

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**CARACTERIZACIÓN DE GENES DE INVASIÓN CELULAR DE
*Brucella melitensis***

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTA:**

RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO

Tutor Principal: Francisco Suárez Güemes

**Comité Tutorial: Antonio Verdugo Rodríguez
José Luis Puente García**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue financiado por los proyectos:

UNAM-PAPIIT: IN-245802 y CONACYT: C02-45271

Durante la realización de la tesis el alumno fue becado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología: No. de registro 96148

DEDICATORIA

A mis Padres y Hermanos, gracias por su apoyo incondicional.

A mi hermano Osvaldo, por que algún día nos volveremos a encontrar, descansa en paz.

A la Familia Martínez-Chavarría, por darme la oportunidad de conocerlos y compartir bellos momentos.

A ti, parte esencial de mi vida. Por qué aunque te encuentres lejos, siempre estas a mi lado. Quien sino?

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial, por sus valiosos comentarios para la realización de este trabajo.

A los integrantes del jurado, por la crítica constructiva para mejorar este trabajo.

A Erika Carrillo y Beatriz Arellano, por su valiosa ayuda en las artes del cultivo celular.

A mis compañeros de laboratorio: Lucy, Erika, Beatriz, Yuliett, Rosalia, Alma, Irasema, Gaby, Olga, Alexis, Valeria, Elihú, Jorge, Uziel, Pablo, Bruno, Víctor, Carlos, Rosa Elena, Antonio, José Ángel y Marino, por hacer menos difícil el trabajo.

A la Dirección de Investigación del Hospital General Dr. Manuel Gea González, en especial al Dr. Pablo Maravilla, gracias por la oportunidad de ser parte de ustedes.

ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Diagnóstico	3
1.3 Serología	4
1.4 Identificación Molecular	5
1.5 Control y Prevención	6
1.6 Taxonomía	7
1.7 Factores de Virulencia	9
1.8 Lipopolisacárido	9
1.9 Sobrevivencia Intracelular	11
1.10 Sistema de Secreción IV	15
1.11 Interacción de <i>Brucella</i> con la Célula Hospedadora	17
1.12 Sistema de dos Componentes <i>bvrRS</i>	18
1.13 Glucano cíclico β-1,2	19
1.14 Genoma	20
1.15 Genoma de <i>Brucella melitensis</i>	24
2 JUSTIFICACIÓN	26
3 HIPÓTESIS	28
4 OBJETIVOS	28
4.1 Objetivos Específicos	28
5 MATERIAL Y MÉTODOS	29
5.1 Cepas bacterianas y Condiciones de Cultivo	29

5.2 Oligonucleótidos y Reactivos	29
5.3 Clonación y Construcción de la Mutante BMEI0216 de <i>B. melitensis</i>	29
5.4 Clonación y Construcción de la Mutante <i>invB</i> de <i>B. melitensis</i>	32
5.5 Clonación y Construcción de la Mutante <i>aida-I</i> de <i>B. melitensis</i>	33
5.6 Ensayos de Complementación	34
5.7 Ensayos de Invasión en Distintos Tipos Celulares	34
6 RESULTADOS	36
6.1 Clonación y Construcción de la Mutantes BMEI0216 de <i>B. melitensis</i>	36
6.2 Ensayos de Invasión de la Mutante BMEI0216 de <i>B. melitensis</i>	43
6.3 Supervivencia Intracelular de la Mutante BMEI0216 de <i>B. melitensis</i>	46
6.4 Clonación y Construcción de la Mutante <i>invB</i> de <i>B. melitensis</i>	47
6.5 Clonación y Construcción de la Mutante <i>aida-I</i> de <i>B. melitensis</i>	53
7 DISCUSIÓN	63
8 CONCLUSIONES	69
9 PERSPECTIVAS	69
10 LITERATURA CITADA	70

RESUMEN

Los miembros del género *Brucella* son microorganismos intracelulares facultativos, Gram negativos que no forman esporas y son inmóviles. *Brucella* es el agente etiológico de la brucelosis, una enfermedad infecciosa de curso crónico que afecta a los animales domésticos y silvestres, así como constituir una de las principales zoonosis en el mundo. En comparación con otros patógenos bacterianos, *Brucella* carece de factores de virulencia clásicos como exotoxinas, variación antigénica, plásmidos de virulencia, formas de resistencia, pili, flagelo y cápsula. En forma general la virulencia de *Brucella* radica en la habilidad de invadir, sobrevivir y replicarse dentro de vacuolas especializadas en una gran variedad de tipos celulares. Dentro de éstos, los macrófagos son el mayor blanco en animales infectados y constituyen un eficiente vehículo para distribuir a la bacteria a diferentes tejidos. Asimismo, se ha demostrado que macrófagos, neutrófilos y células M ingieren a *Brucella* mediante fagocitosis tipo “Zipper-like”. Sin embargo, los mecanismos que determinan el tropismo celular, así como los mecanismos de adhesión e invasión aún no están completamente descritos. En este trabajo se analizó el gen BMEI0216 de *Brucella melitensis*, que codifica para una proteína hipotética con características de proteína asociada transglicosilada. Para evaluar la función del gen BMEI0216 construyó una mutante por inserción de un cassette de kanamicina en el sitio único *HpaII* del gen BMEI0216 y se realizaron ensayos de invasión en células HeLa y en ensayos de sobrevivencia intracelular en macrófagos murinos. La mutación no afectó la sobrevivencia o multiplicación en macrófagos murinos. Al realizar ensayos de invasión utilizando células HeLa, no se observaron diferencias en tiempos de 30 y 45 min, sin embargo en tiempos de 1 y 2 horas, la mutante fue incapaz de invadir. Estos resultados sugieren que el gen BMEI0216 es necesario para la invasión de *B. melitensis*. Por otro lado, se analizó la región que contiene el gen *aida-I* anotado como BMEII1069, el cual codifica para el dominio de un autotransportador de 1461 pb y un producto de 487 aminoácidos. La manipulación genética de esta región al construir una mutante en el gen *aida-I* mostró diferencias en los fragmentos adyacentes. El análisis de esta región demostró que el gen que se encuentra corriente arriba (BMEII1070) es el dominio pasajero de este autotransportador y que en una región intergénica entre ambos genes se encontraban tres codones de paro, por lo que fue anotado como un pseudogen. Por ultimo en este trabajo

se construyó una mutante por inserción en el gen *invB* de *B. melitensis* y su caracterización se encuentra en proceso.

Palabras clave: *Brucella melitensis*, invasión, *aida-I*,

ABSTRACT

Members of the *Brucella* genus are intracellular facultative microorganisms. Gram negatives, immobile, and non spore forming bacteria. *Brucella* is the etiological agent of brucellosis, an infectious and chronic disease, which affects domestic and wild animals. Brucellosis is considered one of the most important zoonosis in the world. In comparison with other pathogenic bacteria *Brucella* lacks the known virulence factors such as exotoxins, antigenic variation forms, virulence plasmids, resistant forms, pili, flagella and capsule. In general, *Brucella* virulence factors are based on its ability to invade and survive within specialized vacuoles in a wide range of cells. Among them, macrophages are the major target and constitute an efficient vehicle to distribute the bacteria to different tissues in infected animals. Macrophages, neutrophils and M cells had been demonstrated to internalize *Brucella* by Zipper-like phagocytosis. Nevertheless, the mechanisms that determine cellular tropism, as well as the adhesion and invasion mechanisms are not completely described yet. In this work, we assess the interruption of a BMEI0216 gene of *Brucella melitensis*, by using HeLa epithelial cells and murine macrophages for invasion and replication experiments assays. The mutation did not affect survival or multiplication into macrophages. Likewise, in invasion assays with HeLa cells no differences were observed at 30 and 45 min, whereas at 1h and 2 h, the infection ability of mutant was drastically affected. These results suggest that the BMEI0216 gene is required for *B. melitensis* internalization. We analyzed the region that contains the *aida-I* gene, this gene was annotated as BMEII1069, and codifies for a β -domain of an autotransporter with size of 1461 bp and a predicted product of 487 amino acids. The genetic manipulation of the region when an *aida-I* mutant was constructed showed differences in the adjacent fragments to the gene. This region analysis demonstrated that the upstream gene (BMEII1070) is the passenger domain of this autotransporter and three stop codons are in an intergenic region between these genes, therefore it was annotated as pseudogen. Finally, a mutant was constructed by insertion in the *invB* gene of *B. melitensis* and its characterization is in progress.

Keywords: *Brucella melitensis*, invasion, *aida-I*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa de origen bacteriano que afecta al humano así como a diferentes especies animales domésticas y silvestres. Esta enfermedad es de distribución mundial y se considera como enzoótica en la república mexicana. Sin embargo, en algunos países los programas de control y erradicación han permitido su eliminación total como es el caso de Inglaterra, Noruega, Suecia, Dinamarca y Finlandia; o bien reducir considerablemente su incidencia como Japón, Nueva Zelanda, Australia y Alemania. En la actualidad la brucelosis es una de las enfermedades bacterianas más importantes en México y el mundo, y su impacto se ve reflejado en las grandes pérdidas económicas en el sector agropecuario, que resultan de la enfermedad en el ganado y de las restricciones aplicadas tanto a los animales infectados como a los productos de éstos, además de su importancia en salud pública.^{1,2,}

3

El Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud en México reportó 1961 casos en el 2005, para el 2006 se reportaron 1799 casos, en donde el estado de Nuevo León fue el de mayor número de casos con 177, seguido de San Luís Potosí con 145 casos, Jalisco con 142 casos, Coahuila 139 casos y Guanajuato con 138 casos. Los datos reportados hasta la semana 13 del 2007 señalan 468 casos, siendo Guanajuato el de mayor numero de casos con 76, Nuevo León con 54 y Tamaulipas con 38 casos.

Los microorganismos del género *Brucella*, son coco-bacilos Gram negativos, intracelulares facultativos, no móviles y no forman esporas. Crecen lentamente en los medios básicos; su crecimiento se puede mejorar mediante la adición de sangre o suero y en algunos casos con la adición de CO₂, el cual es esencial para ciertos biotipos. Su metabolismo es aerobio; no hay crecimiento bajo condiciones estrictas de anaerobiosis. Estos microorganismos tienen poca o nula acción fermentativa sobre los carbohidratos en medios convencionales. Oxidan ciertos aminoácidos, así como intermediarios del ciclo de la urea. Son catalasa positivos y usualmente oxidasa positivos, reducen nitratos e hidrolizan la urea en diferentes grados. Además, no producen hemólisis y no utilizan el citrato como única fuente de carbono.^{1,2}

En México, han sido aisladas 5 de las 6 especies identificadas de *Brucella*. Entre éstas se encuentran *B. melitensis* biotipo 1-3; *B. abortus* biotipos 1, 2, 4-6; *B. suis* biotipo 1, *B. canis* y *B. ovis*. Algunos de estos aislamientos se han realizado en hospedadores no tradicionales, por lo que parece que el contacto de un animal a otro, ayuda a diseminar la enfermedad.³

La brucelosis es además una zoonosis muy importante, ya que algunas especies de *Brucella* pueden ser transmitidas al humano y causar enfermedad. Por ejemplo, fiebre ondulante por *B. abortus* y fiebre de Malta por *B. melitensis*. La infección puede adquirirse por vía conjuntival, por aerosoles o a través de piel lesionada, pero el consumo de leche cruda y productos derivados constituye la principal fuente de transmisión. Los síntomas de la brucelosis humana son inespecíficos; la mayoría de los pacientes presentan fiebre, debilidad, dolor de cabeza y artralgia. Esta enfermedad puede afectar varios sistemas, en los que produce diversos signos y síntomas, tales como artritis, espondilitis, osteomielitis, meningoencefalitis, endocarditis, abscesos hepáticos y esplénicos, orquitis y ocasionalmente neumonía.^{4,5}

En humanos el diagnóstico requiere el aislamiento del microorganismo a partir de sangre o tejidos corporales, así como pruebas serológicas y manifestaciones clínicas. Entre los antibióticos utilizados para el tratamiento de la enfermedad se encuentran las tetraciclinas, doxiciclina, rifampicina, estreptomina, quinolonas y sulfas-trimetoprim; un punto importante a señalar es que en los animales de producción no se da tratamiento terapéutico, los animales positivos pueden entrar a un programa de vacunación o enviarse a rastro. Por otro lado, en animales de compañía como los perros se puede llegar a dar tratamiento terapéutico aunado a la castración y ovario-histerectomía.⁴

Brucella abortus, *B. melitensis* y *B. suis* constituyen las principales especies patógenas para el ser humano. En la República Mexicana del total de los casos anuales el 93% de los humanos son infectados con *B. melitensis* de origen caprino, 5% con *B. melitensis* de origen bovino, 1.5% con *B. abortus* de origen bovino y 0.5% con *B. suis* de origen bovino.⁶

1.2. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la brucelosis se realiza por medio del aislamiento del microorganismo y su caracterización bacteriológica mediante pruebas bioquímicas. Dependiendo del número de características fenotípicas analizadas, los organismos son caracterizados en género, especie, biotipo y algunas veces se puede llegar a identificar el tipo de cepa, en forma específica para el caso de las cepas vacunales, las cuales también suelen causar problemas de abortos, e inclusive ocasionar enfermedad en el humano.⁷

Las muestras para obtener el aislamiento abarcan desde placenta, descargas vaginales, tejidos fetales o contenido abomasal, leche, calostro o ambos y de tejidos colectados en la necropsia, como glándula mamaria, útero, linfonodos, testículos, epidídimo y glándulas accesorias. Existen diversos medios de cultivo que se utilizan para el aislamiento, los medios clásicos son el agar tripticasa soya (TSA), agar Brucella y el agar sangre; éstos pueden ser suplementados con bacitracina, polimixina B y vancomicina. Sin embargo, cuando se trata de muestras clínicas que implican la presencia de flora normal o presencia de microorganismos contaminantes el medio Farell es el medio de elección, este medio de cultivo tiene como base el medio de agar Brucella y polimixina B 2,500 U, bacitracina 12,500 U, nistatina 50,000 U, ciclohexamida 50 mg, vancomicina 10 mg y ácido nalidixico 2.5 mg, asimismo para aislamientos primarios se puede adicionar 10% de suero fetal bovino.⁸

Las colonias que produce *Brucella* en medio de TSA o agar brucella tienen un tamaño de 0.5 a 1 mm de diámetro, de borde entero, después de 72 h de incubación a 37°C. Bajo la luz directa, las colonias con morfología lisa son brillantes, amarillentas, pero bajo el reflejo de la luz son de color azul; las colonias rugosas son similares en cuanto a tamaño y forma. La identificación adicional se realiza mediante pruebas metabólicas y susceptibilidad a los fagos.^{2,8}

La identificación de biotipos se realiza con base en el crecimiento a diferentes concentraciones de colorantes (tionina y fucsina básica), producción de H₂S, requerimientos de CO₂ y aglutinación con antisueros específicos A, M y R.⁸

El aislamiento e identificación a partir de muestras clínicas tiene algunas desventajas, una de las más importantes es la duración desde que se tiene la muestra clínica hasta la identificación definitiva, típicamente se utilizan dos semanas, periodo de tiempo importante para el ganadero, procesador de alimentos o paciente enfermo. Asimismo, las pruebas son complejas y deben realizarse por personal capacitado en un laboratorio certificado.⁷

1.3. SEROLOGÍA

En México, el diagnóstico obligatorio de la Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales para los bovinos incluye pruebas serológicas oficiales: rosa de bengala y rivanol, como pruebas primarias; fijación de complemento como prueba complementaria y confirmatoria; y la prueba de anillo en leche o anillo de Bang como prueba de vigilancia epidemiológica. Para el caso de ovinos y caprinos la prueba primaria es rosa de bengala y la prueba complementaria es fijación de complemento. En el mismo sentido, se ha descrito una gran variedad de pruebas que ayudan a resolver de una forma más rápida y precisa el diagnóstico de la brucelosis, como las pruebas de ELISA, ELISA indirecta y competitiva, y recientemente la prueba de fluorescencia polarizada, las cuales cada vez son más utilizadas. Su integración a la campaña nacional se ha mencionado; sin embargo, aun se mantienen en etapa de experimentación.^{2, 3, 8}

1.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Mediante técnicas de biología molecular se han realizado importantes aportaciones para la sección de diagnóstico, la búsqueda de regiones o de genes específicos que permitan lograr una identificación más rápida y segura de estos microorganismos ha tenido grandes avances. Se han diseñado diversos iniciadores utilizados en técnicas de amplificación de ADN en forma específica en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permiten identificar y diferenciar a diversas especies de *Brucella*, y en algunos casos biotipos y cepas.

Existen diversos tipos de PCR para identificar al género *Brucella*, los primeros iniciadores fueron diseñados para amplificar un locus único que era altamente conservado en *Brucella*, como el gen BCSP31 o el operón 16S-23S ARNr.^{9, 10} Estos ensayos son útiles cuando un PCR género específico es suficiente, tal es el caso de las infecciones por *Brucella* en el humano, ya que en primera instancia es importante saber si se trata de *Brucella*, esto con el fin de asegurar el tratamiento adecuado. Los estudios posteriores determinarán la especie involucrada, esta situación es similar en la caso de la microbiología de alimentos, donde la identificación de la especie no es un punto crítico.⁷

Por otro lado, se han desarrollado diferentes PCR's para diferenciar entre especies y biotipos de *Brucella*. Estos ensayos son dirigidos hacia locus variables entre las especies y biotipos. Mientras que se han encontrado deleciones o inversiones dentro de algunas especies o biotipos, la mayoría de las diferencias consisten en polimorfismos de nucleótidos simples; son muy raras las regiones variables entre especies y biotipos. Los ensayos que diferencian entre especies o biotipos son particularmente útiles para la vigilancia epidemiológica o para aquellos programas de erradicación especie-específicos.

Ejemplo de este método es el AMOS-PCR, llamado así por las especies que es capaz de identificar y diferenciar (*abortus*, *melitensis*, *ovis* y *suis*), que explota el hecho de que muchas especies presentan al menos una secuencia de inserción IS711 con localización cromosomal única. Recientemente Ocampo-Sosa y col., reportaron una nueva variedad genética del biotipo 3 de *B. abortus*, utilizando como gen específico la secuencia de inserción IS711.^{11, 12, 13, 14, 15}

Existen otras versiones en técnicas de amplificación de ADN que permiten identificar las especies de *Brucella*, en estos métodos se emplean iniciadores cortos, diseñados arbitrariamente que se alinean a secuencias de ADN bajo condiciones de baja astringencia, lo que permite la hibridación al azar de secuencias parcialmente homólogas. Las metodologías son el AP-PCR (*Arbitrary primed PCR*) y el RAPD-PCR (*Random amplified polymorphic DNA PCR*).¹⁶

Diversos grupos de investigación han desarrollado métodos para la detección del microorganismo a partir del análisis directo de las muestras clínicas como tejidos del aborto y la madre, semen y sangre^{17, 18, 19, 20, 21, 22}. Aunado a esto también se han diseñado metodologías para la detección de *Brucella* en alimentos como la leche y queso, así como al diagnóstico de la brucelosis en humanos a partir de muestras de sangre periférica.^{23, 24, 25, 26, 27, 28}

1.5. CONTROL Y PREVENCIÓN

En nuestro país se publicó en 1995 la Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995 con el nombre de Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales, cuyo objeto establece los procedimientos, actividades, criterios, estrategias y técnicas para el control y eventual erradicación de la brucelosis en las especies susceptibles en todo el territorio nacional.²⁹ La campaña establece el concepto de regionalización, pudiendo reconocer zonas de control, erradicación y libres en el ámbito municipal, estatal, regional y nacional. Las estrategias de la campaña son la constatación de hatos y la vacunación. La primera tiene como objetivo final el establecimiento de hatos libres, a través del muestreo y la eliminación de animales reactivos. Para llevar a cabo estas acciones se reconocen tres fases o zonas: control, erradicación y libre de brucelosis.

Para llevar a cabo estas acciones la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), tiene instrumentado un esquema de aprobación de Médicos Veterinarios en ejercicio libre, para que desarrollen actividades de campaña y aplique esta normativa. Para el diagnóstico de la brucelosis bovina se utilizan las pruebas primarias y confirmatorias antes mencionadas y para la vacunación se cuenta con la vacuna oficial RB51 de *B. abortus*. Sin embargo, es importante señalar que en la década pasada, la vacuna que se usaba ampliamente en los bovinos, era la cepa vacunal *B. abortus* S19, y aunque nunca se eliminó del esquema de vacunación en los bovinos esta vacuna dejó de producirse en nuestro país. Recientemente, diversos productores de leche del país han adoptado de nuevo la vacuna S19 como la cepa de elección para el control de la brucelosis en sus hatos. Además, se propone el uso de la prueba de anillo en leche para la vigilancia epidemiológica de la enfermedad en zonas de recolección lechera o cuencas productoras.

Para el control de la brucelosis en ovinos y caprinos la Norma Oficial Mexicana establece a la vacunación con la cepa de *B. melitensis* Rev1, cepa lisa que aun conserva virulencia residual. Debido a su naturaleza lisa, los anticuerpos generados pueden confundirse con las pruebas serológicas de diagnóstico. Sin embargo, la cepa Rev1 es considerada la mejor vacuna disponible para el control de la brucelosis en ovinos y caprinos.²⁹

1.6. TAXONOMÍA

Con base en su patogenicidad y preferencia por el hospedero, el género *Brucella* ha sido clasificado en seis especies clásicas: *B. abortus* (bovinos), *B. melitensis* (cabras y ovejas), *B. suis* (cerdo), *B. ovis* (ovejas), *B. canis* (perros) y *B. neotomae* (rata del desierto). *Brucella abortus* ha sido clasificada en 7 biotipos, *B. suis* en 5 biotipos y *B. melitensis* en tres biotipos; las demás permanecen como especies únicas. La diferenciación entre especies y biotipos se realiza mediante pruebas que permitan la caracterización fenotípica de antígenos de superficie (lipopolisacárido), requerimientos de CO₂, producción de H₂S, susceptibilidad a fagos, sensibilidad a colorantes (tionina y fucsina), producción de ureasa y propiedades metabólicas.^{2, 3, 29}

Recientemente nuevas cepas que afectan mamíferos marinos se han aislado y de acuerdo al polimorfismo de DNA utilizando el locus *omp2* y su preferencia por el hospedero se han propuesto dos nuevas especies: *Brucella cetaceae* para aislamientos de cetáceos y *Brucella pinnipediae* para aislamientos de pinípedos. Asimismo, entre ellos pueden ser diferenciados de acuerdo a características fenotípicas y metabólicas como requerimientos de CO₂, crecimiento primario en medio Farrell y actividad metabólica sobre la galactosa.^{30, 31, 32, 33}

De acuerdo a estudios moleculares sobre la unidad 16S ARNr, el género *Brucella* pertenece a la subdivisión α -2 de la clase *Proteobacteria*, y poseen una estrecha relación filogenética con patógenos y simbiontes de plantas tales como *Agrobacterium*, *Mesorhizobium*, y *Rhizobium*, así como a parásitos intracelulares que afectan mamíferos como *Bartonella* y *Rickettsia* y a bacterias de vida libre y oportunistas como *Ochrobactrum* y *Caulobacter*.^{34, 35}

Estudios de hibridación DNA-DNA han revelado un alto grado de homología (>90%) entre las seis especies de *Brucella*, por lo que se ha propuesto como un género monoespecífico *B. melitensis*, considerando a las otras cinco especies como subespecies de *B. melitensis*. Sin embargo, la validez taxonómica de este hecho ha sido aceptada, pero la nueva nomenclatura propuesta, en la que *Brucella* constituiría un género monoespecífico con *B. melitensis* como única especie y las restantes como biotipos de ésta, se ha encontrado con oposiciones en el campo práctico.³⁶

Otros métodos que utilizan mapeos de restricción e hibridaciones cruzadas para proporcionar una lista genética han mostrado concordancia con la taxonomía clásica del género. Hoy en día se requiere de estudios de secuenciación a gran escala para proporcionar datos y resolver la posición taxonómica de las especies de *Brucella* y tener suficientes datos que permitan generar un grupo filogenético robusto. La mayoría de las especies del género *Brucella* posee dos cromosomas, con excepción de *B. suis* biotipo 3, que posee un solo cromosoma; el porcentaje de Guanina+Citosina en forma general en el ADN es de 58-59%.³⁷

Estudios de secuenciación de las diferentes especies se encuentran en progreso, esta búsqueda ayudara a proveer suficiente información para formar árboles filogenéticos y así resolver el verdadero estado de la taxonomía de *Brucella*. La gran uniformidad entre el género *Brucella* ofrece la oportunidad de poder encontrar genes relacionados con la patogenicidad, así como genes utilizables como marcadores específicos vía análisis de genómica comparativa.

1.7. FACTORES DE VIRULENCIA

La característica principal del género *Brucella* es la habilidad de sobrevivir dentro de las células fagocíticas y no fagocíticas; sin embargo, esta habilidad está representada por una gran variedad de factores, hasta el momento no se ha demostrado que un factor único sea el responsable de la virulencia del género *Brucella*.

El destino preferido de *Brucella* es la formación de un nicho intracelular donde puede sobrevivir, multiplicarse y expandirse a nuevas células. Por lo tanto, los verdaderos factores de virulencia de *Brucella* son aquellos que le permiten invadir, resistir la muerte intracelular y alcanzar su nicho replicativo en fagocitos profesionales y

no profesionales. En contraste con otros patógenos, en *Brucella* no se han descrito factores de virulencia clásicos, como exotoxinas, citolisinas, cápsula, fimbrias y plásmidos de virulencia. Dentro de los factores de virulencia descritos en *Brucella* destacan algunos como el LPS y sus dos variedades.

1.8. LIPOPOLISACÁRIDO

El LPS de bacterias intracelulares pertenecientes a la familia *Proteobacteria* como *Brucella* posee propiedades y estructuras distintas al LPS de las enterobacterias. El LPS de las bacterias Gram negativas está compuesto del lípido A, unido a un centro de oligosacáridos compacto asociado con una cadena de O-polisacáridos (cadena O). La mayoría de las especies de *Brucella* poseen LPS liso (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae* y recientemente las especies de *Brucella* que afectan a mamíferos marinos), este LPS presenta sus tres dominios antes mencionados, por otro lado *B. ovis* y *B. canis*, presentan LPS rugoso de forma natural, donde la cadena O se encuentra afectada por mutaciones naturales. *Brucella* posee un LPS liso peculiar llamada no-clásico, debido a que el lípido A posee un eje compuesto de diaminoglucosa, mientras que la mayoría de las enterobacterias tienen un eje compuesto de glucosamina, además de poseer los grupos acil largos (C18-C19, C28) en lugar de C12 y C14, y están unidos al centro por enlaces amida en lugar de enlaces ester y amida que poseen el LPS de enterobacterias (Fig. 1).^{38, 39}

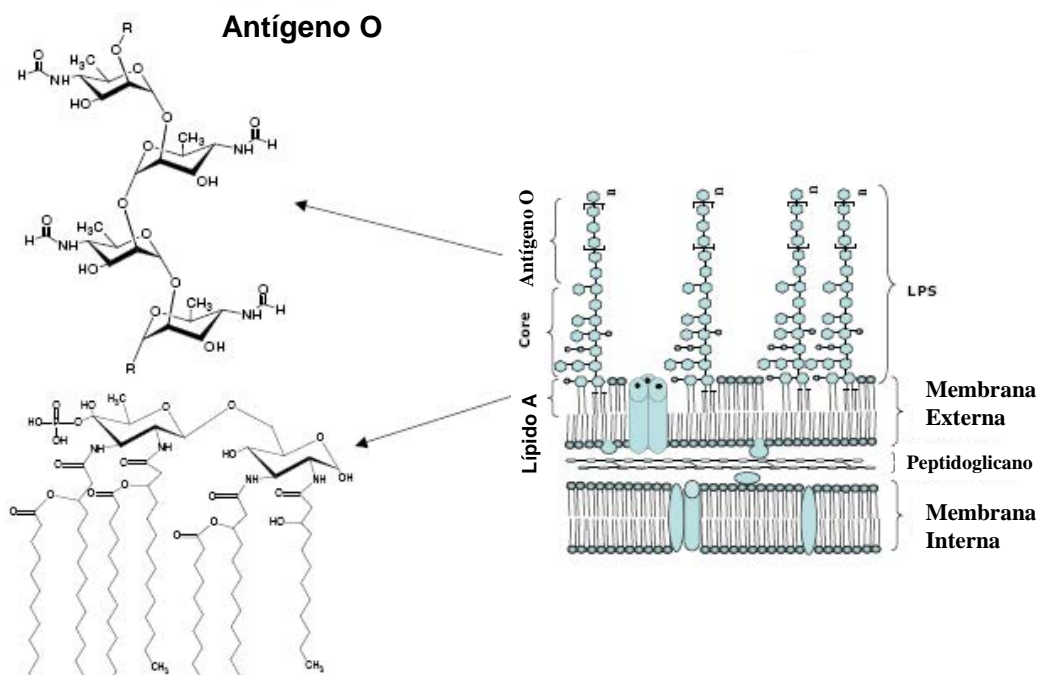


Fig. 1. Esquema estructural del lipopolisacárido (LPS) de *Brucella* spp.⁴⁰

Esta estructura no clásica le confiere a *Brucella* características tales como ser menos activo y varias miles de veces menos tóxico que el LPS de *E. coli*, así como inducir un pobre estallido respiratorio, inducir menos intermediarios de nitrógeno y secreción de lisozima. De igual manera tiene poca influencia en la producción de citocinas como TNF- α , IFN tipo I y tipo II, así como proteínas anti-microbianas como GTPasas de la familia p-47.⁴¹

La virulencia de *Brucella* está asociada a la estructura química del LPS y le permite ser altamente resistente a efectores antibacterianos del sistema inmune innato. Asimismo, se ha observado que puede inhibir el complemento y péptidos antimicrobianos, así como prevenir la síntesis de mediadores inmunes. Como otras bacterias Gram-negativas la membrana externa de *Brucella* está compuesta de una gran variedad de posibles patrones moleculares asociados a patógenos los cuales pueden ser reconocidos por receptores tipo “Toll”. La cadena O puede impedir el reconocimiento específico de estos patrones y como consecuencia evitar la expresión de citocinas e iNOS (sintasa de óxido nítrico inducible), ambas moléculas involucradas en la eliminación de *Brucella* en el ambiente intracelular.

Durante la infección, la resistencia al complemento y al ataque de péptidos catiónicos, así como a la protección contra patrones moleculares asociados a patógenos permiten a *Brucella* sobrevivir antes de formar su nicho intracelular. Además, en los primeros estadios de la infección, el complemento es la única fuente para opsonizar a *Brucella*. Así, previniendo la opsonización, el LPS contribuye a evitar la entrada en las células hospederas debido a rutas no favorables dependientes de receptor-complemento.⁴²

Por otro lado, se ha reportado en *Brucella* con LPS liso que la entrada y la sobrevivencia en las primeras etapas es dependiente de modificaciones de lípidos de la membrana, así como evitar la fusión fago-lisosoma durante las primeras horas de la

infección. Comparada con las especies de *Brucella* con LPS rugoso, ésta no entra vía modificación de lípidos de la membrana y se fusiona rápidamente con lisosomas; en contraste, *Brucella* con LPS liso muerta retrasa la fusión con los lisosomas, confirmado el papel de la cadena O en este evento.⁴³

1.9. SOBREVIVENCIA INTRACELULAR

La sobrevivencia y multiplicación intracelular de *Brucella* son características esenciales para el establecimiento y desarrollo de la fase crónica de la enfermedad. *Brucella* asegura su vida intracelular sobreviviendo a la fusión fago-lisosoma en macrófagos y células epiteliales. Adicionalmente, posee un sistema de secreción tipo IV, conocido como VirB para su sobrevivencia y replicación intracelular. En forma específica VirB se encuentra involucrada en el control de la maduración de la vacuola que contiene a *Brucella*, conocida como Brucelosoma, organelo donde se replica. Una hipótesis sobre la acción directa de VirB es que controla la dirección y destino intracelular de *Brucella* vía el transporte de proteínas dentro de la célula hospedera para alterar las funciones celulares.⁴⁴

Asimismo, se ha descrito que la entrada, sobrevivencia en etapas tempranas y replicación de *Brucella* se ve afectada por modificaciones o perturbaciones de los dominios de lípidos de la membrana, en este sentido se ha propuesto que la sobrevivencia intracelular y la replicación están mediadas por estas modificaciones de lípidos de membrana y son etapas VirB-dependiente. De acuerdo a este modelo, las modificaciones de dominios de lípidos mediarán la entrada de *Brucella* permitiendo a las bacterias silvestres escapar de la vía endocítica, mientras que las mutantes *virB* serán enviadas a la vía endocítica. Recientemente, se ha propuesto que en la entrada de *Brucella* participa la unión de VirB con la proteína de superficie Hsp60 a la proteína celular prión PrP^c. Se describió que la participación de PrP^c es segregando a *Brucella* de la vía endocítica, permitiendo su vida intracelular; sin embargo, esta asociación aún no esta bien descrita.^{45, 46}

Otro modelo alternativo para la sobrevivencia intracelular está basado en el control de la maduración del fagosoma, *Brucella* evita la fusión de la vacuola temprana con los lisosomas asegurando la sobrevivencia en tiempos cortos indicando que la

bacteria es capaz de alterar la maduración de esta vacuola a lo largo de la vía endocítica. La vacuola que contiene a *Brucella* en estadios tempranos interactúa con el endosoma temprano pero no adquiere GTPasas Rab7 o bien otros marcadores endosomales, lo que excluye interacciones de fusión con compartimentos tardíos de la vía endocítica.

Una característica de la vacuola es la rápida adquisición de la glicoproteína lisosomal asociada a membrana-1 (LAMP-1), esta adquisición no implica la maduración a fagolisosoma. Las bases moleculares de la inhibición de la fusión lisosomal no están del todo descritas. Datos recientes indican que VirB no se encuentra asociado a la sobrevivencia en estadios tempranos en diferentes tipos celulares, además VirB no se encuentra involucrado en la evasión de iNOS o NADPH oxidasa y la expresión de VirB es consistente en estadios tardíos.^{47, 48}

En macrófagos murinos la vacuola que contiene a *Brucella* no alberga marcadores endosoma-lisosomal tardíos, indicando que el compartimiento de replicación es segregado de la vía endocítica. La vacuola donde se encuentra *Brucella* rápidamente entra en contacto con el retículo endoplásmico y este evento es independiente de VirB. La unión al retículo endoplásmico es seguida por una adquisición progresiva de marcadores específicos del mismo a través de un evento de fusión limitada. En este estado la vacuola adquiere propiedades de la membrana del retículo y permite la replicación bacteriana. Se observa una total re-organización en el retículo endoplásmico como resultado de la replicación; esta estrategia para generar un organelo de replicación es única en *Brucella* (Figura 2).

Por otra parte, las vacuolas que contienen mutantes *virB* de *Brucella* son deficientes en una maduración completa y no son capaces de sostener una interacción y fusión con el retículo endoplásmico; sin embargo, se ha observado una unión inicial entre *Brucella* y el retículo. En este mismo sentido, las mutantes no pueden controlar las interacciones de la vacuola donde están contenidas junto al retículo, por lo que permanecen como compartimientos inmaduros intermedios y al final son fusionados a los lisosomas.^{49, 50, 51}

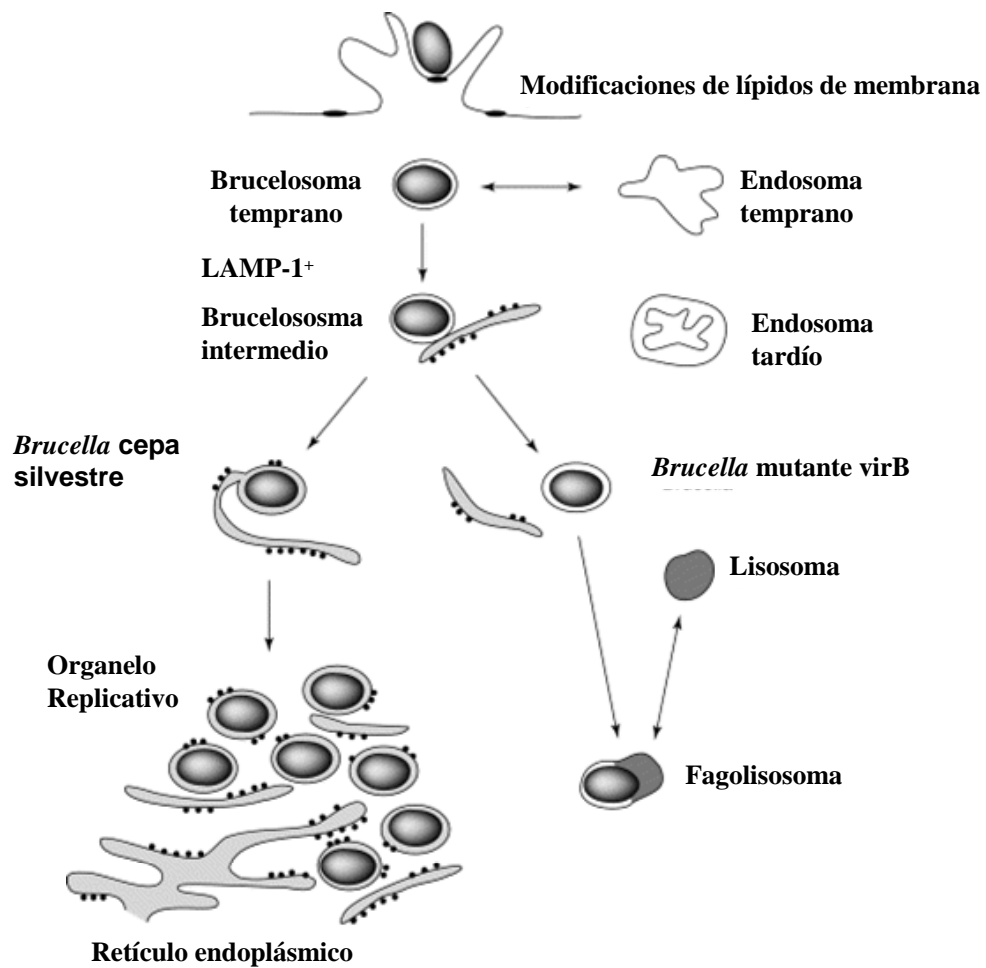


Fig. 2. Modelo dependiente de VirB de *Brucella* en la biogénesis de órgano replicativo (Brucelosoema) en el macrófago. Entrada rápida mediada por modificaciones de lípidos de membrana, *Brucella* escapa de la vía endocítica para ser localizado en una fase intermedia y adquirir rápidamente la glicoproteína lisosomal asociada a membrana-1

LAMP-1⁺, este es un compartimiento no-replicativo que interactúa con el retículo endoplásmico. La unión al retículo endoplásmico es seguida por una adquisición progresiva de marcadores específicos del mismo a través de un evento de fusión limitada. Los organelos derivados de esta fusión soportan la replicación de *Brucella* en vacuolas individuales. Las mutantes VirB son degradadas por la fusión con los lisosomas.⁵¹

1.10. SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO IV

El sistema de secreción tipo IV (SSTIV) es un complejo de multiproteínas que sirven para secretar macromoléculas. Los primeros miembros descritos sirven primariamente para transferir complejos de nucleoproteínas durante la conjugación bacteriana o la transferencia de ADN-T de *Agrobacterium* a células de plantas. Algunos miembros de esta familia, utilizan este sistema para secretar factores de virulencia, por ejemplo: Ptl, sistema para la secreción de la toxina pertusis de *Bordetella pertusis*, el sistema de transporte codificado en la isla de patogenicidad *cag* de *Helicobacter pylori* y el sistema Dot/Icm de *Legionella pneumophila*.

El SSTIV es un grupo complejo de 11 diferentes proteínas que abarcan la pared celular, en *A. tumefaciens* se le conoce al SSTIV como sistema *virB*, de igual manera es conocido en el género *Brucella*. Estudios de función estructural en *A. tumefaciens* han demostrado que existen tres grupos funcionales: El pili en la superficie bacteriana, un poro a través de las dos membranas y dos ATPasas en la membrana interna al lado del citoplasma, la cual provee energía para ensamblar el sistema, así como para transportar el sustrato por el complejo.^{52, 53}

El SSTIV fue descubierto en *Brucella suis* al buscar en un banco de mutantes por inserción TnBlaM la habilidad de sobrevivir y multiplicarse en células epiteliales o en macrófagos. En una de las mutantes se observó que la mutación se encontró en dos genes homólogos a *virB9* y *virB10* de *Agrobacterium tumefaciens* y *ptlG-ptlH* de *B. pertusis*. Al secuenciar las regiones que flanquean esta área se localizó en una región de 12 kb, la cual contenía los 11 genes del SSTIV, en el cromosoma pequeño. Diferentes experimentos han demostrado que mutantes en la región de *virB*, tanto de *B. suis*, *B.*

abortus y de *B. melitensis* son incapaces de sobrevivir y multiplicarse intracelularmente.^{54, 55, 56}

En la actualidad se ha demostrado que *Brucella* posee 11 genes homólogos al sistema *virB* de *A. tumefaciens*, pero además cuenta con un doceavo gen, *virB12*, este gen codifica para una lipoproteína de 19 kDa, y se encuentra presente en los plásmidos pSB102 y pIPO2T presentes en *Sinorhizobium meliloti*. Asimismo, se observó que *virB12* mostró homología con la proteína F de *Pseudomonas fluorescens* y *P. syringae*. A pesar de contar con una región intergénica grande, como la presente entre *virB1* y *virB2*, la cual es de 439 pb, además de poseer otras dos regiones intergénicas pequeñas, entre *virB5* y *virB6* y entre *virB6* y *virB7*, de 183 y 163 pb, los 12 genes en *Brucella* se comportan como un operón (Figura 3).⁵⁶

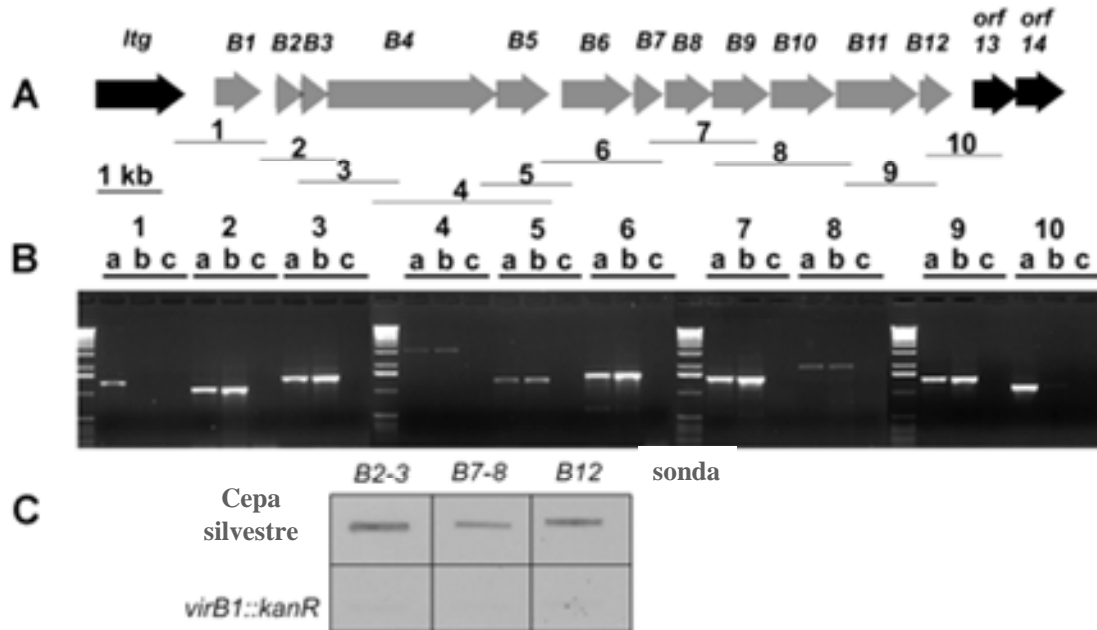


Fig. 3. Organización transcripcional del operón *virB* de *B. suis*. (A) Organización de la región del operón *virB*. Las regiones amplificadas son señaladas por números. (B) Gel de agarosa que muestra los productos de amplificación por RT-PCR. Tres líneas son señaladas [a, control positivo ADN de *Brucella*; b, RT-PCR; c, control negativo (ARN, no RT)]. 1-kb “*ladder*” utilizado como marcador de peso molecular. (C) Ensayo de

hibridación utilizando diferentes sondas *virB* de *B. suis* 1330 y la cepa mutante 1330 *virB1::Kan* mostrando el efecto polar en los genes corriente abajo.⁵⁴

Asimismo, para observar la expresión del sistema *virB* en *B. suis* se han realizado ensayos de invasión en macrófagos murinos utilizando la proteína verde fluorescente como gen reportero, encontrando que a las tres horas post-infección se observaba una señal inducción, y solo en bacterias intracelulares. La expresión del SSTIV en *Brucella* es diferente al observado en bacterias del género *Agrobacterium* y *Bordetella* (bacterias extracelulares), donde la expresión del sistema se lleva a cabo en la superficie de la célula hospedera, y la expresión está regulada por estímulos fisicoquímicos como temperatura, pH, e inductores químicos. En *Legionella* se ha demostrado que el sistema se induce antes de que la bacteria infecte a la célula, en el mismo sentido en otra bacteria intracelular como *Bartonella* se observó que el SSTIV se induce intracelularmente.^{57, 58, 59}

1.11. INTERACCIÓN DE *Brucella* CON LA CÉLULA HOSPEDERA

Como se ha mencionado, una característica importante de *Brucella* es su capacidad para sobrevivir dentro de las células del hospedero. Los detalles de la interacción entre *Brucella* y las células se encuentran poco estudiados. La mayoría de los estudios se han realizado en macrófagos, célula que infecta, donde persiste y se replica. Sin embargo, *Brucella* tiene la habilidad de poder infectar células epiteliales, fagocitos profesionales y no profesionales, tejido respiratorio, neuronas, y tejidos del tracto reproductivo (machos y hembras) entre otras.

En relación a la interacción con trofoblastos de la placenta se ha sugerido que tiene la habilidad de adquirir hierro, elemento indispensable para que *Brucella* entre en su estado replicativo agudo y provoque una alteración en la placenta, dando como resultado el aborto o nacimientos de crías débiles y su infección. Un elemento importante en la determinación del tropismo celular es el eritritol. *Brucella abortus* utiliza este alcohol preferentemente sobre otros azúcares. En estudios *in vitro* se ha observado que al metabolizar el eritritol, *Brucella* aumenta sus necesidades de hierro, activando entonces sideróforos como el ácido 2,3-dihidroxybenzoico o brucebactina.^{60,}

Recientemente, se ha descrito que *Brucella* se une a residuos de ácido siálico presente en glóbulos rojos de humano y animal, esta característica de los glóbulos rojos se observó en los tipos A+ y B+ de origen humano, así como glóbulos rojos de hámster y conejo. La capacidad de hemoaglutinar fue asociada a la proteína de superficie de 29 kDa (SP29) que se une selectivamente a esos eritrocitos. Por otro lado, se demostró que esta hemoaglutinación se inhibía utilizando neuraminidasa, sulfato de condroitina, el ácido N-acetilneuramínico y la N-acetilneuramin-lactosa.

Adicionalmente, este grupo de investigación ha publicado que la proteína de superficie SP41 de *Brucella* se encuentra asociada con la adherencia y la invasión en células epiteliales HeLa. Experimentos con células HeLa tratadas con neuraminidasa no permitieron la unión con la proteína SP41, lo que demostró que el ácido siálico es indispensable para esta interacción. Asimismo, anticuerpos contra SP41 inhibieron la adherencia e invasión en células HeLa. La localización de la proteína fue determinada por inmunofluorescencia e inmunodetección con partículas de oro. La construcción de una mutante en la proteína SP41 confirmó el efecto inhibitorio de *Brucella* con respecto a la adhesión e invasión.^{62, 63}

1.12. SISTEMA DE DOS COMPONENTES *bvrRS*

El operon *bvrRS* de *Brucella* codifica un sistema de regulación de dos componentes que controla la expresión de genes involucrados en el mantenimiento de la integridad de la envoltura celular. Estos genes codifican para múltiples miembros de la familia de proteínas Omp3, así como productos de genes que modifican la composición de ácidos grasos de la molécula del lípido A del LPS. Mutantes en *bvrS* y *bvrR* han mostrado un incremento en la sensibilidad a péptidos catiónicos antimicrobianos en ensayos *in vitro*, comparados con su cepa parental. Asimismo, son menos resistentes a la muerte intracelular en macrófagos y células epiteliales y son marcadamente atenuadas en ratones infectados experimentalmente.

Si bien las bases moleculares de la atenuación de mutantes *bvrRS* son desconocidas, se ha postulado que al alterar las propiedades de la membrana, se provoca que las mutantes en este operón sean menos resistentes a las condiciones ácidas

encontradas en los compartimentos fagosomales durante los primeros estadios de la infección. También se ha demostrado que mutantes en *bvrRS* son menos invasivas en células HeLa o macrófagos y fallan en formar el fagosoma replicativo, ésto sugiere que la superficie alterada de la bacteria tiene influencia en la ruta de la entrada y el tráfico intracelular.^{64, 65}

En adición, estas modificaciones en la integridad de la membrana de *Brucella*, alcanzan a la composición del lípido A del LPS lo que podría influir en interacciones con receptores tipo “*Toll*”, acelerando y aumentando la respuesta inflamatoria para eliminar a este tipo de mutantes *bvrS-bvrR*. El estilo de vida de este microorganismo es semejante al de otras bacterias de la misma familia α -proteobacteria. Tal es el caso de *Sinorhizobium meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens*, los cuales poseen un sistema de regulación de dos componentes homólogo al de *Brucella*, ChvI/ExoS y ChvI/ChvG, respectivamente. Dichos sistemas son utilizados por estos microorganismos para mantener la integridad de su envoltura celular (composición de proteínas de la membrana externa y del lípido A), pero de manera más importante son esenciales para mantener el estado de simbiosis con la planta hospedera para el caso de *Sinorhizobium meliloti* y producir enfermedad en la planta para el caso de *Agrobacterium tumefaciens*.⁶⁶

1.13. GLUCANO CÍCLICO β -1,2

Recientemente se ha descrito al glucano cíclico β -1,2 como una molécula que evita la fusión de *Brucella* con los lisosomas. Este componente periplásmico es producido por proteobacterias de la subdivisión α -2, donde se ha descrito que esta molécula está involucrada en la osmoregulación o bien como supresor de la respuesta de defensa de plantas a bacterias endosimbióticas, como *Bradyrhizobium japonicum*. En el caso de *Brucella* el gen que codifica para este componente es llamado *cgs* y las mutantes en este gen no evitan la fusión con los lisosomas, indicando que el glucano cíclico β -1,2 es necesario para el tráfico intracelular apropiado. Experimentos donde a cultivos de mutantes *cgs* se adicionaba glucano cíclico β -1,2 exógeno previo a ensayos de infección, se observó que se restauraba el tráfico intracelular y una replicación eficiente, esto sugiere que este componente puede ser internado por *Brucella* o bien

unirse a la superficie celular y complementar a la mutante. La función de este componente en la vida intracelular de *Brucella* está relacionada con la habilidad de extraer colesterol de las membranas de células eucariotas, lo cual implicaría que el glucano cíclico β -1,2 es secretado intracelularmente y así modifica los dominios lípidos ricos en colesterol presentes en la membrana fagolisosomal.

Asimismo, este componente podría estar implicado en la maduración de la vacuola debido a las modificaciones de lípidos y consecuentemente evitar la fusión. Esto se ha demostrado ya que las vacuolas que contienen a mutantes *cgs* son pobres en flotilina, molécula presente en la maduración de la vacuola a lo largo de la vía endocítica. Esta ausencia de flotilina se asocia a la modificación de dominios de lípidos de membrana antes mencionada.^{67, 68, 69}

1.14. GENOMA

Los genomas completos de *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus* han sido completados y reportados. El genoma de *B. ovis* ATCC25840 (The Institute for Genomic Research TIGR) se encuentra en proceso. El genoma de *B. melitensis* está compuesto de 3,294, 931 pb distribuidos en 2 cromosomas de 2,117, 144 pb y 1,177, 787 Mb, cada uno. Por otro lado, el genoma de *B. suis* se compone de 3.31-Mb distribuidos en 2 cromosomas de 2, 107, 792 pb y 1, 207, 381 pb. El genoma de *B. abortus* biotipo 1 está formado de 3.3 Mb y se encuentra compuesto de dos cromosomas circulares de 2,124,242 pb (cromosoma I) y 1,162,780 pb (cromosoma II). El contenido de G+C del cromosoma I (57.2%) y cromosoma II (57.3%) de *B. abortus* es idéntico al de *B. suis* y está en concordancia con el de *B. melitensis*.^{70, 71, 72}

Estudios comparativos del genoma de *B. melitensis* y *B. suis* han revelado pocos marcos abiertos de lectura (ORF's) específicos comparados con organismos similares. El análisis de ambos genomas mostró solo 42 genes únicos en *B. suis* y 32 para *B. melitensis*, los cuales se encuentran asociados con islas genómicas, lo que sugiere un posible origen a través de transferencia lateral. Se ha postulado que dentro del género *Brucella* existe poco intercambio genético, debido a su preferencia por sobrevivir dentro de un nicho intracelular que lo protege, dando como resultado una reducción en la

oportunidad de intercambio genético, esto aunado a la ausencia de plásmidos o fagos lisogénicos en *Brucella*.^{71,72}

Con referencia a la localización de islas genómicas en el género *Brucella*, y utilizando la secuencia del genoma completo de *B. melitensis* (especie altamente patógena para el humano), se construyó un microarreglo para localizar sitios específicos de las diferentes especies del género *Brucella*. Al realizar hibridaciones de los genomas marcados de las 5 especies y comparándolo con el de *B. melitensis*, se localizó un total de 217 ORF's alterados o diferentes en las 5 especies de *Brucella* analizadas. Estos ORF's se encuentran frecuentemente en *clusters* (islas) en el genoma de *B. melitensis* 16M. Se identificaron 9 regiones con al menos tres ORF's contiguos, designadas islas genómicas, las cuales se encontraban ausentes en las 5 especies de *Brucella* (Figura 4).⁷³

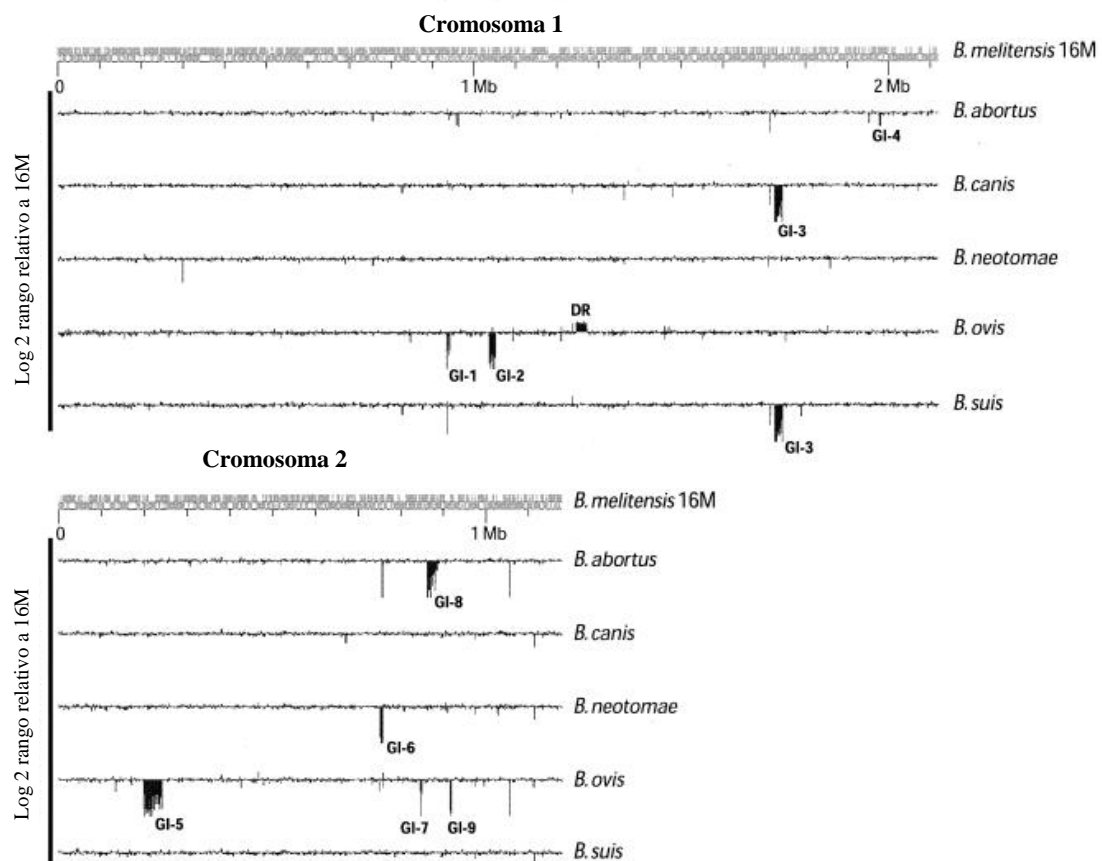


Fig. 4. Comparación de genomas de 5 especies de *Brucella* contra *B. melitensis* 16M utilizando microarreglos. El genoma de *B. melitensis* 16M fue hibridado contra ADN genómico marcado de 5 especies de *Brucella*. Regiones donde >3 ORF's continuos tenían un rango log2 significativo por debajo de la media fueron designados como islas

genómicas de la cepa 16M. Una región de ORFs continuos con un rango log2 significativo por encima de la media fue señalada como doble repetición (DR).⁷³

Asimismo, mediante el análisis de los genomas se demostró la ausencia de factores de virulencia clásicos como cápsula, fimbria y toxinas. Una sorpresa fue la localización de genes que codifican para componentes flagelares putativos. La naturaleza de *Brucella* como bacteria no móvil se encuentra en debate. Recientemente el grupo de investigación del Dr. J. J. Letesson demostraron que en la fase logarítmica temprana de la curva de crecimiento en medio 2YT, *B. melitensis* expresa genes que corresponden al anillo basal, gancho y partes del filamento del aparato flagelar. Bajo estas condiciones y utilizando un microscopio electrónico se observa una estructura flagelar polar. Mutantes en diferentes partes del flagelo fueron incapaces de establecer una infección crónica en ratones inoculados intraperitonealmente. Con estos estudios se formularán preguntas del posible papel biológico de este apéndice flagelar y su posible expresión *in vivo*.⁷⁴

La disposición del genoma de tres de las especies de *Brucella* ha permitido observar la función de una gran variedad de genes que no habían sido descritos. Tal es el caso de la nicotinamidas-pirimidasa de *B. abortus*, al interrumpir este gen se observó que la mutante era incapaz de replicarse en células HeLa y macrófagos derivados de médula ósea.⁷⁵

Además, se encontró que al infectar ratones con la mutante, ésta mostró una reducción en el número de bacterias recuperadas de bazo, en comparación con la cepa parental. Lavigne et al., identificaron un nuevo factor de virulencia en *B. suis* llamado BvfA, una pequeña proteína periplásmica única en *Brucella*. Al realizar una mutante en BvfA se observó una atenuación al infectar macrófagos y ratones. Además, al utilizar fusiones con la proteína verde fluorescente se demostró que la expresión de *bvfA* es inducida dentro de macrófagos debido a la acidificación del fagosoma y fue co-regulada por el operón *virB*, indicando que una posible función de la proteína esté relacionada con el establecimiento de sitio de replicación intracelular.⁷⁶

Por otro lado, Loisel-Meyer y col., 2006; demostraron que el gen *norD* presente en el operón *norEFQBQD* que codifica para una reductasa de óxido nítrico, era

necesario para la sobrevivencia en condiciones desnitrificantes anaeróbicas. Asimismo, la cepa mutante en el gen *norD* mostró atenuación en macrófagos murinos en relación a la producción de óxido nítrico, así como una rápida eliminación en ratón, demostrando que el gen *norD* es esencial para la virulencia de *Brucella*.⁷⁷

En este sentido, Bandara et al., 2005; trabajaron con una proteína de la membrana externa con características de autotransportador, presente en una gran variedad de microorganismos, y ausente en *B. abortus* y *B. melitensis*. Asimismo, generaron una mutante al interrumpir el gen en la región que codifica para el dominio conocido como pasajero α , no encontraron diferencias entre la mutante y la cepa parental en referencia a sobrevivencia intracelular en macrófagos murinos. Al inocular ratones encontraron que durante la primera semana pos-inoculación no había diferencias significativas; sin embargo, entre la tercera y novena semana se observó que la mutante era eliminada rápidamente en comparación con la cepa parental, demostrando que este gen tiene un papel en la fase crónica de la infección en *Brucella suis*.⁷⁸

En el genoma de *B. abortus* y *B. suis* se localizó la presencia de dos genes *xthA*, los cuales son homólogos al gen *xthA* de *E. coli*, cuya función es reparar el daño oxidativo contra el ADN. Para demostrar la función del gen se generó una mutante en *xthA-1* en *B. abortus*, la cual mostró una resistencia menor a la acción de agentes como el H_2O_2 y el $ONOO^-$, indicando que el gen participa en la protección contra el daño oxidativo. Con respecto a la supervivencia intracelular y virulencia residual en el modelo ratón no se observó diferencia entre la cepa mutada y cepa parental, demostrando que el papel del gen radica en la resistencia al daño oxidativo y reparación de ADN y no es requerido como factor de virulencia en el modelo del ratón.⁷⁹

Por el contrario, cuando se analizó el genoma de *B. melitensis* se observó que posee dos reguladores *nnrA* y *nnrB* localizados cerca de genes putativos involucrados en la des-nitrificación (*nirKV* para una nitrito reductasa; *norEFCBQ* para NO reductasa y *nosRZDFYSLX* para oxido nitroso reductasa). Para evaluar la acción de *nnrR* se construyó una mutante, la cual acumuló mayor cantidad de nitritos que la cepa silvestre. Para evaluar la función de *nnrA* en la regulación de genes des-nitrificantes, se construyeron fusiones transcripcionales con el gen reportero *lacZ* y diferentes genes como *narK*, *nirK*, *norC* y *nosR*. Utilizando la mutante *nnrA* se observó que la

transcripción de *nirK* fue menor con referencia a la cepa silvestre, de igual manera este efecto se observó en *nosR* y *norC*.

Por otro lado se evaluó la virulencia residual en el modelo murino y la mutante *nnrA* fue altamente atenuada a las 4 semanas pos-infección, demostrando las posibles funciones de *nnrA* como regulador, así como en funciones de sobrevivencia en el modelo del ratón.⁸⁰

Recientemente, se ha descrito una hidrolasa de sales biliares en *B. abortus*. El gen de esta hidrolasa se encuentra en los tres genomas de *Brucella* disponibles y es codificada por el gen *cgh*. Su función *in vitro* fue demostrada utilizando CGH de *Brucella* en forma recombinante sobre glicolato, generando dos productos, glicina y colato. Para demostrar el efecto de la bilis en el crecimiento de *Brucella* se construyó una mutante en *cgh*, encontrando que en medio con 5 y 10% de bilis la mutante redujo notablemente su crecimiento en comparación con la cepa silvestre. Al infectar ratones con la mutante versus cepa silvestre por la vía intraperitoneal y vía oral se observó que la mutante fue eliminada significativamente a los 10 y 20 días pos-infección. Este estudio demostró la función de CGH para resistir la acción antimicrobiana de las sales biliares, así como la contribución para el establecimiento de la infección del hospedero por la vía oral.⁸¹

1.15. GENOMA DE *B. melitensis*

Al analizar el genoma de *B. melitensis* 16M se anotaron 3197 marcos abiertos de lectura (ORFs), en donde el número de ORFs para el cromosoma I fue de 2059 y para el cromosoma II fue de 1138. No fueron encontrados plásmidos. El porcentaje de ORFs con funciones asignadas fue del 78% que equivale a 2487 ORFs, el número de ORFs sin funciones asignadas fue de 716 de estos 228 no mostraron funciones asignadas o similitud con otros genes y 488 sin función asignada pero con similitud. El genoma contiene tres operones ARNr, dos de ellos localizados en el cromosoma I y separados por alrededor de 200 kb y el tercero en el cromosoma II, la organización estructural de los operones es idéntica a los biotipos 1, 2 y 4 de *B. suis*, consistente con la hipótesis que menciona que el origen de los dos cromosomas es un cromosoma sencillo ancestral originado por la recombinación de los dos operones ARNr.⁷²

Los tres operones ribosomales están organizados de la misma manera: 16S, *ile* ARNt, *ala* ARNt, 23S, 5S y *met* ARNt, este arreglo es idéntico al de bacterias púrpuras fotosintéticas no sulfurosas como *Rhodobacter capsulatus*. Además, analizando la secuencia de la subunidad 16S y 23S ARNr de *B. melitensis* se observó una similitud muy estrecha (98%) con *R. capsulatus*, *R. sphaeroides* y *R. palustres*.⁷²

2. JUSTIFICACIÓN

El análisis del genoma de *B. melitensis* reveló que posee diversos genes que han sido previamente caracterizados como factores de virulencia, como las proteínas de membrana externa (94 kDa, Omp2a de 41 kDa, Omp2b de 43 kDa, Omp 25 y Omp31), el sistema de secreción tipo IV, el LPS y enzimas como superóxido dismutasa. Por otro lado, se reportaron diversos genes no descritos y caracterizados, dentro de estos están los que codifican para tres diferentes proteínas con dominios de auto-transportadores, tres tipos de hemolisinas (hemolisina, alfa-hemolisina y hemolisina III) y dos genes con homología a *ialA* e *ialB*, que son genes asociados a invasión en *Bartonella bacilliformis*.⁷²

En este sentido y analizando los posibles genes que se encuentran involucrados en la adhesión, se observó que uno de éstos mostró homología con el gen *aida-I* de *E. coli* (adhesin-involved-in-diffuse-adherence), por sus siglas en inglés y con el gen *shdA* de *Salmonella enterica*. Se ha descrito que el gen *aida-I* se encuentra implicado en la adhesión inespecífica de *E. coli* en diferentes tipos celulares y en *S. enterica* se encuentra asociado a la diseminación en heces.⁷²

También se observó la presencia de un gen de invasión (*invB*) con homología al gen *ialB* de *B. bacilliformis* (34% de identidad y 55% de similitud). Este gen se encuentra ausente en el genoma de *B. suis* y solo muestra una identidad del 26% y una similitud del 45% con una proteína hipotética conservada, en *B. bacilliformis* se encuentra asociado a la invasión de eritrocitos. Por otro lado, se observó un posible gen con homología a una invasina (*invA*) de *Mezorhizobium loti*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bartonella bacilliformis* y *Rickettsia conorii*. En *Bartonella bacilliformis* se encuentra formando un operón junto al gen *ialB* (*ialAB*, “invasion-associated locus”) en donde ambos son indispensables para la invasión de eritrocitos, mientras que en *Brucella* estos dos genes se encuentran separados en el cromosoma grande.

Al conocer la existencia de estos genes que no habían sido identificados y descritos en *Brucella*, se abre una puerta muy importante para conocer los determinantes moleculares de la adhesión e invasión de este microorganismo. Asimismo, el acceso al genoma completo permitirá la identificación de secuencias

especie-específicas, para el desarrollo de nuevas herramientas para el diagnóstico de la brucelosis. La reciente publicación de los genomas y proteomas de *B. melitensis*, *B. suis* y *B. abortus* proporcionarán información importante para conocer a fondo el metabolismo, funciones de replicación, traducción y transcripción, transporte de hierro, sistemas de secreción y virulencia de estos microorganismos.^{82, 83}

3. HIPÓTESIS

Los genes *aida-I*, *invB* y BMEI0216 de *Brucella melitensis*, se encuentran asociados a los procesos de invasión celular.

4. OBJETIVO GENERAL

Construcción y evaluación de mutantes *aida-I*, BMEI0216 e *invB* de *B. melitensis*

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Construcción de mutantes en los genes *aida-I*, BMEI0216 e *invB* mediante mutagénesis dirigida.
2. Análisis de invasión y supervivencia celular en células epiteliales HeLa y macrófagos murinos J774, respectivamente.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. CEPAS BACTERIANAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la tabla 1. Las cepas de *E. coli* DH5 α (*endA1 recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Δ argF-lacZYA U169 ϕ 80dlacZ Δ*) y *E. coli* S17.1 (*recA thi pro his hsdR -M+ Tpr Sm^r RP4-2-Tc::Mu Km Tn7*) fueron crecidas en caldo Luria-Bertani (LB) o agar LB a 37°C con agitación orbital. Las cepas de *Brucella* (*B. melitensis* 133, *B. melitensis* 16M, *B. melitensis* 40, *B. melitensis* 40-C y *B. melitensis invB-Km*) fueron crecidas en caldo Brucella o agar Brucella a 37°C. Cuando fue necesario el medio fue suplementado con antibióticos: kanamicina (50 μ g/ml), ampicilina (100 μ g/ml), ácido nalidíxico (10 μ g/ml), estreptomicina (50 μ g/ml) y tetraciclina (50 μ g/ml).

5.2. OLIGONUCLEÓTIDOS Y REACTIVOS

Los oligonucleótidos fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología, UNAM. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando la enzima *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen); las enzimas de restricción y T4 DNA ligasa (Roche) fueron utilizadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los procedimientos de ADN recombinante, así como las manipulaciones de ADN fueron realizadas de acuerdo a procedimientos estándar.⁸⁴

5.3. CLONACIÓN Y CONSTRUCCIÓN DE LA MUTANTE EN EL GEN BMEI0216 DE *Brucella melitensis*

El gen BMEI0216 de 255 pb se amplificó mediante el diseño de iniciadores a partir del genoma de *B. melitensis* 16M, este gen se encuentra localizado en el cromosoma I y fue amplificado en un producto de 1606 pb que contiene el gen BMEI0216 y secuencias flanqueantes, el gen *invA* corriente arriba y los genes de una proteína hipotética corriente abajo (Mapa 1). El producto de amplificación se clonó directamente utilizando el plásmido pCR 2.1. Posteriormente, se realizó un corte con la enzima *EcoRI* para liberar el fragmento clonado y ligarlo al plásmido suicida pKOK4. Para interrumpir el gen se realizó un corte con la enzima de restricción *HpaII*, lo que

permitió introducir el gen de resistencia a kanamicina y mediante doble recombinación homóloga se generó la mutante BMEI0216. La identificación de la mutante fue realizada mediante PCR y secuenciación.

Cepas y plásmidos	Características	Referencia
pCR2.1	Vector de clonación, 3.9 kb; Kan ^r ; Amp ^r	Invitrogen
pHC1	Derivado de pCR2.1, contiene el producto de amplificación de 1.6 kb que incluye al gen BMEI0216; Kan ^r ; Amp ^r	Este estudio
pHC2	Derivado de pH1, contiene un fragmento 2.9 kb que incluye al gen BMEI0216 interrumpido con el cassette de kanamicina; Kan ^r ; Amp ^r	Este estudio
pHC3	Derivado de pKOK.4 contiene el gen BMEI0216 interrumpido con el cassette de kanamicina; Amp ^r , Tc ^r	Este estudio
pHC4	pBBR4MCS con un fragmento de 1.6 kb que incluye al gen BMEI0216; Amp ^r	Este estudio
pHC10	Derivado de pCR2.1, contiene el producto de amplificación de 3105 pb que incluye el gen <i>aida-I</i> ; Kan ^r ; Amp ^r	Este estudio
pHC20	Derivado de pCR2.1, contiene el producto de amplificación de 2005 pb que incluye al gen <i>invB</i> ; Kan ^r ; Amp ^r	Este estudio
pHC21	Derivado de pHC20, contiene el gen <i>invB</i> interrumpido con el cassette de kanamicina; Kan ^r ; Amp ^r	Este estudio
pHC22	Derivado de pKOK.4 contiene el gen <i>invB</i> interrumpido con el cassette de kanamicina; Amp ^r , Tc ^r	Este estudio
pUC4K	Vector de clonación, 3.9 kb, Kan ^r , Amp ^r	GE Healthcare
pKOK.4	Vector suicida para <i>Brucella</i> , Amp ^r , Cm ^r , Tc ^r	85
pBBR4MCS	Plásmido de moderado número de copias; Amp ^r	86

<i>E. coli</i> DH5 α	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44</i> <i>relA1</i> Δ (<i>argF-lacZYA</i>) U169 80 <i>dlacZ</i> Δ	FMVZ-UNAM
<i>E. coli</i> S17.1	<i>recA thi pro his hsdR -M+ Tpr Sm^r RP4-2-</i> Tc:: <i>Mu Km Tn7</i>	87
<i>B. melitensis</i> 16 M	Cepa de referencia Biotipo 1; ATCC 23456; Nal ^r	FMVZ-UNAM
<i>B. melitensis</i> 133	Cepa Silvestre Mexicana Biotipo 1, Nal ^r	FMVZ-UNAM
<i>B. melitensis</i> 40	Derivada de <i>B. melitensis</i> 133 mutante BMEI0216-Km; Kan ^r	Este estudio
<i>B. melitensis</i> 40-C	Mutante BMEI0216-Km con pH4	Este estudio
<i>B. melitensis invB</i> -Km	Derivada de <i>B. melitensis</i> 133 mutante <i>invB</i> -Km; Kan ^r	Este estudio

Tabla 1.- Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este estudio.

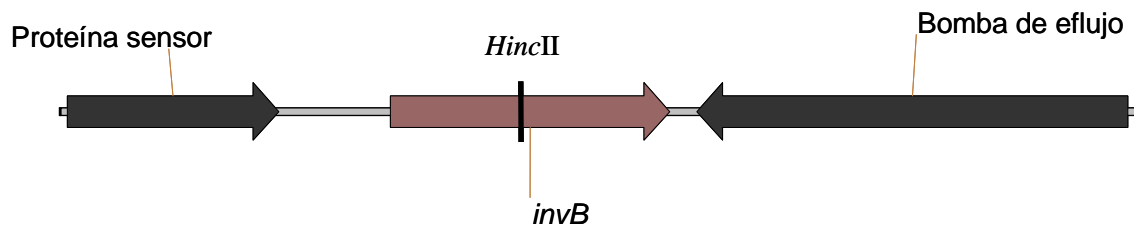


Mapa 1.- Mapa genético del gen BMEI0216 y genes flanqueantes.

5.4. CLONACIÓN Y CONSTRUCCIÓN DE LA MUTANTE EN EL GEN *invB* DE *Brucella melitensis*

Se diseñaron iniciadores a partir del genoma de *B. melitensis* 16M, los cuales amplificaron un fragmento de 2005 pb. El fragmento contenía el gen completo *invB* de 519 pb y una secuencia flanqueante de 736 pb corriente arriba y 750 pb corriente abajo (Mapa 2). El producto de 2005 pb se clonó directamente en el plásmido pCR 2.1.

Posteriormente, se interrumpió el gen *invB* realizando un corte en el sitio único *HincII* en la posición 240 del gen *invB*. En el sitio de corte *HincII* se insertó el gen de resistencia a kanamicina lo que permitió interrumpir el gen. Asimismo, la construcción completa fue liberada mediante digestión del plásmido con *EcoRI*, este fragmento fue sub-clonado en el plásmido suicida pKOK.4 para realizar ensayos de conjugación mediante la cepa donante *E. coli* S17.1 y la cepa receptora *B. melitensis* 133. Mediante doble recombinación homóloga se generó la mutante. La identificación de la mutante fue realizada mediante PCR y secuenciación.



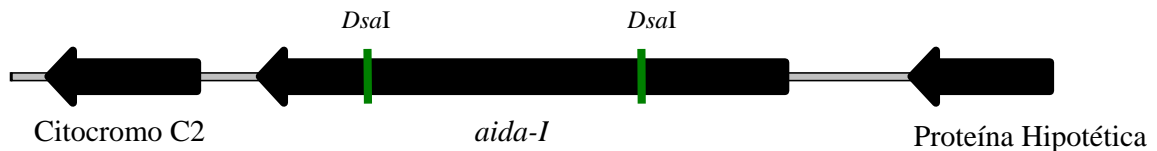
Mapa 2.- Mapa genético del gen *invB* y genes flanqueantes.

5.5. CLONACIÓN Y CONSTRUCCIÓN DE LA MUTANTE EN EL GEN *aida-I* DE *Brucella melitensis*

El gen de adhesión *aida-I* de 1569 pb se encuentra localizado en el cromosoma II en la sección 101-107 de la secuencia completa del genoma de *B. melitensis*. La amplificación del gen se llevó a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se amplificó un producto de 3105 pb que contiene el gen completo, así como 740 pb corriente arriba y 796 pb corriente abajo del gen *aida-I* (Mapa 3). El producto de

PCR se clonó directamente en el plásmido pCR2.1. Posteriormente el plásmido fue digerido con la enzima de restricción *EcoRI* para liberar el fragmento clonado y ligarlo en el plásmido pKOK.4 (plásmido suicida para *Brucella*). Posteriormente el plásmido fue digerido con la enzima *BtgI*, lo que permitió eliminar un fragmento de 760 pb del gen *aida-I*, en este sitio se introdujo un cassette de kanamicina y se interrumpió el gen antes mencionado.

El plásmido generado fue transformado en la cepa *E. coli* S17.1 que permitió realizar ensayos de conjugación con la cepa receptora *B. melitensis* 133 y obtener la mutante mediante doble recombinación homóloga. La selección de mutantes se realizó por resistencia a kanamicina y ácido nalidíxico y sensibilidad a ampicilina. La identificación de la mutante será realizada mediante PCR y secuenciación.



Mapa 3.- Mapa genético del gen *aida-I* y genes flanqueantes.

5.6. ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN

Para demostrar que *aida-I*, BMEI0216 e *invB* juegan un papel directo en la invasión, es necesario poder restaurar la actividad de los genes *aida-I*, BMEI0216 e *invB* en las mutantes de *B. melitensis*, mediante complementación.

Para ello se utilizó el producto de amplificación que contiene el gen completo *aida-I*, BMEI0216 e *invB* y secuencias flanqueantes, que se encuentran clonados en forma individual en el plásmido pCR 2.1. Dichos productos fueron liberados mediante la digestión con la enzima de restricción *EcoRI*. Los fragmentos liberados fueron subclonados en forma individual en el plásmido de moderado número de copias

pBBR4MCS, el cual permite realizar la complementación. El plásmido pBBR4MCS con el fragmento clonado fue transformado a *E. coli* S17.1 para realizar ensayos de conjugación con las diferentes cepas receptoras de *B. melitensis* 133. Las mutantes complementadas se analizaron mediante la presencia del plásmido, utilizando lisis alcalina y mapeo con enzimas de restricción.

5.7. ENSAYOS DE INVASIÓN EN DISTINTOS TIPOS CELULARES

Las mutantes construídas *B. melitensis aida-I-Km*, BMEI0216-Km e *invB-Km* y las cepas complementadas fueron utilizadas para realizar experimentos de invasión usando células epiteliales HeLa, y para analizar la sobrevivencia intracelular se utilizaron macrófagos murinos J774. La línea celular J774 fue cultivada en RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (10%) y 2mM de L-glutamina y aminoácidos no esenciales. Los macrófagos se incubaron por 24 h a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂. Un día previo a la infección los macrófagos fueron resuspendidos en medio fresco y colocados en placas de cultivo de 24 pozos a una concentración de 5 x 10⁴ células/ml.

Las células se infectaron por 30 min. con las diferentes cepas de *Brucella* a una multiplicidad de infección (MOI) de 1:100. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con solución de fosfatos (PBS), y se incubaron en medio con 100 µg/ml de gentamicina por una hora. Después, las células se lavaron cinco veces con PBS para eliminar la gentamicina y se agregó medio fresco. Las células infectadas se lisaron con Tritón X 100 al 0.1% en PBS, a diferentes tiempos postinfección (0 h, 2h, 24 h y 48 h). Diluciones seriadas en PBS fueron realizadas y sembradas en agar *Brucella* para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC) intracelulares. Los experimentos fueron realizados por triplicado y repetidos tres veces.^{88, 89, 90}

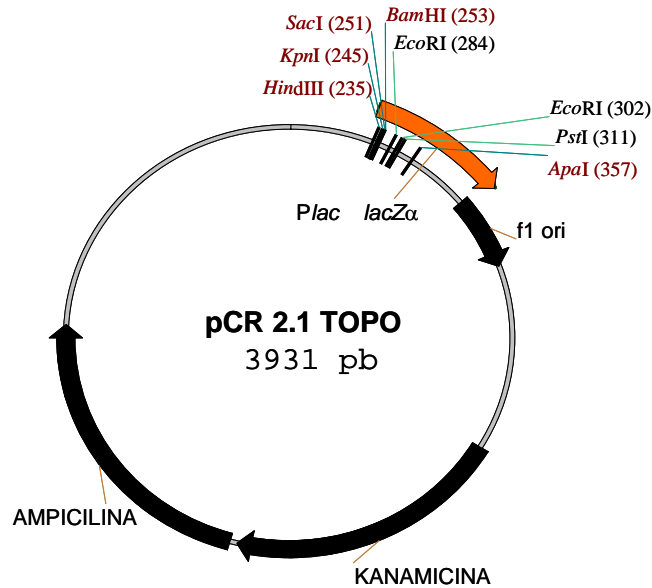
Para los ensayos de invasión se utilizaron células HeLa, las cuales fueron crecidas a 37°C en un atmósfera de 5% de CO₂ en medio mínimo esencial Eagle (MEM) conteniendo 10% de suero fetal bovino y 2mM de L-glutamina y aminoácidos no esenciales. Las células fueron sembradas a una concentración de 5 x 10⁴ en cajas de cultivo celular de 24 pozos un día antes de cada ensayo de infección. Las células fueron infectadas con las diferentes cepas de *B. melitensis* a una multiplicidad de infección de 1:200.

Posteriormente se incubaron durante diferentes tiempos: 0, 30 min., 45 min., 1 h y 2 h. Para cuantificar las bacterias intracelulares las células infectadas fueron incubadas por 1 hora con 100 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares. Las células infectadas fueron lavadas tres veces con PBS y tratadas con 1 ml de Tritón X-100 al 0.2%. Diluciones seriadas en PBS fueron realizadas y sembradas en agar Brucella para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC) intracelulares. Los experimentos fueron realizados por triplicado y repetidos tres veces.

6. RESULTADOS

6.1. CLONACIÓN Y CONSTRUCCIÓN DE LA MUTANTE BMEI0216 DE *B. melitensis*

Para clonar el gen BMEI0216 se utilizaron un par de iniciadores diseñados a partir del genoma de *B. melitensis* 16M (5' aggatgtgaccctgttcgat 3' y 3' cgatgcgcaaaatgataagg 5') que amplificaron un producto de 1606 pb, el cual contiene el gen completo BMEI0216, el gen *invA* y el gen de una proteína hipotética (Fig. 5).



Mapa 4.- Plásmido comercial pCR 2.1 TOPO (Invitrogen, Ventura CA, USA). Las flechas en color negro señalan los genes de resistencia a kanamicina y ampicilina, respectivamente, así como el sitio de replicación f1 ori. La flecha en color rojo representa el gen *lacZ* y su promotor. Los diferentes sitios de restricción son señalados con números.

Posteriormente se realizó un análisis de restricción del producto de amplificación con las enzimas *HindIII* y *ClaI* (Fig. 6). Una vez analizado el producto de amplificación fue clonado directamente en el plásmido pCR2.1 (Mapa 4), realizando selección blanco-azul para la detección de las colonias que contenían el plásmido con el producto clonado. Asimismo, se realizó una digestión con *EcoRI*, lo que permitió liberar el producto clonado (Fig. 7). Se analizaron tres colonias y el plásmido generado fue llamado pHC1 (Mapa 5).

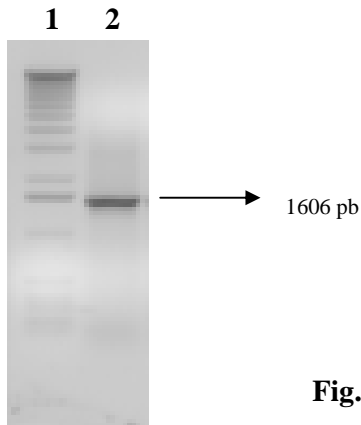


Fig. 5

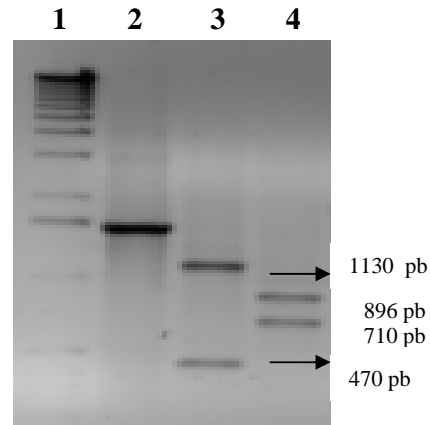
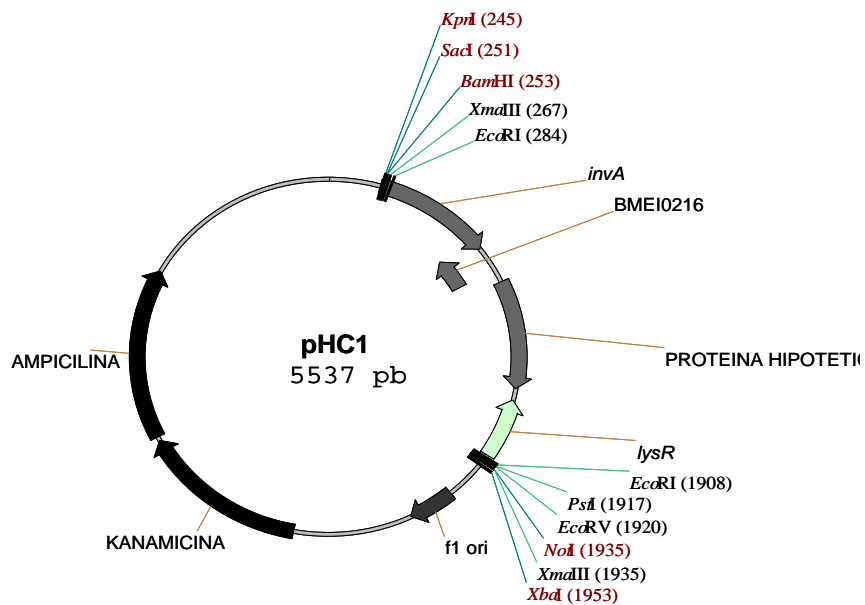


Fig. 6

Fig.5. Gel de agarosa al 1% en Tris-Ácido acético-EDTA (TAE 1X) teñido con bromuro de etidio. Carril 1. Marcador de peso molecular 1 kb “*ladder*” plus; Carril 2. Producto amplificado de 1606 pb, señalado con la flecha. **Fig. 6.** Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1. Marcador de peso molecular 1 kb “*ladder*” plus; Carril 2. Producto amplificado 1606 pb; Carril 3. Producto de amplificación digerido con *Hind*III; Carril 4. Producto de amplificación digerido con *Cla*I.



Mapa 5.- Plásmido pHC1 derivado del plásmido pCR 2.1. Contiene el fragmento clonado de 1606 pb que incluye el gen *invA*, BMEI0216 y el gen *lysR*, respectivamente. Los genes son señalados con líneas. La posición de los sitios de corte de las enzimas de restricción está señalada con números.

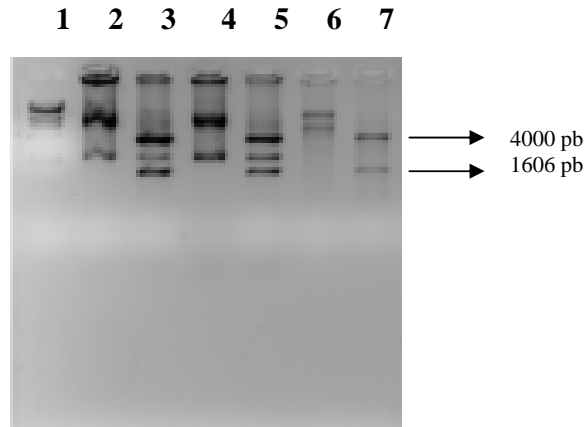
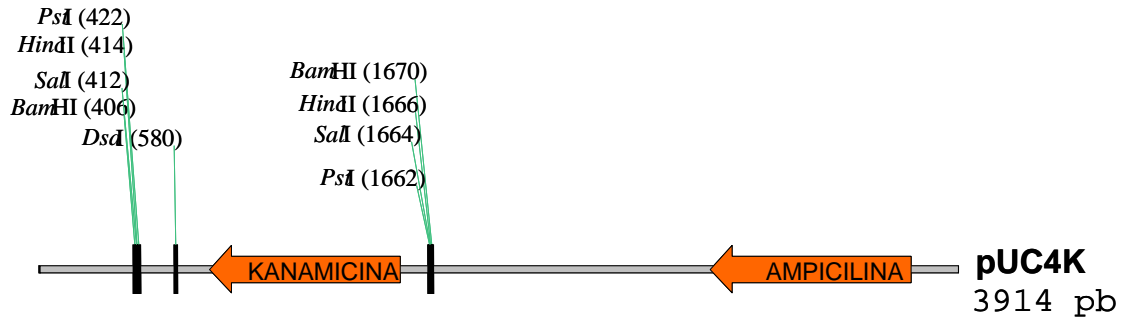


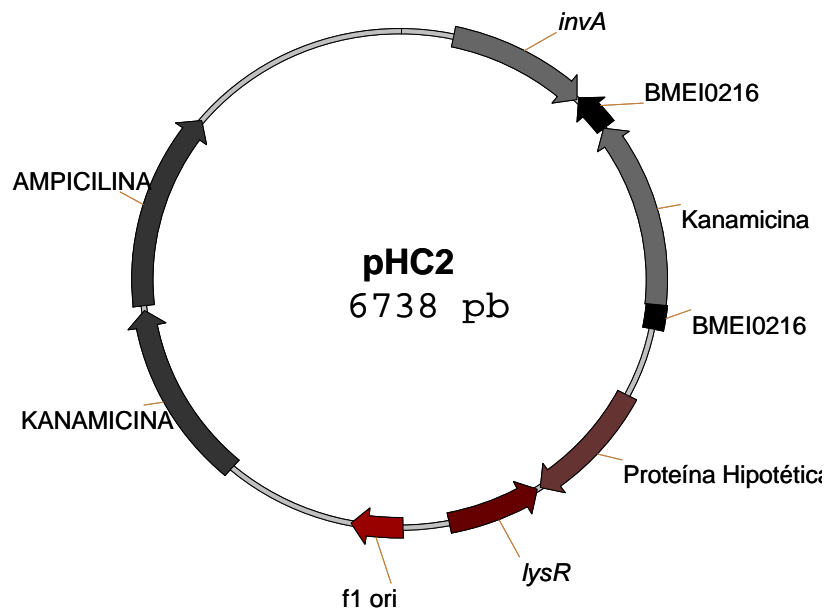
Fig. 7. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1. Marcador de peso molecular λ *Hind*III. Carril 2, 4, 6. Plásmido pHC1 sin digerir; Carril 3, 5, 7. Plásmido pHC1 digerido con *Eco*RI. Los productos de la digestión con la enzima de restricción *Eco*RI son señalados con las flechas.

Posteriormente, el plásmido pHC1 fue digerido en el sitio único *Hpa*II del gen BMEI0216, para introducir el cassette de resistencia a kanamicina de 1200 pb obtenido del plásmido pUC4K (Mapa 6) por PCR y con los sitios de restricción *Hpa*II en los extremos, generando el plásmido pHC2 (Fig. 8 y Mapa 7). Este plásmido fue digerido con *Eco*RI para obtener un fragmento de 2.9 kb y ligarlo en el plásmido suicida pKOK.4 y generar el plásmido pHC3 (Fig. 9-10 y Mapa 8).

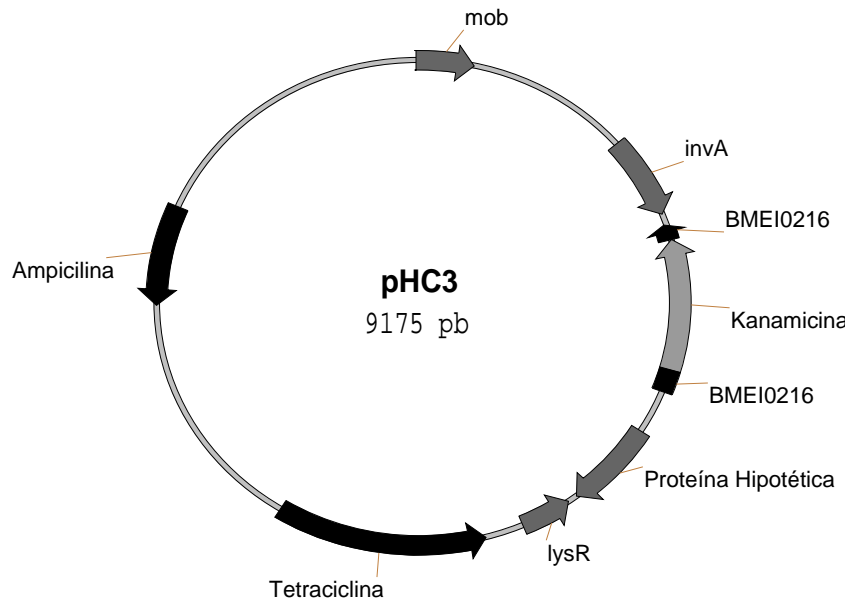
La mutación en el gen BMEI0216 fue realizada por intercambio alélico (Mapa 9). El plásmido pHC3 fue introducido a *B. melitensis* 133 a partir de *E. coli* S17.1 por conjugación y las colonias transconjugantes fueron seleccionadas en placas con kanamicina y ácido nalidíxico. Las colonias resistentes a kanamicina que fueron susceptibles a ampicilina y tetraciclina fueron seleccionadas para confirmar la interrupción del gen BMEI0216 mediante PCR y secuenciación. La cepa mutante por inserción en el gen BMEI0216 fue llamada *B. melitensis* 40.



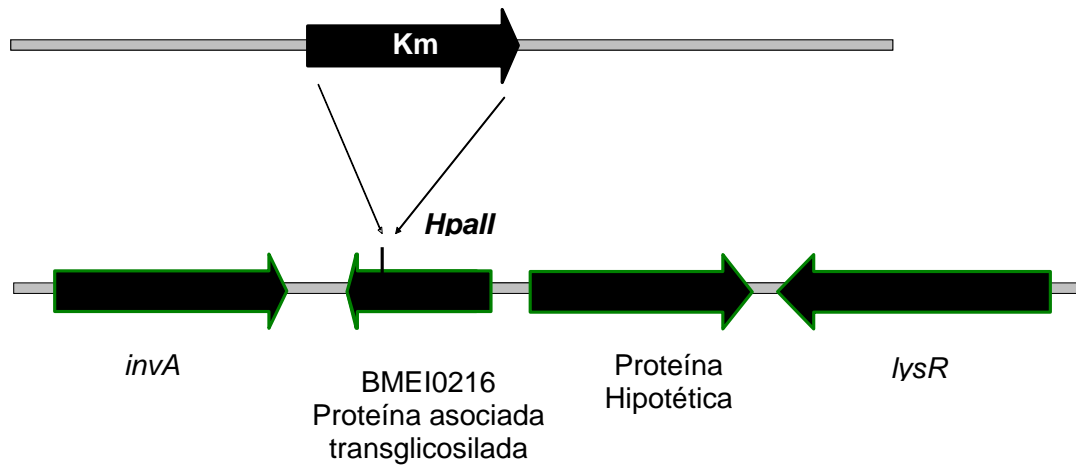
Mapa 6.- Diseño esquemático del plásmido pUC4K. Las flechas señalan los genes de Ampicilina y kanamicina, respectivamente. Los sitios de restricción son señalados en su sitio de corte con números.



Mapa 7.- Plásmido pHC2 derivado del plásmido pHC1, contiene el gen BMEI0216 interrumpido con el gen de resistencia a kanamicina. Los diferentes genes representados por flechas son señalados con líneas.



Mapa 8.- Plásmido pHC3 derivado del plásmido suicida pKOK.4. Contiene el gen BMEI0216 interrumpido por el gen de resistencia a kanamicina. Los diferentes genes son señalados con líneas.



Mapa 9. Diseño esquemático del sitio de mutación en el gen BMEI0216. Las figuras de las flechas indican los genes y su dirección. El sitio único *HpaII* está señalado para introducir el gen de resistencia a kanamicina.

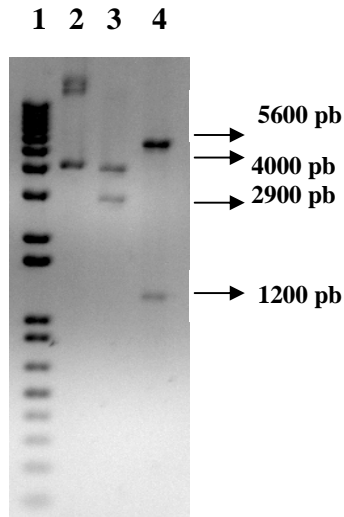


Fig. 8

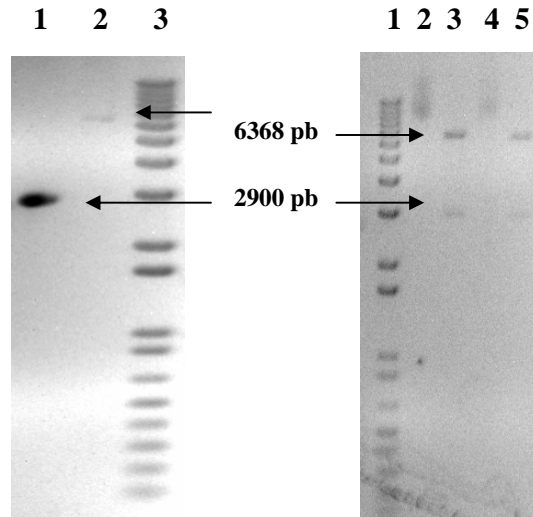


Fig. 9

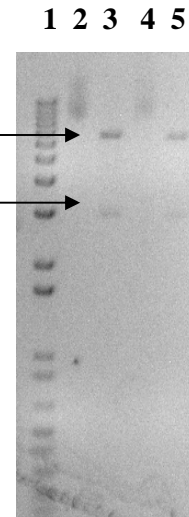


Fig. 10

Fig. 8. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1. Marcador de peso molecular 1 kb “*ladder*” plus; Carril 2. Plásmido pHC2 sin digerir; Carril 3. Plásmido pHC2 digerido con *EcoRI*, los productos de la digestión son señalados con flechas; Carril 4. Plásmido pHC2 digerido con *ClaI*, los productos de la digestión son señalados con flechas.**Fig. 9.** Carril 1. Fragmento *EcoRI* purificado señalado con la flecha; Carril 2. Plásmido pKOK4 digerido con *EcoRI*, señalado con la flecha; Carril 3. Marcador de peso molecular 1 kb “*ladder*” plus. **Fig. 10.** Carril 1. Marcador de peso molecular 1 kb “*ladder*” plus; Carriles 2 y 4. Plásmido pHC3 sin digerir; Carriles 3 y 5. Plásmidos pHC3 digeridos con *EcoRI*, productos de la digestión señalados con las flechas.

La interrupción del gen BMEI0216 fue confirmada por PCR utilizando los iniciadores empleados para amplificar un producto de 1.6 kb que contenía el gen BMEI0216. El producto de PCR en *B. melitensis* 133 fue de 1.6 kb, mientras que en la cepa mutante *B. melitensis* 40 fue de 2.9 kb. Adicionalmente, se utilizaron un juego de iniciadores que flanquean el gen BMEI0216 y que generan un producto de 772 pb, con este juego de iniciadores la cepa 133 de *B. melitensis* mostró un producto de PCR de 772 pb y la cepa mutante *B. melitensis* 40 un producto de 2 kb, esto confirma la introducción del gen de resistencia a kanamicina y con ello la interrupción del gen BMEI0216 (Fig. 11).

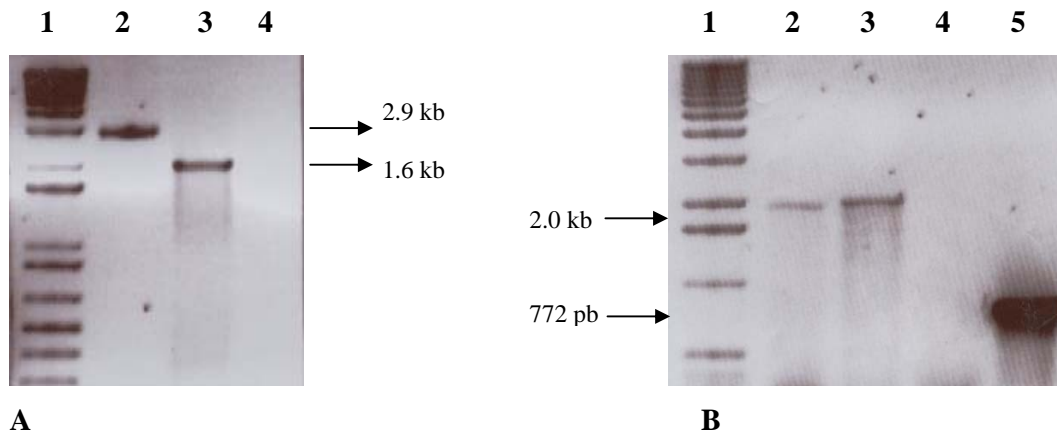
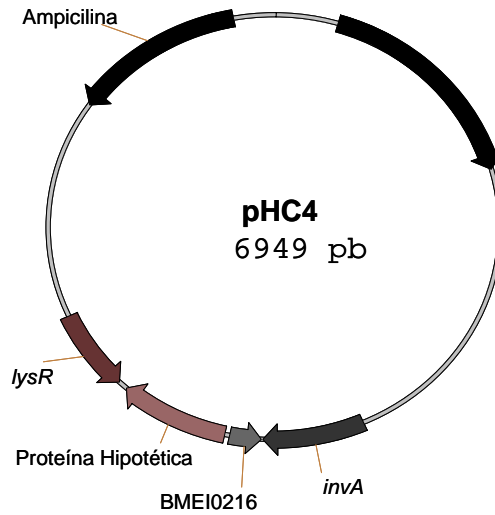


Fig. 11. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Reacción de PCR de la cepa mutante de *B. melitensis* BMEI0216. (A). Carril 1.- Marcador de peso molecular 1 Kb “ladder” plus. Carril 2.- *B. melitensis* 40, producto de amplificación de 2.9 kb, señalado con la flecha; Carril 3.- *B. melitensis* 133, producto de amplificación de 1.6 kb señalado con la flecha. Carril 4.- Control negativo agua (B) Carril 1.- Marcador de peso molecular 1 Kb “ladder” plus. Carriles 2-3 *B. melitensis* 40, producto de amplificación de 772 pb señalado con la flecha; Carril 4.- Control negativo agua. Carril 5.- *B. melitensis*133, producto de amplificación de 2 kb señalado con la flecha.

Para restaurar el gen BMEI0216, se digirió el plásmido pHC1 con la enzima *EcoRI* y el producto de 1.6 kb que contiene el gen completo BMEI0216 fue ligado en el plásmido de moderado número de copia pBBR4MCS4-*EcoRI* para generar el plásmido pHC4 (Mapa 10). La cepa mutante *B. melitensis* 40 fue conjugada con el plásmido pHC4 utilizando la cepa *E. coli* S17 como cepa donadora. Las colonias resistentes a ampicilina fueron seleccionadas y evaluadas para verificar la presencia del plásmido pHC4.



Mapa 10.- Plásmido pHC4 derivado del plásmido pBBR4MCS4. Contiene el fragmento de 1.6 kb que incluye el gen *invA*, BMEI0216 y el gen *lysR* y el gen de una proteína hipotética. Los diferentes genes están señalados con líneas.

6.2. ENSAYOS DE INVASIÓN DE LA MUTANTE BMEI0216 DE *B. melitensis*

Monocapas de cultivos de células HeLa fueron expuestos a *B. melitensis* 133, *B. melitensis* 16M, *B. melitensis* 40 y la cepa *B. melitensis* 40 complementada (*B. melitensis* 40-C). El índice de infección fue calculado dividiendo el número de bacterias viables en el ensayo, entre el número de bacterias en el tiempo cero, expresadas como UFC/ml. Para evaluar la función del gen BMEI0216 se realizaron ensayos de invasión a 30 min., 45 min., 1 h y 2 h utilizando células HeLa. A los 30 y 45 minutos pos-infección la cepa mutada no mostró diferencias significativas al compararla con la cepa silvestre *B. melitensis* 133 y la cepa 16M de *B. melitensis* (Fig. 12 y 13). En contraste, al evaluar la cepa mutante *B. melitensis* 40 con las cepas *B. melitensis* 16 M y *B. melitensis* 133 en ensayos de invasión de una hora de infección se observó que la cepa parental *B. melitensis* 133 y la cepa *B. melitensis* 16M invadieron dos veces más que la cepa mutada. Asimismo, a las 2 h de invasión se observaron las diferencias entre la cepa mutada y la cepa parental y 16M, la cepa parental invadió 19 veces más que la mutante, y la cepa 16 M 14 veces más (Fig. 14 y 15). La cepa complementada fue capaz de restaurar la acción del gen BMEI0216 al mostrar valores similares a los de la cepa parental 133.

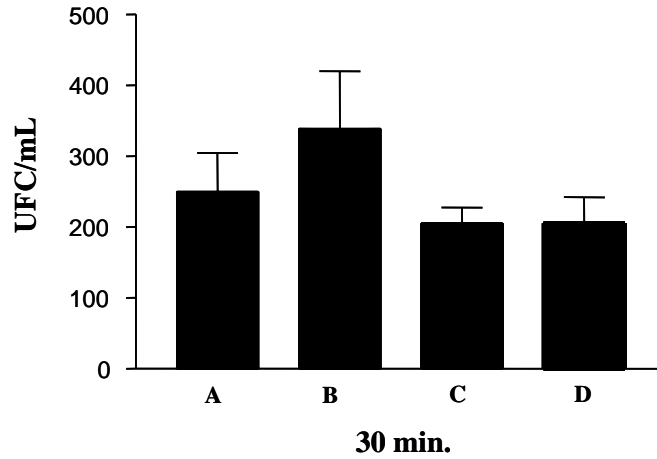


Fig. 12. Ensayo de invasión 30 min. en células HeLa. A.- *B. melitensis* 133; B.- *B. melitensis* 16M; C.- *B. melitensis* 40; D.- *B. melitensis* 40-C. Los experimentos fueron repetidos tres veces de forma independiente. El error en las barras indica la desviación estándar de tres experimentos por triplicado.

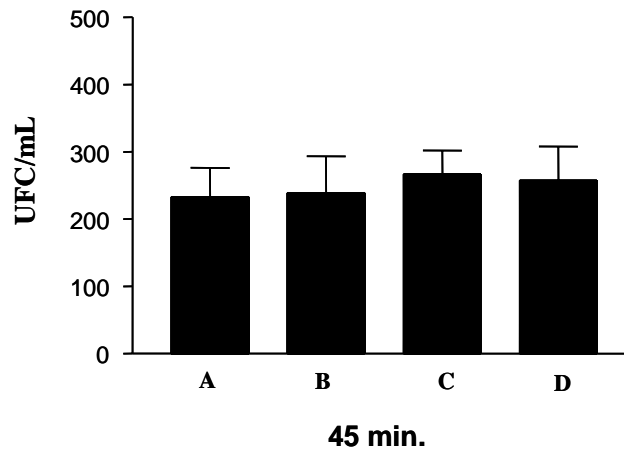


Fig. 13. Ensayo de invasión 45 min. en células HeLa. A.- *B. melitensis* 133; B.- *B. melitensis* 16M; C.- *B. melitensis* 40; D.- *B. melitensis* 40-C. Los experimentos fueron repetidos tres veces de forma independiente. El error en las barras indica la desviación estándar de tres experimentos por triplicado.

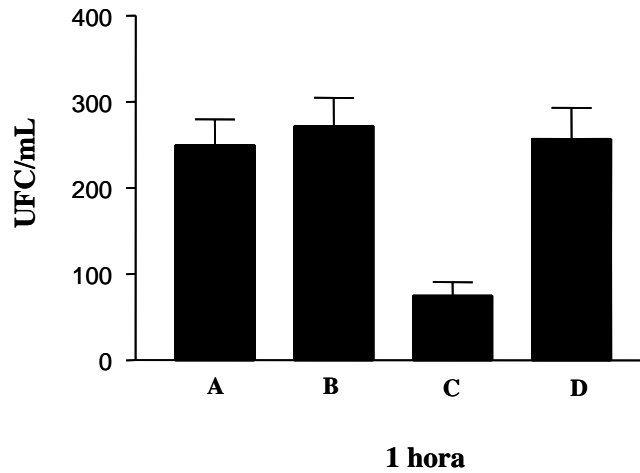


Fig. 14. Ensayo de invasión 1 hora en células HeLa. A.- *B. melitensis* 133; B.- *B. melitensis* 16M; C.- *B. melitensis* 40; D.- *B. melitensis* 40-C. Los experimentos fueron repetidos tres veces de forma independiente. El error en las barras indica la desviación estándar de tres experimentos por triplicado.

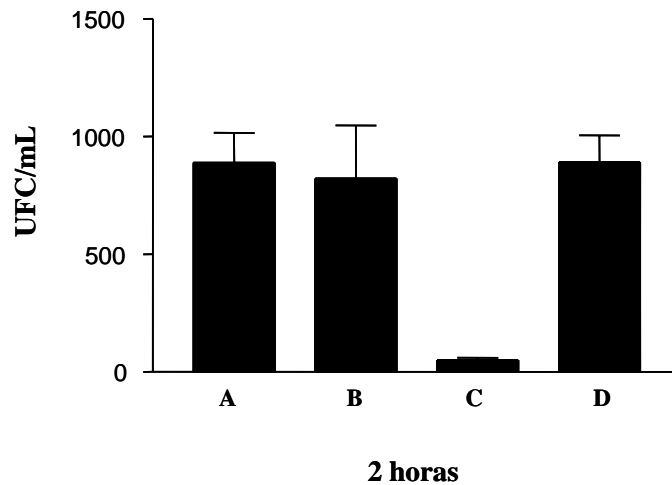


Fig. 15. Ensayo de invasión 2 horas en células HeLa. A.- *B. melitensis* 133; B.- *B. melitensis* 16M; C.- *B. melitensis* 40; D.- *B. melitensis* 40-C. Los experimentos fueron repetidos tres veces de forma independiente. El error en las barras indica la desviación estándar de tres experimentos por triplicado.

6.3. SUPERVIVENCIA INTRACELULAR DE LA MUTANTE BMEI0216 DE *B. melitensis* EN MACRÓFAGOS MURINOS

Para evaluar el papel del gen BMEI0216, se evaluó la supervivencia intracelular de las cepas de *B. melitensis* 133, *B. melitensis* 16M, *B. melitensis* 40 y la cepa *B. melitensis* 40 complementada (*B. melitensis* 40-C) en macrófagos murinos. El número de bacterias viables en el ensayo fue determinado a las 0, 2, 24 y 48 h. Para inhibir el crecimiento de bacterias extracelulares se agregó al medio gentamicina a una concentración final de 100 µg/ml por una hora después de la infección. No se encontraron diferencias al evaluar la cepa mutante *B. melitensis* 40 con las cepas *B. melitensis* 16 M, *B. melitensis* 133 y *B. melitensis* 40-C, en los diferentes tiempos de supervivencia intracelular (Fig. 16).

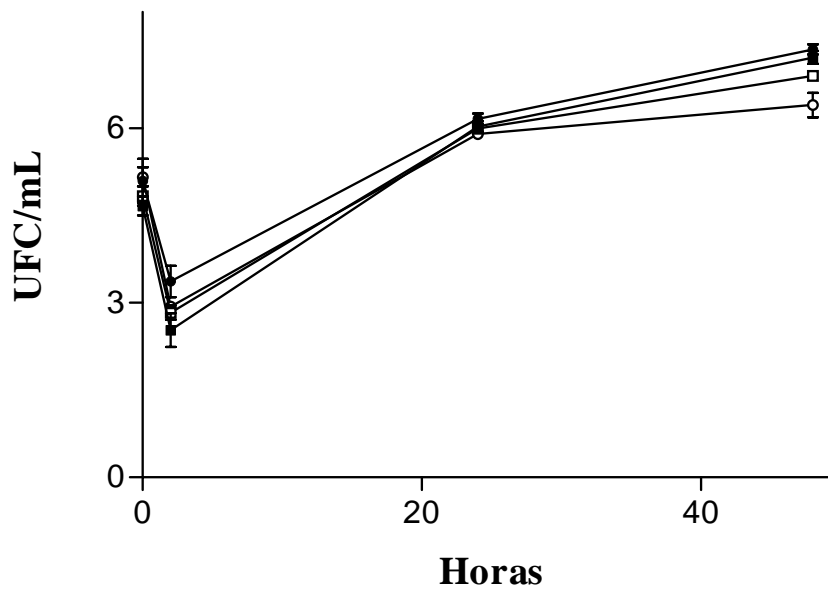


Fig. 16. Supervivencia intracelular de *B. melitensis* 133 (■); *B. melitensis* 16 M (□); *B. melitensis* 40 (●); *B. melitensis* 40-C (○). Los datos representan el resultado de tres experimentos independientes repetidos por triplicado. El error en las barras indica la desviación estándar de tres experimentos por triplicado.

6.4. CLONACIÓN Y CONSTRUCCIÓN DE LA MUTANTE *invB* DE *B. melitensis*

El gen *invB* de *B. melitensis* fue obtenido mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando la base de datos del genoma de *B. melitensis* 16M (cromosoma I) se diseñaron un par de iniciadores (5'GGAAAGCTTGTCCGCCATTT3' y 3'GTCTTCGCTGGCTTGTCCAC5') para amplificar un producto de 2005 pb, el producto de amplificación contiene el gen completo *invB* y el gen de una proteína sensor y una bomba de eflujo corriente arriba y corriente abajo, respectivamente. Para analizar el producto de amplificación, éste fue digerido con la enzima de restricción *HincII* lo que generó un fragmento de 1000 y 1005 pb observándose como una sola banda al momento de visualizarla en el gel de agarosa, confirmando el patrón de restricción esperado (Fig. 17).

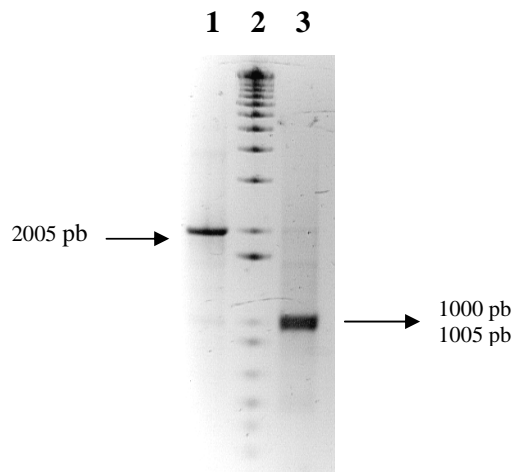
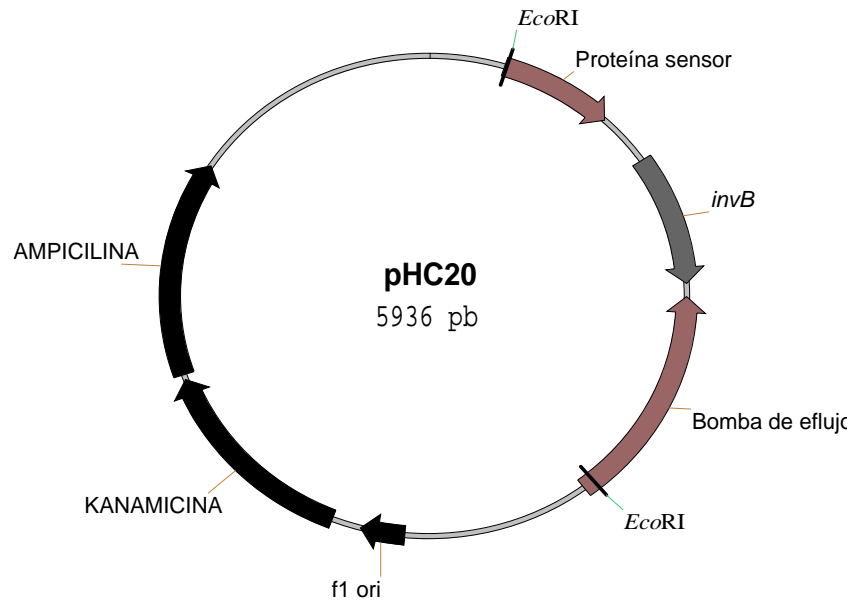


Fig. 17. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1. Producto de amplificación de 2005 pb conteniendo el gen *invB* de *B. melitensis* 133, señalado con la flecha; Carril 2. Marcador de peso molecular 1 kb “*ladder*” plus; Carril 3. Producto de amplificación digerido con *HincII*, productos de la digestión señalados con la flecha.

Posteriormente, el producto de amplificación fue clonado directamente al plásmido pCR2.1 generando el plásmido pHC20 (Mapa 11). El plásmido pHC20 fue digerido con la enzima de restricción *HincII* para interrumpir el gen *invB* en la posición 240. Por otro lado, el gen de kanamicina fue obtenido mediante digestión con *HincII* del plásmido pUC4K, el producto de la digestión de 1252 pb contiene el gen completo con los sitios de corte *HincII* en los extremos. El gen de kanamicina fue ligado en el sitio único *HincII*, generando el plásmido pHC21 (Fig. 18 y Mapa 12). EL plásmido pHC21 fue digerido con la enzima *EcoRI* para obtener la construcción con el gen *invB* interrumpido con el gen de kanamicina. El fragmento fue ligado al plásmido suicida pKOK4 y transformado en la cepa donante de *E. coli* S17 (Fig. 19-20 y Mapa 13).



Mapa 11.- Plásmido pHC20 derivado del plásmido pCR2.1. Contiene el fragmento 2005 pb que incluye el gen *invB*, el gen que codifica para una proteína sensor y el gen que codifica para una bomba de flujo. Los diferentes genes son señalados con líneas.

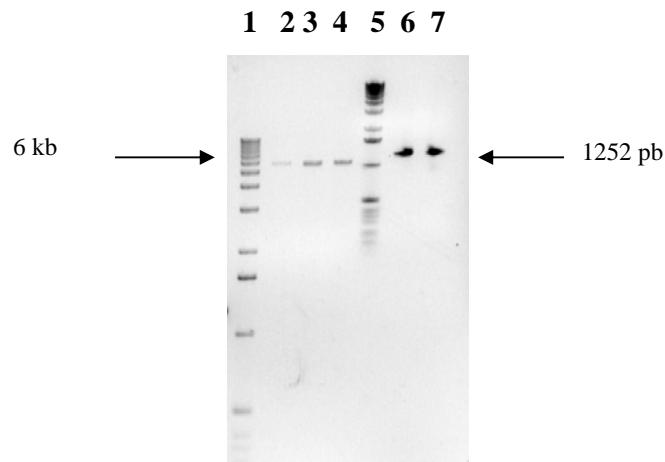
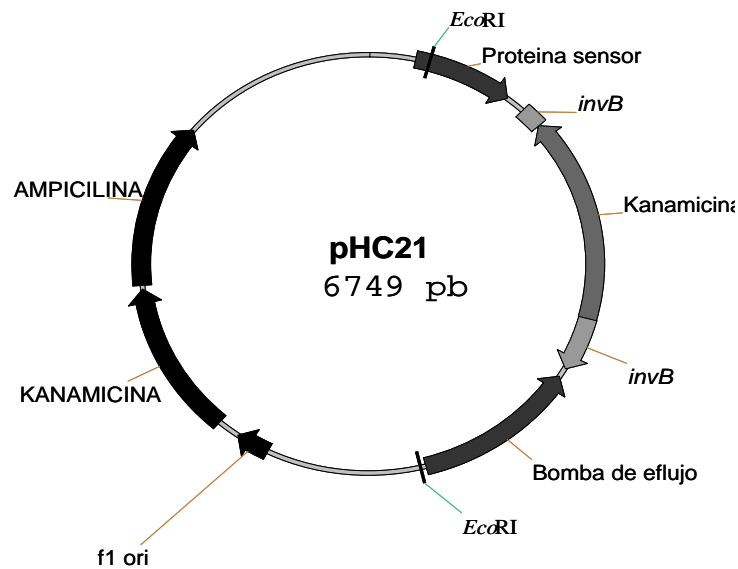


Fig.18. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1 y 5. Marcador de peso molecular 1 kb “*ladder*”. Carriles 2-4. Plásmido pCH21 digerido con *HincII*, el tamaño del plásmido es señalado con la flecha. Carriles 6 y 7. Gen de resistencia a kanamicina digerido con *HincII*, el gen es señalado con la flecha.



Mapa 12.- Plásmido pHC21 derivado del plásmido pHC20. Contiene el gen *invB* interrumpido con el gen de resistencia a kanamicina. Los diferentes genes son señalados con líneas.

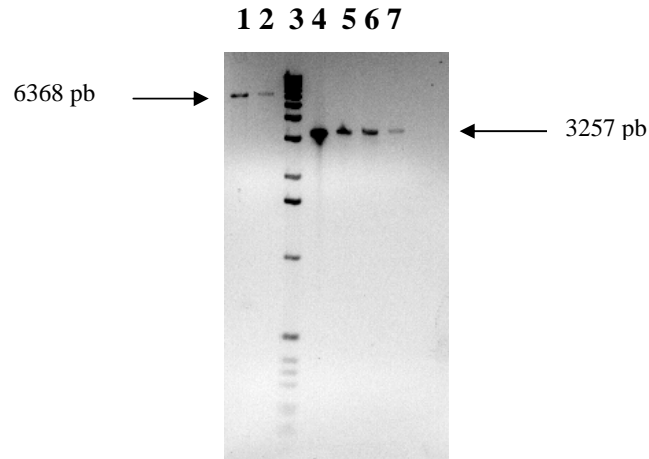


Fig.19. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1 y 2. Plásmido pKOK.4 digerido con la enzima *EcoRI*, el tamaño del plásmido es señalado con la flecha. Carril 3.- Marcador de peso molecular 1 kb “*ladder*”. Carriles 4-7.- Gen *invB* interrumpido con el gen de kanamicina digerido con la enzima *EcoRI*, el tamaño del producto digerido es señalado con la flecha.

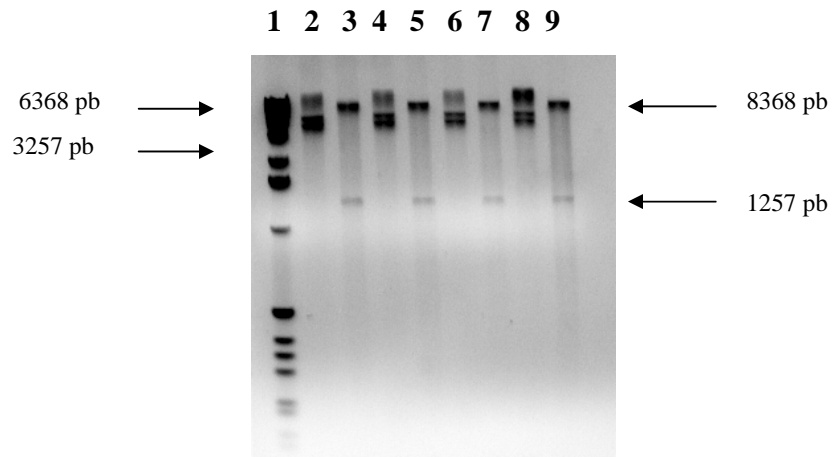
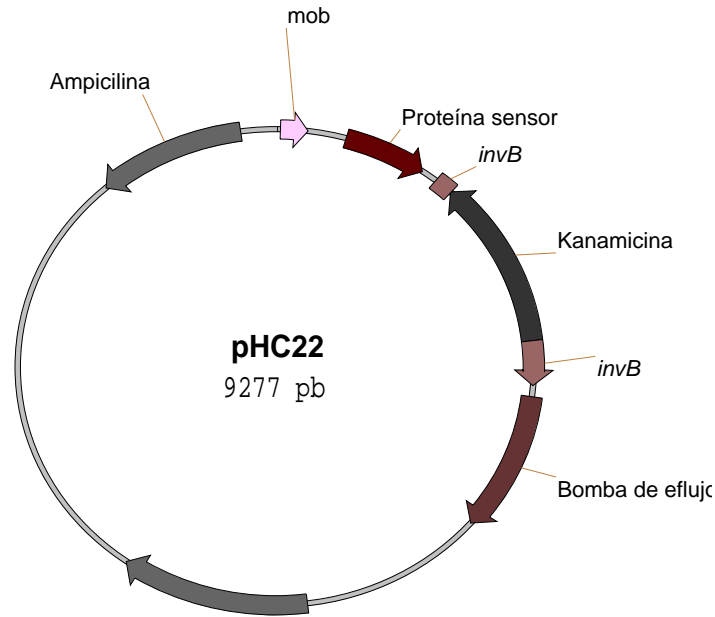


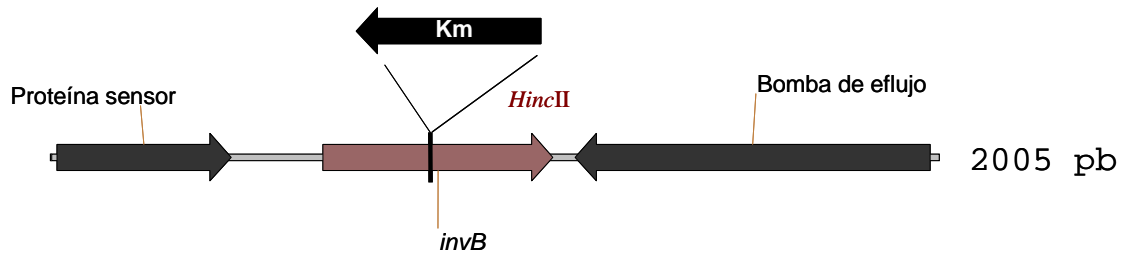
Fig.20.- Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1.- Marcador de peso molecular 1 kb “*ladder*”. Carriles 2, 4, 6, 8. Plásmido pKOK.4 con el gen *invB*-kanamicina digerido con la enzima *EcoRI*, los productos de la digestión son señalados con las flechas. Carriles 3, 5, 7, 9.- Plásmido pKOK.4 con el gen *invB*-kanamicina digerido con la enzima *HincII*, los fragmentos de la digestión son señalados con las flechas.



Mapa 13.- Plásmido pHC22 derivado del plásmido suicida pKOK.4. Contiene el gen *invB* interrumpido con el gen de resistencia a kanamicina. Los diferentes genes son señalados con líneas.

La mutación en el gen *invB* fue realizada por intercambio alélico (Mapa 14). El plásmido pHC22 fue introducido a *B. melitensis* 133 a partir de *E. coli* S17.1 por conjugación y las colonias transconjugantes fueron seleccionadas en placas con kanamicina y ácido nalidíxico. Las colonias resistentes a kanamicina que fueron susceptibles a ampicilina y tetraciclina fueron seleccionadas para confirmar la interrupción del gen *invB* mediante PCR y secuenciación. La cepa mutante por inserción en el gen *invB* fue llamada *B. melitensis invB-Km*.

La interrupción del gen *invB* fue confirmada por PCR utilizando los iniciadores empleados para amplificar un producto de 2 kb que contenía el gen *invB*. El producto de PCR en *B. melitensis* 133 fue de 2 kb, mientras que en la cepa mutante *B. melitensis invB-Km* fue de 3.2 kb (Fig. 21). La evaluación de la mutante *invB-Kn* en células HeLa y macrófagos murinos, así como la evaluación en el modelo murino se encuentra en proceso.



Mapa 14.- Diseño esquemático del sitio de mutación en el gen *invB*. Las figuras de las flechas indican los genes y su dirección. El sitio único *HincII* está señalado para introducir el gen de resistencia a kanamicina.

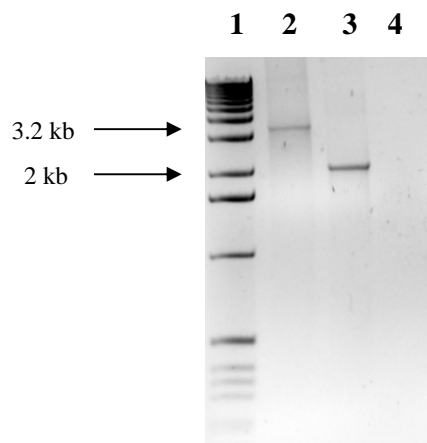


Fig. 21.- Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1.- Marcador de peso molecular 1 kb “ladder”. Carriles 2.- Mutante de *B. melitensis invB-Km*. Carril 3.- Cepa 133 de *B. melitensis*. Carril 4.- Control negativo agua.

6.5. CLONACIÓN Y CONSTRUCCIÓN DE LA MUTANTE *aida-I* DE *B. melitensis*

Para la obtención del gen *aida-I* se diseñaron iniciadores para amplificar un producto de 3105 pb (5'CCAGGCATGGCGACTTTTGGGA'3 y 5'TGCGGTGACGTTTCAGTCGG'3), el cual contiene el gen completo *aida-I* de 1569 pb, así como el gen de una citocromo C₂ corriente arriba y una proteína hipotética corriente abajo (Fig. 22). Posteriormente el producto amplificado fue digerido con la enzima de restricción *PstI* para confirmar el producto amplificado (Fig. 23).

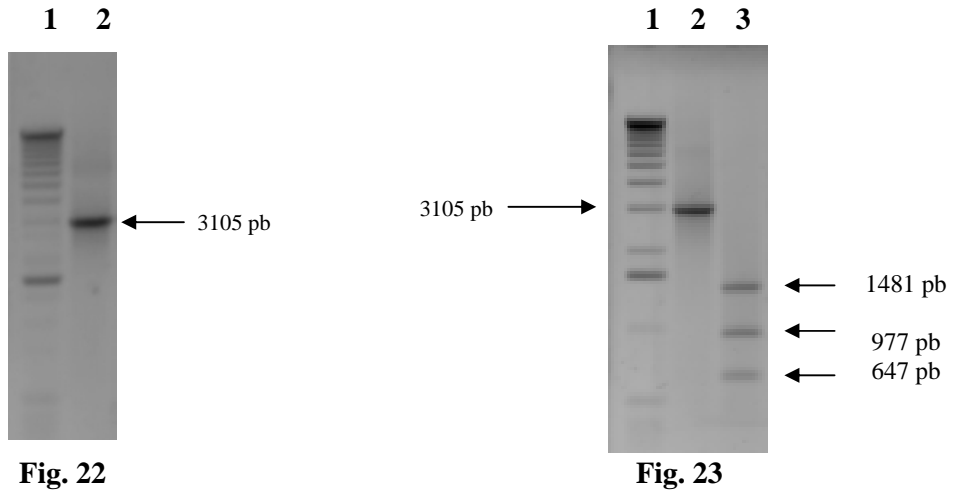


Fig. 22. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1. Marcador de peso molecular 1 kb “*ladder*” plus. Carril 2. Producto de amplificación conteniendo el gen *aida-I* señalado con la flecha. **Fig. 23.** Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1. Marcador de peso molecular 1 kb “*ladder*” plus. Carril 2. Producto de amplificación conteniendo el gen *aida-I*. Carril 3. Productos de amplificación digeridos con la enzima *PstI* señalados con las flechas.

El producto de amplificación fue clonado directamente en el plásmido pCR2.1 generando el plásmido pHC10 (Mapa 15), asimismo se realizó una digestión con la enzima de restricción *EcoRI* para liberar el fragmento clonado y verificar la clonación de *aida-I* (Fig. 24).

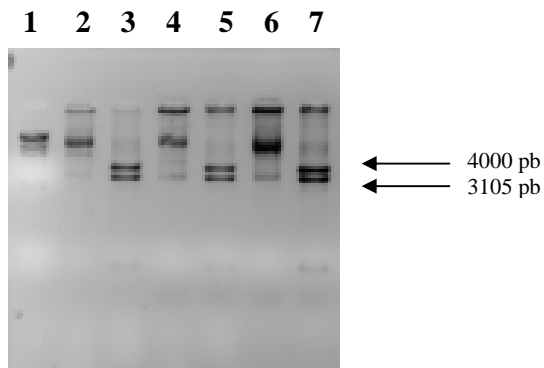
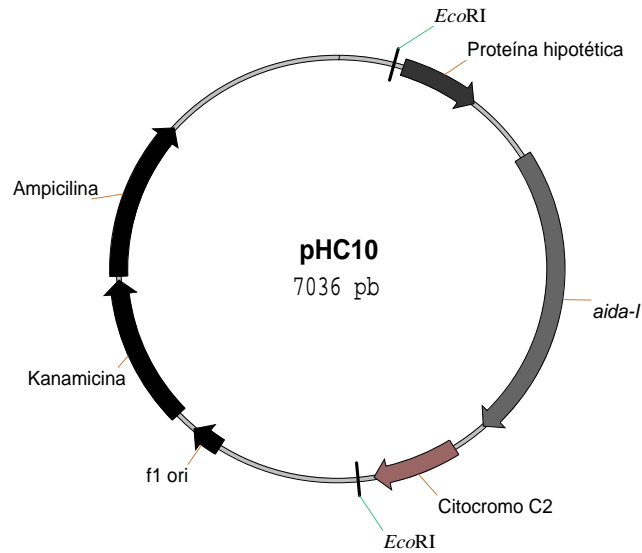
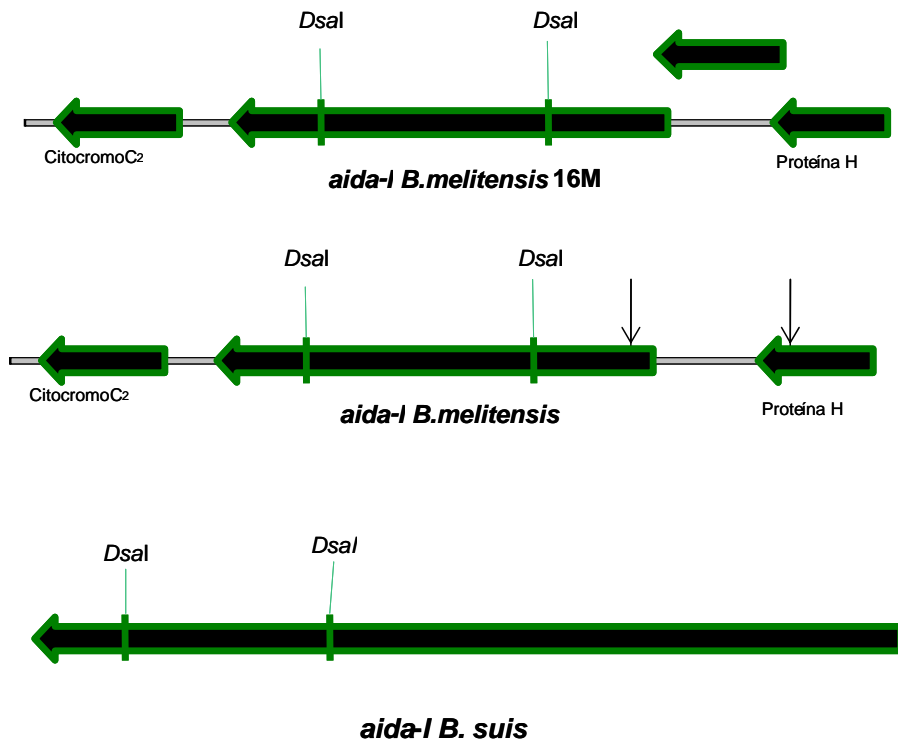


Fig. 24. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Carril 1. Marcador de peso molecular 1 kb “*ladder*” plus. Carriles 2, 4, y 6. Plásmido pHC10 sin digerir; Carriles 3, 5 y 7. plásmido pHC10 digerido con *EcoRI*.



Mapa 15.- Plásmido pHC10 derivado del plásmido pCR2.1. Contiene el fragmento 3105 pb que incluye el gen *aida-I*, el gen que codifica para una proteína hipotética y el gen que codifica para un citocromo C2. Los diferentes genes son señalados con líneas.

Al realizar la introducción del gen de resistencia a kanamicina para realizar la mutación en el área determinada, se observó una diferencia en los fragmentos esperados por lo que se decidió secuenciar la zona con variabilidad. Para esto se diseñó un par de oligonucleótidos para secuenciar la zona corriente abajo del gen *aida-I* y compararla con la base de datos de los genomas de *Brucella* disponibles, así como con el genoma de *B. melitensis* corregido (Mapa 16). La zona corriente abajo del gen fue secuenciada 4 veces en ambos sentidos, los oligonucleótidos utilizados fueron 5' AGATCGAGCGTGCCGTCAGT 3' y 5'GGGAGTGCAGGCAATCACAG 3'. La secuencia consenso de ambos sentidos fue comparada con el gen *aida-I* de *B. suis* y *B. melitensis*. El análisis de la secuencia de nucleótidos mostró que el gen *aida-I* de *B. melitensis* presenta una delección de 422 pb al comparar la secuencia con el gen homólogo de *B. suis* (Fig. 25). Esta situación determinó que la construcción de esta mutante no se realizara.



Mapa 16. Esquema de la organización gen *aida-I* de *B. melitensis* 133, *B. melitensis* 16M y *B. suis*. Las flechas muestran el sitio donde se diseñaron los oligonucleótidos para secuenciar la zona corriente abajo del gen *aida-I*.

2001 2050

A (1) -----

B (1) -----

C (1264) ATTCACCACCTGCACATTGGTGTGCCCCGAGTATCGCCACCAACCATCA

D (2001) ATTCACCACCTGCACATTGGTGTGCCCCGAGTATCGCCACCAACCATCA

2051 2100

(1) -----

(1) -----CCCGTGTGAAGACGATG

(1314) GCTTGTGCGTCTTGGAAATGTCATCACCAAGAACCGTGTGAAGACGATG

(2051) GCTTGTGCGTCTTGGAAATGTCATCACCAAGAACCGTGTGAAGACGATG

2101 2150

(1) -----

(19) GTACCGTCATGAACCGACATAATCGCCATTGACCATCAGCGTGAACCGG

(1364) GTACCGTCATGA-CCGACATAATCGCCATTGACCATCAGCGTGAACCGG

(2101) GTACCGTCATGA-CCGACATAATCGCCATTGACCATCAGCGTGAACCGG

2151 2200

(1) -----

(69) CGGCCCGACATTCATGTTGATTGTGCCGGCATTGTAAGCGCGCCAG**C**

(1413) CGGCCCGACATTCATGTTGATTGTGCCGGCATTGTAAGCGCGCCAG**C**

(2150) CGGCCCGACATTCATGTTGATTGTGCCGGCATTGTAAGCGCGCCAG**C**

2201 2250

(1) -----

119) **AT**CGTATCGAAGCCGCCAGATCGAGCGTCCGTCAGT**ATCCACGTCATA**

(1463) **AT**CGTATCGAAGCCGCCAGATCAAGCGTGCCGTCAGTATCCACGTCATA

(2200) **AT**CGTATCGAAGCCGCCAGATCGAGCGTCCGTCAGTATCCACGTCATA

2251 2300

(1) -----

(169) GCGCGACGAAGCCGTACTGAAG-----

(1513) GCGCGACGAAGCCGTACTGAAGCCTCCTGCCGCCCCCTGTGTCAGCGTGC

(2250) GCGCGACGAAGCCGTACTGAAGCCTCCTGCCGCCCCCTGTGTCAGCGTGC

2301 2350

(1) -----

(191) -----

(1563) CCGCAGACACCGTCGTTGCGCCCGTATAGCTATTGGCGCCAGAAAGCGTT

(2272) CCGCAGACACCGTCGTTGCGCCCGTATAGCTATTGGCGCCAGAAAGCGTT

2351 2400

(1) -----

(191) -----
(1613) AGCGTGCCAGCACCCTCTTCATCAAGCTGCCAGCGCCGGAGATCGCGTT
(2272) AGCGTGCC-----

2401 2450
(1) -----
(191) -----
(1663) GGCGAGATTAAGTGCCTCGGAGCGTTTACGACAAGCGCACCATGTGTTAG
(2272) -----

2451 2500
(1) -----
(191) -----
(1713) CGATATCGCCCGCAAGGTTGCCGCTCGTCCCGCCAGTGCCAATCTGAAGT
(2272) -----

2501 2550
(1) -----
(191) -----
(1763) ACAGCTCCCGCATCAACCGTCGTGCGCCGCGCCGGTATTGTCACCCGT
(2272) -----

2551 2600
(1) -----
(191) -----
(1813) CAGCGTCAGTATGCCCCGAGACACCGTCGTGCCACCCGTATAGCTGTTGA
(2272) -----

2601 2650
(1) -----
(191) -----
(1863) CGCCAGAAAGCGTCAGCGTGCCAGCACCGTCTTCGTCAGACTACCCGTA
(2272) -----

2651 2700
(1) -----
(191) -----
(1913) CCGGAGATCACGTTGGCAAGATCAAATGCATTGGAACGGTCAACGACAAG
(2272) -----

2701 2750
(1) -----
(191) -----
(1963) CGTACCATTGTTGACGATATCACCTGCAAGGCTGCCGCTCACCCACCAG
(2272) -----

(1) -----GAAGCCTCCTGCCGCCCT
(191) -----CCTCCTGCCGCCCT
(2013) TGCCGATCTGAAGTCCTGCCCCACATCAACCGTCTCTGTCGCCGCCCT
(2272) -----CCTCCTGCCGCCCT

2801 2850
(21) GTGTC-----AGCGTGCCCGCAGACACCGTCGTT-CGCC
(207) GTGTC-----AGCGTGCCCGCAGACACCGTCGTT-CGCC
(2063) GTGTTGTCGTTGCCACCACGAGCGTAAGCGCCGACACCGTCGTTGCCGCC
(2288) GTGTC-----AGCGTGCCCGCAGACACCGTCGTT-CGCC

2851 2900
(54) CGTATAGCTATTGGCGCCAGAAAGCGTCAGCGTGCCGGAACCGCTCTTCG
(240) CGTATAGCTATTGGCGCCAGAAAGCGTCAGCGTGCCGGAACCGCTCTTCG
(2113) CGTATAGCTGTTAGCGCCAGAAAGCGTCAGCGTGCCGGAACCGCTCTTCG
(2321) CGTATAGCTATTGGCGCCAGAAAGCGTCAGCGTGCCGGAACCGCTCTTCG

2901 2950
(104) TCAGACCGCCAGCGCCGCCACACCTTGCGTGACCGCAAATATTTCGCC
(290) TCAGACCGCCAGCGCCGCCACACCTTGCGTGACCGCAAATATTTCGCC
(2163) TCAGACCGCCAGCGCCGCCACACCTTGCGTGACCGCAAATATTTCGCC
(2371) TCAGACCGCCAGCGCCGCCACACCTTGCGTGACCGCAAATATTTCGCC

2951 3000
(154) GCATCCTCAATGTCGAAAGTGCCGCCGCTGCCTGCAGGCTCACCGCCCA
(340) GCATCCTCAATGTCGAAAGTGCCGCCGCTGCCTGCAGGCTCACCGCCCA
(2213) GCATCCTCAATGTCGAAAGTGCCGCCGCTGCCTGCAGGCTCACCGCCCG
(2421) GCATCCTCAATGTCGAAAGTGCCGCCGCTGCCTGCAGGCTCACCGCCCA

3001 3050
(204) GTTCGTTGACGTCCAACCTCGTCCCCGTACCTGCAAAGTGCCGCCGTTAA
(390) GTTCGTTGACGTCCAACCTCGTCCCCGTACCTGCAAAGTGCCGCCGTTAA
(2263) GTTCGTTGACGTCCAACCTCGTCCCCATCACCTGCAAAGTGCCGCCGTTAA
(2471) GTTCGTTGACGTCCAACCTCGTCCCCGTACCTGCAAAGTGCCGCCGTTAA

3051 3100
(254) ATGTCAGATCGCCGCCAAGCCGCACCTCTTTATCCACAGACACAACA
(440) ATGTCAGATCGCCGCCAAGCCGCACCTCTTTATCCACAGACACAACA
(2313) ATGTCAGATCGCCGCCAAGCCGCACCTCTTTATCCACAGACACAACA
(2521) ATGTCAGATCGCCGCCAAGCCGCACCTCTTTATCCACAGACACAACA

3101 3150
(304) CCGCCCGGAAAACCGTCCCCCGTATAGGTATTGTCTGCCGTCAGCGT
(490) CCGCCCGGAAAACCGTCCCCCGTATAGGTATTGTCTGCCGTCAGCGT
(2363) CCGCCCGGAAAACCGTCCCCCGTATAGGTATTGTCTGCCGTCAGCGT
(2571) CCGCCCGGAAAACCGTCCCCCGTATAGGTATTGTCTGCCGTCAGCGT

3151 3200
(354) CAGCGTGCCTGAGCCATTTTGGTGAGGCGGCCAACATCCGACAGCACAC
(540) CAGCGTGCCTGAGCCATTTTGGTGAGGCGGCCAACATCCGACAGCACAC
(2413) CAGCGTGCCTGAGCCATTTTGGTGAGGCGGCCAACATCCGACAGCACAC
(2621) CAGCGTGCCTGAGCCATTTTGGTGAGGCGGCCAACATCCGACAGCACAC

3201 3250
(404) CCGAAAGAACCAGATTATCGGCGCCTTGCAACAACAAGTCCGCTTGTGCTG
(590) CCGAAAGAACCAGATTATCGGCGCCTTGCAACAACAAGTCCGCTTGTGCTG
(2463) CCGAAAGAACCAGATTATCGGCGCCTTGCAACAACAAGTCCGCTTGTGCTG
(2671) CCGAAAGAACCAGATTATCGGCGCCTTGCAACAACAAGTCCGCTTGTGCTG

3251 3300
(454) GCTCCATAAGGATTGTTCTTGAGCACAAAA--CTGATCCAGCA-CTTGAT
(640) GCTCCATAAGGATTGTTCTTGAGCACAAAA--CTGATCCAGCACTTGAT
(2513) GCTCCATAAGGATTGTTCTTGAGCACAAAAGACTGATTCAGCA-CTTGAT
(2721) GCTCCATAAGGATTGTTCTTGAGCACAAAA--CTGATCCAGCA-CTTGAT

3301 3350
(501) CCCC GGACGCCTCAATGGCGCCGCCCTGCGCTGTGATGCCTGCACTCCC
(688) CCCC GGACGCCTCAATGGCGCCGCCCTGG-----
(2562) CCCC GGACGCCTCAATGGCGCCGCCCTGCGCTGTGATGCCTGCACTCCC
(2768) CCCC GGACGCCTCAATGGCGCCGCCCTGCGCTGTGATGCCTGCACTCCC

3351 3400
(551) AATGCCGCTGGCCCCGTGACTACGAGAGCGCCGCCATTAGAGTTGTTTC
(716) -----
(2612) AATGCCGCTGGCCCCGTGACTACGAGAGCGCCGCCATTAGAGTTGTTTC
(2818) AATGCCGCTGGCCCCGTGACTACGAGAGCGCCGCCATTAGAGTTGTTTC

3401 3450
(601) TCCACTGACAATGGCGCTGCCGCTAACAGTCCATCGCCCGCCATTGACGA
(716) -----
(2662) TCCACTGACAATGGCGCTGCCGCTAACAGTCCATCGCCCGCCATTGACGA
(2868) TCCACTGACAATGGCGCTGCCGCTAACAGTCCATCGCCCGCCATTGACGA

3451 3500
(651) CAAGGTGCTCAA AACCCCTTATACTGCGTCGCCGATATGTTTGCGCCGTCA
(716) -----
(2712) CAAGGTGCTCAA AACCCCTTATACTGCGTCGCCGATATGTTTGCGCCGTCA
(2918) CAAGGTGCTCAA AACCCCTTATACTGCGTCGCCGATATGTTTGCGCCGTCA

3501 3550
(701) GACTGCCCTCCATCAATTTAGAAAGGGTCTGAAGCGTCAGTGTATC
(716) -----

(2762) GACTGCCCTCCATCAATTTTAGAAAGGGTGTCTGAAGCGTCAGTGTATC
(2968) GACTGCCCTCCATCAATTTTAGAAAGGGTGTCTGAAGCGTCAGTGTATC

3551 3600
(751) ATCATTGCCATTGGCGCTAACTACACCGTTGATAACGGACTTAGTGGTGA
(716) -----
(2812) ATCATTGCCATTGGCGCTAACTACACCACTGATGACGGACTTGGTGGTGA
(3018) ATCATTGCCATTGGCGCTAACTACACCGTTGATAACGGACTTAGTGGTGA

3601 3650
(801) GGGTGAGGCTATTGATTCCCGACTGAAACGTCACCGCA--AAGGCGAATT
(716) -----
(2862) GGGTAAGGCTATTGATTCCCGACTGAAACGTCACCGCATCATTTTGAACC
(3068) GGGTGAGGCTATTGATTCCCGACTGAAACGTCACCGCA-----

3651 3700
(849) CTGCAAA-----
(716) -----
(2912) CCGGCGTTCAAGCCTCCAGTGCCACCAATACCACCGTTATCGTGCCATT
(3106) -----

3701 3750
(856) -----
(716) -----
(2962) ATTGATGACTGCGATATTTGCACCGATAATACCGGCACCGCCTTGCGAAC
(3106) -----

3751 3800
(856) -----
(716) -----
(3012) TGGTGCCCTGACTGCCGCCTGTACGGATACTGCCTGCGGCACCACCCTCA
(3106) -----

3801 3850
(856) -----
(716) -----
(3062) CCCGCGCCTCCAGTAGCGCCATAATAGACAGGCCAAGCCGAATTCAATCC
(3106) -----

3851 3900
(856) -----
(716) -----
(3112) GCCTGCGCCACCGGTTATAGTCCATTGTTGTGATCGTTACGAGTGTGC
(3106) -----

3901 3950

```

(856) -----
(716) -----
(3162) TATTACCAACAACATACACGCCCGCGCCGCCACCACCGCCGCTGAATTC
(3106) -----

          3951                                4000
(856) -----
(716) -----
(3212) TGACCGCGACTAGTATTGGCCCCATCTCCACCGGCCCGCCGATCACGGT
(3106) -----

          4001                                4050
(856) -----
(716) -----
(3262) AGAGTTGTTGGTAAAATTTGCGGAGGTTGCGACACCGGCCGCCACCGCCGC
(3106) -----

          4051                                4081
(856) -----
(716) -----
(3312) CACCAGCACCAGCACCCGACCACGCACCCAA
(3106) -----

```

Fig. 25. Alineación de la secuencia de nucleótidos del gen *aida-I* de *B. melitensis* y *B. suis*, así como la región corriente abajo del dominio autotransportador de ambos genes. Fondo naranja y letras amarillas: codón de inicio del dominio autotransportador. Fondo gris y letras azules: Bloque de nucleótidos conservados. Fondo gris y letras rojas: Bloque idéntico. Oligonucleótidos utilizados para secuenciar la zona corriente abajo señalados en un cuadro. A.- *B. melitensis* 133 *aida-I* For.- B.- *B. melitensis* 133 *aida-I* Rev. C.- *B. suis aida-I*. D.- Gen *aida-I* *B. melitensis* 16M disponible en el GenBank.

7. DISCUSIÓN

El destino preferido de *Brucella* es la formación de un nicho intracelular donde se puede multiplicar y expandir a nuevas células. En el hospedero, *Brucella* persiste en tejidos con predominio de componentes del sistema mononuclear fagocítico, así como en órganos reproductivos. Sin embargo, los mecanismos que determinan el tropismo celular y la vía que permite a *Brucella* entrar y sobrevivir dentro de diferentes células hospedadoras tales como macrófagos y células epiteliales aún no están completamente descritos.^{1, 2, 6}

Es este trabajo se evaluó la interrupción del gen que codifica para una proteína hipotética con características de transglicosilación (BMEI0216) en *Brucella melitensis*, utilizando células epiteliales HeLa y macrófagos murinos. En el genoma de *B. melitensis* 16M se anotaron 716 marcos abiertos de lectura sin asignación, de los cuales 488 son similares a proteínas hipotéticas de otros microorganismos y 228 no mostraron ninguna similitud con otras proteínas. Dentro de las proteínas hipotéticas con función similar, 13 ORF's con características de transglicosilación en el cromosoma I y un gen con iguales características en el cromosoma II, la mayoría de estos genes (11 genes), se encuentran asociados a la lisis del peptidoglucano. El gen BMEI0216 se encuentra anotado como una proteína hipotética se encuentra flanqueado por el gen *invA* corriente arriba y por una proteína hipotética de membrana corriente abajo, así como una proteína de la familia LysR. Todos estos genes aun no se han caracterizado en el género *Brucella*.⁷²

El gen BMEI0216 se encuentra localizado en el cromosoma grande en la cadena 3'-5' con un tamaño predictivo de 84 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos mostró una homología del 100% con una proteína hipotética transglicosilada de *Brucella ovis* ATCC 25840 y *B. abortus* 2308, asimismo con organismos relacionados genéticamente se observó una homología del 73% con una proteína transglicosilada de *Mesorhizobium loti* y una homología del 70% con una proteína con las mismas características de *Bradyrhizobium* spp, con otros microorganismos se encontró una homología del 59% y 55% con una proteína hipotética de *Rhodopseudomonas palustris* y *Burkholderia pseudomallei*, respectivamente.

Por otro lado, al analizar la región que contiene el gen BMEI0216 en los genomas de *Brucella* disponibles, se observó que el gen BMEI0216 no se encuentra anotado en los genomas de *B. suis* 1330 y *B. abortus* 9-941; sin embargo, en la misma región pero en la cadena 5'-3' de ambos genomas se encontró un ORF anotado como una proteína hipotética de 130 aminoácidos, al comparar la secuencia de aminoácidos del gen BMEI0216 y el de la proteína anotada en la cadena 5'-3' no se encontró homología entre ambas. Bajo este contexto, todo parece indicar que es un problema de anotaciones en los genomas, sin embargo recientemente Dricot et al., 2004 generaron el *ORFeome* de *B. melitensis* 16M⁹¹, el cual es una biblioteca de cada ORF que codifica para una proteína cada ORF clonado en un plásmido (pCDS) y dentro de este *ORFeome* 1.1 se localiza el gen BMEI0216, confirmando que el ORF BMEI0216 codifica para una proteína y no es un error de anotación en el genoma.

El análisis de la secuencia de aminoácidos utilizando los programas Pfam e InterProScan determinó que esta pequeña proteína posee características de ser una proteína transglucosilada con una posible localización celular en la membrana interna. La mutación no afectó la sobrevivencia o multiplicación en macrófagos murinos a tiempos de 0, 2, 24 y 48 h. Sugiriendo que este gen no es necesario para la sobrevivencia intracelular. Por el contrario, al evaluar la mutante en ensayos de invasión utilizando células epiteliales HeLa no se observaron diferencias en tiempos de 30 y 45 min.; sin embargo, en tiempos de 1 y 2 horas de invasión se observaron diferencias significativas entre la cepa mutante y la cepa parental, lo que sugiere que este gen es importante en el proceso de invasión a este tipo celular.

El gen BMEI0216 se encuentra flanqueado por el gen *invA* corriente abajo y por una proteína hipotética corriente arriba, ambos genes aun no se han caracterizado en *Brucella*. Con relación al gen *invA*, éste posee una homología del 54% con el gene *ialA* de *Bartonella bacilliformis*, el cual forma un locus junto con el gen *ialB* (*ialAB*, "invasion-associated locus"), indispensable para invadir eritrocitos humanos.^{92, 93, 94} Sin embargo, al analizar la región el gen *invA* se transcribe en dirección opuesta, así como con el gen de kanamicina que se utilizó para construir la mutante, eliminando así una posibilidad de que la atenuación se deba a un efecto polar en el gen *invA*.

Como se mencionó anteriormente, en el genoma de *B. melitensis* se encuentran anotados 13 genes con características de transglicosilación, 11 de ellos se encuentran asociados a lisis de peptidoglucano y dos de ellos con función hipotética, incluyendo el gen BMEI0216. Solo uno de los 13 genes se ha descrito su función, el gene *mtgA*, el cual se ha identificado en *B. melitensis* y en *B. abortus* por sistemas de mutación al azar, *signature-tagged mutagenesis* y por inserción de un transposon Tn5Km2, respectivamente.^{95,96}

La identificación del efecto del gen en ambos casos se observó por la disminución en la habilidad para invadir y sobrevivir en macrófagos; en este sentido, la mutante BMEI0216 sólo presentó una disminución en la invasión de células HeLa, no así en macrófagos donde a las 0, 2, 24 y 48 h no se observaron diferencias significativas con su cepa parental. Una importante diferencia entre ambas mutantes, radica en el fenotipo, la mutante en *mtgA* es del tipo rugoso y la mutante BMEI0216 es de tipo liso, lo que puede explicar la diferencia mostrada en la sobrevivencia intracelular en macrófagos murinos, donde las cepas rugosas son eliminadas rápidamente, mientras que las cepas lisas se recuperan después de las 2-4 horas post-infección y posteriormente se multiplican.

Otra posible explicación de nuestros resultados es la relacionada a funciones asignadas a genes transglicosilados presentes en el genoma de *B. melitensis*, la cual en su mayoría se restringe a la lisis del peptidoglucano, mecanismo importante en el mantenimiento de la integridad de la pared celular, así como en la degradación del peptidoglucano para un correcto ensamblaje de diferentes sistemas de secreción.^{97,98} Con base en lo anterior se puede formular una hipótesis donde al mutar el gen BMEI0216 se podría ver afectada la integridad de la pared celular, algún componente de membrana o alterar algún sistema de secreción y así alterar el proceso de invasión de *Brucella*.

Por otro lado, observando mínimas diferencias genéticas dentro del género *Brucella* se puede inferir que estos genes únicos en las diferentes especies de *Brucella* podrían ser elementos importantes en la patogénesis del microorganismo y su predilección de hospedero. De igual manera otro elemento que podría estar involucrado

en la patogénesis de *Brucella* podría ser el resultado de modificaciones post-transduccionales, como la glicosilación en una gran variedad de genes.

Con respecto al gen *aida-I* se decidió construir una mutante por delección en la cepa 133 de *B. melitensis*, este gen se encuentra anotado en el cromosoma pequeño del genoma de *B. melitensis* con la anotación BMEII1069 el cual codifica para el β -dominio de un autotransportador de 1461 pb y un producto de 487 aminoácidos. Este gen presentó homología del 100% solo con el β -dominio de *Brucella suis*, así como una homología del 46% con un β -dominio de *Agrobacterium tumefaciens* localizado en el plásmido pAT, con *Rhizobium leguminosarum* un 44% con una adhesina con características de autotransportador, un 37% con un adhesina de *Yersinia pestis*, un 37% con un autotransportador de *Bordetella bronchiseptica*, un 34% con una adhesina (*aidA-I*) de *Escherichia coli* 32% y un 30% con un autotransportador de *Salmonella typhimurium*.^{99, 100, 101}

Las características de este gen en una gran variedad de bacterias Gram-, son propias de un sistema de secreción tipo V (SSTV), conocido como autotransportador, este sistema es único ya que el sustrato es capaz de dirigir su propia secreción a través de la membrana externa. Los SSTV poseen tres dominios: 1) una secuencia señal amino terminal, 2) un translocador carboxilo terminal conocido como β -dominio y 3) el pasajero conocido como α -dominio, localizado entre la secuencia señal y el β -dominio. Existe una variedad de SSTV, conocido como sistema de dos compañeros (“Two partner secretion system”), donde el pasajero posee una secuencia señal que lo trasloca directamente al espacio periplásmico y es traslocado al exterior por un β -dominio, y son traducidas como dos proteínas separadas.^{102, 103}

Cientos de autotransportadores han sido descritos, donde el β -dominio es altamente conservado y el pasajero es la parte del gen que posee funciones representativas del autotransportador, por ejemplo: adhesina, proteasa, hemoaglutinina, y toxinas entre otros, esto dependerá del nicho particular ocupado por el patógeno.¹⁰³

Al analizar la región donde se encuentra el gen *aida-I*, se localizó corriente arriba el ORF BMEII1070 que fue anotado como una proteína hipotética en el genoma

de *B. melitensis* 16M, esto sugirió que el gen BMEII1069 formaba parte de una variante del SSTV, conocido como sistema de dos compañeros. Sin embargo, al realizar la manipulación genética se observaron diferencias en los fragmentos adyacentes del gen. En este sentido en la Universidad de Namur, Bélgica, y bajo la dirección del doctor Christophe Lambert se comenzaron a realizar las correcciones de las anotaciones del genoma de la cepa 16M de *B. melitensis*. Las nuevas anotaciones y correcciones del genoma se encuentran disponibles en la dirección <http://urbm59.urbm.fundp.ac.be/>. El análisis de esta región demostró que el gen que se encuentra corriente arriba (BMEII1070) es el dominio pasajero de este autotransportador y que en una región intergénica entre ambos genes se encontraban tres codones de paro, por lo que fue anotado como un pseudogen.

En la cepa 133 de origen mexicano, se encontró que en la región antes señalada se localizó una delección de 422 pb, encontrando una diferencia en este gen entre ambas cepas (Mapa 6 y Fig. 25). Por otro lado, en los genomas de *B. suis* y *B. abortus* cepa 9-941 se observó que en *B. suis* este gen se encuentra completo, como un autotransportador clásico y en *B. abortus* se encuentra también como pseudogen, solo que la presencia de codones de paro se encuentra en el dominio pasajero cerca del aminoácido 304.^{70, 71, 72}

Esta situación a nivel genoma demuestra la variabilidad que existe en esta región de *Brucella*, así como en *B. suis* este gen representa a uno de los 42 genes únicos en esta especie.³⁸ Recientemente, en *B. suis* se demostró que el gen *omaA*, cumple con las características de un autotransportador clásico y con funciones de adhesina, asimismo utilizando mutantes en este gen se observó que participa en la fase crónica de la infección en el modelo murino, por otro lado, el análisis de los diferentes dominios del autotransportador presentó homología del 100% solo con el β -dominio del gen *aida-I* de *B. melitensis*; sin embargo, al comparar las secuencias completas de ambos genes se observó que solo comparten un 47% de identidad, esta información es similar a la reportada en varios tipos de autotransportadores, donde existe una alta homología en el dominio β -dominio y baja homología en el dominio pasajero.⁷⁸

Con respecto al gen *invB* se observó homología con el gen *ialB* de *B. bacilliformis* (34% de identidad y 55% de similitud). Este gen se encuentra presente en

el genoma de *B. abortus* y como pseudogen en el genoma de *B. suis*. En *B. melitensis* y *B. abortus* el gen *invB* codifica para una proteína putativa de 133 aminoácidos; sin embargo, en *B. suis* este gen contiene una base adicional (T) en la posición 254 causando un cambio en la lectura del marco abierto de lectura dando como resultado un producto truncado. En *B. bacilliformis* este gen se encuentra junto con el gen *ialA* formando un locus esencial para la invasión de eritrocitos, se ha observado que al mutar solo al gen *ialB* se observa una reducción de un 50% en la invasión a eritrocitos humanos.

En este trabajo se construyó una mutante por inserción en el gen *invB* de *B. melitensis* y su caracterización se encuentra en proceso. En este sentido una característica importante del género *Brucella* radica en que no necesita de un mecanismo específico de invasión para entrar en los macrófagos, el poseer una proteína de invasión puede ser importante para comenzar la invasión en fagocitos no profesionales, tal es el caso de trofoblastos y contribuir así en la patología reproductiva de la infección.

Hasta el momento en *Brucella* no se ha caracterizado este gen y solo existe un reporte de donde utilizan al gen *invB* (BMEI1584) como vacuna de DNA, en el cual se demostró que el gen se transcribe bajo diferentes condiciones de cultivo, así como al vacunar ratones BALB/c y desafiarlos con *B. melitensis* 16M se observó una protección del 60%, así como una fuerte respuesta de anticuerpos en forma específica IgM, IgG1 e IgG2a, y una producción débil pero sostenida de IFN γ .¹⁰⁴

8. CONCLUSIONES

El gen BMEI0216 de *B. melitensis* 133, que codifica para una proteína asociada transglicosilada afecta la invasión de *Brucella* en células HeLa y no tiene efecto en la sobrevivencia intracelular.

El gen *aida-I* de *B. melitensis* 133 presento una delección de 422 pb corriente abajo del β -domino que corresponde a la región del pasajero de este autotransportador, por lo que este gen fue anotado como pseudogen tanto en la cepa de origen mexicano como en la cepa de referencia *B. melitensis* 16M y en *B. abortus*, sin embargo en *B. suis* este gen se encuentra completo y posee los dominios clásicos de un autotransportador.

9. PERSPECTIVAS

Para explicar las posibles implicaciones del gene BMEI0216 en la patogénesis de *Brucella* se realizarán infecciones experimentales utilizando el modelo murino y el modelo caprino.

Para confirmar el papel del gen BMEI0216 se realizarán estudios de microscopia electrónica, así como de inmunofluorescencia diferencial.

Con respecto a la mutante *invB* de *B. melitensis* se realizarán ensayos de invasión en células HeLa, así como ensayos de fagocitosis y sobrevivencia intracelular en macrófagos murinos. De igual manera que en la mutante anterior se pretende realizar infecciones experimentales en el modelo murino y caprino.

10. LITERATURA CITADA

- 1.- Corbel MJ. Brucellosis: an overview. *Emerg Infect Dis* 1997, 3:213-221.
- 2.- Díaz E, Hernández G, Valero G, Arellano B. Diagnóstico de brucelosis animal. México D.F.: INIFAP, 2001.
- 3.- Luna-Martínez JE, Mejía-Terán C. Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Vet Microbiol* 2002, 90:19-30.
- 4.- Doganay M, Aygen B. Human brucellosis: an overview. *Int J Infect Dis* 2003, 7:173-186.
- 5.- Sauret J, Vilissova N. Human brucellosis. *J Am Board Fam Pract* 2002, 15 : 401-406.
- 6.- Pacheco HA, Luna-Martínez JE. Identificación de factores de riesgo de brucelosis como zoonosis en la República Mexicana. LIII Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Salud Pública. Monterrey, 1999.
- 7.- Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol* 2002, 2402:1-12
- 8.- OIE. Manual of Standards diagnostic tests and vaccines, 4th edition, 2000.
- 9.- Herman L, De Ridder H. Identification of *Brucella* spp by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ microbiol* 1992, 58:2099-2101.
- 10.- Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg* 1992, 95(4):271-5.
- 11.- Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol* 1994, 32:2660-2666.

- 12.- Bricker BJ, Halling SM. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR Assay for Differentiation of *Brucella abortus* Vaccine Strains S19 and RB51. J Clin Microbiol 1995, 33:1640-1642.
- 13.- Ewalt DR, Bricker BJ. Validation of the Abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a Rapid Screening Method for Differentiation of *Brucella abortus* Field Strain Isolates and the Vaccine Strains, 19 and RB51. J Clin Microbiol 2000, 38:3085-3086.
- 14.- Bricker BJ, Ewalt DR, Olsen SC, Jensen AE. Evaluation of the *Brucella abortus* species-specific polymerase chain reaction assay, an improved version of the *Brucella* AMOS polymerase chain reaction assay for cattle. J Vet Diagn Invest 2003, 15:374-378.
- 15.- Ocampo-Sosa AA, Agüero-Balbín J, García-Lobo JM. Development of a new PCR assay to identify *Brucella abortus* biovars 5, 6 and 9 and the new subgroup 3b of biovar 3. 2005, Vet Microbiol 110:41-51.
- 16.- Bantle JA, Halling SM, Stich RW. Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers J Bacteriol 1992b;174:7778-7783.
- 17.- Cetinkaya B, Ongor H, Muz A, Ertas HB, Kalender H, Erdogan HM. Detection of *Brucella* species DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR. Vet Rec 1999;144:239-240.
- 18.- Cortez A, Scarcelli E, Soares RM, Heinemann MB, Sakamoto SM, Genovez ME, Ferreira F, Richtzenhain LJ. Detection of *Brucella* DNA from aborted bovine fetuses by polymerase chain reaction. Aust Vet J 2001, 79:500-501.
- 19.- Fekete A, Bantle JA, Halling SM. Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. J Vet Diagn Invest 1992a, 4:79-83.

- 20.- Gallien P, Dorn C, Alban G, Staak C, Protz D. Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. *Vet Rec* 1998;142:512-514.
- 21.- Amin AS, Hamdy ME, Ibrahim AK. Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. *Vet Microbiol* 2001, 83:37-44.
- 22.- Guarino A, Serpe L, Fusco G, Scaramuzzo A, Gallo P. Detection of *Brucella* species in buffalo whole blood by gene-specific PCR. *Vet Rec* 2000;147:634-636.
- 23.- Romero C, López-Goni I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1999, 65:3735-3737.
- 24.- Serpe L, Gallo P, Fidanza N, Scaramuzzo A, Fenizia D. Single step method for rapid detection of *Brucella* spp. in soft cheese by gene-specific polymerase chain reaction. *J Dairy Res* 1999, 66:313-317.
- 25.- Tantillo G, Di Pinto A, Vergara A, Buonavoglia C. Polymerase chain reaction for the direct detection of *Brucella* spp. in milk and cheese. *J Food Prot* 2001; 64:164-167.
- 26.- Morata P, Queipo-Ortuno MI, de Dios Colmenero J. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol* 1998, 36:2443-2446.
- 27.- Queipo-Ortuno MI, Morata P, Ocon P, Manchado P, Colmenero JD. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *J Clin Microbiol* 1997, 35:2927-2930.
- 28.- Zerva L, Bourantas K, Mitka S, Kansouzidou A, Legakis NJ. Serum is the preferred clinical specimen for diagnosis of human brucellosis by PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39:1661-1664.
- 29.- NORMA Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales.

- 30.- Cloeckaert A, Grayon M, Grépinet O, Boumedine KS. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals by infrequent restriction site-PCR and development of specific PCR identification tests. *Microbes Infect* 2003; 5:593-602.
- 31.- Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Paquet JY, Garin.Bastuji B, Foster G, Godfroid J. Classification of *Brucella* spp. Isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes Infect* 2001;3:729-738.
- 32.- Bricker BJ, Ewalt DR, Alastair PM, Foster G, Brew S. Molecular characterization of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *J Clin Microbiol* 2000;38:1258-1262.
- 33.- Verger J M, Grayon M, Cloeckaert A, Lefevre M, Ageron E, Grimont F. Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals using DNA-DNA hybridization and ribotyping. *Res Microbiol* 2000;151:797:799.
- 34.- Verger JM, Grimont F, Grimont PA, Grayon M. (1985). *Brucella* a monoespecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hibridization. *Int J Syst Bacteriol.* 35: 292-295.
- 35.- Moreno E, Cloeckaert A, Moriyón I. *Brucella* evolution and taxonomy. (2002). *Vet Microbiol.* 90: 209-227.
- 36.- Allardet-Servent A, Boung G, Ramuz M, Pages M, Bellis M, Roizes G. DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *J Bacteriol* 1988;170:4603-7.
- 37.- Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G, O'Callaghan D, Ramuz M. Differences in chromosome number and genome rearrangements in the genus *Brucella*. *Mol Microbiol* 1998; 27: 99-106.
- 38.- Moriyon I. Against Gram-negative bacteria: the LPS case. In *Intracellular Pathogens in Membrane Interactions and Vacuole Biogenesis*. Edited by Gorvel JP. Georgetstown, Texas: Landes Bioscience 2003:204-230.

- 39.- Goldstein J, Hoffman T, Frasc C, Lizzio EF, Beining PR, Hochstein D, Lee YL, Angus RD, Golding B. Lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus* is less toxic than that from *Escherichia coli* suggesting the possible use of *B. abortus* or LPS from *B. abortus* as a carrier in vaccines. *Infect Immun* 1992, 60:1385-1389.
- 40.- Gomes Cardoso P, Costa Macedo G, Azevedo V, Costa Oliveira S. *Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb Cell Fact* 2006, 5:13.
- 41.- Keleti G, Feingold DS, Youngner JS. Interferon induction in mice by lipopolysaccharide from *Brucella abortus*. *Infect Immun* 1974, 10:282-283.
- 42.- Porte F, Naroeni A, Ouahrani-Bettache S, Liautard JP. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in the phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun* 2003, 71:1481-1490.
- 43.- Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Curr Opin Microbiol* 2004, 8:60-66.
- 44.- Foulongne V, Bourg G, Cazevieuille C, Michaux-Charachon S, O'Callaghan D. Identification of *Brucella suis* genes affecting intracellular survival in an in vitro human macrophages infection model by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infect Immun* 2000, 68:1297-1303.
- 45.- Naroeni A, Porte F. Role of cholesterol and the ganglioside Gm (1) in entry and short term survival of *Brucella suis* in murine macrophages. *Infect Immun* 2002, 70:1640-1644.
- 46.- Wataria M, Kim S, Erdenebaatar J, Makino S, Horiuchi M, Shirahata T, Sakaguchi S, Katamine S. Cellular prion protein promotes *Brucella* infection into macrophages. *J Exp Med* 2003, 198:5-17.

- 47.- Boschioli ML, Ouahrani-Bettache G, Foulong V, Michaux-charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, Cazevieille C, Liautard JP, Ramuz M, O'Callaghan D. The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 2002, 99:1544-1549.
- 48.- Sun YH, den Hartigh AB, Santos RL, Adams LG, Tsolis RM. virB-mediated survival of *Brucella abortus* in mice and macrophages is independent of a functional inducible nitric oxide synthase or NADPH oxidase in macrophages. Infect Immun 2002, 70: 4826-4832.
- 49.- Celli J, de Chastellier C, Franchini D-M, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP. *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with endoplasmic reticulum. J Exp Med 2003, 198:545-556.
- 50.- Comerci DJ, Martinez-Lorenzo MJ, Sieira R, Gorvel JP, Ugalde RA. Essential role of the VirB machinery in the maturation of the *Brucella abortus*-containing vacuole. Cell Microbiol 2001, 3:159-168.
- 51.- Celli J, Gorvel JP. Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. Curr Opin Microbiol 2004, 7:93-97.
- 52.- Christie PJ, Vogel JP. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. Trends Microbiol 2000, 8:354-360.
- 53.- Lai EM, Kado CI. The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. Trends Microbiol 2000, 8:361-369.
- 54.- Boschioli ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, Cazevieille C, Liautard JP, Ramuz M, O'Callaghan D. The *Brucella suis* virB operon is induced intracellularly in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002, 99:1544-1549.

- 55.- De Mot R, Schoofs G, Roelandt A, Declerck P, Proost P, Van Damme J, Vanderleyden J. Molecular characterization of the major outer-membrane protein OprF from root-colonizing *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiol* 1994, 140:1377-1387.
- 56.- Delrue RM, Martinez-Lorenzo M, Lastrate P, Danese I, Bielarz V, Mertens P, De Bolle X, Tibor A, Gorvel JP, Letesson JJ. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. *Cell Microbiol* 2001, 3: 487-497.
- 57.- Ouahrani-Bettache S, Porte F, Teyssier J, Liautard JP, Kohler S. pBBR1-GFP: a broad-host-range vector for prokaryotic promoter studies. *Biotechniques* 1999, 26:620-622.
- 58.- Watarai M, Andrews HL, Isberg RR. Formation of a fibrous structure on the surface of *Legionella pneumotropa* associated with exposure of DotH and DotO proteins after intracellular growth. *Mol Microbiol* 2001, 39:313-329.
- 59.- Schmiederer M, Arcenas R, Widen R, Valkov N, Anderson B. Intracellular induction of the *Bartonella henselae* *virB* operon by human endothelial cells. *Infect Immun* 2001, 69: 6495-6502.
- 60.- González-Carrero MI, Sangari FJ, Agüero J, García-Lobo JM. *Brucella abortus* strain 2308 produces brucebactin, a highly efficient catecholic siderophore. *Microbiol* 2002, 148:353-360.
- 61.- Bellaire BH, Elzer PH, Baldwin CL, Roop II RM. Production of the siderophore 2,3-dihydroxybenzoic acid is required for wild-type growth of *Brucella abortus* in the presence of erythritol under low-iron conditions in vitro. *Infect Immun* 2003, 71:2927-2932.
- 62.- Castañeda-Roldan EI, Ouahrani-Bettache S, Saldaña Z, Avelino F, Rendón MA, Dornand J, Girón JA. Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells. *Cell Microbiol* 2006, 8:1877-87.

- 63.- Rocha-Gracia R, Castañeda-Roldán EI, Giono-Cerezo S, Girón JA. *Brucella* spp. bind to sialic acid residues on human and animal red blood cells. FEMS Microbiol Lett 2002, 213:219-224.
- 64.- López-Goñi I, Guzmán-Verri D, Manterota L, Sola-Landa A, Moriyón I, Moreno E. Regulation of *Brucella* virulence by two component system BvrR/BvrS. Vet Microbiol 2002, 90:329-339.
- 65.- Guzmán-Verri D, Manterota L, Sola-Landa A, Parra A, Cloeckart A, Garin J. The two- component system BvrR/BvrS essential for *Brucella abortus* virulence regulates the expression of outer membrane proteins with counterparts in members of the *Rhizobiaceae*. Proc Natl Acad sci USA 2002, 99: 123750-112380.
- 66.- Sola-Landa A, Pizarro-Cerda J, Grillo MJ, Moreno E, Moriyón I, Blasco JM. A two-component regulatory system playing critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. Mol Microbiol 1998, 29:125-138.
- 67.- Arellano-Reynoso B, Lapaque N, Salcedo S, Briones G, Ciocchini AE, Ugalde R, Moreno E, Moriyon I, Gorvel JP. Cyclic β -1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival. Nat Immunol 2005, 618-625.
- 68.- Bhagwat AA, Mithofer A, Pfeffer PE, Kraus C, Spickers N, Hotchkiss A, Ebel J, Keister DL. Further studies of the role of cyclic beta-glucans in symbiosis: An *ndvC* mutant of *Bradyrhizobium japonicum* synthesizes cyclodecakis-(1->3)-beta glucosyl. Plant Physiol 1999, 1057-1064.
- 69.- Dermine JF, Duclos S, Garin J, St.-Louis F, Rea S, Parton RG, Desjardins M. Flotillin-1 enriched lipid raft domains accumulated on maturing phagosomes. J Biol Chem 2001, 276:18507-18512.
- 70.- Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac LM, Beanan MJ, Daugherty SC, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Nelson WC, Ayodeji B, Kraul M, Shetty J, Malek J, Van Aken

SE, Riedmuller S, Tettelin H, Gill SR, White O, Salzberg SL, Hoover DL, Lindler LE, Halling SM, Boyle SM, Fraser CM. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. Proc Natl Acad Sci 2002, 99:20:12503-5.

71.- Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li LL, Kapur V, Alt DP, Olsen SC. Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. J Bacteriol. 2005, 187:2715-26.

72.- DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, 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 PH, Hagijs S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyrpides N, Overbeek R. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. Proc Nac Acad Sci. 2002, 99:443-448.

73.- Rajashekara G, Glasner JD, Glover DA, Splitter GA. Comparative whole-genome hybridization reveals genomic islands in *Brucella* species. J Bacteriol 2004, 186:5040-5051.

74.- Fretin D, Fauconnier A, Kohler S, Halling S, Leonard S, Nijskens C, Ferooz J, Lestrade P, Delrue RM, Danese I, Vandenhautte J, Tibor A, DeBolle X, Letesson JJ. The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection. Cell Microbiol. 2005, 7:687.

75.- Kim S, Kurokawa D, Watanabe K, Makino S, Shirahata T, Watarai M. *Brucella abortus* nicotinamidase (PncA) contributes to its intracellular replication and infectivity in mice. FEMS Microbiol Lett. 2004, 234:289-295.

76.- Lavigne JP, Patey G, Sangari FJ, Bourg G, Ramuz M, O'Callaghan D, Michaux-Charachon S. Identification of a new virulence factor, BvfA, in *Brucella suis*. Infect Immun 2005, 73:5524-5529.

- 77.- Loisel-Meyer S, Jiménez-de Bagüés MP, Bassères E, Dornand J, Köhler S, Liautard JP, Jubier-Maurin V. Requirement of *norD* for *Brucella suis* virulence in a murine model of in vitro and in vivo infection. *Infect Immun* 2006, 74: 1973-1976.
- 78.- Bandara A, Sriranganathan N, Schurig G, Boyle SM. Putative outer membrane autotransporter protein influences survival of *Brucella suis* in BALB/c mice. *Vet Microbiol* 2005, 109:95-104.
- 79.- Hornback ML, Roop II MR. The *Brucella abortus xthA-1* gene product participates in base excision repair and resistance to oxidative killing but is not required for wild-type virulence in the mouse model. *J Bacteriol* 2006, 188:1295-1300.
- 80.- Haine V, Dozot M, Dornand J, Letesson JJ, De Bolle X. NnrA is required for full virulence and regulates several *Brucella melitensis* denitrification genes. *J Bacteriol* 2006, 188:1615-1619.
- 81.- Delpino VM, Marchesini M, Estein SM, Comerci DJ, Cassataro J, Fossati CA, Baldi PC. A bile salt hydrolase of *Brucella abortus* contributes to the establishment of a successful infection through the oral route in mice. *Infect Immun* 2007, 75:299-305.
- 82.- Wagner MA, Eschenbrenner M, Horn TA, Kraycer JA, Mujer CV, Hagijs S, Elzer P, DelVecchio VG. Global analysis of the *Brucella melitensis* proteome: identification of proteins expressed in laboratory-grown culture. *Proteomics* 2002, 2:1047-1060.
- 83.- Eschenbrenner M, Wagner MA, Horn TA, Kraycer JA, Mujer VM, Hagijs S, Elzer P, DelVecchio VG. Comparative proteome analysis of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev1 and virulent strain 16M. *J Bacteriol* 2002, 184:4962-4970.
- 84.- Sambrook, J, Maniatis T, Fritsch EF. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: (1989). Cold Spring Harbor Laboratory.
- 85.- Kokotek W, Lotz W. Construction of a mobilizable cloning vector for site-directed mutagenesis of gram-negative bacteria: application to *Rhizobium leguminosarum*. *Gene* 1991, 98:7-13.

- 86.- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM 2nd, Peterson KM. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*. 1995,166:175-176.
- 87.- Simon R, Priefer U, Pühler A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering, transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1983, 1:784–791.
- 88.- Arenas NG, Staskevich AS, Aballay A, Mayorga L. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infect Immun* 2000, 68:4255-4263.
- 89.- Ko, J. and Splitter, G. A. *Brucella abortus* tandem repeated ATP-binding proteins, BapA and BapB, homologs of *Haemophilus influenzae* LktB, are not necessary for intracellular survival. *Microb Pathog* 2000, 29:245-253.
- 90.- Tibor A, Wansard V, Bielartz V, Delrue R-M, Danese I, Michel P, Walravens K, Godfroid J, Letesson J-J. Effect of *omp10* or *omp19* deletion on *Brucella abortus* outer membrane properties and virulence in mice. *Infect Immun* 2002, 70:5540-5546.
- 91.- Dricot A, Rual JF, Lamesch P, Bertin N, Dupuy D, Hao T, Lambert C, Hallez R, Delroisse JM, Vandenhoute J, Lopez-Goñi I, Moriyon I, Garcia-Lobo JM, Sangari FJ, Macmillan AP, Cutler SJ, Whatmore AM, Bozak S, Sequerra R, Doucette-Stamm L, Vidal M, Hill DE, Letesson JJ, De Bolle X. Generation of the *Brucella melitensis* ORFeome version 1.1. *Genome Res* 2004;14:2201-6.
- 92.- Mitchell JS, Minnick FM. Characterization of a two-gene locus from *Bartonella bacilliformis* associated with the ability to invade human erythrocytes. *Infect Immun* 1995, 63:1552-1562.
- 93.- Conyers BG, Bessman JM. The gene *ialA* associated with the invasion of human erythrocytes by *Bartonella bacilliformis* designates a nudix hydrolase active on dinucleoside 5'-polyphosphates. *J Biol Chem* 1999, 274:1203-1206.

- 94.- Cartwright LJ, Britton P, Minnick FM, McLennan GA. The *ialA* invasion gene of *Bartonella bacilliformis* encodes a (Di)nucleoside polyphosphate hydrolase of the MutT motif family and has homologs in other invasive bacteria. *Biochem Biophys Acta* 1999, 256:474-479.
- 95.- Lestrade P, Delrue R, Danese I, Didembourg C, Taminiau B, Mertens P, De Bolle X, Tibor A, Tang CM, Letesson JJ. Identification and characterization of *in vivo* attenuated mutants of *Brucella melitensis*. *Mol Microbiol* 2000, 38:543-551.
- 96.- Kim S, Watarai M, Kondo Y, Erdenebaatar J, Makino S, Shirahata T. Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of *Brucella abortus* deficient in internalization and intracellular growth in HeLa cells. *Infect Immun* 2003, 71:3020-3027.
- 97.- Patey G, Qi Z, Bourg G, Baron C, O'Callagahn D. Swapping of periplasmic domains between *Brucella suis* VirB8 and a pSB102 VirB8 homologue allows heterologous complementation. *Infect Immun* 2006, 74:4945-4949.
- 98.- Zahrl D, Wagner M, Bischof K, Bayer M, Zavec B, Beranek A, Ruckenstein C, Zarfel G, Koraimann G. Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology* 2005, 151: 3455-3467.
- 99.- Lettemann CT, Maurer J, Gerland E, Meyer FT. Autodisplay: Functional display of active β -lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. *J Bacteriol* 2000, 182:3726-3733.
- 100.- Maurer J, Jose J, Meyer TF. Autodisplay: One-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1997, 179:794-804.
- 101.- Kingsley AR, van Amsterdam K, Kramer N, Baumler A. The *shdA* gene is restricted to serotypes of *Salmonella enterica* subspecies I and contributes to efficient and prolonged fecal shedding. *Infect Immun* 2000, 68:2720-2727.

102.- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D. Type V Protein Secretion Pathway: The autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004, 68:692-744.

103.- Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* 2001, 69:1231-1243.

104.- Commander NJ, Spencer SA, Wren BW, MacMillan AP. The identification of two protective DNA vaccines from a panel of five plasmid constructs encoding *Brucella melitensis* 16M genes. *Vaccine* 2007, 25:43-54.