antimicrobial A combined/alone}) + (\text{MIC of antimicrobial B combined/alone})$, and was interpreted as follows: synergy (<0.5), additive effect (0.5 to 1.0), indifferent action (1.1 to 2.0), or antagonism (>2.0) (55).

Definition of BSM and its performance with field sheep samples for the isolation of Rev1 Δwzm or 16M Δwzm . To formulate the BSM, ≈ 30 CFU/100 μL of Rev1 Δwzm were cultured in triplicate in CM prepared with different concentrations and combinations of vancomycin (20, 15 or 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and colistin (8, 6 or 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The mean CFU \pm the SD ($n = 3$) obtained in each culture medium and in BAB were calculated as described above.

Once the optimal concentrations of vancomycin and colistin for BSM were selected (Table 3), we assessed the bacterial survival of *B. melitensis* 16M, Rev1, 16M Δwzm , and Rev1 Δwzm in BSM, FM, and CM versus the BAB control. For this, we seeded (100 μL , in triplicate) each of the seven 10-fold serial dilutions of each strain suspension in each medium, and we calculated the mean CFU/mL \pm the SD ($n = 3$) in each medium and the percent bacterial survival versus BAB in at least three independent experiments, as described above.

The performance of BSM for the primary isolation of Rev1 Δwzm and 16M Δwzm mutants was determined by duplicate culturing (at 37°C for 14 days) of 1,502 samples from 141 experimentally infected sheep; CM and BAB were used as controls. The cultured samples were swabs impregnated in vaginal fluid, semen, milk, amniotic fluid, cotyledons, or fetuses, as well as in liver, spleen, seminal vesicle, epididymis, uterus, mammary gland, and lymph node tissues, all of which were obtained, processed, and homogenated in PBS as previously described (27). The identity of the presumptive 16M Δwzm and Rev1 Δwzm colonies was confirmed by subculturing them in BAB, and further analysis was carried out to differentiate Rev1 from 16M and to detect the deletion in *wzm* by PCR-RFLP and PCR-WZM, as previously described (27, 56). The number of CFU/plate was used to determine the percentage of increasing productivity as follows: $[(\text{CFU in medium A} - \text{CFU in medium B})/\text{CFU in medium B}] \times 100$. Also, plates were classified according to several infection categories: 0 (no CFU found), 1 (1 to 5 CFU), 2 (6 to 25 CFU), 3 (26 to 125 CFU), 4 (126 to 650 CFU), or 5 (>650 CFU), and the number of BSM plates classified in higher, equal, or lower infection categories than CM was also recorded. Also, the contaminant microorganisms found in selective media were identified by MALDI-TOF MS at the Services of the Universidad Complutense de Madrid (UCM) as described elsewhere (57) and used for selectivity studies.

The selectivity of BSM was determined by recording the number of contaminated plates after culturing a total of 1,789 veterinary sheep samples in duplicate in BSM and CM; 75 of them were also checked in FM.

Growth of other brucellae in BSM, FM, and CM. The percent bacterial survival of *B. abortus* bv1 2308, S19, and RB51, *B. suis* bv1 1330 and bv2, *B. ovis* PA, and *B. canis* RM6/66 (Table 1) was assessed in plates of BSM, FM, and CM versus BAB (or BAB-S for *B. ovis* PA). After observing the inhibition of *B. abortus* bv1 strains in BSM and CM, we performed a similar study with eight additional *B. abortus* bv1 and one bv3 field strains in both selective culture media, either freshly prepared (within 1 week) or after 8 weeks of storage at 4°C (long-stored media). We also determined the effect of incubation in a 10% CO_2 atmosphere by determining the percent survival of *B. abortus* 2308 in both BSM and CM versus BAB.

To elucidate the properties of BSM over time, we evaluated the medium pH (pH indicator strips; Merck, Darmstadt, Germany) after 1, 2, 3, and 4 weeks of plate storage at 4°C. Also, changes in medium properties due to dehydration were analyzed by determining the MIC of the antimicrobials in BSM for *B. abortus* 2308 by the microdilution broth method described above, with some modifications. Briefly, the antimicrobials were added to TSB or TSB-S, which were used freshly prepared or after 4 weeks of storage, at the same concentration as in the solid selective medium and at 2-fold dilutions; Rev1 was used as a control of noninhibition.

Thereafter, we evaluated the susceptibility of *B. abortus* bv1 strain 2308 to 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ colistin during the storage time by determining the percent bacterial survival in BAB-S plates with colistin at 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (BAB-S-Col₄), either freshly prepared (within 1 week) or after 2, 4, and 8 weeks of storage at 4°C. In addition, strain 2308 dilutions were cultured in fresh BSM containing 3, 2, 1, 0.5, or 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of colistin.

In all these experiments, the percent bacterial survival was determined as detailed above by culturing seven bacterial suspensions of the corresponding strain prepared by 10-fold serial dilutions in each culture medium versus BAB (or BAB-S for *B. ovis* PA) in at least two independent experiments.

Definition and performance of BruSIC. To solve the problem of *B. abortus* bv1 inhibition, we tested activated charcoal powder diluted at different concentrations (from 0.1 to 4 g/L) in BAB supplemented with the mix of antimicrobials selected for BSM and in the absence of NBCS. The percentage of strain 2308 survival was determined by seeding seven 10-fold serial dilutions in each culture medium versus BAB, as detailed above.

Finally, BruSIC was formulated with 1 g/L of activated charcoal. To assess its productivity, the growth of *B. melitensis* H38, 16M, Rev1, 16M Δwzm , and Rev1 Δwzm strains, *B. abortus* 2308, S19, and RB51 strains,

and *B. ovis* PA strains was assessed by triplicate plating of ≈ 300 CFU/100 μ L in BruSIC and BAB (or BAB-5 for *B. ovis* PA). The mean number of CFU \pm the SD ($n = 3$) for each strain grown in each culture medium was determined as described above.

The ability of BruSIC and BSM to inhibit contaminant microorganisms was analyzed with a laboratory collection of 15 bacteria isolated from veterinary samples (Table 4), as well as with highly contaminated real field samples (swabs and tissue homogenates). For contaminant bacteria, seven 10-fold dilutions of each overnight culture at 37°C in TSB ($\approx 10^{10}$ CFU/mL) were seeded (100 μ L/plate, triplicate; 37°C, 14 days) in CM, BSM, and BruSIC versus TSA control plates, used either freshly prepared or after storage at 4°C for 1, 2, 3, 4, 8, or 12 weeks; the highest completely inhibited bacterial concentration was recorded. For real veterinary samples, a total of 81 samples from *Brucella*-free sheep (milk $n = 42$ and tissues $n = 19$) or cows (milk $n = 20$) were cultured in BruSIC, BSM, and BAB to determine the inhibition of contaminant microorganisms in each medium, recording the number of contaminated plates in each culture medium.

Statistical analysis and graphical representation. Statistical analysis and graphical representations were performed with Prism 8.4.0 software (GraphPad, Inc., San Diego, CA). Significance was determined by using a chi-square test, a paired one-tailed Student *t* test, or one- or two-way analysis of variance, followed by a Fisher least significant difference test with 95% confidence intervals, according to data classification. The final figures were assembled using the GNU Image Manipulation Program v. 2.10 (GIMP, open source, www.gimp.org) and Illustrator 2020 (Adobe, San José, CA).

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the Department of Industry of the Gobierno de Navarra (PT068-2018 and PT007-2019) and Agencia Estatal de Investigación of the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (AGL2014-58795-C4-2-R and RTI2018-098658-B-C21). The contract of S.M.-B. was granted by a UPNA 2018-2022 predoctoral fellowship, and that of I.P.-U. was granted by the Doctorados Industriales program of the Gobierno de Navarra cofunded by CSIC. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

We thank the staff of Laboratorio Central de Sanidad Animal (LCSA; Granada, Spain) for supplying some of the strains, and the staff of VISAVET (UCM, Madrid, Spain) and INTIA (Navarra Government, Spain) for their veterinary assistance and/or support in obtaining animal samples.

We declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES

- Office International of Epizooties, World Organization for Animal Health. 2018. Chapter 3.1.4: brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis*, and *B. suis*) (infection with *B. abortus*, *B. melitensis*, and *B. suis*). In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, 8th ed. World Organization for Animal Health, Paris, France.
- Felsenfeld O, Young VM, Loeffler E, Ishihara SJ, Schroeder WF. 1951. A study of the nature of brucellosis in chickens. *Am J Vet Res* 12:48–54.
- Kuzdas CD, Morse EV. 1953. A selective medium for the isolation of brucellae from contaminated materials. *J Bacteriol* 66:502–504. <https://doi.org/10.1128/jb.66.4.502-504.1953>.
- Renoux G. 1954. A selective medium for isolation of *Brucella melitensis*. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 87:325–333.
- Mair NS. 1955. A selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from herd samples of milk. *Mon Bull Minist Health Public Health Lab Serv* 14:91.
- Morris EJ. 1956. A selective medium for *Brucella* spp. *J Gen Microbiol* 15: 629–631. <https://doi.org/10.1099/00221287-15-3-629>.
- Jones LM, Morgan WJB. 1958. A preliminary report on a selective medium for the culture of *Brucella*, including fastidious types. *Bull World Health Organ* 19:200–203.
- Thayer JD, Martin JE. 1966. Improved medium selective for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. *Public Health Rep* 81:559–562. <https://doi.org/10.2307/4592771>.
- Brinley Morgan WJ. 1960. Comparison of various media for the growth and isolation of *Brucella*. *Res Vet Sci* 1:47–52. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)35028-8](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)35028-8).
- Ryan W. 1967. A selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from milk. *Mon Bull Minist Health Public Health Lab Serv* 1967:33–38.
- Farrell ID. 1974. The development of a new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from contaminated sources. *Res Vet Sci* 16: 280–286. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)33726-3](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)33726-3).
- Ewalt DR, Packer RA, Harris SK. 1983. An improved selective medium for isolating *Brucella* species from bovine milk. *Proc Int Symp Vet Lab Diagn* 3:577–578.
- Farrell ID, Robertson L. 1972. A comparison of various selective media, including a new selective medium for the isolation of brucellae from milk. *J Appl Bacteriol* 35:625–630. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1972.tb03744.x>.
- Bowden RA, Verger JM, Grayon M, Limet JN, Dubray G. 1993. Simultaneous expression of smooth and rough phase properties related to lipopolysaccharide in a strain of *Brucella melitensis*. *J Med Microbiol* 39: 363–370. <https://doi.org/10.1099/00222615-39-5-363>.
- Marín CM, Alabart JL, Blasco JM. 1996. Effect of antibiotics contained in two *Brucella* selective media on growth of *Brucella abortus*, *B. melitensis*, and *B. ovis*. *J Clin Microbiol* 34:426–428. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.2.426-428.1996>.
- Verger JM, Grayon M, Zundel E, Lechopier P, Olivier-Bernardin V. 1995. Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against a *Brucella melitensis* experimental infection in pregnant ewes. *Vaccine* 13:191–196. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(95\)93135-V](https://doi.org/10.1016/0264-410X(95)93135-V).
- De Miguel MJ, Marín CM, Muñoz PM, Dieste L, Grilló MJ, Blasco JM. 2011. Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *J Clin Microbiol* 49:1458–1463. <https://doi.org/10.1128/JCM.02301-10>.
- Marín CM, Jiménez de Bugués MP, Barberán M, Blasco JM. 1996. Comparison of two selective media for the isolation of *Brucella melitensis* from naturally infected sheep and goats. *Vet Rec* 138:409–411. <https://doi.org/10.1136/vr.138.17.409>.
- Vicente AF, Antunes JMAP, Lara GHB, Mioni MSR, Allendorf SD, Peres MG, Apolinário CM, Listoni FJP, Ribeiro MG, Megid J. 2014. Evaluation of three formulations of culture media for isolation of *Brucella* spp. regarding their ability to inhibit the growth of contaminating organisms. *Biomed Res Int* 2014:702072. <https://doi.org/10.1155/2014/702072>.

20. Martínez de Tejada G, Pizarro-Cerdá J, Moreno E, Moriyón I. 1995. The outer membranes of *Brucella* spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. *Infect Immun* 63:3054–3061. <https://doi.org/10.1128/iai.63.8.3054-3061.1995>.
21. Wang Z, Bie P, Cheng J, Lu L, Cui B, Wu Q. 2016. The ABC transporter YejA-BEF is required for resistance to antimicrobial peptides and the virulence of *Brucella melitensis*. *Sci Rep* 6:31876. <https://doi.org/10.1038/srep31876>.
22. Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, Oliveira SC. 2006. *Brucella* spp. non-canonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb Cell Fact* 5:1–11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-13>.
23. Freer E, Pizarro-Cerdá J, Weintraub A, Bengoechea JA, Moriyón I, Hultenby K, Gorvel JP, Moreno E. 1999. The outer membrane of *Brucella ovis* shows increased permeability to hydrophobic probes and is more susceptible to cationic peptides than are the outer membranes of mutant rough *Brucella abortus* strains. *Infect Immun* 67:6181–6186. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.11.6181-6186.1999>.
24. Freer E, Moreno E, Moriyón I, Pizarro-Cerdá J, Weintraub A, Gorvel JP. 1996. *Brucella-Salmonella* lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than are their native *Brucella* sp. counterparts. *J Bacteriol* 178:5867–5876. <https://doi.org/10.1128/jb.178.20.5867-5876.1996>.
25. Wang Z, Wang J, Cheng J, Yang X, Jiang H, Wu Q. 2021. Genome-wide analysis of the response of *Brucella melitensis* NI to polymyxin B. *Curr Pharm Biotechnol* 22:1891–1899. <https://doi.org/10.2174/1389201021666201218125148>.
26. Sola-Landa A, Pizarro-Cerdá J, Grilló MJ, Moreno E, Moriyón I, Blasco JM, Gorvel JP, López-Goñi I. 1998. A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol Microbiol* 29:125–138. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00913.x>.
27. Mena-Bueno S, Poveda-Urkixo I, Irazoki O, Palacios L, Cava F, Zabalza-Baranguá A, Grilló MJ. 2022. *Brucella melitensis* Wzm/Wzt system: changes in the bacterial envelope lead to improved Rev1Δwzm improved vaccine properties. *Front Microbiol* 13:908495. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.908495>.
28. Monreal D, Grilló MJ, González D, Marín CM, de Miguel MJ, López-Goñi I, Blasco JM, Cloeckaert A, Moriyón I. 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* 71:3261–3271. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3261-3271.2003>.
29. Jensen AE, Halling SM. 2010. Effect of polymyxin B and environmental conditions on isolation of *Brucella* species and the vaccine strain RB51. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33:121–131. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2008.08.005>.
30. Daly JG, Stevenson RMW. 1985. Charcoal agar, a new growth medium for the fish disease bacterium *Renibacterium salmoninarum*. *Appl Environ Microbiol* 50:868–871. <https://doi.org/10.1128/aem.50.4.868-871.1985>.
31. Casino P, López A, Peiró S, Ríos M, Ríos S, Porta A, Agustí G, Asensio D, Marqués A, Piqué N. 2022. GVPC medium manufactured without oxygen improves the growth of *Legionella* spp. and exhibits enhanced selectivity properties. *Microbiol Spectr* 10:27–31. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02401-21>.
32. Roemhild R, Bollenbach T, Andersson DI. 2022. The physiology and genetics of bacterial responses to antibiotic combinations. *Nat Rev Microbiol* 20:478–490. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00700-5>.
33. Barrio MB, Grilló MJ, Muñoz PM, Jacques I, González D, De Miguel MJ, Marín CM, Barberán M, Letesson JJ, Gorvel JP, Moriyón I, Blasco JM, Zygmunt MS. 2009. Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less effective than Rev 1 vaccine against *Brucella melitensis* infection of sheep. *Vaccine* 27:1741–1749. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.025>.
34. Her M, Cho DH, Kang S, Cho YS, Hwang IY, Bae YC, Yoon H, Heo YR, Jung SC, Yoo H. 2010. The development of a selective medium for the *Brucella abortus* strains and its comparison with the currently recommended and used medium. *Diagn Microbiol Infect Dis* 67:15–21. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.12.013>.
35. Karagül MS, İkiz S. 2017. Comparison of the isolation and inhibition abilities of selective media used for *Brucella* spp. isolation. *Turk J Vet Anim Sci* 41:781–786. <https://doi.org/10.3906/vet-1701-50>.
36. De Nardi Júnior G, Megid J, Ferreira VA, Paganini LF, Morato MF, Batista LG, Garcia MR, Mungai CM, Garcia RM. 2015. Comparison of brucella agar, CITA, and Farrell media for selective isolation of *Brucella abortus* from semen of bovine bulls. *Afr J Microbiol Res* 9:617–620.
37. Karagül MS, İkiz S. 2018. The evaluation of *Brucella* spp. isolation rates in ruminant abortion cases by using different selective media. *Maced Vet Rev* 41:177–186. <https://doi.org/10.2478/macvetrev-2018-0024>.
38. Ledwaba MB, Nduumgo OC, Matle I, Gelaw AK, Van Heerden H. 2020. Investigating selective media for optimal isolation of *Brucella* spp. in South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 87:1–9.
39. Orwa JA, Govaerts C, Gevers K, Roets E, Van Schepdael A, Hoogmartens J. 2002. Study of the stability of polymyxins B1, E1 and E2 in aqueous solution using liquid chromatography and mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 29:203–212. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(02\)00016-X](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(02)00016-X).
40. Taylor RB, Richards RME, Low AS, Hardie L. 1994. Chemical stability of polymyxin B in aqueous solution. *Int J Pharm* 102:201–206. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)90056-6).
41. Li J, Milne RW, Nation RL, Turnidge JD, Coulthard K. 2003. Stability of colistin and colistin methanesulfonate in aqueous media and plasma as determined by high-performance liquid chromatography. *Antimicrob Agents Chemother* 47:1364–1370. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1364-1370.2003>.
42. He J, Figueroa DA, Lim PT, Chow DS, Tam VH. 2010. Stability of polymyxin B sulfate diluted in 0.9% sodium chloride injection and stored at 4 or 25°C. *Am J Health Syst Pharm* 67:1191–1194. <https://doi.org/10.2146/ajhp090472>.
43. Ezadi F, Ardebili A, Mirnejad R. 2019. Antimicrobial susceptibility testing for polymyxins: challenges, issues, and recommendations. *J Clin Microbiol* 57:e01390-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.01390-18>.
44. Karvanen M, Malmberg C, Lagerbäck P, Friberg LE, Cars O. 2017. Colistin is extensively lost during standard *in vitro* experimental conditions. *Antimicrob Agents Chemother* 61:1–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.00857-17>.
45. Sharafi T, Ardebili A. 2019. Plastic binding feature of polymyxins: the effect on MIC susceptibility measurements. *Infect Drug Resist* 12:2649–2653. <https://doi.org/10.2147/IDR.S219130>.
46. Hindler JA, Humphries RM. 2013. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 51:1678–1684. <https://doi.org/10.1128/JCM.03385-12>.
47. Davis SD, Iannetta A, Wedgwood RJ. 1971. Paradoxical synergism and antagonism between serum and the antibacterial activity of colistin. *J Infect Dis* 123:392–398. <https://doi.org/10.1093/infdis/123.4.392>.
48. Ditommaso S, Giacomuzzi M, Memoli G, Garlasco J, Zotti CM. 2021. Comparison of BCYE α +AB agar and MWY agar for detection and enumeration of *Legionella* spp. in hospital water samples. *BMC Microbiol* 21:48–46. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02109-1>.
49. Karagül MS. 2019. Evaluation of adding erythritol to Farrell medium for primary isolation of the *Brucella melitensis* strains. *Kocatepe Vet J* 12:1–1. <https://doi.org/10.30607/kvj.494891>.
50. Larsson DGJ, Flach CF. 2022. Antibiotic resistance in the environment. *Nat Rev Microbiol* 20:257–269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>.
51. Pan MJ, Van Staden J. 1998. The use of charcoal in *in vitro* culture: a review. *J Plant Growth Regul* 26:155–163. <https://doi.org/10.1023/A:1006119015972>.
52. Álvarez B, Guijarro JA. 2007. Recovery of *Flavobacterium psychrophilum* viable cells using a charcoal-based solid medium. *Letts Appl Microbiol* 44:569–572. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02126.x>.
53. Grilló MJ, De Miguel MJ, Muñoz PM, Marín CM, Ariza J, Blasco JM. 2006. Efficacy of several antibiotic combinations against *Brucella melitensis* Rev 1 experimental infection in BALB/c mice. *J Antimicrob Chemother* 58:622–626. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl289>.
54. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2016. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST polymyxin breakpoints working group. EUCAST, Basel, Switzerland. <https://www.eucast.org>. Accessed 12 July 2021.
55. Mateu-de-António EM, Martín M. 1995. *In vitro* efficacy of several antimicrobial combinations against *Brucella canis* and *Brucella melitensis* strains isolated from dogs. *Vet Microbiol* 45:1–10. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)00122-d](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)00122-d).
56. Cloeckaert A, Grayon M, Grépinet O. 2002. Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP based on a mutation in the *rpsL* gene. *Vaccine* 20:2546–2550. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(02\)00159-7](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(02)00159-7).
57. Pérez-Sancho M, Cerdá I, Fernández-Bravo A, Domínguez L, Figueras MJ, Fernández-Garayzábal JF, Vela AI. 2018. Limited performance of MALDI-TOF for identification of fish *Aeromonas* isolates at species level. *J Fish Dis* 41:1485–1493. <https://doi.org/10.1111/jfd.12837>.



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Vaccine properties of *Brucella melitensis* 16MΔwzm and reactivation of placental infection in pregnant sheep

A. Zabalza-Baranguá^a, I. Poveda-Urkixo^a, S. Mena-Bueno^{a,b}, G.A. Ramírez^c, X. De Bolle^d, M.J. Grilló^{a,*}

^aInstituto de Agrobiotecnología (IdAB, CSIC-Gobierno de Navarra), 31192, Mutilva, Navarra, Spain

^bUniversidad Pública de Navarra (UPNA), 31006, Pamplona, Navarra, Spain

^cDepartamento de Ciencia Animal, Universidad de Lleida, 25198, Lleida, Spain

^dUnité de Recherche en Biologie des Micro-Organismes (URBM), University of Namur (UNamur), 5000, Namur, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 October 2022

Received in revised form 3 January 2023

Accepted 9 January 2023

Available online xxxx

Keywords:

Brucella melitensis

Vaccine

Serological response

Placental infection

Mice

Sheep

ABSTRACT

Brucellosis, a worldwide zoonotic disease, is endemic in many developing countries. Besides causing significant economic losses for the livestock industry, it has severe consequences for human health. In endemic regions, small ruminants infected by *Brucella melitensis* are the main source of human brucellosis. Rev1, the only vaccine currently recommended to control the disease in sheep and goats, has several drawbacks. Rough lipopolysaccharide (R-LPS) mutants have been tested as alternatives, but most lack efficacy. Those in the Wzm/Wzt system responsible for O-polysaccharide export to the periplasm have been proposed as promising vaccine candidates, although to date they have been scarcely investigated in the natural host. In the present work, we studied the biological properties of a 16MΔwzm in-frame deletion mutant, including its safety in pregnant mice and sheep. In mice, 16MΔwzm prevented placental and fetal infections before parturition and protected against *B. melitensis* and *Brucella ovis* infections. In sheep, 16MΔwzm was equally safe in lambs, rams, and non-pregnant ewes, inducing some transient Rose Bengal reactions (<7 weeks). The serological reactions occurred earlier and more strongly in pregnant than in non-pregnant ewes and were significantly reduced when conjunctival rather than subcutaneous vaccination was used. In ewes vaccinated at mid-pregnancy, 16MΔwzm was not shed in vaginal discharges during the pregnancy and did not induce abortions/stillbirths. However, some ewes showed a transitory reactivation of infection in placentas and/or milk at parturition, accompanied by a seroconversion in smooth LPS (S-LPS) and/or R-LPS tests. Overall, 16MΔwzm can be considered as a safe vaccine for lambs, rams, and non-pregnant ewes, but its use at mid-pregnancy should be avoided to prevent vaccine dissemination at parturition. If the efficacy results against *B. melitensis* and *B. ovis* observed in mice are confirmed by further studies in the natural host, 16MΔwzm could constitute a useful vaccine.

© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Brucellosis is a worldwide zoonotic disease that severely affects livestock productivity and human health. Small ruminants infected by *Brucella melitensis* are the main source of human brucellosis, which can only be prevented by eradicating the infection in animals [1,2]. The vaccine currently recommended for sheep and goats is Rev1 [3], which despite its efficacy has serious shortcomings: lack of safety in pregnant sheep/goats, infectivity for humans,

resistance to streptomycin, and interference with conventional brucellosis serological tests. Consequently, several studies have investigated alternatives to Rev1 [2,4].

O-polysaccharide (O-PS) is the most surface-exposed moiety of smooth-lipopolysaccharide (S-LPS) and acts as the immunodominant antigen in serological tests [5]. It enhances pathogenicity by protecting the pathogen from bactericidal host responses and modulating macrophage recognition, epithelial cell invasion and intracellular survival [6]. We have demonstrated that the O-PS [7] and a complete core [8] play a crucial role in conferring protection against virulent *Brucella* infection in mice. Accordingly, among the different *B. melitensis* rough (R-LPS) mutants postulated as vaccine candidates, only those carrying internal O-PS (Bm16MRwzm and Bm16MRwa**) were able to confer good protection in mice

* Corresponding author.

E-mail addresses: ana.zabalza@csic.es (A. Zabalza-Baranguá), irati.poveda@csic.es (I. Poveda-Urkixo), s.mena.bueno@csic.es (S. Mena-Bueno), gustavo.ramirez@udl.cat (G.A. Ramírez), xavier.debolle@unamur.be (X. De Bolle), mj.grillo@csic.es (M.J. Grilló).

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.01.017>
0264-410X/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

against a virulent *B. melitensis* infection [9], but the mutant carrying an incomplete core (Bm16MRwa**) failed to prevent a virulent *B. melitensis* infection in pregnant ewes [10]. Debatable efficacy was observed with the spontaneous R mutant *B. melitensis* B115 in mice and goats [11–16] and its multiple mutations [12] and spontaneous reversion to S-LPS in pregnant ewes [15] discourages its use as a vaccine.

A particular feature of $\Delta wzm/\Delta wzt$ mutants is O-PS accumulation at the cytosolic face of the inner membrane. The O-PS cannot be exported to the periplasm by the Wzm (transmembrane channel protein) and Wzt (ATP-binding protein) two-component ATP-binding cassette (ABC) transporter to complete the synthesis of the S-LPS molecule [6,17,18]. Consequently, $\Delta wzm/\Delta wzt$ mutants carry R-LPS with a complete core and O-PS at the inner membrane, which could configure a different immunogenic bacterial composition [19]. We recently studied the Wzm/Wzt transporter system in Rev1 by using simple and double $\Delta wzm/\Delta wzt$ mutants. Rev1 Δwzm exhibited superior vaccine properties in mice and safety in pregnant ewes, with an enhanced immunogenicity, and its low persistence was not at odds with efficacy [19]. The aim of the present work was to investigate whether a 16M Δwzm mutant generated in a virulent background is as safe as Rev1 Δwzm in pregnant sheep while retaining the compromise between persistence and efficacy shown by Rev1.

2. Materials and methods

2.1. Bacteria and culture conditions

Bacterial strains (Table S1) were stored at -20°C and grown in Blood Agar Base No. 2 (BAB; Oxoid), Trypticase Soy Broth (TSB; Pronadisa), Luria Bertani Broth (LB; Pronadisa) or 2YT rich medium [20]. When required, the media were supplemented with 1.5% bacteriological agar (Pronadisa), 5% sucrose (Suc₅; Serva), 5% NBCS (Gibco; BAB-S) and/or the following antibiotics (Sigma-Aldrich): nalidixic acid at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Nal₂₅); kanamycin at 35 or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Km₃₅ and Km₅₀); gentamicin at 15 or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Gm₁₅, Gm₅₀); ampicillin at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Amp₁₀₀); penicillin G at 5 IU/mL (P₅); streptomycin at 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Str_{2.5}); and polymyxin B (PxB) at different concentrations.

For the primary isolation of 16M Δwzm from veterinary samples (see section 2.8.3), double plating in CITA medium (CM) [34] and *Brucella* Selective Medium (BSM) [35] and incubation in an air atmosphere were used. Bacterial inocula were prepared in sterile phosphate buffered saline solution (PBS; pH 7.2) by spectrophotometric adjustment in a SmartSpec Plus Spectrophotometer (BioRad); the exact number of CFU/mL was assessed retrospectively by serial ten-fold dilutions and plating, as reported [7]. Briefly, 100 μL of bacterial suspensions were plated in triplicate in BAB or a specific culture medium, as detailed, and plates were incubated at 37°C for 5–7 days; the limit of detection of the method was 4 CFU/mL.

2.2. DNA manipulation and sequence analysis

Plasmid and chromosomal DNA purifications were performed with QIAprep[®] Spin Miniprep (Qiagen) and Ultraclean Microbial DNA Isolation (Mo Bio Laboratories) Kits, respectively. DNA from agarose gels was purified using the Quick Gel Extraction Kit (Qiagen). Single-colony DNA was extracted by boiling for 30 min and centrifugation at 13,000 rpm. Primers were synthesized by Sigma-Aldrich Química SL (Madrid, Spain) and DNA sequencing was performed at STAB VIDA (Caparica, Portugal). *In silico* studies were carried out using NCBI [21] and KEGG [22].

2.3. Mutant construction and complementation

The 16M Δwzm in-frame deletion mutant was obtained by direct mutagenesis using a PCR overlapping method and *B. melitensis* 16M as a DNA template [19]. Briefly, a 484 bp fragment (including *wzm* codons 1–31 and 390 bp upstream of the start codon) and a 447 bp fragment (including *wzm* codons 247–265 and 385 bp downstream of the stop codon) were obtained by amplification (Table S2) and ligated by PCR overlapping. The resulting fragment containing the deleted *wzm* allele was cloned into PCR2.1 (TOPO[®]TA Cloning, ThermoFisher Scientific), sequenced, and subcloned into the BamHI and XbaI sites of the pJQKm suicide plasmid [23]. Then, pJQKm Δwzm was introduced into 16M by conjugation to provide allelic exchange by double recombination. The mutant was checked by PCR-WZM with *wzm*-F1/*wzm*-R4 (931 bp in 16M Δwzm ; 1,573 bp in 16M) and *wzm*-F1/*wzm*-R5 (no amplification in 16M Δwzm ; 724 bp in 16M), assessing an 82% deletion of *wzm* ORF. GFP tagging of 16M Δwzm and 16M (16M $\Delta wzm::gfp$ and 16M::gfp) was performed by the mini-Tn7 chromosomal insertion (Table S1) and transconjugants selected by PCR-GFP (Table S2), as reported [24]. Complementation of 16M Δwzm was performed by conjugation with *E. coli* S17 λ pir-pSRKwzm (Table S1) and transconjugants checked by PCR with *wzm*-F6/*wzm*-R7 (Table S2).

2.4. R-LPS and O-PS analysis

The presence and antigenicity of the O-PS moiety conjugated with bactoprenol in 16M Δwzm were revealed by 12% SDS-PAGE and alkaline silver-staining modified for LPS [25] using phenol-inactivated bacteria (9×10^{10} CFU) or by Western Blot (WB) using heat-inactivated bacteria (3×10^9 CFU) and a monospecific anti-M serum (IdAB-CSIC collection) or mAb anti-C A76-12G12 [13]; strains 16M and BmH38RmanB_{core} were used as controls. The absence of O-PS on the 16M Δwzm mutant surface was checked by immunofluorescence (Nikon 80i) at 457.5–492.5 nm (green) and 542–582 nm (red) excitation [20] using A76-12G12 mAb and anti-mouse conjugated with Texas Red (Invitrogen).

2.5. Bacteriological characterization

Besides conventional *Brucella* typing tests [26], colony size and phase homogeneity was assessed in $\approx 5,000$ CFU grown in BAB (37°C , 5 days) [27]. The outer membrane properties were also analyzed by autoagglutination of a bacterial static culture in TSB at room temperature ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.8$), recording $\text{OD}_{600\text{nm}}$ readings at selected intervals for 24 h. 16M Δwzm and 16M growth curves were determined in TSB, starting from 100 CFU/mL, by measuring both $\text{OD}_{600\text{nm}}$ and CFU/mL daily over 7 days of incubation (37°C , 150 rpm) [24]. Growth properties and antibiotic susceptibility of 16M Δwzm were determined under different *in vitro* culture conditions using 16M as a control. Thus, serial ten-fold dilutions from 10^9 to 10^3 CFU/mL were plated (0.1 mL, by triplicate) in BAB and BAB-S, alone or supplemented with P₅ or Str_{2.5}, and plates were incubated (37°C , 6 days) under normal air or 10% CO₂ atmospheres. For each culture condition, the CFU/mL and percentage of bacterial survival vs. standard conditions (BAB, 37°C , air atmosphere) were assessed. Susceptibility to PxB and conventional sheep and cow sera was tested, as described [19].

2.6. Epithelial and trophoblast cell culture studies

HeLa and BeWo (ATCC CCL-98; Sigma-Aldrich) cells ($4\text{--}5 \times 10^4$ cells/mL) were infected with 16M $\Delta wzm::gfp$ or 16M Δwzm at a multiplicity of infection of 300 [20] or 100 [28], respectively. Extracellular bacteria were killed after 1 h-incubation (37°C) by 1 h-

exposure to Gm₅₀ (HeLa) or after 30 min-incubation (37°C) by 1.5 h-exposure to Gm₅₀ (BeWo). At 2 h post-infection (PI), cells were lysed with 0.1% Triton X-100 in PBS and the number of intracellular (Gm₅₀ treated) and total (untreated) CFU/mL were determined. Bacterial adhesion, internalization and intracellular multiplication were determined, as detailed [19]. S-LPS strains 16M/16M::gfp (virulent) and Rev1/Rev1::gfp (attenuated) were used as controls. Also, intracellular colocalization of 16MΔwzm::gfp and 16M::gfp in HeLa cells was determined at 24 h-PI by epifluorescence [20] and the results were expressed as a percentage of LAMP-1 positive *Brucella*-containing vacuoles (BCV).

2.7. Mouse experiments

2.7.1. Biosafety and ethical statements

Brucella, GMOs and mice were used in registered BSL3 facilities (codes A/ES/15/I-05 and ES/31-2016-000002-CR-SU-US) of the IdAB, with GMOs (code A/ES/16/39) and animal experimentation (code PI-025-14) authorizations, in compliance with current Spanish (RD 53/2013 and ECC/566/2015) and European (Directive 2010/63/EU) legislation. Four-week-old CD1 and seven-week-old BALB/c female mice were purchased from Charles River (Elbeuf, France) and acclimated for two weeks in cages with water and food *ad libitum*; animals were handled following the FELASA [29] and ARRIVE [30] recommendations. No humane endpoints were necessary.

2.7.2. Attenuation and vaccine efficacy in BALB/c mice

The ability of 16MΔwzm to infect, multiply and persist in mouse spleens was assessed by intraperitoneal (IP) inoculation of 10⁶, 10⁷ or 10⁸ CFU/mouse and determination of spleen weights and CFU/spleen (n = 5) [9]. Control mice received 10⁶ CFU of 16M. The mean ± SD (n = 5) of spleen weights and log₁₀ CFU/spleen were determined as reported (limit of detection 4 CFU/spleen = 0.60 logs/organ) [7].

Protection against a virulent challenge was determined in mice (n = 5) vaccinated IP or subcutaneously (SC) with 10⁸ CFU of 16MΔwzm and IP-challenged four weeks later in standard conditions with *B. melitensis* (10⁴ CFU/mouse of H38::Gm) or *B. ovis* (2 × 10⁵ CFU/mouse of BoPA::Gm), as described [9,24,31]; control mice (n = 5) were inoculated with PBS or Rev1 in standard conditions (2 × 10⁵ CFU, SC). The individual log₁₀ CFU/spleen of the challenge strain were graphically represented and the mean ± SD (n = 5) calculated for statistical purposes [7].

2.7.3. Safety and immunogenicity in pregnant mice

Experiments in CD1 pregnant mice were performed as reported [32], using doses of each strain able to provide similar levels of spleen infections in all groups [19]. Briefly, pregnant mice (n = 16) on Day of Gestation (DG) 4.5 ± 1 received IP 10⁷ CFU/mouse of 16MΔwzm, and the following parameters were assessed after euthanasia at day 14: (i) fetal viability and body development; (ii) bacterial counts in spleens, placentas and fetuses, as CFU/g of tissue (limit of detection 33 CFU/g = 1.52 logs); and (iii) levels of IFN-γ, IL-6, IL-12p40, and TNF-α cytokines in serum samples, using Mouse ELISA Set (BD OptEIA™, Bioscience). Control pregnant mice received IP 10⁶ CFU/mouse of 16M (n = 14), Rev1 (n = 19) or PBS (n = 7). Histopathological studies of placental disc and envelopes were performed by hematoxylin-eosin staining, scoring lesions from 0 (absence) to 3 (signs of injury and high cellular density) in yolk sac, decidua, spongiotrophoblast and labyrinth layers [32].

2.8. Safety and serological response in 16MΔwzm-vaccinated sheep

2.8.1. Animals, biosafety, and ethical statements

Churra and Ripollesa sheep were purchased from brucellosis-free herds of Spain. Before starting the experiments, all animals were serologically confirmed as free of *B. melitensis* and *B. ovis* and other reproductive infections. Animals were kept in authorized BSL2 and BSL3 facilities of VISAVET-UCM (codes ES/281200000147 and ES/280790000154, respectively) and BSL2 of AM Animalia SL (code A/ES/20/I-38). GMOs and animal experiments were evaluated by the ethics and biosecurity committees of UCM (code OH (CEA)-UCM-32-2018) and Animalia (code CEEA-11090), the National CIOMG (codes B/ES/18/31 and A/ES/20/83) and AEMPS (codes 194/PIV and 432/ECV). Final authorizations were granted by Comunidad de Madrid (PROEX187/18) and Generalitat de Catalunya (11266).

2.8.2. Experimental design

The safety and serological response induced by 16MΔwzm in sheep were determined firstly in SC-vaccinated young and adult sheep and then in ewes SC or conjunctively (CJ) vaccinated at mid-pregnancy, as follows:

Experiment 1. Churra sheep aged four months (n = 12; 4 males and 8 females) or four years (n = 16; 7 rams and 9 ewes) were SC inoculated (4 mL) in the left elbow with 2 × 10¹⁰ CFU/lamb of 16MΔwzm [10] or 5.7 × 10¹⁰ CFU/adult, proportionally to the body weight. Safety was assessed daily for the first two weeks-PI by monitoring clinical symptoms, rectal temperature, and local reactions at the inoculation site. Vaginal and preputial double-swab and blood samples (see section 2.8.5) were obtained weekly. 16MΔwzm presence in organs and lymph nodes was assessed at two and eight weeks-PI [10].

Experiment 2. Churra (n = 6) or Ripollesa (n = 10) sheep were SC inoculated (DG75 ± 2) with 1.5 × 10¹⁰ CFU/ewe in 2 mL or 1.2 × 10¹⁰ CFU/ewe CJ in 60 μL (30 μL/eye) of 16MΔwzm, respectively, in two independent experiments; cohorts of control pregnant ewes inoculated with PBS SC (n = 4) or CJ (n = 4) were included, as recommended [33]. The clinical inspection, vaginal excretion and serum sampling were as in Experiment 1; placenta-cotyledon samples were processed for histopathological analysis and homogenized in PBS for bacteriology; swabs impregnated in vaginal fluid, 1 mL amniotic liquid (when available) and milk samples were obtained at parturition and then weekly; in fetuses, swabs from the abomasum, lung, spleen and liver were also processed; all ewes and offspring were necropsied before 4 weeks-PI, as in Experiment 1.

2.8.3. Bacteriological culture

The organ and tissue samples were processed as described [10,19]. Briefly, samples of swabs, the aforementioned fluids, and homogenates of placentas, lymph nodes (i.e. cranial, prescapular, crural, iliac, and mammary/scrotal), spleen, liver, uterus and mammary gland or epididymis and male accessory glands in PBS were individually cultured by double-plating (1 mL/plate) in CM [34] and BSM [35], as outlined in section 2.1. After seven and 14 days of incubation (37°C), suspected colonies were checked phenotypically and by PCR-WZM (see section 2.3). A sample was considered infected when at least 1 CFU was found in at least one plate, and classified according to categories of infection 1: 1–5 CFU, 2: 6–25 CFU, 3: 26–125 CFU, 4: 126–650 CFU or 5: >650 CFU/plate.

2.8.4. Histopathological analysis

Placental samples were stained by hematoxylin-eosin [32] and the lesion degree was evaluated according to chorionic polymorphonuclear neutrophil infiltration, necrosis, vascular alterations,

perivascular leukocytic infiltrates, epithelial integrity, and leukocyte exocytosis.

2.8.5. Serological analysis

All sera were analyzed by ELISA-R/LPS (INgezim *Brucella ovis* kit, Ingenasa), RBT and CFT-S/LPS; also, sera from pregnant ewes were analyzed by ELISA-S/LPS (INgezim® BRUCELLA Compac 2.0, Eurofins Technologies) and a selection (see section 3) were titrated by CFT-R/LPS. ELISA-S/LPS and CFT tests were performed using accredited techniques at the LCA-Navarra, as recommended [3].

2.9. Statistical analysis

In all experiments, the mean values were compared by a one-way ANOVA followed by LSD test, and the percentages by Chi-square test. Data were processed with IBM SPSS Statistic, version 22.0 (IBM Corporation, USA) and graphical representations with GraphPad Prism® 8 Software (USA).

3. Results

3.1. 16MΔwzm has the expected R-LPS phenotype (complete core and internal O-PS)

Phenotypically, 16MΔwzm displayed R-LPS properties in the standard *Brucella* typing tests (crystal violet-oxalate staining, acriflavine agglutination, and R/C phage lysis), a complete core by silver staining, less reactive O-PS compared to 16M by WB, and O-PS absence on the bacterial surface by epifluorescence. Autoagglutination was evidenced at 4 h and beyond. Complementation with 16MΔwzm-pSRKwzm restored the S-LPS phenotype.

3.2. 16MΔwzm has small homogeneous colonies and normal in vitro growth curves, but is inhibited by 10% CO₂ incubation, penicillin and streptomycin

The mutant showed small size (still almost undetectable at 3 days post-incubation), but normal *in vitro* growth curves measured as OD_{600nm} or log₁₀ CFU/mL. Unexpectedly, incubation in 10% CO₂ reduced ($p \leq 0.001$) 16MΔwzm growth to 25% in BAB, but it was completely restored in BAB-S (Table 1). Growth was totally inhibited in BAB-Str_{2.5}, and only 23.75% of 16MΔwzm survived in BAB-P₅ vs. 49.25% of 16M ($p \leq 0.01$); notably, this inhibition was higher in BAB-S-P₅ ($p \leq 0.001$).

Table 1

Growth of 16MΔwzm and 16M under different *in vitro* culture conditions.

Culture medium	CFU/mL (% survival vs. BAB)			
	16M		16MΔwzm	
	Normal atmosphere	10% CO ₂	Normal atmosphere	10% CO ₂
BAB	6.7×10^8 (N.A.)	6.7×10^8 (100%)	8.0×10^8 (N.A.) [†]	2.0×10^8 (25%) ^{†§}
BAB-S	6.7×10^8 (100%)	6.6×10^8 (98.51%)	7.6×10^8 (95%)	7.9×10^8 (98.75%)
BAB-P ₅	3.3×10^8 (49.25%) ^{†,§}	6.4×10^8 (95.52%) [§]	1.9×10^8 (23.75%) ^{†,§}	2.2×10^4 (3×10^{-3} %) [†]
BAB-S-P ₅	2.2×10^3 (3×10^{-4} %) [†]	7.7×10^7 (11.49%) [†]	1.3×10^3 (2×10^{-4} %) [†]	9.3×10^3 (1×10^{-3} %) [†]
BAB-Str _{2.5}	2.4×10^2 (3×10^{-5} %) [†]	5.6×10^7 (8.36%) ^{†§}	0 (0%) [†]	0 (0%) [†]
BAB-S-Str _{2.5}	2.0×10^2 (3×10^{-5} %) ^{†,§}	2.0×10^8 (29.85%) [†]	1.8×10^2 (2×10^{-5} %) [†]	8.9×10^2 (1×10^{-4} %) [†]

The number of CFU/mL was determined in triplicate in plates of Blood Agar Base No. 2, either plain (BAB) or supplemented with 5% calf serum (BAB-S), penicillin G at 5 IU/mL (P₅) and/or streptomycin at 2.5 μg/mL (Str_{2.5}). Plates were incubated (37°C, 6 days) in either normal or 10% CO₂ atmospheres. Results are also expressed as the percentage of bacterial survival with respect to the standard culture conditions (i.e., BAB, air atmosphere). N.A.: not applicable; 0: no CFU found in the initial inoculum adjusted to 10⁹ CFU/mL; LSD test: [†] $p \leq 0.001$ vs. growth in BAB plates incubated in normal air atmosphere; [‡] $p \leq 0.001$ vs. the same conditions but incubated in 10% CO₂ atmosphere; [§] $p \leq 0.01$ vs. serum supplementation (growth in BAB-S).

3.3. 16MΔwzm is highly susceptible to innate immune system factors

The mutant was completely inhibited at 0.750 mg/mL of PxB vs. 100% survival of 16M at 1.5 mg/mL. Likewise, 16MΔwzm was more susceptible than 16M to both sheep and bovine sera at 18 h ($p \leq 0.05$).

3.4. 16MΔwzm is attenuated and protects against *B. melitensis* and *B. ovis* challenges in BALB/c mice

At 10⁶ CFU/mouse, spleen infections were at very low levels during the first three weeks PI, increased slowly up to a peak at six weeks, and decreased quickly thereafter until complete clearance by week 15. In contrast, higher doses induced higher ($p \leq 0.001$) initial infection, peaking at week 3 and cleared < 12 weeks-PI (Fig. 1A).

Efficacy studies revealed that inoculation of 16MΔwzm, not only IP but also SC, was as effective as Rev1 against both *B. melitensis* and *B. ovis* PA virulent infections (Fig. 1B-C). Besides effectiveness against *B. melitensis* [9], these results indicate that 16MΔwzm has the potential to be more effective than previously developed vaccines against the virulent *B. ovis* infection [11,31,45,46].

3.5. 16MΔwzm is more attenuated in BeWo trophoblasts than in HeLa cells

As shown in Fig. 2A, 16MΔwzm::gfp was able to adhere to and internalize in HeLa cells more efficiently ($p \leq 0.001$) than 16M::gfp and Rev1::gfp smooth strains. Intracellularly, 16MΔwzm::gfp did not show the active multiplication of S-LPS strains, and persisted at the levels of Rev1::gfp. Epifluorescence revealed a predominant lysosomal (LAMP-1 positive) colocalization of the mutant at 24 h-PI, unlike 16M::gfp (Fig. 2B-C). In BeWo, 16MΔwzm was more adherent ($p \leq 0.001$) than the two smooth strains, as in HeLa, but was less internalized and persistent (Fig. 2D).

3.6. 16MΔwzm does not infect mouse placentas and fetuses at term pregnancy

Spleen infections in all pregnant mice were similar, but placental and fetal infections differed greatly between 16MΔwzm (all mice infection-free) and 16M or Rev1 (≥ 6.49 log₁₀ CFU/g; Table 2), even when the former was inoculated at a ten-fold higher dose (10⁷ CFU/mouse; higher doses are not recommended, as they can induce bacteremia, masking true placental infections). Macroscopically (Fig. 3A), 16MΔwzm allowed normal pregnancies and healthy fetuses; Rev1 resulted in a high proportion of viable

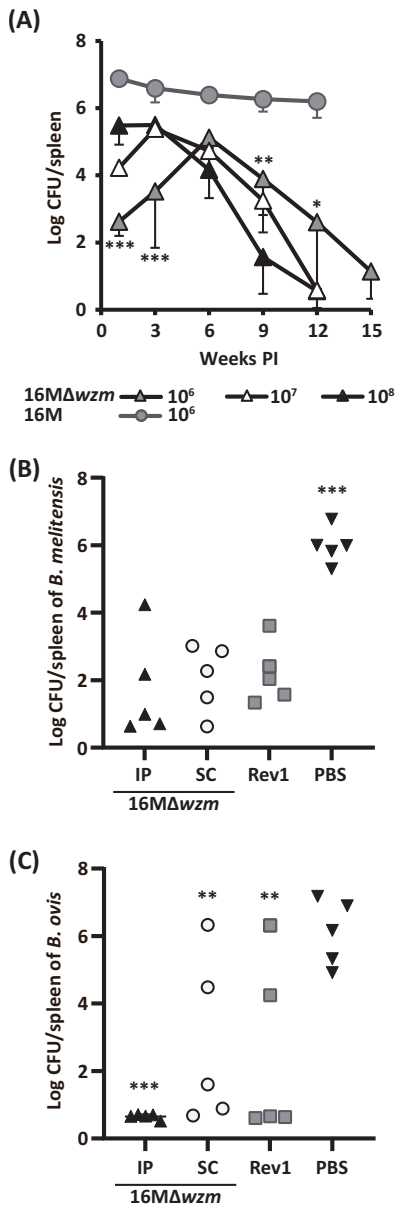


Fig. 1. 16MΔwzm is attenuated and protects against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis* in BALB/c mice. (A) Attenuation in mouse spleens: groups of 25–30 mice were inoculated by the intraperitoneal route (IP) with 10⁶, 10⁷ or 10⁸ CFU/mouse of 16MΔwzm or 10⁶ CFU/mouse of the 16M control. The number of CFU/spleen was determined at selected intervals post-inoculation (PI) and represented as the mean ± SD (n = 5) of individual log₁₀ CFU/spleen at each interval. Fishers least significant differences (LSD) test: ***p ≤ 0.001, **p ≤ 0.01 and *p ≤ 0.05 for 10⁶ vs. 10⁷ and 10⁸ CFU/mouse of 16MΔwzm groups. Efficacy against (B) *B. melitensis* or (C) *B. ovis* PA challenges: groups of 10 BALB/c mice were inoculated with 10⁸ CFU/mouse of 16MΔwzm IP or subcutaneously (SC), Rev1 in standard conditions (10⁵ CFU, SC) or PBS; four weeks later, half of the mice were IP challenged with (B) 10⁴ CFU/mouse of *B. melitensis* H38 and the other half with (C) 2 × 10⁵ CFU/mouse of *B. ovis* PA; and necropsied at two or three weeks after the *B. melitensis* or *B. ovis* challenges, respectively. Efficacy was expressed as the individual log₁₀ CFU/spleen of the challenge strain. LSD test: ***p ≤ 0.001 and **p ≤ 0.014 for vaccine vs. PBS groups.

fetuses but also cases of reabsorption and intrauterine edema, whereas 16M induced almost total fetal reabsorption and non-viable fetuses. Histologically (Fig. 3B-C), 16M and Rev1 induced different degrees of placentitis. Symptoms were particularly severe with 16M, including necrotic foci of the spongiotrophoblast layer and epithelial damage, as revealed by cell debris and extensive neutrophilic infiltration. Conversely, 16MΔwzm-inoculated mice displayed integrity of the endometrial epithelium and normal regression of decidua before parturition, as in the PBS group. Interestingly, 16MΔwzm induced lower IL-12p40 and higher TNF-α serum cytokine levels vs. 16M and Rev1 (Fig. 3D).

3.7. 16MΔwzm is safe and induces minimal serological interference in S-LPS tests in lambs, rams, and non-pregnant ewes

In Experiment 1, SC vaccination with 2–5.7 × 10¹⁰ CFU of 16MΔwzm in lambs (n = 12) and adult sheep (n = 16), respectively, did not generate any adverse clinical effects, only mild local and transient reactions at the inoculation site. Reactive inoculation sites containing 16MΔwzm were found in 3/6 lambs and 1/3 adults necropsied at two weeks-PI, but not in any of the 19 sheep necropsied at week eight. At necropsies (Fig. 4A-B), high rates of infection were found in the prescapular lymph nodes in all animals analyzed at two weeks-PI, but at week eight, only 1/6 lambs and 2/13 adults were infected, and at low levels (<5 or 6–25 CFU/plate). In organs (mainly the spleen) and other lymph nodes (mainly cranial), only a few animals showed 16MΔwzm at two weeks-PI. The reproductive tissues were not infected in lambs or adults.

The serological response was followed up for eight weeks in the 19 sheep (6 lambs, 6 ewes and 7 rams). All but two (1 lamb and 1 ram; 89.5%) were positive by ELISA-R/LPS, the percentage of reactors increased progressively from two to five weeks-PI (Fig. 4C), and 50% of lambs (3/6) and 76.9% of adults (10/13) remained positive at week eight. In the S-LPS tests, a higher proportion (p ≤ 0.05) of adults (5/13; 38.5%) than lambs (1/6; 16.7%) reacted in the RBT, and only one adult reacted in the CFT-S/LPS (titer 1/4). Along the experiment, the maximum number of RBT reactors occurred at 2–3 weeks-PI, all turning negative before week seven.

3.8. 16MΔwzm allows normal pregnancies and births in ewes but can be shed in placentas and transiently in post-partum vaginal exudates and milk

For safety studies, pregnant ewes were inoculated by either SC (n = 6) or CJ (n = 10) routes at DG75, the period of maximum susceptibility to *Brucella* infection. Four of these ewes (2 SC, 1 CJ, and 1 PBS; Table 3) suffered reproductive failures related to carrying multiple fetuses but not infectious causes; *Brucella* was not found in amniotic liquid, placentas, fetuses, vaginal exudates, or in organs and lymph nodes after necropsy, and all four ewes were serologically negative by RBT and ELISA-S/LPS. The remaining ewes (4 SC, 9 CJ, and 7 PBS) reached normal parturition, all reproductive parameters being within the expected average, with no abortions, stillbirths, or perinatal deaths (Table 3). The body weight of newborn lambs was similar (p = 0.61) in the 16MΔwzm (3.79 ± 0.87 kg) and PBS (4.02 ± 0.99 kg) groups.

Bacteriologically, the mutant was not detected in vaginal fluids at any time during pregnancy. Unexpectedly, however, at parturition, we found 16MΔwzm in placentas and vaginal fluids of 2/4 (50%) and 5/9 (55.6%) ewes receiving SC and CJ vaccinations, respectively (Table 3); most of these samples showed high levels of infection (Fig. 5A). Despite this, the lambs born from infected ewes had similar (p = 0.17) body weights (3.47 ± 0.85 kg) to those (4.24 ± 0.76 kg) of non-infected ewes. Likewise, histopathological studies revealed no specific lesions other than those of a normal

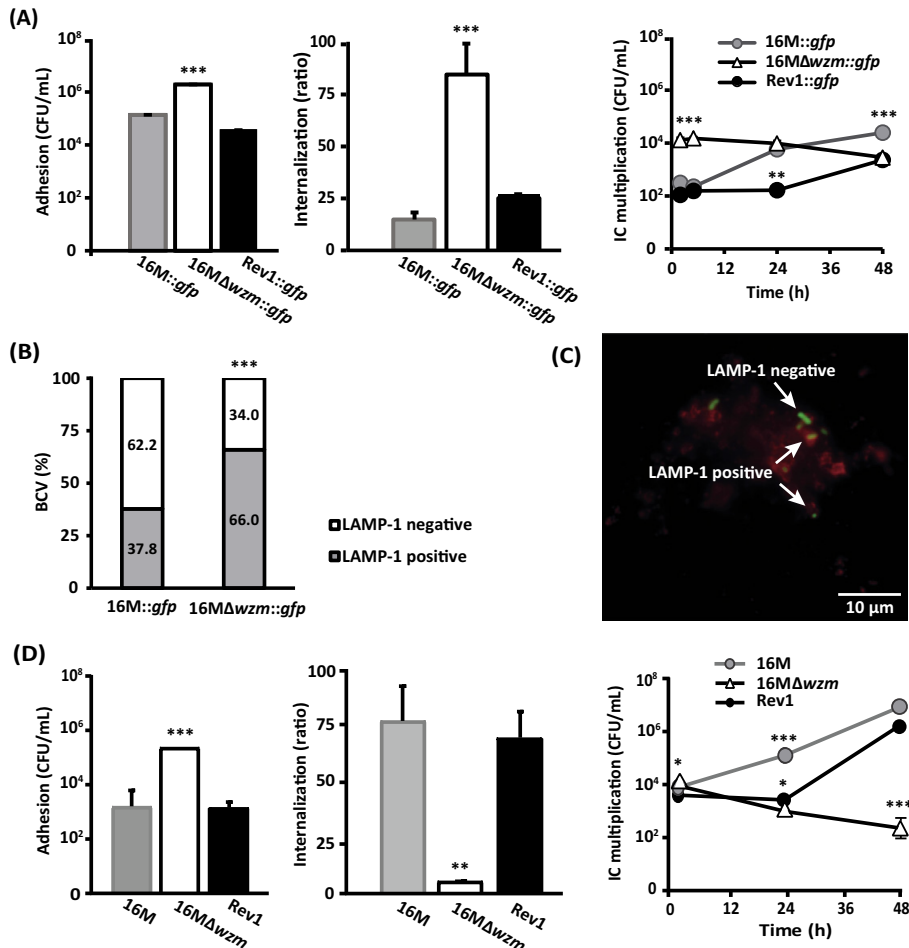


Fig. 2. *16MΔwzm* is more attenuated in BeWo than in HeLa cells. (A-C) HeLa cells: (A) adhesion, internalization and intracellular (IC) multiplication of *16MΔwzm::gfp*; (B) percentage of LAMP-1 positive vs. negative *Brucella*-containing vacuoles (BCV); and (C) colocalization by epifluorescence of *16MΔwzm::gfp* (in green) with LAMP-1 labelled with Texas Red (in red) after 24 h of infection. (D) BeWo cells: adhesion, internalization and IC multiplication. Strains 16M/*16M::gfp* and Rev1/*Rev1::gfp* were used as controls. LSD or Chi-square tests: *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$ vs. other group/s of the same experiment or time point. The results are representative of three independent experiments. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

parturition, except in three *16MΔwzm*-infected ewes, which exhibited small, moderate, and very scarce (1–3 foci/cotyledon) focal neutrophilic infiltrates located in the chorion adjacent to the cotyledon or at the ends of the chorionic villi (Fig. 5B).

Milk shedding was detected at parturition in three ewes (1/2 SC and 2/5 CJ) also infected in the placenta (Fig. 5A); this shedding was transitory, disappearing before three weeks. Also, only one of the 32 lambs presented *16MΔwzm* in the abomasum content

Table 2
16MΔwzm infection in CD1 pregnant mice.

Strain	No. of mice	Dose of inoculation (CFU/mouse)	Spleens	Placentas		Fetuses
			log ₁₀ CFU/g (mean ± SD)	No. of mice infected/total	log ₁₀ CFU/g (mean ± SD)	log ₁₀ CFU/g (mean ± SD)
16MΔwzm	16	0.6 × 10 ⁷	4.30 ± 0.66	0/16 †	0 ¹	0 ¹
16M	14	0.5 × 10 ⁶	4.80 ± 0.53	14/14	6.90 ± 1.60	7.10 ± 1.49
Rev1	19	0.7 × 10 ⁶	4.91 ± 0.82	19/19	8.29 ± 0.90	6.49 ± 1.33
PBS	7	–	0 ¹	0/7 †	0 ¹	0 ¹

Pregnant CD1 mice were inoculated intraperitoneally at 4.5 days of pregnancy with the indicated doses of *16MΔwzm*, 16M or Rev1 (lower doses of the mutant induced lower levels of spleen infections than the reference strains). At two weeks post inoculation, all mice were necropsied, and spleens, placental discs and fetuses were individually cultured to determine the number of CFU/g of tissue; 0: under the detection limit in our experimental conditions: <33 CFU/g of tissue (i.e., <1.52 logs). An additional group inoculated with 0.1 mL of PBS was used as a control. †LSD and ‡Chi-square tests: $p \leq 0.001$ vs. 16M and Rev1.

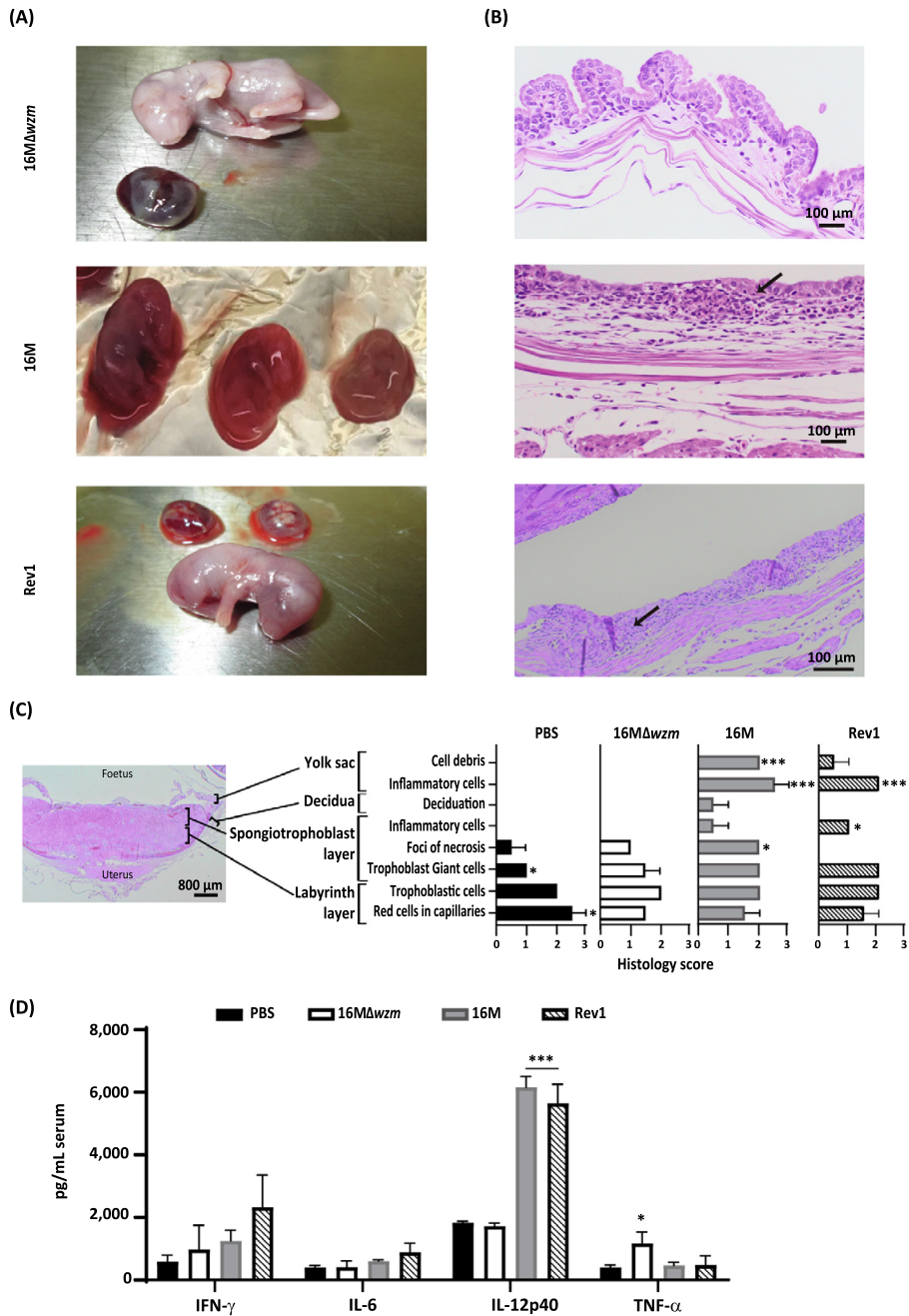


Fig. 3. 16MΔwzm is safe in pregnant mice, shifting the cytokine response induced by 16M and Rev1 at term pregnancy. (A) Macroscopic and (B) histological (arrows indicate leukocyte infiltration) images of CD1 mouse placentas and fetuses at 14 days after intraperitoneal infection with 16MΔwzm (n = 16), 16M (n = 14), Rev1 (n = 19) or PBS (n = 7). For experimental details, see footnote of Table 2. (C) Average of lesion score (from 0 to 3) of different cellular types analyzed in the yolk sac, decidua, spongiotrophoblast and labyrinth layers. (D) Levels of IFN- γ , IL-6, IL-12p40 and TNF- α cytokines in mouse sera at necropsy in the same animals. LSD test: ***p \leq 0.001 and *p \leq 0.05 vs. the other groups.

at necropsy; this lamb suckled milk from an ewe (SC group) shedding 16MΔwzm at category 5, but its other samples were infection-free (Table 3).

Vaginal shedding disappeared before 1-week post-partum in 4/5 ewes with CJ vaccinations, and before the third week in 1/2 ewes with SC vaccinations. In the remaining two ewes, excretion

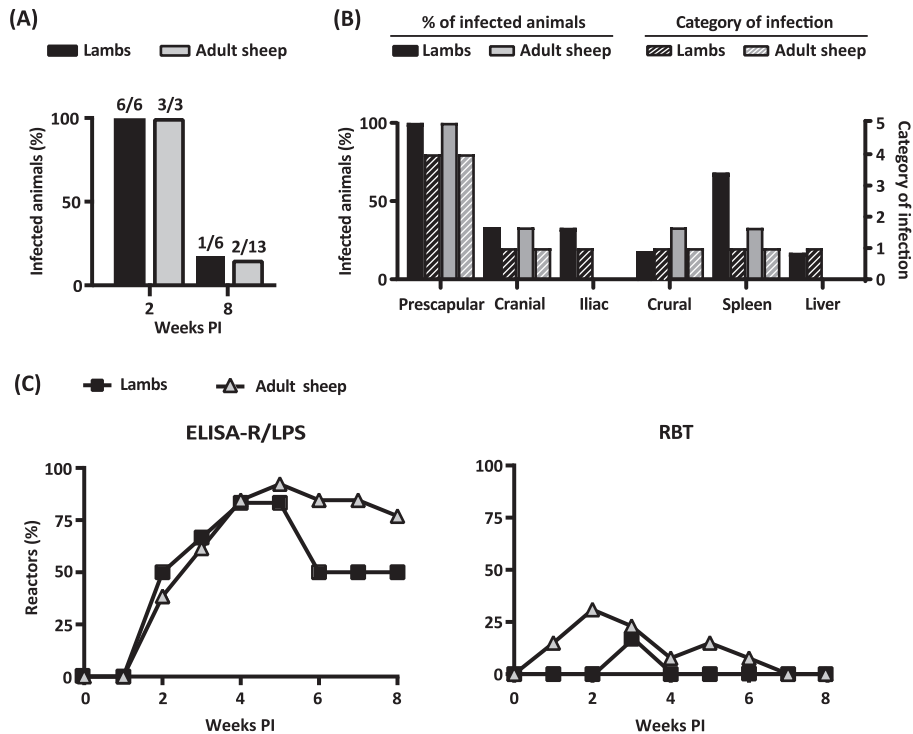


Fig. 4. Inoculation with 16MΔwzm in lambs, rams and non-pregnant ewes is safe and shows low interference in the Rose Bengal test. Lambs (n = 12) and adult sheep (n = 16) were subcutaneously vaccinated with 2×10^{10} or 5.7×10^{10} CFU of 16MΔwzm, respectively, and thereafter were bled weekly for serological studies. Necropsies were carried out at two (6 lambs and 3 adults) and eight (6 lambs, 7 rams and 6 ewes) weeks-PI for bacteriological assessment of infection and its distribution through the organism by sampling lymph nodes (LN; prescapular, cranial, iliac, crural, and mammary/testicular), spleen, liver, uterus/mammary glands or epididymis/male accessory glands. (A) Percentage of lambs (black) or adult rams and non-pregnant sheep (grey) infected by 16MΔwzm in at least one sample at two and eight weeks-PI, and (B) distribution of infection in % animals (solid symbols) and mean category of the infection (striped symbols; 1: 1–5 CFU, 2: 6–25 CFU, 3: 26–125 CFU, 4: 126–650 CFU or 5: >650 CFU per plate) found in each sample at two weeks-PI; all animals were negative in testicular/mammary LN and epididymis/accessory glands/uterus (not shown). (C) Percentage of reactors in ELISA-R/LPS and Rose Bengal test (RBT) in the animals maintained until the end of the experiment.

Table 3

Reproductive parameters and safety of 16MΔwzm in pregnant ewes vaccinated subcutaneously (SC) or conjunctively (CJ) at mid-pregnancy (DG75 ± 2).

Vaccination			Parturitions						
Sheep breed (No. vaccinated)	Route	Dose (CFU/ewe)	No. ewes with multiple fetuses	No. ewes delivering ^a	Prolificity (lambs/ewe)	Duration of pregnancy	Abortions	No. ewes shedding ^b	No. infected lambs/total ^c
Churra (6)	SC	1.5×10^{10}	6	4	2 ± 0	149 ± 1.4	0	2 (50%)	1/8 ^d
Churra (4)	SC	PBS	1	4	1.3 ± 0.50	148 ± 3.4	0	0	0/5
Ripollesa (10)	CJ	1.2×10^{10}	3	9	1.5 ± 0.97	147 ± 3.3	0	5 (55.6%)	0/14
Ripollesa (4)	CJ	PBS	2	3	1.5 ± 0.70	146 ± 1.5	0	0	0/5

^a Some ewes from each group did not reach delivery due to non-infectious factors related with multifetal pregnancies.

^b presence of at least one colony of 16MΔwzm in placenta (including cotyledons), vaginal swabs and/or milk samples at parturition.

^c transmission of 16MΔwzm to offspring analysed by separately culturing abomasum content, and lung, spleen and liver swabs.

^d one lamb (suckling from a ewe excreting the mutant through milk) showed 16MΔwzm exclusively in the abomasum content.

progressively declined to category 1 (Fig. 5C) but remained infected at necropsy in uterus (categories 5 and 1 in SC and CJ groups, respectively), mammary gland and mammary lymph nodes (both category 1); additionally, 16MΔwzm was found in the crural lymph nodes (category 2) and spleen (category 1) of the SC inoculated ewe.

3.9. Conjunctival administration of 16MΔwzm reduces serological interference triggered by subcutaneous inoculation in pregnant sheep

The serological response after SC vaccination with 16MΔwzm occurred earlier and was stronger in pregnant ewes than in lambs,

rams, and non-pregnant ewes (Fig. 5D–4C). In fact, all SC vaccinated pregnant ewes were positive at two weeks-PI by both ELISA-R/LPS and RBT, and most of them also by ELISA-S/LPS but only one was positive by CFT-S/LPS (titers 1/4) at four weeks-PI. All RBT reactions turned negative before eight weeks, whereas all but one remained positive by ELISA-R/LPS (Table 4, Fig. 5D). In contrast, CJ administration reduced the number of reactors in all tests. At the end of pregnancy, all animals were RBT-negative and ~30% positive by ELISA-S/LPS, and the percentage of ewes still positive by ELISA-R/LPS was lower in the CJ vs. SC group. Although all but one CJ vaccinated ewe reacted in the RBT at two to five weeks-PI, a peak of 60% of reactors was observed at week four (Fig. 5D). Ani-

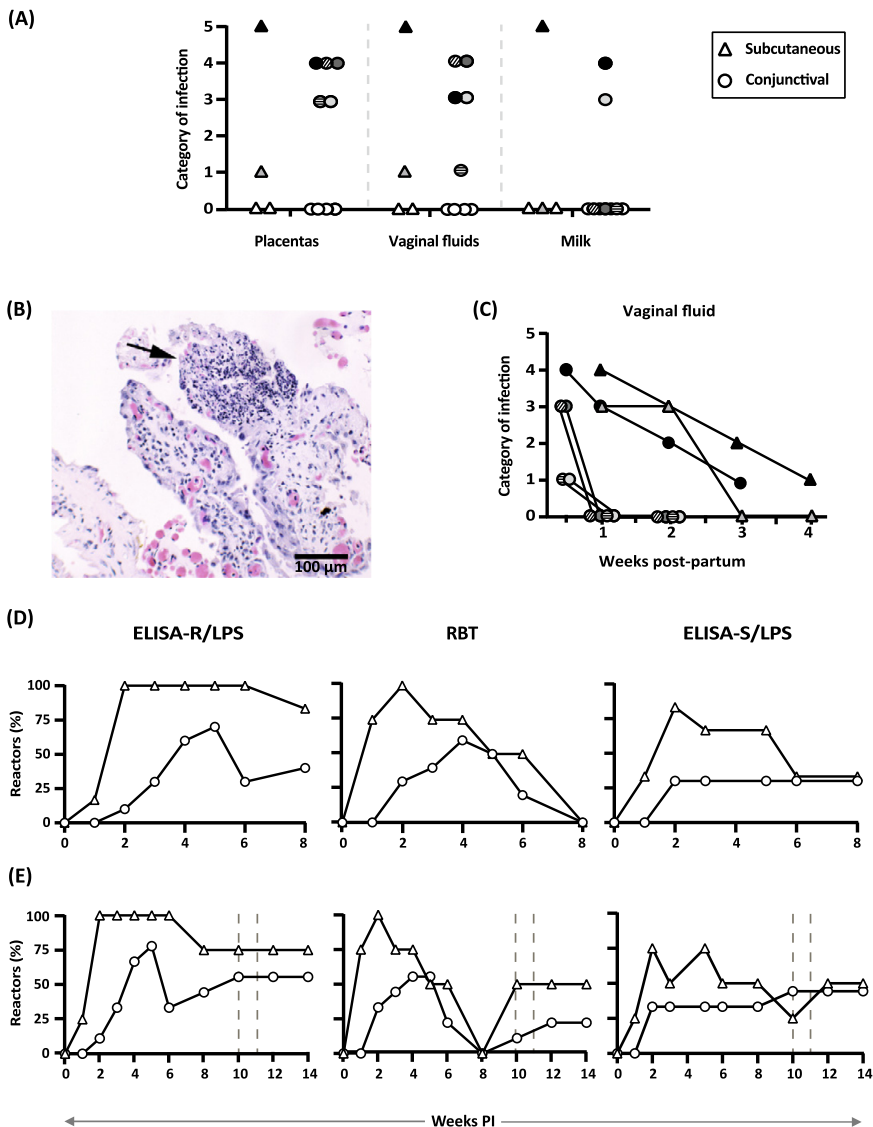


Fig. 5. Pregnant ewes can shed 16MΔwzm in placentas and transiently after parturition, accompanied by a serological reactivation. Pregnant ewes were vaccinated at mid-pregnancy (DG75) either subcutaneously (SC; n = 6) or conjunctively (CJ; n = 10) with $1.5\text{--}1.2 \times 10^{10}$ CFU of 16MΔwzm and monitored for serological and vaginal shedding during pregnancy. At parturition, ewes were sampled for bacteriological analysis of placentas, vaginal fluids, and milk; thereafter, vaginal swabs and milk were sampled weekly for four weeks post-parturition or until two consecutive negative results. (A) Individual categories of infection (see Fig. 4 caption) found in placentas, vaginal fluids and/or milk of ewes sampled at parturition; each culture-positive ewe is represented by a different color symbol. (B) Histopathological hematoxylin-eosin staining image of a sheep placenta showing (arrow) focus of polymorphonuclear neutrophil (PMN) cells in a cotyledonary villus. (C) Individual categories of 16MΔwzm shedding through vaginal fluid for four weeks post-partum; each culture-positive ewe is represented by a different color symbol, as in Panel A. (D-E) Evolution of the serological response (% of ewes positive) in ELISA-R/LPS, Rose Bengal test (RBT) and ELISA-S/LPS after inoculation with 16MΔwzm (D) in all animals until parturition (n = 6 SC and n = 10 CJ) and (E) in the animals maintained until the end of the experiment (n = 4 SC and n = 9 CJ); PBS ewes did not show any serological reaction (not shown). The parturition period is indicated between dashed lines.

mals reacting in the RBT remained positive for a maximum of five and six weeks in the CJ and SC groups, respectively.

3.10. 16MΔwzm placental infection in ewes is accompanied by a reactivation of the serological response at delivery

The seven ewes showing the mutant in placentas, vaginal fluids and/or milk at parturition (2 SC and 5 CJ) experienced a quick and

intense reactivation of the serological response at delivery (Fig. 5E, Table 4). In fact, these ewes showed no vaginal shedding of 16MΔwzm during pregnancy, accompanied by a progressive reduction of serological response, until turned negative in RBT and CFT-S/LPS at 2 weeks before parturition. Thereafter, however, all seven were positive in at least one serological test (six of them in S-LPS tests) and increased their CFT-R/LPS titers; even four ewes (2 SC and 2 CJ) showed an increase in CFT-S/LPS titers (Table 4).

Otherwise, all non-infected ewes (2 SC and 4 CJ) remained or turned (1 SC) serologically negative after parturition. Overall, the serological reactions strongly support the bacteriological results.

4. Discussion

In this work, a 16MΔwzm in-frame deletion mutant without induced antibiotic resistance was built, characterized, and tested for safety and immune response in sheep, including pregnant ewes. An essential step before testing the new mutants in animal experiments was to establish their optimal growth conditions. We found that 16MΔwzm was drastically inhibited by 10% CO₂ incubation, a condition that usually improves *Brucella* growth or is even essential for some strains [26,36]. Possible explanations are medium acidification and/or toxic accumulation of intermediate metabolites disturbing essential metabolic pathways [37,38]. Additionally, CO₂ inhibition could explain the small colony size of 16MΔwzm in an air atmosphere, where the growth of the innermost cells was restricted. Thus, to obtain the maximum performance of the bacteriological method, 16MΔwzm should be cultured in a normal air atmosphere [35].

A principal objective of this work was to investigate the placental pathogenesis of 16MΔwzm. In a first approach, we used an experimental model of BeWo trophoblast-like human cells as targets of *Brucella* infection [28] and a pregnant mouse preclinical model [19,32], in which the attenuation of 16MΔwzm was demonstrated, even when administered at doses 10-times higher than the virulent 16M and attenuated Rev1. This could be at least partially due to 16MΔwzm inducing a significant increase in circulating TNF-α and inhibition of IL-12p40, in contrast with the almost total inhibition of TNF-α and high levels of IL-12p40 induced by 16M. This switch in the IL-12p40 and TNF-α balance has been proposed as a self-limiting mechanism of the inflammatory cascade [39]. Our findings also agree with the low invasiveness of R-LPS *Brucella* and high levels of TNF-α described in cells [40] and non-pregnant mice [41,42]. Likewise, trophoblast giant cells are considered an early *Brucella* location and replication site in mammals, triggering IFN-γ production, loss of development and functionality of trophoblasts, and subsequent abortion in mice [43]. Although IFN-γ

levels seemed unaltered at term pregnancy, lymphocyte infiltration and necrosis in the spongiotrophoblast layer induced by the virulent 16M could inhibit progesterone secretion by trophoblast giant cells, thus reducing pup viability [44].

Experimental models are highly recommended as a rational screening approach to avoid undue experimentation in the natural host. The attenuation and efficacy of 16MΔwzm against *B. melitensis* and *B. ovis* challenges in mice indicated that the vaccine properties of the mutant were similar to those of Rev1 [24], each at its appropriate vaccination dose; against *B. ovis*, the mutant protected at the levels of Rev1Δwzm [19], showing both vaccine candidates the potential to be more effective than other previously developed vaccines [8,31,45,46]. The predictive value of the pregnant mouse model used must be established, considering the different manifestations of infection, such as bacterial vaginal shedding during pregnancy, placental infection, and/or abortion, as well as the anatomical and physiological differences between human cells, mouse placentas and ruminant pregnancies. In this regard, previous studies have demonstrated the utility of the pregnant mouse model to envisage *Brucella* pathogenicity in the natural host, describing bacterial replication in mouse placentas and transmission to offspring [32,43,47–50]. In the present study, 16M and Rev1 actively multiplied in BeWo cells and mouse placentas and pups at term pregnancy (18.5 pregnancy days), as previously reported [32]. These findings may be related with the vaginal shedding during pregnancy, abortifacient effects, and transmission to offspring observed in ewes [51,52]. In our experimental conditions, besides the direct relationship between attenuation in BeWo cells and absence of infection in mouse placentas and pups, 16MΔwzm was not shed through ewe vaginas during pregnancy and was not abortifacient or transmitted to the offspring. However, contrarily to Rev1Δwzm [19], 16MΔwzm was detected in some delivered placentas; thus, the mouse model used (analyzing placentas at 2–3 days before parturition) was not able to detect the 16MΔwzm reactivation of placental infections at parturition observed in sheep. Additional studies in mice at parturition can be performed to determine whether mice suffer a reactivation of 16MΔwzm infection at delivery.

A major drawback of Rev1 is a tendency to be shed through vaginal discharges during pregnancy, induce abortions, and be

Table 4
Serological results two weeks prior to, during, and two weeks after parturition in ewes inoculated with 16MΔwzm either subcutaneously (SC) or conjunctively (CJ) at mid-pregnancy (DG75 ± 2).

Route of inoculation	Ewe code	Bacteriology in Placenta/Vaginal swabs/Milk ^a	Serological response at parturition weeks -2/0/+2 ^b															Tests evidencing serological reactivation ^c
			S-LPS									R-LPS						
			Test 1. RBT			Test 2. CFT-S/LPS			Test 3. ELISA-S/LPS			Test 4. ELISA-R/LPS			Test 5. CFT-R/LPS			
			w-2	w0	w+2	w-2	w0	w+2	w-2	w0	w+2	w-2	w0	w+2	w-2	w0	w+2	
SC	1	+/-	-	+	+	-	1/4	1/4	+	-	+	+	+	+	1/10	1/5	1/80	1, 2, 3, 5
	2	+/+	-	+	+	-	1/8	1/4	-	+	+	+	+	+	-	>1/320	>1/320	1, 2, 3, 5
	3	-/-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	1/10	1/5	-	-
	4	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CJ	1	+/+	-	+	+	-	1/64	1/16	+	+	+	+	+	+	1/5	1/80	1/160	1, 2, 5
	2	+/+	-	+	+	-	-	1/4	+	+	+	-	+	+	1/10	1/10	1/20	1, 2, 4, 5
	3	+/+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	1/10	1/80	>1/320	4, 5
	4	+/+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	1/10	1/10	1/20	3, 5
	5	+/+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	1/80	1/80	4, 5
	6	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	7	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Detection of 16MΔwzm in placenta, vaginal swabs and milk at parturition.

^b Serological tests performed before (w-2) and after (w0 and w+2) parturition; Test 1. RBT: Rose Bengal Test; Test 2. CFT-S/LPS: Complement Fixation Test with S-LPS; Test 3. ELISA-S/LPS: competitive ELISA anti-S/LPS, Eurofins Technologies; Test 4. ELISA-R/LPS: indirect ELISA anti-R/LPS, Ingenasa; and Test 5. CFT-R/LPS: CFT with R-LPS.

^c Tests (numbered as 1-5, as in the previous column headings) showing serological reactivation after parturition (from w-2 to w0 and/or w+2) or no reactivation (-).

transmitted to lambs when administered at mid-pregnancy, regardless of the inoculation route or dose [1,3,51,52]. Despite this limitation, CJ vaccination is considered safer than SC [53] and the use of Rev1 is recommended in ewes at pre-mating, the last month of pregnancy and during lactation, when the risk of abortion and shedding is lower [1,52,54]. We did not assess the utility of 16MΔwzm at all these stages, but when administered at the period of highest risk (DG75), the mutant was not shed in vaginal fluids of the pregnant sheep and was not abortifacient, irrespective of the inoculation route. Unexpectedly, 16MΔwzm was present in the placenta of approximately half the inoculated ewes, with subsequent transitory shedding in vaginal fluids and/or milk after delivery. Thus, milk from a few of these ewes could be a source of 16MΔwzm human infections, particularly in countries where milk is not habitually pasteurized, as reported for cows vaccinated with RB51 [55] and for ewes and doe goats with Rev1 [56–58]. In contrast with previous vaccine strains, 16MΔwzm is highly susceptible to Str_{2,5}, which represent a clear advantage over Rev1, as this is an antibiotic of choice for human brucellosis treatment [59,60]. Although other *B. melitensis* R-LPS mutants have been described as totally safe in pregnant sheep or goats, only the Rev1Δwzm study [19] is comparable with ours, as the others were performed with low vaccination doses, at the end of pregnancy, and using non-selective or highly inhibitory selective culture media [61–63].

The placental tropism of 16MΔwzm in ewes seemed unaffected by the vaccination route, as reported for Rev1 [1]. When inoculated by SC or CJ routes, 16MΔwzm (i) was not shed during pregnancy; (ii) did not induce abortions or the birth of underweight lambs (suggesting no chronic damage in the placenta); (iii) did not induce placental lesions or only rare unspecific polymorphonuclear neutrophil infiltrates in the chorion, and (iv) resulted in a progressive drop in serological response until parturition. However, the mutant was found in delivered placentas of some ewes. The reactivation of the *Brucella* infection in placentas was detected not only by the improved bacteriological method, but also through a seroconversion observed exclusively in ewes infected at parturition. To our knowledge, this is the first report demonstrating a *Brucella* infection reactivation, but it should not be discarded in other R brucellae such as RB51, which can be excreted at parturition and through milk [64]. In the present study, this reactivation was clearly detected due to the S-LPS seroconversion triggered by the internal O-PS present in 16MΔwzm. *Brucella* is known to maintain a low replication rate in target lymph nodes and organs before starting a new replicative cycle under favorable conditions in the natural host [65]. 16MΔwzm reactivation in sheep placentas could be related to the swift and dramatic immunological and hormonal changes occurring at parturition, which can disinhibit or induce pathogen multiplication in placentas and milk. However, more in-depth studies to elucidate the exact mechanisms involved in bacterial reactivation at parturition are needed.

An additional benefit of R-LPS vaccines is their minimal interference in S/LPS tests. The internal O-PS of 16MΔwzm triggered lower reactivity than 16M S-LPS with the anti-C mAb, as described for other mAbs and *Brucella* strains [13,14,19,62]. Accordingly, the induction of S-LPS antibodies by 16MΔwzm was transient and affected a low number of lambs, rams and non-pregnant ewes (adults more markedly), in contrast with the intense and long-lasting serological response reported for Rev1 (also more marked in vaccinated adult sheep) [53]. Our serological results differ from those previously reported in lambs inoculated with inner O-PS-carrying mutants such as Bm16MRwzm and Bm16MRwa**, which showed a higher percentage (>50%) of RBT-reactors than here [10]. No comparable results exist in adult sheep, except for a 16MΔwzt mutant in pregnant ewes, which were positive in anti-R/LPS tests but showed no serological response in ELISA-S/LPS or SAT tests [62], in contrast with the 100% RBT-positivity in

16MΔwzm-infected pregnant ewes in our study. These differences can be explained by experimental variables, such as partial attenuation of parental 16M, a lower inoculation dose, the sensitivity of the S-LPS serological tests, or the age/breed/pregnancy period of vaccinated sheep [62]. Nor can changes in structural and immunogenic differences associated with the mutated pathway be ruled out. In fact, the lack of WadA in Bm16MRwa** retains an intact Wzm/Wzt system, provoking O-PS accumulation in the periplasm and a defective LPS-core [9]. Also, the lack of Wzt in 16MΔwzt blocks the O-PS in the cytoplasmic face of the inner membrane, so it remains unlinked to the Wzt protein and is unable to trigger anti-O-PS antibodies. This could imply a haptenic O-PS, changes in antigen epitopes and/or LPS biosynthetic gene regulation, as reported in Rev1Δwzm/Δwzt mutants [19].

In our study, pregnant ewes inoculated SC with 16MΔwzm developed a stronger and earlier serological response than non-pregnant ewes. This effect can be due to the physiological immune-suppression intended to preserve fetal viability, entailing inhibition of the Th1 cytokine response and subsequent enhancement of Th2 production [66,67]. Moreover, we found that CJ vaccination induced a lower serological response compared to SC vaccination, as reported for Rev1 in pregnant ewes [52] and rams [53]. As CJ vaccination confers adequate protection in sheep [1,68], this route would be recommendable in further efficacy experiments with 16MΔwzm in lambs, rams and non-pregnant ewes. Additionally, particularities of the internal O-PS could be used to develop a serological test able to differentiate between vaccinated and infected sheep using the ELISA-NH antigen [69] or as proposed in a B115-based CFT [11]. Likewise, the interference observed in R-LPS serological tests could be overcome by GFP tagging [24,70].

5. Conclusions

16MΔwzm can be considered as a safe vaccine for lambs, rams, and non-pregnant ewes, but its use at mid-pregnancy should be avoided to prevent dissemination at parturition and post-partum in placentas/vaginal exudates and milk. During pregnancy, 16MΔwzm is not shed through vaginal discharges, and allows delivery of healthy lambs (no abortions or perinatal mortality). However, a transitory reactivation of placental infection can occur at parturition, evidenced in our study both by bacteriology and the reactivation of serological response against S-LPS and/or R-LPS. If further experiments in sheep confirm the efficacy results observed in mice, 16MΔwzm could represent a vaccine candidate against *B. melitensis* and *B. ovis* to be applied preferably in lambs, rams, and non-pregnant ewes.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MJG conceived and led the study; AZB built the GMOs; AZB, IPU and SMB performed the *in vitro* experiments, and serological and bacteriological analysis, and analyzed data; AZB, IPU and MJG carried out mouse experiments; GAR performed histopathological analysis; AZB and MJG described the SOP protocols in sheep; IPU, SMB and MJG performed the sheep experiments; XDB participated and discussed genetic, molecular and cell culture studies; AZB and MJG wrote the draft and the final manuscript. All authors corrected the draft and approved the final manuscript for publication.

Data availability

Data will be made available on request.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was funded by the Agencia Estatal de Investigación of the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades of Spain (AGL2014-58795-C4-2-R and RTI2018-098658-B-C21) and Dirección General de Industria, Energía Proyectos Estratégicos S3 of Gobierno de Navarra, Spain (projects PT068-2018 and PT007-2019). IPU was contracted in the context of the Doctorados Industriales program of Gobierno de Navarra, co-funded by CSIC (2017-2020). SMB contracts were funded by the “Garantía Juvenil” program of CSIC-FEDER 2016-2018 and a predoctoral (2018-2019) fellowship of the Public University of Navarra (UPNA, Spain). Also, we thank the scientific advice of Professor Jean-Jacques Letesson; and the technical support of Sagrario Pérez, Elena San Miguel and Manuel Barrón (LCA-Navarra, Spain) as well as the staff of the subcontracted companies Maeva Servet-Visavet and Animalia (Spain).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.01.017>.

References

- Blasco JM. A review of the use of *B. melitensis* Rev1 vaccine in adult sheep and goats. *Prev Vet Med* 1997;31:275–83. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(96\)01110-5](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(96)01110-5).
- Moriyón I, Grilló MJ, Monreal D, González D, Marín C, López-Goñi I, et al. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet Res* 2004;35:1–38. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003037>.
- OIE. Chapter 3.1.4: Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*) Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*. *Off. Int. Epizoot. World Organ. Anim. Heal. Man. Diagnostic Tests Vaccines Terr. Anim.*, 2018.
- Yang X, Skyberg JA, Cao L, Clapp B, Thornburg T, Pascual DW. Progress in *Brucella* vaccine development. *Front Biol (Beijing)* 2013;8:60–77. <https://doi.org/10.1007/s11515-012-1196-0>.
- Ducrottoy MJ, Conde-Álvarez R, Blasco JM, Moriyón I. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2016;171:81–102. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.002>.
- Valvano MA. Genetics and biosynthesis of lipopolysaccharide, vols. 1–3. Elsevier Ltd; 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00004-4>.
- Grilló MJ, Manterola L, De Miguel MJ, Muñoz PM, Blasco JM, Moriyón I, et al. 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;24:2910–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.12.038>.
- Monreal D, Grilló MJ, González D, Marín CM, De Miguel MJ, López-Goñi I, et al. 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;71:3261–71. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3261-3271.2003>.
- González D, Grilló MJ, De Miguel MJ, Ali T, Arce-Gorvel V, Delrue RM, et al. Brucellosis vaccines: Assessment of *Brucella melitensis* lipopolysaccharide rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export. *PLoS One* 2008;3:e2760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002760>.
- Barrio MB, Grilló MJ, Muñoz PM, Jacques I, González D, de Miguel MJ, et al. Rough mutants defective in core and O-polysaccharide synthesis and export induce antibodies reacting in an indirect ELISA with smooth lipopolysaccharide and are less effective than Rev 1 vaccine against *Brucella melitensis* infection of sheep. *Vaccine* 2009;27:1741–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.025>.
- Adone R, Francia M, Ciuchini F. Evaluation of *Brucella melitensis* B115 as rough-phenotype vaccine against *B. melitensis* and *B. ovis* infections. *Vaccine* 2008;26:4913–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.030>.
- Adone R, Muscillo M, la Rosa G, Francia M, Tarantino M. Antigenic, immunologic and genetic characterization of rough strains *B. abortus* RB51, *B. melitensis* B15 and *B. melitensis* B18. *PLoS One* 2011;6:e24073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024073>.
- Cloekaert A, Zygmunt MS, Nicolle JC, Dubray G, Limet JN. O-chain expression in the rough *Brucella melitensis* strain B115: Induction of O-polysaccharide-specific monoclonal antibodies and intracellular localization demonstrated by immunoelectron microscopy. *J Gen Microbiol* 1992;138:1211–9. <https://doi.org/10.1099/00221287-138-6-1211>.
- Godfroid F, Cloekaert A, Taminiou B, Danese I, Tibor A, De Bolle X, et al. Genetic organisation of the lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis region of *Brucella melitensis* 16M (*wbk*). *Res Microbiol* 2000;151:655–68. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)90130-X](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)90130-X).
- Pérez-Sancho M, Adone R, García-Seco T, Tarantino M, Diez-Guerrero A, Drumo R, et al. Evaluation of the immunogenicity and safety of *Brucella melitensis* B115 vaccination in pregnant sheep. *Vaccine* 2014;32:1877–81. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.01.070>.
- Morgan WJ, Littlejohn AL, Mackinnon DJ, Lawson JR. The degree of protection given by living vaccines against experimental infection with *Brucella melitensis* in goats. *Bull World Health Organ* 1966;34:33–40.
- Bi Y, Mann E, Whitfield C, Zimmer J. Architecture of a channel-forming O-antigen polysaccharide ABC transporter. *Nature* 2018;553:361–5. <https://doi.org/10.1038/nature25190>.
- Valvano MA. Export of O-specific lipopolysaccharide. *Front Biosci* 2003;8:452–71. <https://doi.org/10.2741/1079>.
- Mena-Bueno S, Poveda-Urkixo I, Irazoki O, Palacios L, Cava F, Zabalza-Barangüa A, et al. *Brucella melitensis* Wzm/Wzt system: changes in the bacterial envelope lead to improved Rev1Δwzm vaccine properties. *Front Microbiol* 2022;13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.908495/FULL>.
- Francis N, Poncin K, Fioravanti A, Vassen V, Willemart K, Ong TAP, et al. CtrA controls cell division and outer membrane composition of the pathogen *Brucella abortus*. *Mol Microbiol* 2017;103:780–97. <https://doi.org/10.1111/mmi.13589>.
- Sayers EW, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Chan J, Comeau DC, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). *Nucleic Acids Res* 2022;50:D20–6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>.
- Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 2000;28:27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>.
- Scupham AJ, Triplett EW. Isolation and characterization of the UDP-glucose 4'-epimerase-encoding gene, *galE*, from *Brucella abortus* 2308. *Gene* 1997;202:53–9. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00453-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00453-8).
- Zabalza-Barangüa A, San-Román B, Chacón-Díaz C, de Miguel MJ, Muñoz PM, Iriarte M, et al. GFP tagging of *Brucella melitensis* Rev1 allows the identification of vaccinated sheep. *Transbound Emerg Dis* 2019;66:505–16. <https://doi.org/10.1111/tbed.13053>.
- Tsai CM, Frasch CE. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1982;119:115–9. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90673-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90673-X).
- Alton G, Jones L, Angus R, Verger J. Techniques for the brucellosis laboratory. 1988.
- Grilló MJ, Bosserey N, Blasco JM. *In vitro* markers and biological activity in mice of seed lot strains and commercial *Brucella melitensis* Rev 1 and *Brucella abortus* B19 vaccines. *Biologicals* 2000;28:119–27. <https://doi.org/10.1006/biol.2000.0249>.
- Salcedo SP, Chevrier N, Lacerda TLS, Ben Amara A, Gerart S, Gorvel VA, et al. Pathogenic brucellae replicate in human trophoblasts. *J Infect Dis* 2013;207:1075–83. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit007>.
- Rehbinder C, Alenius S, Bures J, de las Heras M, Greko C, Kroon PS, et al. Felasa recommendations for the health monitoring of experimental units of calves, sheep and goats. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) working group on animal health. *Lab Anim* 2000;34:329–50. <https://doi.org/10.1258/002367700780387723>.
- Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The arrive guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 2020;18:e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>.
- Soler-Lloréns P, Gil-Ramírez Y, Zabalza-Barangüa A, Iriarte M, Conde-Álvarez R, Zúñiga-Ripa A, et al. Mutants in the lipopolysaccharide of *Brucella ovis* are attenuated and protect against *B. ovis* infection in mice. *Vet Res* 2014;45:1–11. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0072-0>.
- Poveda-Urkixo I, Ramírez GA, Grilló MJ. Kinetics of placental infection by different smooth *Brucella* strains in mice. *Pathogens* 2022;11. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030279>.
- EMA/CVMP/VICH/359665/2005. VICH Topic GL44 Step 7: Guideline on target animal safety for veterinary live inactivated vaccines. Section 2.2. Reproductive Safety Test. *Eur Med Agency Defn* 2009. <https://doi.org/10.32388/vokp53>.
- De Miguel MJ, Marín CM, Muñoz PM, Dieste L, Grilló MJ, Blasco JM. Development of a selective culture medium for primary isolation of the main *Brucella* species. *J Clin Microbiol* 2011;49:1458–63. <https://doi.org/10.1128/JCM.02301-10>.
- Mena-Bueno S, Poveda-Urkixo I, Asensio D, Echarte I, Zabalza-Barangüa A, Grilló MJ. BruSIC: a novel selective medium for the primary isolation of *Brucella* in veterinary samples. *Microbiol Spectr* 2022. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01759-22>.
- Lonsway DR, Jevitt LA, Uhl JR, Cockerill FR, Anderson ME, Sullivan MM, et al. Effect of carbon dioxide on broth microdilution susceptibility testing of *Brucella* spp. *J Clin Microbiol* 2010;48:952–6. <https://doi.org/10.1128/JCM.01860-09>.

- [37] Daniels JA, Krishnamurthi R, Rizvi SSH. A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *J Food Prot* 1985;48:532–7. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-48.6.532>.
- [38] Debs-Louka E, Louka N, Abraham G, Chabot V, Allaf K. Effect of compressed carbon dioxide on microbial cell viability. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:626–31. <https://doi.org/10.1128/aem.65.2.626-631.1999>.
- [39] Ma X. TNF- α and IL-12: a balancing act in macrophage functioning. *Microbes Infect* 2001;3:121–9. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01359-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01359-9).
- [40] Jiménez de Bagüés MP, Terraza A, Gross A, Dornand J. Different responses of macrophages to smooth and rough *Brucella* spp.: relationship to virulence. *Infect Immun* 2004;72:2429–33. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2429-2433.2004>.
- [41] Baldwin CL, Goenka R. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: Does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? *Crit Rev Immunol* 2006;26:407–42. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v26.i5.30>.
- [42] Jain-Gupta N, Waldrop SG, Tenpenny NM, Witonsky SG, Boyle SM, Sriranganathan N. Rough *Brucella neotomae* provides protection against *Brucella suis* challenge in mice. *Vet Microbiol* 2019;239. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108447>.
- [43] Kim S, Dong SL, Watanabe K, Furuoka H, Suzuki H, Watarai M. Interferon- γ promotes abortion due to *Brucella* infection in pregnant mice. *BMC Microbiol* 2005;5:22. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-22>.
- [44] Ren J, Hou H, Zhao W, Wang J, Peng Q. Administration of exogenous progesterone protects against *Brucella abortus* infection-induced inflammation in pregnant mice. *J Infect Dis* 2021;224:532–43. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa722>.
- [45] Sancho P, Tejedor C, Sidhu-Muñoz RS, Fernández-Lago L, Vizcaíno N. Evaluation in mice of *Brucella ovis* attenuated mutants for use as live vaccines against *B. ovis* infection. *Vet Res* 2014;45:1–10. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-61>.
- [46] Da Costa MR, Irache JM, Blasco JM, Muñoz MP, Marín CM, Grilló MJ, et al. Evaluation of particulate acellular vaccines against *Brucella ovis* infection in rams. *Vaccine* 2010;28:3038–46. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.10.073>.
- [47] Tobias L, Cordes DO, Schurig GG. Placental pathology of the pregnant mouse inoculated with *Brucella abortus* strain 2308. *Vet Pathol* 1993;30:119–29. <https://doi.org/10.1177/030098589303000204>.
- [48] Tobias L, Schurig GG, Cordes DO. Comparative behaviour of *Brucella abortus* strains 19 and RB51 in the pregnant mouse. *Res Vet Sci* 1992;53:179–83. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(92\)90107-D](https://doi.org/10.1016/0034-5288(92)90107-D).
- [49] Wang Z, Wang SS, Wang GL, Wu TL, Lv YL, Wu QM. A pregnant mouse model for the vertical transmission of *Brucella melitensis*. *Vet J* 2014;200:116–21. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.12.021>.
- [50] Watanabe K, Tachibana M, Tanaka S, Furuoka H, Horiuchi M, Suzuki H, et al. Heat shock cognate protein 70 contributes to *Brucella* invasion into trophoblast giant cells that cause infectious abortion. *BMC Microbiol* 2008;8. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-212>.
- [51] Hensel ME, García-González DG, Chaki SP, Hartwig A, Gordy PW, Bowen R, et al. Vaccine candidate *Brucella melitensis* 16M Δ vjbR is safe in a pregnant sheep model and confers protection. *Ther Prev* 2020;5:120–220. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00120-20>.
- [52] Jiménez de Bagüés MP, Marín CM, Barberán M, Blasco JM. Responses of ewes to *B. melitensis* Rev1 vaccine administered by subcutaneous or conjunctival routes at different stages of pregnancy. *Ann Rech Vet* 1989;20:205–13.
- [53] Muñoz PM, De Miguel MJ, Grilló MJ, Marín CM, Barberán M, Blasco JM. Immunopathological responses and kinetics of *Brucella melitensis* Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. *Vaccine* 2008;26:2562–9. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.03.030>.
- [54] Pérez MM, Marín CM, Grilló MJ. Vacunación de ovejas lactantes con Rev1 por vía conjuntival. *ITEA* 1995;16:536–8.
- [55] Gruber JF, Newman A, Egan C, Campbell C, Garafalo K, Wolfgang DR, et al. Notes from the field: *Brucella abortus* RB51 infections associated with consumption of raw milk from Pennsylvania-2017 and 2018. *Morb Mortal Wkly Rep* 2020;69. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00240-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00240-7).
- [56] Zundel E, Verger JM, Grayon M, Michel R. Conjunctival vaccination of pregnant ewes and goats with *Brucella melitensis* Rev 1 vaccine: Safety and serological responses. *Ann Rech Vet* 1992;23:177–88.
- [57] Higgins JL, González-Juarrero M, Bowen RA. Evaluation of shedding, tissue burdens, and humoral immune response in goats after experimental challenge with the virulent *Brucella melitensis* strain 16M and the reduced virulence vaccine strain Rev. 1. *PLoS One* 2017;12:1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185823>.
- [58] Ponsart C, Riou M, Locatelli Y, Jacques I, Fadeau A, Jay M, et al. *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccination generates a higher shedding risk of the vaccine strain in Alpine ibex (*Capra ibex*) compared to the domestic goat (*Capra hircus*). *Vet Res* 2019;50:1–13. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0717-0>.
- [59] Grilló MJ, De Miguel MJ, Muñoz PM, Marín CM, Ariza J, Blasco JM. Efficacy of several antibiotic combinations against *Brucella melitensis* Rev 1 experimental infection in BALB/c mice. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:622–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl289>.
- [60] Ariza J, Bosch J, Gudíol F, Liñares J, Viladrich PF, Martín R. Relevance of *in vitro* antimicrobial susceptibility of *Brucella melitensis* to relapse rate in human brucellosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;30:958–60. <https://doi.org/10.1128/AAC.30.6.958>.
- [61] Wang Z, Wu Q. Research progress in live attenuated *Brucella* vaccine development. *Curr Pharm Biotechnol* 2013;14:887–96. <https://doi.org/10.2174/1389201014666131226123016>.
- [62] Wang Z, Niu JR, Wang XL, Wu TL, Cheng J, Lu L, et al. Evaluation of a *Brucella melitensis* mutant deficient in O-polysaccharide export system ATP-binding protein as a rough vaccine candidate. *Microbes Infect* 2014;16:633–9. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.06.013>.
- [63] Elzer PH, Enright FM, McQuiston JR, Boyle SM, Schurig GG. Evaluation of rough mutant of *Brucella melitensis* in pregnant goats. *Res Vet Sci* 1998;64:259–60. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(98\)90135-7](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(98)90135-7).
- [64] Arellano-Reynoso B, Díaz-Aparicio E, Leal-Hernández M, Hernández L, Gorvel JP. Intracellular trafficking study of a RB51 *B. abortus* vaccinal strain isolated from cow milk. *Vet Microbiol* 2004;98:307–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.10.024>.
- [65] González-Espinoza G, Arce-Gorvel V, Mémet S, Gorvel J-P, Oliveira C. *Brucella*: reservoirs and niches in animals and humans. *Pathogens* 2021;10. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020186>.
- [66] Quinn HE, Ellis JT, Smith NC. *Neospora caninum*: a cause of immunemediated failure of pregnancy? *Trends Parasitol* 2002;18:391–4. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02324-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02324-3).
- [67] Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 1997;18:478–82. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)01127-4](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)01127-4).
- [68] Verger JM, Grayon M, Zundel E, Lechopier P, Olivier-Bernardin V. Comparison of the efficacy of *Brucella suis* strain 2 and *Brucella melitensis* Rev. 1 live vaccines against experimental infection with *Brucella melitensis* in pregnant ewes. *Elsevier Sci Ltd* 1995;19:191–6. <https://doi.org/10.20506/rst.20.3.1305>.
- [69] Ducrottoy MJ, Muñoz PM, Conde-Álvarez R, Blasco JM, Moriyón I. A systematic review of current immunological tests for the diagnosis of cattle brucellosis. *Prev Vet Med* 2018;151:57–72. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.01.005>.
- [70] Chacón-Díaz C, Zabalza-Baranguá A, San Román B, Blasco JM, Iriarte M, Salas-Alfaro D, et al. *Brucella abortus* S19 GFP-tagged vaccine allows the serological identification of vaccinated cattle. *PLoS One* 2021;16:e0260288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260288>.
- [71] Vassen V. Polarity of envelope growth and heterogeneity of the outer membrane of *Brucella abortus*. *Université de Namur*; 2018.



upna

Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa