

CEPA VACUNAL DE *BRUCELLA* MODIFICADA PARA EL TRATAMIENTO DE BRUCELOSIS

Campo técnico

La presente invención puede incluirse en el campo de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento y/o la prevención de brucelosis. Específicamente, la presente solicitud se refiere a una nueva cepa vacunal del género *Brucella*. La cepa puede usarse como medicamento, específicamente para el tratamiento y/o la prevención de brucelosis.

Antecedentes de la técnica

La brucelosis es una zoonosis. En animales, la infección por *Brucella* provoca abortos, infertilidad, producción disminuida y limitaciones para la comercialización de animales y productos de origen animal. Además, las bacterias se transmiten de los animales infectados a los humanos, infligiendo de ese modo una enfermedad debilitante y a menudo incapacitante, frente a la cual no existe vacuna y cuyo tratamiento requiere altas dosis de antibióticos durante periodos prolongados con recaídas frecuentes.

Por tanto, la brucelosis es un problema de salud pública significativo. Se ha demostrado que la prevalencia de brucelosis humana está directamente relacionada con la prevalencia de brucelosis animal. Por tanto, y en ausencia de vacunas para su uso en humanos, la prevención de la enfermedad requiere el control de la infección en animales. En la mayoría de los contextos socioeconómicos, el único modo fiable para controlar la brucelosis es a través de programas basados en la vacunación de animales de granja, o bien a través de programas de vacunación en masa o bien a través de programas para la vacunación, el diagnóstico y el sacrificio de animales infectados.

Las vacunas de referencia frente a la brucelosis animal son las cepas lisas (S, *smooth*) de *Brucella abortus* S19 para ganado bovino y de *Brucella melitensis* Rev1 para ovejas y cabras (OIE Terrestrial Manual, 2016 - capítulos 2.4.3. y 2.7.2). Ambas son vacunas atenuadas con microbios vivos, libres de adyuvantes, con un bajo coste de producción y adquisición y altamente eficaces frente a la infección con cepas de campo en rumiantes (principal fuente de infección para humanos). Sin embargo, un inconveniente técnico es que generan una respuesta inmunitaria después de la vacunación indistinguible de la inducida después de la infección virulenta por cepas de campo, generando un problema para la diferenciación entre animales infectados y vacunados (DIVA, *Differentiating between Infected and Vaccinated Animals*). Para resolver este problema, se han realizado numerosos esfuerzos científicos. Una estrategia ha consistido en el desarrollo de cepas rugosas (R, *rough*) de *Brucella* que, debido a la ausencia del O-polisacárido (O-PS) de lipopolisacárido (LPS), un factor de virulencia conocido de *Brucella* y el principal antígeno usado en pruebas para el diagnóstico serológico de infección, ha conducido a cepas atenuadas que pueden usarse como vacunas con microbios vivos, que no interfieren significativamente en las pruebas de diagnóstico serológico. En este contexto, en la década de los 90, se desarrolló el mutante espontáneo con un fenotipo R conocido como *B. abortus* RB51 mediante subcultivo (Schurig *et al.*, 1991. *Veterinary Microbiology*, 28: 171-188). La cepa RB51 se ha usado en algunos países frente a la brucelosis bovina, con resultados objeto de controversia. Tanto RB51 como una colección de mutantes R derivados de *B. melitensis* genéticamente bien caracterizados en las diferentes rutas de síntesis de LPS (Godfroid *et al.*, 2000. *Res Microbiol*, 151: 655-668; González *et al.*, 2008. *PLoS One*, 3(7): e2760) reducen los problemas de interferencias en el diagnóstico serológico de infección virulenta, debido a la ausencia de antígeno de O-PS. Sin embargo, se ha demostrado que las vacunas R no son ideales, ya que la protección que confieren frente a infecciones virulentas está bien por debajo de las vacunas de *B. abortus* S19 y *B. melitensis* Rev1 de referencia (González *et al.*, 2008. *PLoS One*, 3(7): e2760; Barrio *et al.*, 2009. *Vaccine*, 27: 1741-1749).

Por otro lado, se ha propuesto el marcaje bacteriano con la proteína xenogénica proteína fluorescente verde (GFP) para resolver el problema de DIVA (Chacón-Díaz *et al.*, 2011. *Vaccine*, 29(3): 577-82).

Además, las vacunas actuales también presentan otros problemas tales como que inducen abortos y están presentes en la leche de animales adultos previamente vacunados (OIE Terrestrial Manual, 2016 - capítulos 2.4.3. y 2.7.2) para generar infecciones humanas y, en el caso de *B. melitensis* Rev1, que son resistentes al tratamiento con estreptomicina (antibiótico de elección). Por tanto, actualmente existe la necesidad de una vacuna y/o un agente terapéutico frente a la brucelosis eficaz que no presente todos los inconvenientes mencionados anteriormente.

Un objeto de la presente invención es proporcionar una cepa de *Brucella* superior para el tratamiento y/o la prevención de brucelosis.

Figuras

Figura 1: Diagrama que muestra la estrategia para el método de delección mediante recombinación doble en marco usada para obtener las cepas de *Brucella*Δwzm y hermanas (no mutada).

Figura 2: Evaluación genética de mutantes de *Brucella*Δwzm y cepas complementadas con los plásmidos pSRK-wzm o pBBR-wzm. La presencia (319 pb) o ausencia (sin amplificación) del gen wzm completo se evaluó mediante PCR con F9 y R5 (tabla 1). MW: marcador de peso molecular; 1: Rev1 hermana; 2: Rev1Δwzm; 3: Rev1Δwzm-

pSRK-*wzm*; Pc1: plásmido para la complementación con pSRK-*wzm*; Pm: plásmido para la mutación de pJQKm- Δ *wzm*; C-: control negativo de PCR; 4: 16M hermana; 5: 16M Δ *wzm*; 6: 16M Δ *wzm*-pBBR-*wzm*; Pc2: pBBR-*wzm*; 7: 2308 hermana; 8: 2308 Δ *wzm*; 9: 2308 Δ *wzm*-pBBR-*wzm*; 10: S19 hermana; 11: S19 Δ *wzm*; 12: S19 Δ *wzm*-pBBR-*wzm*.

Figura 3: Los mutantes de *Brucella* Δ *wzm* (paneles superiores) mostraron un fenotipo rugoso mediante tinción con cristal violeta-oxalato, a diferencia de las cepas hermanas (paneles inferiores).

Figura 4: Los mutantes de *Brucella* Δ *wzm* tienen R-LPS con un núcleo intacto y sintetizan O-PS libre que se acumula en el interior de las bacterias. La complementación de estas cepas de *B. melitensis* y *B. abortus* Δ *wzm* con los plásmidos pSRK-*wzm* o pBBR-*wzm* restituye el fenotipo S-LPS. Imágenes representativas de (A) tinción con plata de LPS de Rev1 Δ *wzm*, 16M Δ *wzm*, 2308 Δ *wzm* y S19 Δ *wzm*. (B) Inmunotransferencia de tipo Western con sueros que reconocen los epítomos de O-PS M en Rev1 Δ *wzm*, C en 16M Δ *wzm* o A tanto en 2308 Δ *wzm* como en S19 Δ *wzm*; 1: Rev1 hermana; 2: Rev1 Δ *wzm*; 3: Rev1 Δ *wzm*-pSRK-*wzm*; 4: 16M hermana; 5: 16M Δ *wzm*; 6: 2308 hermana; 7: 2308 Δ *wzm*; 8: 2308 Δ *wzm*-pBBR-*wzm*; 9: S19 hermana; 10: S19 Δ *wzm*; 11: S19 Δ *wzm*-pBBR-*wzm*. (C) Microscopía de inmunofluorescencia y epifluorescencia de 16M Δ *wzm*::*gfp*-pBBR-*wzm*, 16M Δ *wzm*::*gfp* y 16M hermana, usando un epítipo de O-PS anti-C de MoAc primario y un anticuerpo secundario marcado con rojo Texas.

Figura 5: Rev1 Δ *wzm* es más susceptible al tratamiento con estreptomicina que Rev1. Las bacterias con crecimiento exponencial se ajustaron a $\approx 2 \times 10^3$ UFC/ml en PBS estéril y se sembraron en placa 100 μ l por triplicado en BAB y BAB complementado con 2,5 μ g/ml de estreptomicina (BAB-Str_{2.5}). La cepa Rev1 (Rev1) hermana se usó como control. Después de 5 días de incubación a 37°C, se calculó el número de UFC/ml. Los puntos de datos representan la media $\pm$ desviación estándar (n=3). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Las comparaciones estadísticas de las medias se realizaron mediante las pruebas de ANOVA y PLSD.

Figura 6: 16M Δ *wzm* es más susceptible a la desecación que 16M, pero no que Rev1 Δ *wzm* con respecto a Rev1. Se dejaron secar las suspensiones que contenían $\approx 10^9$ UFC/ml de 16M Δ *wzm*, 16M, Rev1 Δ *wzm* o Rev1 en placas de poliestireno de 12 pocillos y luego se mantuvieron a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. El número de células viables se cuantificó después de la rehidratación del sedimento secado en PBS y el porcentaje de bacterias supervivientes se determinó seis días después. Los puntos de datos representan la media $\pm$ desviación estándar (n=3). Las comparaciones estadísticas de las medias se realizaron mediante las pruebas de ANOVA y PLSD.

Figura 7: Rev1 Δ *wzm* es más susceptible a polimixina B que 16M Δ *wzm*, y las cepas parentales y hermanas de Rev1 y 16M, como modelo de susceptibilidad para los péptidos catiónicos del sistema inmunitario innato. Se incubaron cultivos con $2-3 \times 10^3$ UFC/ml en PBS (1 h, 37°C) con diferentes concentraciones de polimixina B preparada en PSA y luego se cuantificó el número de células viables mediante siembra en placa en BAB e incubación de las placas (5 días, 37°C). Los puntos de datos representan la media $\pm$ desviación estándar (n=3) de UFC/ml a cada concentración de polimixina B. Las comparaciones estadísticas de las medias se realizaron mediante las pruebas de ANOVA y PLSD: *p < 0,0001.

Figura 8: Rev1 Δ *wzm* y 16M Δ *wzm* son más susceptibles que las cepas parentales de Rev1 y 16M para sueros convencionales de ovejas y ganado bovino, principalmente debido al efecto del complemento sérico. Se mezclaron cultivos bacterianos que contenían $\approx 10^4$ UFC/ml en PBS con sueros normales o descomplementados (inactivados por calor a 56°C, 1 h) de ovejas (A) o vacas (B). Después de la incubación (18 h, 37°C), se sembró en placa cada suspensión en BAB y se incubaron las placas (5 días, 37°C) para determinar el número de UFC/ml y el porcentaje de supervivencia bacteriana. Se usó un mutante de *B. melitensis* con núcleo mínimo (C+) como control de susceptibilidad para suero normal. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar (n=3) de porcentaje de supervivencia. Las comparaciones estadísticas de las medias se realizaron mediante las pruebas de ANOVA y PLSD.

Figura 9: Rev1 Δ *wzm* está más atenuada en ratones BALB/c que otros mutantes de *Brucella* Δ *wzm* e indujo un pico de esplenomegalia transitoria, habitualmente asociada con una potencia inmunogénica eficaz. Los paneles representan la carga bacteriana en bazo y los pesos del bazo en ratones BALB/c inoculados por vía intraperitoneal con (A-B) Rev1 Δ *wzm* y Rev1 Δ *wzm*::*gfp* frente a la cepa parental de Rev1; (C-D) 16M Δ *wzm* y 16M Δ *wzm*::*gfp* frente a la cepa parental de 16M; (E-F) 2308 Δ *wzm* frente a la cepa parental de 2308; y (G-H) S19 Δ *wzm* frente a la cepa de S19. Los mutantes de Δ *wzm* se inyectaron a dosis de 10^8 UFC/ratón y las cepas de S-LPS a 10^6 UFC/ratón. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar (n=5) del logaritmo de UFC/bazo o peso en gramos/bazo en cada punto de tiempo seleccionado. Se obtuvieron resultados similares con las correspondientes cepas de *Brucella*::Tn7 marcadas con *gfp*, lo que indica que el marcaje con *gfp* no afecta a las propiedades biológicas de *Brucella*.

Figura 10: Rev1 Δ *wzm* y 16M Δ *wzm* (panel derecho) no inducen lesiones macroscópicas placentarias, a diferencia de las cepas parentales o hermanas de Rev1 o 16M (panel izquierdo). Las flechas indican lesiones macroscópicas en

las placentas individuales, a diferencia de placentas sanas en Rev1Δwzm o 16MΔwzm.

Figura 11: Respuesta serológica frente a LPS de *Brucella* en ovejas vacunadas con Rev1Δwzm::gfp o 16MΔwzm::gfp. Se vacunaron por vía subcutánea corderos de 3-4 meses de edad con $1-2 \times 10^{10}$ UFC de Rev1Δwzm::gfp (n=14) o 16MΔwzm::gfp (n=8). Se usaron grupos de corderos no vacunados (n=13) o vacunados con $1-2 \times 10^9$ UFC de Rev1::gfp (n=12) como controles. Se evaluó la inocuidad durante el primer mes después de la vacunación mediante inspección clínica (temperatura corporal por vía rectal y palpación del sitio de inoculación) y palpación testicular. Se tomaron periódicamente muestras de suero para el análisis serológico mediante (A) rosa de Bengala convencional (sRBT); (B) fijación del complemento (CFT); (C) prueba de difusión en gel frente a antígeno de R-LPS (GDT-R/LPS) y (D) pruebas de ELISA anti-GFP (sólo para corderos vacunados con 16MΔwzm::gfp).

Figura 12: Experimento de destrucción bacteriana. Se incubaron sueros inmunitarios tratados con calor (denominados tratados con suero en la figura) y sin tratar de corderos vacunados con Rev1Δwzm durante 18 h a 37°C, y el 10% de CO₂ con infecciones virulentas por *B. melitensis* H38 y *B. abortus* 2308. Los resultados se expresaron como el porcentaje normalizado de recuentos de bacterias con respecto al recuento inicial en el inóculo. Los sueros inmunitarios de corderos tratados con Rev1Δwzm fueron capaces de destruir o bien *B. melitensis* H38, *B. abortus* 2308 o bien *B. ovis* PA.

Sumario de la invención

La presente solicitud proporciona una cepa de *Brucella* modificada, su uso como medicamento y su uso como medicamento para el tratamiento y/o la prevención de brucelosis. La cepa de *Brucella* se ha modificado a través de una inactivación del gen wzm. Además, la presente solicitud proporciona una composición farmacéutica que comprende la cepa de *Brucella* modificada, su uso como medicamento y su uso como medicamento para el tratamiento y/o la prevención de brucelosis. La presente solicitud también proporciona un kit que comprende la cepa de *Brucella* modificada y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable, y su uso para el tratamiento y/o la prevención de brucelosis.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Los términos “tratamiento” y “terapia”, tal como se usan en la presente solicitud, se refieren a un conjunto de medios higiénicos, farmacológicos, quirúrgicos y/o físicos usados con la intención de curar y/o paliar una enfermedad y/o los síntomas con el objetivo de remediar el problema de salud. Los términos “tratamiento” y “terapia” incluyen métodos preventivos y curativos, ya que ambos se dirigen al mantenimiento y/o restablecimiento de la salud de un individuo o animal. Independientemente del origen de los síntomas, la enfermedad y la discapacidad, la administración de un medicamento adecuado para paliar y/o curar un problema de salud debe interpretarse como una forma de tratamiento o terapia dentro del contexto de esta solicitud.

El término “prevención”, tal como se usa en la presente solicitud, se refiere a un conjunto de medios higiénicos, farmacológicos, quirúrgicos y/o físicos usados para prevenir la aparición y/o el desarrollo de una enfermedad y/o los síntomas. El término “prevención” abarca métodos profilácticos, ya que estos se usan para mantener la salud de un animal o individuo.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de materia que tiene un efecto terapéutico y que es capaz de tratar y/o prevenir la brucelosis.

El término “brucelosis” se refiere a una enfermedad infecciosa provocada por bacterias del género *Brucella*. La brucelosis puede producirse en individuos o animales.

Los términos “individuo”, “paciente” o “sujeto” se usan de manera intercambiable en la presente solicitud y no pretenden ser limitativos en modo alguno. El “individuo”, “paciente” o “sujeto” puede ser de cualquier edad, sexo y estado físico. El término “animal”, tal como se usa en la presente solicitud, se refiere a cualquier heterótrofo eucariota multicelular que no es un humano.

El término “vacuna”, tal como se usa en la presente solicitud, se refiere tanto a “vacunas terapéuticas”, que están destinadas para tratar una enfermedad y/o infección existente mediante el fortalecimiento de la respuesta inmunitaria natural del cuerpo, como a “vacunas profilácticas”, que están destinadas para prevenir que se desarrolle una enfermedad y/o infección en un individuo o animal sano.

El término “modificada” se refiere a cualquier materia que se ha alterado a partir de su forma original. En la presente solicitud, el término “modificada” se refiere a cualquier alteración que se basa en intervención humana.

Tal como se usa en el presente documento, “portador farmacéuticamente aceptable” o “diluyente farmacéuticamente

acceptable” significa cualquiera y todos de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y, sin limitar el alcance de la presente invención, incluyen: agentes de tamponamiento adicionales; conservantes; codisolventes; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables, tales como poliésteres; contraiones formadores de sales, tales como sodio, alcoholes de azúcares polihidroxilados; aminoácidos, tales como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico y treonina; azúcares o alcoholes de azúcares orgánicos, tales como lactitol, estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioininitosa, mioininitol, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitols (por ejemplo, inositol), polietilenglicol; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, [alfa]-monotioglicerol y tiosulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular, tales como albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina, gelatina u otras inmunoglobulinas; y polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona. En una realización preferida, el portador o diluyente farmacéuticamente aceptable es solución salina tamponada con fosfato (PBS). Preferiblemente, el pH de la PBS es 6,85.

El término “*adyuvante farmacéuticamente aceptable*” se refiere a cualquiera y todas de las sustancias que mejoran la respuesta inmunitaria del cuerpo a un antígeno. Los ejemplos no limitativos de adyuvantes farmacéuticamente aceptables son: alumbre, adyuvante incompleto de Freund, MF59, análogos sintéticos de ARNbc tales como poli(I:C), LPS bacterianos, flagelina bacteriana, imidazolquinolinas, oligodesoxinucleótidos que contienen motivos CpG específicos, fragmentos de paredes de células bacterianas tales como muramil dipéptido y Quil-A®.

Cepa de *B. melitensis* Rev1 modificada

En un primer aspecto, la presente solicitud proporciona una cepa de *Brucella melitensis* Rev1 modificada, en la que el gen *wzm* se ha inactivado.

Brucella melitensis Rev1 es una cepa que se atenuó espontáneamente y se obtuvo a partir de la cepa virulenta *B. melitensis* 6056, a través de sucesivas mutaciones espontáneas asociadas con dependencia de estreptomycin (Str) y la posterior neutralización de esa dependencia (Herzberg y Elberg 1953. Journal of Bacteriology 66: 585-599; Herzberg y Elberg 1953. Journal of Bacteriology 66: 600-605). La cepa Rev1 se ha usado a nivel mundial desde la década de los 50 como la única vacuna eficaz para prevenir la brucelosis en pequeños rumiantes, y se considera a nivel internacional la vacuna convencional para controlar la brucelosis ovina y caprina (OIE Terrestrial Manual, 2016 - capítulos 2.4.3. y 2.7.2). Las series de semillas originales de Rev1 están disponibles en el Laboratorio de Referencia de Brucelosis de la OIE de AFSSA (94706 Maisons-Alfort, Francia) o en la Farmacopea Europea (PB 907, 67029 Strasbourg Cedex 1, Francia). Además, la cepa Rev1 está disponible comercialmente y puede adquirirse de diversos proveedores. Por ejemplo, la cepa puede adquirirse de CZV Veterinaria en España con el nombre “CZV Rev1”.

El gen *wzm* codifica para parte del sistema de transportador ABC bicomponente requerido para exportar el O-PS al periplasma, en el que el O-PS se ensambla entonces sobre un resto central para generar un S-LPS. El gen *wzm* puede tener la siguiente secuencia (SEQ ID NO: 1):

```
ATGATATCGTATATGGCTAATGTCTGGAAGGTACGCCACTTCTGGTGGCACCTTTCAATGTCTGATTACGTGGG
CGCTTCAGGCGGTCTCCTTGGGAATATTATGGGCAGTTATACAGCCACTAGCGCTCACGCTGCTACTGTCTTT
CGTGTCTTCTAAATTGTTGAATCAAAGTATATCTGCATATGCCCCCTATATTCTATCTGGGATTATTATCTGGGAAT
ACATATCATTTACAGTGGTTGGTGGCTCAACAGCGCTTGTGCAAGCCGATGCATATATAAAGCAAACCAGAAATC
CTCTTGCAATTTACACGCTTAGGAACACTGTTTCTGGCTTGGTTCGTATTATCCGTAGCAAGTATCTCCCTATTTCGG
GTGGGTACTTATCATGTTTCTGAAACTTCTCGCTTTCATGGTTAGCAATACCAACTTTGCTACCCATCCTTGCT
TTGATAGTTTGGCCGCTTGCCACAATCGTCGGCTACATCGGCGCAAGATTTGAGATCTGCCGAATGCTCTGGC
GCTCGTGTACAGGCAGCTTGGTTTGTTCGCCGGTCTATTTAAAGAATCGATGTTTCAGGCAGGGTGGATTGAA
TGCATTGCTTGATTATAACCCTATTTACCACGTGATGCAGATTCTAAGAGCCCCTGTCCTTTATGGGGAATGGCC
TACGGCTACCAATTACATTTGGTGCTTAGGTGTGAGCCTCCTCCTAACCTGCGTGGCAGTAGCTGTGGGGATGC
GTGCGGAGAAGAGAGCCATTTTTTACCTATGA
```

El gen *wzm* puede inactivarse a través de cualquier forma de modificación genética conocida en la técnica. La inactivación puede implicar la delección parcial o completa del gen del genoma huésped. La inactivación puede implicar una sola mutación sin sentido que da lugar a la proteína expresada no funcional. La inactivación puede implicar la mutación y/o delección del promotor, el sitio de unión al ribosoma u otros reguladores de la transcripción que están implicados en la transcripción del gen *wzm*. La inactivación puede implicar la inserción de una secuencia que provoca un desplazamiento del marco de lectura y/o hace que la proteína incipiente resultante sea no funcional. Puede realizarse cualquiera de las delecciones, inserciones o mutaciones mencionadas anteriormente usando intercambio alélico (Hmelo *et al.*, 2015. Nature Protocols, 10(11): 1820-41) o usando el sistema CRISPR/Cas9 (Wang *et al.*, 2016. ACS Synthetic Biology, 5(7): 721-32). En una realización preferida, el gen *wzt* no está inactivado.

En una realización preferida, la inactivación del gen *wzm* es debida a una delección parcial del gen. Preferiblemente, la delección parcial implica la delección de al menos el 50, el 60 o el 70% de SEQ ID NO: 1. Más preferiblemente, la delección parcial implica la delección de al menos el 80% de SEQ ID NO: 1. En una realización preferida, la inactivación del gen *wzm* no se logra mediante la inserción de un transposón en la secuencia codificante del gen.

En la sección de ejemplos de la presente invención, los nucleótidos 80-721 de SEQ ID NO: 1 se han delecionado en *B. melitensis* Rev1 y 16M usando el plásmido de intercambio alélico pJQKm Δ *wzm*, que genera los mutantes Δ *wzm* correspondientes (figura 1). Por tanto, en una realización preferida, la inactivación del gen *wzm* se logra a través de la delección de los nucleótidos 80-721 de SEQ ID NO: 1.

En una realización preferida, la cepa de *B. melitensis* Rev1 modificada se ha modificado adicionalmente para inactivar *znuA*, *norD*, *bip*, *tcpB*, *cgs*, *ricA*, *bvrR*, *bvrS*, uno o más de los genes que codifican para el sistema de secreción virB de tipo IV seleccionado del grupo que consiste en los ORF de *B. melitensis* 16M: BMEII0025, BMEII0026, BMEII0027, BMEII0028, BMEII0029, BMEII0030, BMEII0031, BMEII0032, BMEII0033, BMEII0034 y BMEII0035, y/o uno o más de los genes implicados en la formación, la modificación y/o el ensamblaje de LPS y/o en rutas metabólicas, incluyendo, pero sin limitarse a, *ppdK*, *wbdR*, *gmd*, *manA*, *manB*, *manC*, *per*, *pgm*, *wbkA*, *wbkB*, *wbkC*, *wbkD*, *wbkF*, *wadC* y *wzt* (regiones cromosómicas *wbk*, *wbo* y *wad*).

En una realización preferida, la cepa de *B. melitensis* Rev1 modificada se ha modificado adicionalmente de modo que se ha eliminado la actividad autóloga de N-formiltransferasa y se expresa funcionalmente un gen heterólogo que codifica para una N-aciltransferasa distinta de una enzima N-formiltransferasa. Por ejemplo, puede inactivarse la *wbkC* y puede introducirse y expresarse la *wbdR* heteróloga en la cepa (véase el documento WO 2017/108515 A1).

En una realización preferida, la cepa *B. melitensis* Rev1 modificada se ha modificado adicionalmente para expresar una proteína fluorescente, preferiblemente GFP. La expresión de la proteína fluorescente en la cepa modificada puede usarse para distinguir adicionalmente individuos o animales inoculados con Rev1 de individuos o animales infectados (Chacón-Díaz *et al.*, 2011. Vaccine. 29(3): 577-82; documento EP 2 508 201 A1). En resumen, este enfoque puede describirse de la siguiente manera: cuando se vacuna un individuo o animal con la cepa modificada adicionalmente, los anticuerpos se alzarán frente a la cepa modificada así como a la proteína fluorescente. Los anticuerpos alzados frente a la proteína fluorescente pueden usarse en una prueba serológica para someter a prueba si el individuo o animal se ha infectado con una cepa de *Brucella* que se produce de manera natural o con la cepa modificada adicionalmente de la presente invención. Por tanto, un kit que comprende la cepa de *B. melitensis* Rev1 modificada que se ha modificado adicionalmente para expresar una proteína fluorescente puede comprender además anticuerpos que se unen a la proteína fluorescente y/o la proteína fluorescente. Preferiblemente, la proteína fluorescente es GFP.

En una realización preferida, la cepa se ha liofilizado. La liofilización puede usarse para aumentar la estabilidad y la vida útil de almacenamiento de la cepa.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la cepa modificada según cualquiera de las realizaciones divulgadas previamente y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende la cepa de *B. melitensis* Rev1 modificada que se ha modificado adicionalmente para expresar una proteína fluorescente.

Una composición farmacéutica, tal como se describe en el presente documento, también puede contener otras sustancias. Estas sustancias incluyen, pero no se limitan a, crioprotectores, lioprotectores, tensioactivos, agentes de carga, antioxidantes y agentes estabilizantes. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede estar liofilizada.

El término “*crioprotector*”, tal como se usa en el presente documento, incluye agentes que proporcionan estabilidad a la cepa frente a los estreses inducidos por congelación, excluyéndose preferentemente de la superficie de la cepa. Los crioprotectores también pueden ofrecer protección durante el secado primario y secundario y el almacenamiento del producto a largo plazo. Los ejemplos no limitativos de crioprotectores incluyen azúcares, tales como sacarosa, glucosa, trehalosa, manitol, manosa y lactosa; polímeros, tales como dextrano, hidroxietil-almidón y polietilenglicol; tensioactivos, tales como polisorbatos (por ejemplo, PS-20 o PS-80); y aminoácidos, tales como glicina, arginina, leucina y serina. Se usa generalmente un crioprotector que presenta una baja toxicidad en sistemas biológicos.

En una realización, se añade un lioprotector a una composición farmacéutica descrita en el presente documento. El término “*lioprotector*”, tal como se usa en el presente documento, incluye agentes que proporcionan estabilidad a la cepa durante el procedimiento de secado por congelación o deshidratación (ciclos de secado por congelación primario y secundario), proporcionando una matriz vítrea amorfa y uniéndose con la superficie de la cepa a través de unión por hidrógeno, reemplazando las moléculas de agua que se eliminan durante el procedimiento de secado. Esto ayuda a minimizar la degradación del producto durante el ciclo de liofilización y mejorar la estabilidad del producto a largo plazo. Los ejemplos no limitativos de lioprotectores incluyen azúcares, tales como sacarosa o

trehalosa; un aminoácido, tal como glutamato de monosodio, histidina o glicina no cristalina; una metilamina, tal como betaína; una sal liotrópica, tal como sulfato de magnesio; un poliol, tal como alcoholes de azúcares trihidroxilados o superiores, por ejemplo, glicerina, eritritol, glicerol, arabitól, xilitol, sorbitol y manitol; propilenglicol; polietilenglicol; Pluronic; y combinaciones de los mismos. La cantidad de lioprotector añadida a una composición farmacéutica es generalmente una cantidad que no conduce a una cantidad inaceptable de degradación de la cepa cuando se liofiliza la composición farmacéutica.

En algunas realizaciones, se incluye un agente de carga en la composición farmacéutica. El término “*agente de carga*”, tal como se usa en el presente documento, incluye agentes que proporcionan la estructura del producto secado por congelación sin interactuar directamente con el producto farmacéutico. Además de proporcionar un polvo para suspensión farmacéuticamente elegante, los agentes de carga también pueden otorgar cualidades útiles en cuanto a modificar la temperatura de disgregación, proporcionar protección frente a la congelación-descongelación y mejorar la estabilidad de la cepa durante el almacenamiento a largo plazo. Los ejemplos no limitativos de agentes de carga incluyen manitol, glicina, lactosa y sacarosa. Los agentes de carga pueden ser cristalinos (tales como glicina, manitol o cloruro de sodio) o amorfos (tales como dextrano, hidroxietil-almidón), y se usan generalmente en formulaciones en una cantidad de desde el 0,5% hasta el 10%.

También pueden incluirse otros portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, tales como aquellos descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980) en una composición farmacéutica descrita en el presente documento, siempre que no afecten negativamente a las características deseadas de la composición farmacéutica. Tal como se usa en el presente documento, “*portador farmacéuticamente aceptable*” significa cualquiera y todos de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen: agentes de tamponamiento adicionales; conservantes; codisolventes; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables, tales como poliésteres; contraiones formadores de sales, tales como sodio, alcoholes de azúcares polihidroxilados; aminoácidos, tales como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico y treonina; azúcares o alcoholes de azúcares orgánicos, tales como lactitol, estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioinositosa, mioinisol, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitols (por ejemplo, inositol), polietilenglicol; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, [alfa]-monotioglicerol y tiosulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular, tales como albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina, gelatina u otras inmunoglobulinas; y polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona..

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende además un adyuvante. Preferiblemente, el adyuvante se selecciona de la lista que consiste en hidróxido de alumbre, adyuvante incompleto de Freund, MF59®, análogos sintéticos de ARNbc tales como poli(I:C), LPS bacterianos, flagelina bacteriana, imidazolquinolinas, oligodesoxinucleótidos que contienen motivos CpG específicos, fragmentos de paredes de células bacterianas tales como muramíl dipéptido y Quil-A®.

La composición farmacéutica puede prepararse para administración oral, sublingual, bucal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, conjuntival, rectal, transdérmica, tópica y/o mediada por inhalación. En una realización preferida, la composición farmacéutica puede ser una disolución que es adecuada para administración intravenosa, intramuscular, conjuntival, transdérmica, intraperitoneal y/o subcutánea. En otra realización, la composición farmacéutica puede ser una disolución que es adecuada para las vías de administración sublingual, bucal y/o mediada por inhalación. En una realización alternativa, la composición farmacéutica puede ser un aerosol que es adecuado para administración mediada por inhalación. En una realización preferida, la composición farmacéutica puede prepararse para administración subcutánea y/o intraperitoneal.

La composición farmacéutica puede comprender además excipientes y portadores comunes que se conocen en el estado de la técnica. Para composiciones farmacéuticas sólidas, pueden usarse portadores sólidos no tóxicos convencionales que incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares. Para una disolución para inyección, la composición farmacéutica puede comprender además crioprotectores, lioprotectores, tensioactivos, agentes de carga, antioxidantes, agentes estabilizantes y portadores farmacéuticamente aceptables. Para administración mediante aerosol, las composiciones farmacéuticas se suministran generalmente en una forma finamente dividida junto con un tensioactivo y un propelente. El tensioactivo debe ser, por supuesto, no tóxico, y es generalmente soluble en el propelente. Representativos de tales agentes son los ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen desde 6 hasta 22 átomos de carbono, tales como los ácidos caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linolénico, olestérico y oleico con un alcohol alifático polihidroxilado o su anhidrido cíclico. Pueden emplearse ésteres mixtos, tales como glicéridos mixtos o naturales. También puede incluirse un portador, según se desee, como por ejemplo, lecitina, para administración intranasal. Para supositorios, los aglutinantes y portadores tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialcalenglicoles o triglicéridos.

En una realización preferida, la composición farmacéutica es una vacuna capaz de inducir una respuesta inmunitaria. El diseño de composiciones farmacéuticas para vacunas está bien establecido y se describe, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, edición más reciente, Mack Publishing Co., Easton, PA, y en el libro de Plotkin y Orenstein titulado Vaccines, 4ª ed., Saunders, Filadelfia, PA (2004).

Usos médicos de la cepa Rev1 modificada

En un tercer aspecto, la cepa o composición farmacéutica de la presente invención puede usarse como medicamento. En un cuarto aspecto, la cepa modificada o composición farmacéutica de la presente invención puede usarse para tratar y/o prevenir la brucelosis.

En una realización preferida, el agente infeccioso que provoca la brucelosis se selecciona del grupo que consiste en *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. microti*, *B. ceti* y *B. pinnipedialis*. Preferiblemente, el agente infeccioso que provoca la brucelosis se selecciona del grupo que consiste en *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. ovis*.

En una realización preferida, la cepa o composición farmacéutica se usa para tratar y/o prevenir la brucelosis en humanos, ganado bovino, cabras, ovejas, cerdos y/o perros. Preferiblemente, la cepa o composición farmacéutica se usa para tratar y/o prevenir la brucelosis en cabras y/u ovejas.

En una realización preferida, el individuo o animal se inocula con al menos 10^4 UFC (unidades formadoras de colonias) de la cepa. Preferiblemente, el individuo o animal se inocula con al menos 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} ó 10^{12} UFC de la cepa. Más preferiblemente, el individuo o animal se inocula con al menos 10^9 UFC de la cepa. En una realización alternativa, el individuo o animal se inocula con de 10^4 a 10^{12} UFC de la cepa.

En una realización preferida, la cepa o composición farmacéutica se administra por vía subcutánea, intradérmica, intravenosa, intraperitoneal, mucosa y/o conjuntival. Preferiblemente, la cepa o composición farmacéutica se administra por vía subcutánea. En una realización alternativa, la composición farmacéutica se administra mediante administración conjuntival.

En una realización preferida, la cepa o composición farmacéutica se usa para prevenir la brucelosis. En esta realización, la cepa o el agente farmacéutico se administra como vacuna profiláctica. Preferiblemente, la cepa o composición farmacéutica se administra a un individuo o animal que está en riesgo de infectarse con bacterias del género *Brucella*.

En una realización, la cepa modificada o composición farmacéutica se usa para tratar la brucelosis. En una realización preferida, el tratamiento de brucelosis también implica la administración de un fármaco. También se contemplan realizaciones en las que el fármaco se administra al mismo tiempo o en momentos diferentes que la cepa modificada o composición farmacéutica. El fármaco puede seleccionarse del grupo que consiste en corticosteroides, penicilinas, cefalosporinas, macrólidos, cloramfenicol, tetraciclinas, aminoglicósidos, trimetoprim, rifampina, quinolonas y sulfametoxazol.

Kit que comprende la cepa Rev1 modificada

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende (i) una cepa de *B. melitensis* Rev1 modificada, en la que el gen *wzm* se ha inactivado, y (ii) un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La cepa modificada puede ser según cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente descritas en esta solicitud. Además, el portador o diluyente farmacéuticamente aceptable puede ser cualquiera de los portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables mencionados anteriormente descritos en esta solicitud. En una realización preferida, el kit comprende instrucciones de cómo combinar la cepa con el portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida, la cepa modificada es un liofilizado. El liofilizado puede estar contenido en un recipiente independiente del portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Además, el kit puede comprender instrucciones de cómo combinar la cepa liofilizada con el portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida, el kit puede comprender además un adyuvante. Preferiblemente, el adyuvante se selecciona de la lista que consiste en alumbre, adyuvante incompleto de Freund, MF59, análogos sintéticos de ARNbc tales como poli(I:C), LPS bacterianos, flagelina bacteriana, imidazolquinolinas, oligodesoxinucleótidos que contienen motivos CpG específicos, fragmentos de paredes de células bacterianas tales como muramil dipéptido y Quil-A®.

En una realización preferida, las instrucciones incluidas con el kit también pueden describir la administración de la cepa a un individuo o animal. La descripción de la administración puede incluir la dosificación que va a usarse, la frecuencia de administración y/o la vía de administración que va a usarse.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona el uso de cualquiera de los kits descritos para el tratamiento y/o la prevención de brucelosis. El uso del kit puede estar en línea con cualquiera de los usos médicos y métodos de administración descritos en esta solicitud.

Cepa de *B. melitensis* 16M modificada

En un séptimo aspecto, la presente solicitud proporciona una cepa de *B. melitensis* 16M modificada, en la que el gen *wzm* se ha inactivado.

“*B. melitensis* 16M” está bien caracterizada y disponible libremente en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC 23456).

El gen *wzm* puede inactivarse a través de cualquier forma de modificación genética conocida en la técnica. La inactivación puede implicar la delección parcial o completa del gen del genoma huésped. La inactivación puede implicar una sola mutación sin sentido que da lugar a la proteína expresada no funcional. La inactivación puede implicar la mutación y/o delección del promotor, el sitio de unión al ribosoma u otros reguladores de la transcripción que están implicados en la transcripción del gen *wzm*. La inactivación puede implicar la inserción de una secuencia que provoca un desplazamiento del marco de lectura y/o hace que la proteína incipiente resultante sea no funcional. Puede realizarse cualquiera de las delecciones, inserciones o mutaciones mencionadas anteriormente usando intercambio alélico (Hmelo *et al.*, 2015. Nature Protocols, 10(11): 1820-41) o usando el sistema CRISPR/Cas9 (Wang *et al.*, 2016. ACS Synthetic Biology, 5(7): 721-32). En una realización preferida, el gen *wzt* no está inactivado.

En una realización preferida, la inactivación del gen *wzm* es debida a una delección parcial del gen. Preferiblemente, la delección parcial implica la delección de al menos el 50, el 60 o el 70% de SEQ ID NO: 1. Más preferiblemente, la delección parcial implica la delección de al menos el 80% de SEQ ID NO: 1. En una realización preferida, la inactivación del gen *wzm* no se logra mediante la inserción de un transposón en la secuencia codificante del gen.

En una realización preferida, la inactivación del gen *wzm* se logra a través de la delección de los nucleótidos 80-721 de SEQ ID NO: 1.

En una realización preferida, la cepa de *B. melitensis* 16M modificada se ha modificado adicionalmente para inactivar *znuA*, *norD*, *bip*, *tcpB*, *cgs*, *ricA*, *bvrR*, *bvrS*, uno o más de los genes que codifican para el sistema de secreción virB de tipo IV seleccionados del grupo que consiste en los ORF de *B. melitensis* 16M: BMEII0025, BMEII0026, BMEII0027, BMEII0028, BMEII0029, BMEII0030, BMEII0031, BMEII0032, BMEII0033, BMEII0034 y BMEII0035, y/o uno o más de los genes implicados en la formación, la modificación y/o el ensamblaje de LPS y/o en rutas metabólicas, incluyendo, pero sin limitarse a, *ppdK*, *wbdR*, *gmd*, *manA*, *manB*, *manC*, *per*, *pgm*, *wbkA*, *wbkB*, *wbkC*, *wbkD*, *wbkF*, *wadC* y *wzt* (regiones cromosómicas *wbk*, *wbo* y *wad*).

En una realización preferida, la cepa de *B. melitensis* 16M modificada se ha modificado adicionalmente de modo que se ha suprimido la actividad autóloga de N-formiltransferasa y se expresa funcionalmente un gen heterólogo que codifica para una N-aciltransferasa distinta de una enzima N-formiltransferasa. Por ejemplo, puede inactivarse la *wbkC* y puede introducirse y expresarse la *wbdR* heteróloga en la cepa (véase el documento WO 2017/108515 A1).

En una realización preferida, la cepa de *B. melitensis* 16M modificada se ha modificado adicionalmente para expresar una proteína fluorescente, preferiblemente GFP. La expresión de la proteína fluorescente en la cepa modificada puede usarse para distinguir adicionalmente individuos o animales inoculados con 16M de individuos o animales infectados (Chacón-Díaz *et al.*, 2011. Vaccine. 29(3): 577-82; documento EP 2 508 201 A1). Por tanto, un kit que comprende la cepa de *B. melitensis* 16M modificada que se ha modificado adicionalmente para expresar una proteína fluorescente puede comprender además anticuerpos que se unen a la proteína fluorescente y/o la proteína fluorescente. Preferiblemente, la proteína fluorescente es GFP.

En una realización preferida, la cepa se ha liofilizado. La liofilización puede usarse para aumentar la estabilidad y la vida útil de almacenamiento de la cepa.

En un octavo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la cepa modificada según cualquiera de las realizaciones divulgadas previamente y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende la cepa de *B. melitensis* 16M modificada que se ha modificado adicionalmente para expresar una proteína fluorescente.

Una composición farmacéutica tal como se describe en el presente documento también puede contener otras sustancias. Estas sustancias incluyen, pero no se limitan a, crioprotectores, lioprotectores, tensioactivos, agentes de carga, antioxidantes y agentes estabilizantes. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede estar liofilizada.

En una realización, se añade un lioprotector a una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, se incluye un agente de carga en la composición farmacéutica. También pueden incluirse otros portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, tales como aquellos descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980) en una composición farmacéutica descrita en el presente documento, siempre que no afecten negativamente a las características deseadas de la composición farmacéutica.

En una realización preferida, la composición farmacéutica comprende además un adyuvante. Preferiblemente, el adyuvante se selecciona de la lista que consiste en alumbre, adyuvante incompleto de Freund, MF59®, análogos sintéticos de ARNbc tales como poli(I:C), LPS bacterianos, flagelina bacteriana, imidazolquinolinas, oligodesoxinucleótidos que contienen motivos CpG específicos, fragmentos de paredes de células bacterianas tales como muramil dipéptido y Quil-A®.

La composición farmacéutica puede prepararse para administración oral, sublingual, bucal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, conjuntival, rectal, transdérmica, tópica y/o mediada por inhalación. En una realización preferida, la composición farmacéutica puede ser una disolución que es adecuada para administración intravenosa, intramuscular, conjuntival, transdérmica, intraperitoneal y/o subcutánea. En otra realización, la composición farmacéutica puede ser una disolución que es adecuada para las vías de administración sublingual, bucal y/o mediada por inhalación. En una realización alternativa, la composición farmacéutica puede ser un aerosol que es adecuado para administración mediada por inhalación. En una realización preferida, la composición farmacéutica puede prepararse para administración subcutánea y/o intraperitoneal.

La composición farmacéutica puede comprender además excipientes y portadores comunes que se conocen en el estado de la técnica. Para composiciones farmacéuticas sólidas, pueden usarse portadores sólidos no tóxicos convencionales que incluyen, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares. Para una disolución para inyección, la composición farmacéutica puede comprender además crioprotectores, lioprotectores, tensioactivos, agentes de carga, antioxidantes, agentes estabilizantes y portadores farmacéuticamente aceptables. Para administración mediante aerosol, las composiciones farmacéuticas se suministran generalmente en una forma finamente dividida junto con un tensioactivo y un propelente. El tensioactivo debe ser, por supuesto, no tóxico, y es generalmente soluble en el propelente. Representativos de tales agentes son los ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen desde 6 hasta 22 átomos de carbono, tales como los ácidos caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linolénico, olestérico y oleico con un alcohol alifático polihidroxilado o su anhidrido cíclico. Pueden emplearse ésteres mixtos, tales como glicéridos mixtos o naturales. También puede incluirse un portador, según se desee, como, por ejemplo, lecitina para administración intranasal. Para supositorios, los aglutinantes y portadores tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialcalenglicoles o triglicéridos.

En una realización preferida, la composición farmacéutica es una vacuna capaz de inducir una respuesta inmunitaria. El diseño de composiciones farmacéuticas para vacunas está bien establecido y se describe, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, edición más reciente, Mack Publishing Co., Easton, PA, y en el libro de Plotkin y Orenstein titulado Vaccines, 4ª ed., Saunders, Filadelfia, PA (2004).

Usos médicos de la cepa 16M modificada

En un noveno aspecto, la cepa o composición farmacéutica de la presente invención puede usarse como medicamento. En un décimo aspecto, la cepa modificada o composición farmacéutica de la presente invención puede usarse para tratar y/o prevenir la brucelosis.

En una realización preferida, el agente infeccioso que provoca la brucelosis se selecciona del grupo que consiste en *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. microti*, *B. ceti* y *B. pinnipedialis*. Preferiblemente, el agente infeccioso que provoca la brucelosis se selecciona del grupo que consiste en *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. ovis*.

En una realización preferida, la cepa o composición farmacéutica se usa para tratar y/o prevenir la brucelosis en humanos, ganado bovino, cabras, ovejas, cerdos y/o perros. Preferiblemente, la cepa o composición farmacéutica se usa para tratar y/o prevenir la brucelosis en cabras y/u ovejas.

En una realización preferida, el individuo o animal se inocula con al menos 10^4 UFC (unidades formadoras de colonias) de la cepa. Preferiblemente, el individuo o animal se inocula con al menos 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} ó 10^{11} UFC de la cepa. Más preferiblemente, el individuo o animal se inocula con al menos 10^9 UFC de la cepa. En una realización alternativa, el individuo o animal se inocula con de 10^4 a 10^{12} UFC de la cepa.

En una realización preferida, la cepa o composición farmacéutica se administra por vía subcutánea, intradérmica, intravenosa, intraperitoneal, mucosa y/o conjuntival. Preferiblemente, la cepa o composición farmacéutica se administra por vía subcutánea. En una realización alternativa, la composición farmacéutica se administra mediante

administración conjuntiva.

En una realización preferida, la cepa o composición farmacéutica se usa para prevenir la brucelosis. En esta realización, la cepa o el agente farmacéutico se administra como vacuna profiláctica. Preferiblemente, la cepa o composición farmacéutica se administra a un individuo o animal que está en riesgo de infectarse con bacterias del género *Brucella*.

En una realización preferida, la cepa o composición farmacéutica se usa para tratar la brucelosis. En esta realización, la cepa o el agente farmacéutico se administra como vacuna terapéutica. Preferiblemente, la cepa o composición farmacéutica se administra a un individuo o animal que padece una infección por bacterias del género *Brucella*.

Kit que comprende la cepa 16M modificada

En un undécimo aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende (i) una cepa de *B. melitensis* 16M modificada, en la que el gen *wzm* se ha inactivado; y (ii) un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La cepa modificada puede ser según cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente descritas en esta solicitud. Además, el portador o diluyente farmacéuticamente aceptable puede ser cualquiera de los portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables mencionados anteriormente descritos en esta solicitud. En una realización preferida, el kit comprende instrucciones de cómo combinar la cepa con el portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida, la cepa modificada es un liofilizado. El liofilizado puede estar contenido en un recipiente independiente del portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Además, el kit puede comprender instrucciones de cómo combinar la cepa liofilizada con el portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida, el kit puede comprender además un adyuvante. Preferiblemente, el adyuvante se selecciona de la lista que consiste en alumbre, adyuvante incompleto de Freund, MF59, análogos sintéticos de ARNbc tales como poli(I:C), LPS bacterianos, flagelina bacteriana, imidazolquinolinas, oligodesoxinucleótidos que contienen motivos CpG específicos, fragmentos de paredes de células bacterianas tales como muramyl dipéptido y Quil-A®.

En una realización preferida, las instrucciones incluidas con el kit también pueden describir la administración de la cepa a un individuo o animal. La descripción de la administración puede incluir la dosificación que va a usarse, la frecuencia de administración y/o la vía de administración que va a usarse.

En un duodécimo aspecto, la presente invención proporciona el uso de cualquiera de los kits descritos para el tratamiento y/o la prevención de brucelosis. El uso del kit puede estar en línea con cualquiera de los usos médicos y métodos de administración descritos en esta solicitud.

Kit de diagnóstico para PCR múltiple

En un decimotercer aspecto, la presente invención proporciona un kit para la identificación de cepas de *Brucella* que comprenden una delección parcial o completa del gen *wzm*. En una realización preferida, el kit comprende un cebador directo e inverso que se aparea con las regiones flanqueantes del gen *wzm* en el genoma de una especie del género *Brucella*. Preferiblemente, el kit comprende SEQ ID NO: 2 como cebador directo y SEQ ID NO: 3 y/o SEQ ID NO: 4 como cebador(es) inverso(s). Los conjuntos de cebadores pueden amplificar un amplicón de aproximadamente 1.573 pb (F1 y R4; AMP NO: 1) o de aproximadamente 724 pb (F1 y R5; AMP NO: 2) en la cepa Rev1 o 16M de tipo natural; o una banda de 931 pb (F1 y R4; AMP NO: 3) en los mutantes de Δwzm (tabla 1). Dado que la identidad entre BME1415 y los ortólogos correspondientes en otras especies de *Brucella* es de al menos el 99,6%, este kit puede usarse para diferenciar las cepas de *Brucella* de tipo natural y los mutantes de *Brucella* Δwzm .

Ejemplos

Ejemplo 1: Cultivo de cepas de *E. coli* y *Brucella*

Todas las cepas se conservaron en crioviales a -20°C, recolectando los cultivos bacterianos en leche desnatada complementada con lactosa estéril al 3% (Applichem Panreac) o con glicerol al 20-40% (v/v).

Para preparar suspensiones con una concentración conocida de *Brucella*, se preparó un cultivo previo a partir de un criovial haciendo crecer las bacterias sobre una placa base de agar sangre número 2 (Oxoid), o bien sencilla (BAB) o bien complementada con suero bovino fetal al 5% (Gibco) (BAB-S) para *B. ovis*. Después de la incubación (3-5 días, a 37°C y en atmósfera complementada con el 10% de CO₂ para *B. ovis*) de este cultivo previo, se transfirieron 2-3 colonias desde las placas BAB o BAB-S a placas BAB o BAB-S nuevas y se incubaron durante 2 días tal como antes. Las colonias crecidas se recogieron en PBS estéril a pH 6,85 para obtener una suspensión concentrada de

bacterias, que se diluyó en el mismo diluyente para obtener una suspensión con alrededor de 0,170 unidades de absorbancia a una densidad óptica de 600 nm ajustada mediante espectrofotometría. En estas condiciones, esta suspensión contiene alrededor de 10⁹ UFC/ml. El número exacto de bacterias se determinó siempre de manera retrospectiva mediante diluciones en serie en PBS, siembra en placa (100 µl por triplicado) e incubación de las placas durante 3-5 días a 37°C. Se calculó el número de UFC/ml.

Para el cultivo líquido de *Brucella*, se inocularon 4-5 colonias de una placa BAB o BAB-S en un caldo con triptona y soja (TSB, Pronadisa) y se incubaron durante la noche a 37°C y 150 rpm.

Se cultivó *E. coli* en caldo Luria Bertani (LB, Pronadisa) o en placas de agar LB. Los cultivos de *E. coli* se incubaron a 37°C.

Se incluyeron concentraciones apropiadas de antibióticos en las placas de agar y los cultivos para selección. Todos los antibióticos se adquirieron de Sigma.

Ejemplo 2: Secuenciación del gen *wzm*

El genoma de Rev1 se extrajo usando el kit purificación de ADN de microbioma PureLink™ (Thermo Fisher Scientific). El gen *wzm* se amplificó usando los cebadores F1 gcaaattgaaatggcagatg y R4 atgaaacgtggcgtagtcc (tabla 1), y el producto de PCR se purificó usando un kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen) y se secuenció mediante el método de Sanger.

La secuencia resultante es AMP NO: 1 (tabla 1), que incluye la SEQ ID NO: 1 descrita en la presente solicitud. Esta secuencia en Rev1 es idéntica a la del gen *wzm* en la cepa virulenta de *B. melitensis* 16M (Genbank: CP007763.1) así como el 99,6% de identidad con respecto a la de *B. abortus* 2308 (Genbank: NC_007618) y la S19 vacunal (Genbank: CP000887.1).

Según la secuenciación, puede usarse el mismo plásmido de intercambio alélico para delecionar parcialmente el gen *wzm* tanto en la especie *B. melitensis* (cepas 16M y Rev1) como en la especie *B. abortus* (cepas 2308 y S19).

Tabla 1. Números de amplificación (AMP NO) usados en este trabajo y el tamaño de fragmentos de ADN correspondiente obtenido mediante secuenciación o mediante PCR con los pares de cebadores indicados con ADN de los genes *wzm* de tipo natural o Δwzm .

AMP NO:	Tamaño de amplicón de ADN	Pares de cebadores de PCR	Secuencia de nucleótidos de cebadores (5'-3')
1	1.573 pb (en tipo natural)	F1/R4	F1: gcaaattgaaatggcagatg (SEQ ID NO: 2) R4: atgaaacgtggcgtagtcc (SEQ ID NO: 3)
2	724 pb	F1/R5	F1: gcaaattgaaatggcagatg (SEQ ID NO: 2) R5: gcgtgtaaattgcaagagga (SEQ ID NO: 4)
3	931 pb (en Δwzm)	F1/R4	F1: gcaaattgaaatggcagatg (SEQ ID NO: 2) R4: atgaaacgtggcgtagtcc (SEQ ID NO: 3)
4	484 pb	F1/R2	F1: gcaaattgaaatggcagatg (SEQ ID NO: 2) R2: agcgccacgtaaatcag (SEQ ID NO: 5)
5	465 pb	F3/R4	F3: ctgatttacgtggcgcttaacctgcgtggcagtagc (SEQ ID NO: 6) R4: atgaaacgtggcgtagtcc (SEQ ID NO: 3)
6	319 pb	F9/R5	F9: atgatatcgatatggcctaag (SEQ ID NO: 7) R5: gcgtgtaaattgcaagagga (SEQ ID NO: 4)
7	816 pb	rrnBP1-F/Gfp_F-R2	rrnBP1-F: gttgcgcggtcagaaaattatttta (SEQ ID NO: 8) Gfp_F-R2: ttattgtatagttcatccatgccca (SEQ ID NO: 9)

*F: directo (*forward*); R: inverso (*reverse*).

Ejemplo 3: Clonación de plásmidos de intercambio alélico

Todas las cepas de *Brucella* Δwzm se construyeron a través de un evento de recombinación doble usando el plásmido de intercambio alélico pJQKm- Δwzm (figura 1). Los cebadores requeridos para construir la forma truncada del gen *wzm* (Δwzm) se diseñaron usando Primer3 basándose en información de secuencia disponible de la cepa *B. melitensis* 16M en la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG) y el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

Se extrajo el genoma de las cepas de *Brucella* y se purificó usando un kit de purificación de ADN de microbioma PureLink™ (Thermo Fisher Scientific). Alternativamente, el DNA se extrajo mediante resuspensión de las bacterias en agua ultra pura y ebullición de la suspensión (100°C, 20 minutos), y luego centrifugación (4.000 rpm, 10 minutos). El ADN se recuperó recogiendo el sobrenadante.

Para clonar el plásmido de intercambio alélico para la delección parcial del gen *wzm*, se amplificó un fragmento de 484 pb (AMP NO: 4, tabla 1) usando PCR con los cebadores F1 gcaaattgaaatggcagatg y R2 agcgccacgtaaatcag (AMP NO: 3, tabla 1). Se amplificó un fragmento de 465 pb (AMP NO: 5, tabla 1) usando PCR y los cebadores F3 ctgattacgtggcgcttaacctgcgtggcagtagc y R4 atgaaacgtggcgtagtcc (tabla 1). Los dos productos de PCR se combinaron usando PCR de extensión solapada y el producto de longitud completa se amplificó usando F1 gcaaattgaaatggcagatg y R4 atgaaacgtggcgtagtcc para producir el casete de Δwzm (figura 1). El fragmento Δwzm tenía una delección del 82% del gen *wzm* de tipo natural ($\Delta 80-721$ de las 783 pb totales del gen *wzm* de tipo natural). El casete de Δwzm se clonó en un plásmido pCR2.1 usando las instrucciones del fabricante (TOPO® TA Cloning®, Thermo Fisher Scientific).

El vector suicida pJQKm se ha descrito previamente (Scupham y Triplett, 1997. Gene, 202, 53-59). Se digirieron pCR2.1 Δwzm y pJQKm usando BamHI y XbaI, y el inserto Δwzm y el vector pJQKm se extrajeron con gel y se purificaron. El inserto Δwzm y el vector pJQKm se ligaron usando una ADN ligasa T4 dando como resultado el plásmido de intercambio alélico pJQKm Δwzm .

Para insertar *gfp* en el genoma de las cepas de *B. melitensis*, se usó el sistema mini-Tn7 mediante una adaptación del método descrito previamente (Choi *et al.*, 2005. Nature Methods, 2(6):443-8). La expresión constitutiva de *gfp* se controló mediante el promotor *rrnB* P1 contenido en el fragmento *rrnB* P1-*gfp*. El constructo *rrnB* P1-*gfp* se extrajo del plásmido pUC18T-mini-Tn7-*gfp*-Gm^r (GenBank: DQ493877.2). Por tanto, el fragmento *rrnB* P1-*gfp* se amplificó con los cebadores rrnBP1-F gttgcgcggtcagaaaattatttta y Gfp_F-R2 ttattgtatagttcatccatgccca (AMP NO: 7) y se clonó en un plásmido pCR2.1 usando las instrucciones del fabricante (TOPO® TA Cloning®, Thermo Fisher Scientific), y luego se subclonó en pUC18R6KT-mini-Tn7-Km^r resistente a 50 µg/ml de kanamicina (Km^r) (Llobet *et al.*, 2009. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53(1): 298–302) usando EcoRI. Esto dio como resultado el plásmido pUC18R6KT-mini-Tn7-*gfp* (tabla 1).

Ejemplo 4: Conjugación de *E. coli* con cepas de *Brucella* y evaluación mediante PCR de mutantes

Se transformaron pUC18R6KT-mini-Tn7-*gfp* o pJQKm Δwzm en *E. coli* S17 (λ pir) y los plásmidos se transfirieron a las cepas de *Brucella* receptoras a través de conjugación. En el caso de la delección parcial del gen *wzm* usando el plásmido de intercambio alélico pJQKm Δwzm , se cultivó 1 ml de cultivo líquido durante la noche de *B. melitensis* con 0,5 ml de cultivos líquidos durante la noche de *E. coli* S17 (λ pir)-pJQKm Δwzm .

Para cepas de *Brucella* Δwzm , la selección de transconjugantes después de la primera recombinación (integración del vector suicida en el cromosoma) se seleccionó haciendo crecer las bacterias en BAB complementada con 50 µg/ml de kanamicina (Km^r) y susceptibilidad para sacarosa al 5% (Sac^s). La segunda recombinación (escisión del plásmido mutador y que conduce a la construcción de la cepa mutante mediante intercambio alélico) se seleccionó por resistencia a sacarosa y sensibilidad a kanamicina (figura 1). Finalmente, las colonias resultantes se exploraron mediante dos PCR, es decir una PCR con los cebadores F1 gcaaattgaaatggcagatg y R4 atgaaacgtggcgtagtcc que amplificó un fragmento de 931 pb en los mutantes Δwzm y un fragmento de 1.573 pb en la cepa parental (tabla 1), y otra PCR con F9 atgatcgttatggctaag y R5 gcgtgtaaattgcaagagga que amplifican un producto de PCR de 319 pb en las cepas de tipo natural y hermana (figura 2). Para la PCR, el ADN genómico se extrajo mediante resuspensión de las bacterias en agua ultra pura y ebullición de la suspensión a 100°C durante 20 minutos, y luego centrifugación del líquido resultante a 4.000 rpm durante 10 minutos y recogiendo el sobrenadante.

En todos los casos, se usaron tres clones de cada mutante y una cepa hermana (es decir, sometidos a los mismos subcultivos que el mutante correspondiente; figura 1) como control en la mayoría de los experimentos para evaluar la ausencia de cambios no controlados durante las manipulaciones genéticas.

Se identificó una cepa Rev1 que contenía la delección parcial (82%) del gen *wzm* y se denominó Rev1 Δwzm . Esta cepa también se depositó en un depositario según el Tratado de Budapest.

Los mutantes de *Brucella* Δwzm se complementaron mediante conjugación con el donante *E. coli* S17pBBR-*wzm* o *E. coli* S17pSRK-*wzm*. Las cepas complementadas se seleccionaron en placas BAB complementadas con 20 µg/ml de cloramfenicol (BAB-Cm₂₀) o 50 µg/ml de kanamicina (BAB-Km₅₀), permitiendo la selección de conjugantes que portan el plásmido no integrador pBBR-*wzm* o pSRK*wzm*, respectivamente. Los transconjugantes se comprobaron mediante PCR (figura 2) con los cebadores F9 atgatcgttatggctaag y R5 gcgtgtaaattgcaagagga (tabla 1), amplificando fragmentos de ADN de 319 pb (AMP NO: 6) exclusivamente en cepas que portan el gen *wzm* de tipo natural (cepas parentales y hermanas) o los plásmidos de complementación pBBR-*wzm* o pSRK-*wzm* (figura 2).

Ejemplo 5: Caracterización fenotípica de los mutantes de *Brucella*Δwzm

Los clones seleccionados de mutantes Δwzm se analizaron mediante los marcadores clásicos para el tipado de *Brucella* siguiendo los protocolos convencionales (Alton *et al.*, 1988. Techniques for the Brucellosis. Laboratory Paris: INRA) de pruebas de exclusión con cristal violeta-oxalato, catalasa, oxidasa, ureasa y acriflavina (todos de Sigma Aldrich), sensibilidad para los fagos Tb, Wb, Iz y R/C, aglutinación con sueros monoespecíficos anti-A y anti-M, dependencia tanto de CO₂ como de suero, susceptibilidad para tintes (es decir, azul de tionina 10, 20 y 40 µg/ml, fucsina 10 y 20 µg/ml y safranina 100 µg/ml; Sigma) y para los antibióticos penicilina 5 mg/ml (P_s) y estreptomycin 2,5 µg/ml (Str_{2,5}), tal como se muestra en la tabla 2.

Además, las cepas Rev1Δwzm, 16MΔwzm, 2308Δwzm y S19Δwzm mostraron un fenotipo R-LPS, en cuanto a la tinción positiva con la técnica de cristal violeta-oxalato (figura 3).

Además, se estudió la estructura de LPS de todos los mutantes Δwzm y las cepas complementadas mediante SDS-PAGE y tinción con plata modificada para LPS. Tal como se muestra en la figura 4A, tanto los mutantes Rev1Δwzm, 16MΔwzm, 2308Δwzm como S19Δwzm mostraron R-LPS con un núcleo intacto idéntico al de las cepas parentales y/o hermanas. Sin embargo, cuando se analizó antigénicamente mediante inmunotransferencia de tipo Western usando epítomos de O-PS anti-M, anti-C o anti-A, todos los mutantes Δwzm mostraron O-PS en menores cantidades o epítomos antigénicamente diferentes (Cloeckaert *et al.*, J Gen Microbiol. Junio de 1992;138(6):1211-9) con respecto a aquellos presentes en el O-PS del S-LPS (figura 4B). Además, se evaluó la complementación de 16MΔwzm::gfp-pBBR-wzm mediante microscopía de epifluorescencia, usando un epítomo de O-PS anti-C de MoAc (anticuerpo monoclonal) primario y un anticuerpo secundario marcado con rojo Texas. Las cepas hermanas 16MΔwzm::gfp y 16M se usaron como controles (figura 4C).

Además de la evaluación mediante PCR (véase el ejemplo 4, figura 2), la caracterización fenotípica mostró que las cepas complementadas restituyeron el fenotipo S-LPS (figuras 3, 4B y 4C).

Tabla 2. Caracterización fenotípica de Rev1Δwzm, 16MΔwzm, 2308Δwzm y S19Δwzm.

CEPA	Lisis de fagos				Dependiente de CO ₂	Catalasa/ Oxidasa/ Ureasa	Aglutinación con		Crecimiento en tintes en BAB-S en presencia/ausencia de CO ₂									
									Sueros anti-		Tionina			Fucsina básica			Safranina	
	Acriflavina y tinción con cristal violeta		A	M			10	20	40	10	20	100						
	Tb	Wb	Iz	R/C														
16M	-	-	-2	-	-	+/+/+	-/-	-	+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+			
16MΔwzm	-	-	-	-3	-	+/+/+	+/+	-	-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+			
Rev1	-	-	0	-	-	+/+/+	-/-	-	+	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+			
Rev1Δwzm	-	-	-	-4	-	+/+/+	+/+	-	-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	-/-			
2308	-3	-4	-4	-	-	+/+/+	-/-	-	+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+			
2308Δwzm	ND	ND	ND	ND	-	+/+/+	+/+	-	-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+			
S19	-3	-3	-2	-	-	+/+/+	-/-	+	+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+			
S19Δwzm	-	-	-	-3	-	+/+/+	+/+	-	-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+			

ND: no determinado

Ejemplo 6: La delección del gen *wzm* en *Rev1Δwzm* y *16MΔwzm* es estable después de subcultivos *in vitro* e *in vivo* en ratones.

Se subcultivaron mutantes de *BrucellaΔwzm* durante 20 pases consecutivos en placas BAB mediante la transferencia de las colonias sobre placas nuevas cada 3-4 días, después se incubaron las placas a 37°C. Además del análisis de estos cultivos, las bacterias que se hicieron crecer se mantuvieron durante 2 meses a 4°C para evaluar su estabilidad después del almacenamiento. Además, se seleccionó un número representativo de UFC aisladas de bazos de ratones en los experimentos descritos en los ejemplos 12 y 13 para la evaluación de la estabilidad.

Cada cultivo seleccionado se analizó para determinar la presencia de la delección mediante PCR con los cebadores F1 gcaaattgaaatggcagatg y R4 atgaaacgtggcgtagtcc, permitiendo la amplificación de ADN en bacterias tanto *wt* (*wild-type*, de tipo natural) como *Δwzm* (tabla 1), y mediante análisis fenotípico, es decir el tamaño de la colonia después de la incubación a 37°C y tinción con cristal violeta-oxalato. Finalmente, se ajustaron inóculos que contenían $\approx 2 \times 10^3$ UFC/ml mediante espectrofotometría y se sembraron en placa por triplicado ($3 \times 100 \mu\text{l}$) en cinco placas, con el fin de analizar el tamaño de la colonia después de 5 días de incubación a 37°C y la fase de la colonia mediante tinción con cristal violeta en alrededor de 3.000 UFC.

Todas las colonias analizadas mostraron el genotipo y fenotipo esperado, lo que indica que la modificación genética es estable.

Ejemplo 7: El crecimiento de *16MΔwzm* pero no de *Rev1Δwzm* se inhibe por la presencia del 10% de CO₂ en la atmósfera de incubación. Este defecto se restituye haciéndolos crecer en agar complementado con sueros fetales bovinos.

El crecimiento bacteriano de mutantes *Δwzm* se estudió en placas BAB incubadas en una atmósfera normal o complementada con el 10% de CO₂. Para esto, se sembraron en placa 100 μl de suspensiones bacterianas que contenían $\approx 5 \times 10^2$ UFC/ml por triplicado y se determinó el número de UFC/100 μl después de la incubación (3-5 días, 37°C). Además, se analizó *16MΔwzm* para determinar la frecuencia de inhibición (es decir, el número de UFC/ml aisladas después de la incubación con CO₂ con respecto al número de UFC/ml aisladas después de la incubación en una atmósfera normal) mediante la siembra de todas las diluciones bacterianas preparadas tanto en BAB como en BAB-S. Cada recuento se repitió tres veces. Los resultados se presentan como media $\pm$ desviación estándar (n=9) de recuentos individuales. Las comparaciones estadísticas de las medias se realizaron mediante las pruebas de ANOVA de un factor y PLSD.

Tal como se muestra en la tabla 3, *16MΔwzm* pero no *Rev1Δwzm* fue incapaz de crecer en BAB en condiciones de incubación con CO₂.

Tabla 3. Crecimiento en placas BAB incubadas en una atmósfera normal o complementada con el 10% de CO₂. Número de UFC/100 μl de suspensiones bacterianas que contienen $\approx 5 \times 10^2$ UFC/ml. Media y desviación estándar de tres experimentos mediante siembra en placa BAB de 100 μl por triplicado.

Cepa	N.º de UFC/100 μl (media $\pm$ D.E.)	
	Atmósfera normal	10% de CO ₂
Rev1	70,1 $\pm$ 5,4	62,9 $\pm$ 8,3
Rev1 hermana	53,8 $\pm$ 3,0	61,8 $\pm$ 4,5
Rev1Δwzm	42,3 $\pm$ 2,3	28,6 $\pm$ 4,2
Rev1Δwzm::gfp	37,7 $\pm$ 2,4	21,5 $\pm$ 1,3
16M	57,9 $\pm$ 2,8	67,8 $\pm$ 2,5
16M hermana	50,5 $\pm$ 1,8	73,1 $\pm$ 3,1
16MΔwzm	31,7 $\pm$ 3,5	0 ^a
16MΔwzm::gfp	21,4 $\pm$ 1,5	0 ^a

^a Pruebas de PLSD: p<0,0001 frente a atmósfera normal y frente a cepas 16M y Rev1 hermanas

La frecuencia de inhibición de 16MΔwzm después de la incubación de placas BAB en una atmósfera con CO₂ fue de 1-0,39×10⁻² UFC/ml. Este fenotipo no se produjo cuando se cultivó 16MΔwzm en placas BAB-S (tabla 4).

Tabla 4. Frecuencia de inhibición de 16MΔwzm y 16MΔwzm::gfp en placas BAB y BAB-S incubadas en una atmósfera normal o complementadas con un 10% de CO₂.

Cepa	UFC/ml		Cepa	UFC/ml	
	Atmósfera normal	10% de CO ₂ (frecuencia de inhibición)		Atmósfera normal	10% de CO ₂ (frecuencia de inhibición)
16M			16MΔwzm		
BAB	4,3×10 ⁸	4,2×10 ⁸ (1×10 ⁰)	BAB	4,3×10 ⁸	4,4×10 ⁶ (1×10 ⁻²)
BAB-S	4,9×10 ⁸	4,2×10 ⁸ (1×10 ⁰)	BAB-S	3,4×10 ⁸	4,5×10 ⁸ (1×10 ⁰)
16M hermana			16MΔwzm::gfp		
BAB	5,4×10 ⁸	6,2×10 ⁸ (1×10 ⁰)	BAB	4,1×10 ⁸	1,6×10 ⁶ (0,39×10 ⁻²)
BAB-S	6,6×10 ⁸	6,2×10 ⁸ (0,9×10 ⁰)	BAB-S	3,9×10 ⁸	4,5×10 ⁸ (1×10 ⁰)

Ejemplo 8: Rev1Δwzm es más susceptible al tratamiento con estreptomicina que Rev1

A diferencia de otras especies de *Brucella* tales como *B. melitensis* 16M y *B. abortus* 2308 y S19, Rev1 presenta una resistencia relativa al tratamiento con 2,5 μg/ml de estreptomicina (Str_{2.5}) cuando se incubaba en una atmósfera normal (en el 10% de CO₂, todas las cepas de *B. melitensis* muestran una resistencia similar). Esta resistencia relativa a Str_{2.5} *in vitro* está directamente relacionada con la ineficacia de tratamientos basados en estreptomicina (un antibiótico de elección en humanos) frente a infecciones por Rev1 tanto en humanos como en modelos animales (Grilló *et al.*, 2006. J Antimicrob Chemother. 58 (3):622–626).

Para evaluar esta propiedad en Rev1Δwzm, se prepararon suspensiones bacterianas que contenían ≈2×10³ UFC/ml en PBS y se cultivaron sembrando 100 μl por triplicado en placas BAB y BAB complementada con Str_{2.5} (BAB-Str_{2.5}). La cepa Rev1 hermana se usó como control. Las placas se incubaron a 37°C, durante 5 días en una atmósfera normal, y se determinó la media ± desviación estándar (n=3) del número de UFC/ml. El experimento se repitió tres veces. Las comparaciones estadísticas de las medias se realizaron mediante las pruebas de ANOVA y PLSD.

Como resultado, Rev1Δwzm fue más susceptible (p<0,001) a Str_{2.5} que Rev1 hermana (figura 5).

Ejemplo 9: 16MΔwzm es más susceptible a la desecación que 16M, y Rev1Δwzm es tan susceptible como Rev1.

La resistencia a la desecación de Rev1Δwzm, 16MΔwzm, Rev1 y 16M se sometió a prueba tomando alícuotas de 200 μl/pocillo de una suspensión de ≈10⁹ UFC/ml en TSB en placas de poliestireno de 12 pocillos. Las suspensiones se dejaron secar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 6 días. A continuación, el sedimento se rehidrató en PBS, se diluyó en serie y se sembró en placas BAB con el fin de determinar el número y el porcentaje de bacterias supervivientes.

Tal como puede observarse en la figura 6, la delección parcial del gen *wzm* en 16MΔwzm disminuyó adicionalmente (p<0,001) la capacidad de la cepa 16M hermana de sobrevivir en ambientes secos. Sin embargo, Rev1Δwzm es tan susceptible como Rev1 hermana. Estos hallazgos proporcionan evidencias de que 16MΔwzm persistiría en el ambiente con menor probabilidad que la cepa virulenta 16M.

Ejemplo 10: Rev1Δwzm es más susceptible que 16MΔwzm a los péptidos catiónicos bactericidas del sistema inmunitario innato. Ambos mutantes Δwzm son más susceptibles que las cepas parentales o hermanas.

Se usó polimixina B como modelo de susceptibilidad bacteriana a los péptidos catiónicos del sistema inmunitario innato. Para esto, Rev1Δwzm o 16MΔwzm en crecimiento exponencial se ajustaron a 2-3×10³ UFC/ml en PBS y se mezclaron con diferentes concentraciones de desde 3 hasta 0,188 mg/ml de polimixina B en tampón ácido de solución salina con fosfato (PSA; NaCl 0,133 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, pH 4,6) en placas de microtitulación de 24 pocillos por duplicado. Las suspensiones (100 μl, por triplicado) se sembraron en placa BAB y se registró el número de UFC viables después de la incubación durante 1 h a 37°C. Se usaron cepas tanto parentales como hermanas como controles. Los puntos de datos representan la media ± desviación estándar (n=3) de UFC/ml.

La figura 7 muestra que la cepa Rev1 Δ wzm es más susceptible que 16M Δ wzm a los efectos perjudiciales de polimixina B. Además, ambos mutantes Δ wzm eran mucho más susceptibles que las cepas Rev1 y 16M parentales y hermanas. De hecho, Rev1 Δ wzm no creció después de la incubación en presencia de la concentración más baja sometida a prueba (0,188 mg/ml) mientras que 16M Δ wzm no se inhibió totalmente hasta una concentración de polimixina B de 0,750 mg/ml, en las mismas condiciones experimentales (figura 7). Por el contrario, las cepas Rev1 parental y hermana se inhibieron para 3 mg/ml, mientras que 16M virulenta resistió incluso a esta concentración elevada. Estos resultados concuerdan con la persistencia *in vivo* diferente de Rev1 Δ wzm y 16M Δ wzm observada en ratones (figura 9).

Ejemplo 11: Rev1 Δ wzm y 16M Δ wzm son más susceptibles que las cepas Rev1 y 16M parentales a sueros de oveja y ganado bovino convencionales.

Se ajustaron bacterias en fase exponencial a una concentración de $\approx 10^4$ UFC/ml en PBS y se dispensaron en placas de microtitulación (45 μ l/pocillo) mezclando con sueros ovino o bovino (90 μ l/pocillo), o bien normales o bien descomplementados (1 hora, 56°C). Después de la incubación (18 h, 37°C), se dispensaron 65 μ l de TSB en cada pocillo, se mezcló la suspensión bacteriana, se sembraron 50 μ l/pocillo en placas BAB y se incubaron las placas (5 días, 37°C) para determinar el número de UFC/ml y el porcentaje de supervivencia bacteriana. Se usó un mutante de *B. melitensis* con núcleo mínimo como control positivo (C+) de alta susceptibilidad para suero normal. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar (n=3) de porcentaje de supervivencia. Las comparaciones estadísticas de las medias se realizaron mediante las pruebas de ANOVA y PLSD.

Tal como puede observarse en la figura 8, las cepas Rev1 Δ wzm y 16M Δ wzm son más susceptibles que las cepas Rev1 o 16M parentales al efecto bactericida de suero normal tanto de oveja como de vaca.

Ejemplo 12: Rev1 Δ wzm está más atenuada que 16M Δ wzm en ratones BALB/c

Se alojaron ratones BALB/c hembra de 7 semanas de edad (Charles River Laboratories, Barcelona, España) en el edificio para animales del Instituto de Agrobiotecnología (número de registro ES/31-2016-000002-CR-SU-US) con agua y alimento a voluntad. Los animales se asignaron al azar y se aclimataron durante 1-2 semanas antes del inicio de los experimentos. La manipulación de los animales y los procedimientos experimentales fueron según las Directrices europea (DOCE 86/609/EEC), nacional (RD 1201/2005) y regional (Ley 11/2003), y se supervisaron por el Comité Ético de la Institución.

Los ratones se inocularon por vía intraperitoneal con $\approx 10^8$ UFC/ratón de Rev1 Δ wzm, Rev1 Δ wzm::*gfp*, 16M Δ wzm o 16M Δ wzm::*gfp* (cepas R-LPS) y 10^6 UFC/ratón de cepas Rev1 o 16M hermanas (cepas S-LPS). Se usaron grupos adicionales de ratones inoculados con $\approx 10^8$ UFC/ratón de los mutantes de *B. abortus* S19 Δ wzm o 2308 Δ wzm y con 10^6 UFC/ratón de las cepas S19 ó 2308 hermanas para comparar el efecto de esta mutación en diferentes antecedentes de *Brucellae*. A los intervalos seleccionados, se sometieron a necropsia grupos de 5 ratones para determinar el número de bacterias viables presentes en los bazoos así como los pesos de los bazoos, tal como se informó previamente (Grilló *et al.*, 2012. Veterinary Research, 43 (1): 29). Las bacterias viables se identificaron en placas BAB. La identidad aproximada de los aislados de bazo se confirmó mediante el método de tinción con cristal violeta-oxalato así como mediante PCR. Los resultados se expresaron como la media $\pm$ desviación estándar (n=5) del log UFC/bazo individual o gramos/bazo. La comparación estadística de las medias se realizó mediante las pruebas de ANOVA de un factor seguida de Diferencias Significativas Mínimas Protegida de Fisher (PLSD).

Tal como puede observarse en las figuras 9A y 9C, la delección parcial del gen *wzm* condujo a una disminución en el número de *B. melitensis* presente en los bazoos de ratones en comparación con las cepas Rev1 o 16M hermanas correspondientes. Sin embargo, Rev1 Δ wzm estaba mucho más atenuada que 16M Δ wzm, dado que se produjo un aclaramiento completo de las infecciones de los bazoos antes de la semana 4 o la semana 12 para Rev1 Δ wzm o 16M Δ wzm, respectivamente. A diferencia de *B. melitensis*, los mutantes de *B. abortus* tanto 2308 Δ wzm como S19 Δ wzm persistieron en los bazoos de manera similar, es decir, algo más de 8 semanas o menos de 9 semanas, respectivamente (figuras 9E y 9G). Estos hallazgos indicaron que ambos mutantes de *B. abortus* estaban más atenuados que el mutante 16M Δ wzm pero menos que Rev1 Δ wzm.

De manera inesperada, la mayor atenuación de Rev1 Δ wzm estaba acompañada por la inducción de una esplenomegalia transitoria que alcanzó su máximo en la semana 2 tras la infección (figura 9B). Este hallazgo se asocia generalmente con el desencadenamiento de una respuesta inmunitaria eficaz (Conde-Álvarez *et al.*, 2012. PLoS Pathog. 8(5): e1002675). Esta reacción esplénica no se observó en 16M Δ wzm (figura 9D) ni tampoco en los mutantes de *B. abortus* 2308 Δ wzm ni S19 Δ wzm (figuras 9F y 9H).

Las cepas Rev1 Δ wzm::*gfp* y 16M Δ wzm::*gfp* mostraron una virulencia y una esplenomegalia similares que Rev1 Δ wzm y 16M Δ wzm, respectivamente (figuras 9A-9D), lo que indica que la inserción de mini-Tn7-*gfp* en el genoma no afectó a las propiedades biológicas de Rev1 Δ wzm y 16M Δ wzm.

Ejemplo 13: Rev1 Δ wzm no infecta placentas o fetos de ratones gestantes

Se infectaron por vía intraperitoneal ratones CD1 hembra (n=7) a los 4,5 días de embarazo con $\approx 7 \times 10^6$ UFC/ratón de Rev1 Δ wzm o 16M Δ wzm o con $\approx 7 \times 10^5$ UFC/ratón de Rev1 o 16M. Todos los ratones se sacrificaron al final natural del embarazo para evaluar las lesiones macroscópicas en la necropsia así como la bacteriología de muestras de bazo, placenta y feto. El número de bacterias viables (log UFC/órgano) en cada tejido se determinó mediante siembra en placa BAB. Además, se registraron el número de hembras embarazadas, las placentas infectadas y las madres que portaban fetos infectados.

Tal como puede observarse en la tabla 5, todos los ratones mostraron infecciones bien establecidas en los bazo a niveles similares (≈ 4 -5 logs) entre grupos. Sin embargo, la esplenomegalia generada por Rev1 Δ wzm y 16M Δ wzm en madres embarazadas fue moderada o baja, respectivamente, a diferencia de las cepas Rev1 y 16M parentales (tabla 5). De manera sorprendente, Rev1 (y hasta un menor grado 16M) indujo una mayor esplenomegalia en el embarazo (tabla 5) que en ratones sin embarazo en la semana 2 (figura 9). Sin embargo, los mutantes Rev1 Δ wzm y 16M Δ wzm indujeron una esplenomegalia similar en ratones gestantes y no gestantes, lo mostrando pesos de bazo en la semana 2 mayores en Rev1 Δ wzm que en 16M Δ wzm (0,30 frente a 0,16 gramos/bazo, tabla 5). Se observó el final natural de los embarazos en la mayoría de los ratones vacunados con Rev1 Δ wzm o 16M Δ wzm, así como en aquellos vacunados con Rev1, pero sólo unas pocas madres infectadas con 16M parental lograron un final natural del embarazo. Además, si bien Rev1 Δ wzm y 16M Δ wzm fueron prácticamente incapaces de colonizar las placentas y los fetos a la dosis administrada, la infección con un logaritmo menos de Rev1 permitió la colonización de estos tejidos a niveles muy altos (6-8 logs de infección) en todas las madres (tabla 5).

Estos niveles de infección estaban acompañados por lesiones macroscópicas en placentas infectadas con Rev1 y 16M pero no en aquellas de madres inoculadas con los mutantes Rev1 Δ wzm o 16M Δ wzm (figura 10). Todos estos resultados indicaron que los mutantes Rev1 Δ wzm o 16M Δ wzm eran más seguros ratones gestantes que las cepas de referencia tanto virulenta como vacunal.

Tabla 5. Infecciones en bazo, placenta y feto y finales naturales de los embarazos en ratones CD1 infectados con Rev1 Δ wzm, 16M Δ wzm, Rev1 o 16M en el día 4,5 de embarazo y sacrificados 15 días después.

Cepa	Inoculación	Bazo	Embarazo	Placenta	Fetos			
<i>B. melitensis</i>	Dosis/vía	log UFC/bazo	Peso del bazo (gramos)	N.º de gestantes/madres totales	N.º de madres con placentas infectadas/gestantes	log UFC/gramo de placenta*	N.º de madres con fetos infectados/gestantes	log UFC/gramo de feto*
Rev1 (vacuna)	6,0x10 ⁵ /i.p.	5,70 ± 0,80	0,89 ± 0,29	10/14	10/10	8,5 ± 0,8	10/10	6,71 ± 0,49
Rev1Δwzm	6,3x10 ⁶ /i.p.	4,70 ± 0,80	0,30 ^a ± 0,16	12/14	0/12	1,52 ± 0 ^a	0/5	1,52 ± 0 ^a
16M (virulenta)	6,9x10 ⁵ /i.p.	4,10 ± 0,50	0,83 ± 0,43	4/14	4/4	6,0 ± 1,42	2/2	6,16 ± 1,21
16MΔwzm	6,5x10 ⁶ /i.p.	3,60 ± 0,70	0,16 ^a ± 0,08	5/7	0/5	1,52 ± 0 ^a	0/5	1,52 ± 0 ^a

i.p.: intraperitoneal; ^a: p < 0,001 frente a ratones infectados con 16M (virulenta) o Rev1 (vacuna); *Límite de detección = 1,52 log (es decir, sin UFC aisladas)

Ejemplo 14: Rev1 Δ wzm y 16M Δ wzm confieren una protección sólida frente a infecciones virulentas S y R en ratones, equivalente o mejor que la conferida por Rev1.

La eficacia vacunal de los mutantes *Brucella* Δ wzm se evaluó en ratones BALB/c hembra de 8-10 semanas de edad (n=5) mediante vacunación intraperitoneal o subcutánea con $\approx 10^8$ UFC/ratón del mutante correspondiente. Los ratones (n=5) vacunados por vía subcutánea con 2×10^5 UFC/ratón de Rev1 o S19 se usaron como controles vacunados de referencia frente a infecciones con o bien *B. melitensis* H38 y *B. ovis* PA o bien *B. abortus*, respectivamente. Se usaron tres grupos de ratones (n=5) inoculados con 0,1 ml de PBS estéril como controles sin vacunar en el experimento correspondiente. Cuatro semanas después de la vacunación, todos los ratones se expusieron por vía intraperitoneal con $\approx 1 \times 10^4$ UFC/ratón de *B. melitensis* H38::Gm^r, 2×10^5 UFC/ratón de *B. ovis* BoPA::Gm^r o 5×10^4 UFC/ratón de *B. abortus* 2308::Gm^r, cepas de exposición resistentes al tratamiento con 15 μ g/ml de gentamicina (Gm₁₅). Finalmente, se determinó el número de bacterias virulentas en los bazo a las 2 (H38::Gm^r y 2308::Gm^r) y 3 (BoPA::Gm^r) semanas después de la exposición mediante siembra en placa de cada bazo sobre BAB-S-Gm₁₅.

Tal como puede observarse en la tabla 6A, los mutantes tanto Rev1 Δ wzm como 16M Δ wzm::gfp mostraron un grado de protección frente a infección virulenta con *B. melitensis* similar al mostrado por la cepa vacunal de referencia Rev1, no sólo mediante vacunación por vía intraperitoneal sino también por vía subcutánea. Además, ambos mutantes de *B. melitensis* Δ wzm confirieron una protección superior frente a infección con *B. ovis* ($p < 0,001$) que la conferida por la cepa Rev1. Por el contrario, de manera sorprendente, la mutación Δ wzm en las cepas de *B. abortus* tanto 2308 Δ wzm como S19 Δ wzm no confirió una protección adecuada frente a infección virulenta con *B. abortus* en ratones (tabla 6B).

Tabla 6A. Eficacia de vacunación frente a infección virulenta con *B. melitensis* H38 (cepa virulenta de S-LPS) o *B. ovis* PA (cepa virulenta de R-LPS).

	Dosis/vía de vacunación	Exposición a H38::Gm ^r			Exposición a <i>B. ovis</i> PA::Gm ^r		
		log H38/bazo (media±D.E.)	Sin infectar ^a /totales ^a	UP ^b	log BoPA/bazo (media±D.E.)	Sin infectar/totales ^a	UP ^b
Rev1Δwzm	10 ⁸ /i.p.	1,44 ± 1,28 ^c	3/5	4,32	0,7 ± 0,00 ^a	5/5	5,37
	10 ⁸ /s.c.	1,93 ± 1,43 ^c	2/5	3,83	ND		
16Δwzm::gfp	10 ⁸ /i.p.	1,75 ± 1,52 ^c	3/5	4,01	0,62 ± 0,05 ^a	5/5	5,45
	10 ⁸ /s.c.	2,05 ± 1,00 ^c	1/5	3,71	1,91 ± 1,76 ^a	2/5	4,16
Rev1	2x10 ⁵ /s.c.	1,39 ± 1,16 ^c	3/5	4,37	2,58 ± 1,88 ^a	2/5	3,49
Control de PBS	-	5,76 ± 0,58	0/5	-	6,07 ± 0,24	0/5	

i.p.: intraperitoneal; s.c.: subcutánea; ^a < 5 UFC/bazo; ^b Unidades de protección = log UFC/bazo en control sin vacunar – grupo sometido a prueba; ^c p<0,001 frente a control de PBS mediante prueba de PLSD.

ND: no determinado

Tabla 6B. Eficacia de vacunación con 2308Δwzm o S19Δwzm frente a la infección virulenta con *B. abortus* 2308::Gm^R (cepa virulenta S-LPS)

Cepa vacunal	Dosis/vía de vacunación	Exposición a 2308::Gm ^r	
		log 2308/bazo (media ± D.E.)	Sin infectar/totales*
2308Δwzm	10 ⁸ /i.p.	2,97 ± 1,41 ^b	1/5
	10 ⁸ /s.c.	4,13 ± 1,08	0/5
S19Δwzm	10 ⁸ /i.p.	4,18 ± 1,91	0/5
S19	10 ⁵ /s.c.	1,57 ± 1,96 ^a	4/5
Control de PBS	-	5,87 ± 0,26	0/5

i.p.: intraperitoneal; s.c.: subcutánea; * < 5 UFC/bazo; **Unidades de protección = log UFC/bazo en control sin vacunar – en grupo sometido a prueba; ^a: p<0,001; ^b: p<0,05 frente a control de PBS mediante la prueba PLSD

Ejemplo 15: Respuesta serológica de corderos inoculados con Rev1Δwzm::gfp o 16MΔwzm::gfp frente a Rev1::gfp

Se usaron corderos de raza Rasa Aragonesa machos y hembras nacidos en el rebaño experimental del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) del Gobierno de Aragón (Zaragoza, España) en estos experimentos, a los 3-4 meses de edad. Estos animales se alojaron en las instalaciones autorizadas del CITA (número de registro ES/50-2970-12005), se manejaron y manipularon según las recomendaciones de FELASA (www.felasa.eu) y ARRIVE (Kilkenny *et al.*, 2010. PLoS Biology, 8: e1000412).

Los corderos se vacunaron mediante inoculación por vía subcutánea de una suspensión que contenía 1-2×10¹⁰ UFC de Rev1Δwzm::gfp (n=14) o 16MΔwzm::gfp (n=8). Se usaron grupos de corderos sin vacunar (n=13) o vacunados con 1-2×10⁹ UFC de Rev1::gfp (n=12) como controles. Después de eso, se evaluó la inocuidad mediante inspección clínica (temperatura corporal por vía rectal y palpación del sitio de inoculación) durante un mes después de la vacunación y mediante examen periódico del epidídimo y los testículos, todo ello a lo largo del experimento. Además, se extrajeron muestras de sangre justo antes de la vacunación y, después de eso, cada semana o cada dos semanas, mediante punción de la vena yugular usando tubos de vacío Venojet® (Terumo). Después de la extracción a temperatura ambiente durante 24 h, las muestras de sangre se centrifugaron a 3.500 rpm durante 10 minutos, y el suero resultante se conservó a -20°C hasta su análisis.

Se midió la respuesta anti-LPS usando una prueba de rosa de Bengala convencional (sRBT) y una prueba de fijación del complemento (CFT), recomendadas por la OMS/OIE. Adicionalmente, se llevaron a cabo pruebas de difusión en gel (GDT) con antígeno de R-LPS con el fin de evaluar mediante seroconversión que la vacunación fue eficaz. Pueden encontrarse detalles sobre estas pruebas serológicas en el “*Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*” de la Organización Mundial para la Salud Animal (OIE, 2016). También se realizó un ELISA para los anticuerpos anti-GFP en el suero en muestras obtenidas del suero de los corderos inoculados con 16MΔwzm::gfp.

Las figuras 11A y 11B muestran que, a diferencia de Rev1::gfp, la vacunación con Rev1Δwzm::gfp o 16MΔwzm::gfp indujo (si es que lo hizo) una interferencia serológica mínima en las pruebas de *Brucella* para S-LPS. De hecho, las respuesta serológica inducida mediante vacunación con Rev1Δwzm no produjo ninguna interferencia en sRBT (figura 11A) y sólo tres corderos produjeron anticuerpos anti-S/LPS detectables mediante CFT. Por el contrario, tres animales vacunados con 16MΔwzm::gfp fueron positiva en sRBT (figura 11A) y uno de ellos también fue positivo en CFT. En cualquier caso, estos cuatro corderos positivos en CFT vacunados con los mutantes Δwzm mostraron títulos de anti-S/LPS muy bajos, que persistieron durante menos de 6 semanas tras la vacunación (figura 11B). El 100% de animales positivos en GDT-R/LPS (figura 11C) demostró que todos los corderos se vacunaron de manera correcta con el mutante Rev1Δwzm::gfp o 16MΔwzm::gfp, lo que indica que la ausencia de reacciones con S/LPS será debida a la naturaleza de los O-PS acumulados en los mutantes Δwzm.

La figura 11D muestra que los corderos que se inocularon con 16MΔwzm::gfp también produjeron anticuerpos que se unen a GFP. Estos anticuerpos pudieron usarse en una prueba serológica para discriminar entre corderos vacunados e infectados. Además, esta distribución de la prueba también pudo usarse para discriminar entre corderos inoculados con Rev1Δwzm::gfp y corderos infectados.

Ejemplo 16: Eficacia de la vacunación con Rev1Δwzm::gfp frente a la infección experimental con *B. ovis* PA en carneros.

Se usaron corderos de raza Rasa Aragonesa machos y hembras nacidos en el rebaño experimental del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) del Gobierno de Aragón (Zaragoza, España) en estos experimentos, a los 3-4 meses de edad. Estos animales se alojaron en las instalaciones autorizadas del CITA (número de registro ES/50-2970-12005), se manejaron y manipularon según las recomendaciones de FELASA (www.felasa.eu) y ARRIVE (Kilkenny *et al.*, 2010. PLoS Biology, 8: e1000412).

Los corderos (n=14) se vacunaron mediante inyección por vía subcutánea de $1-2 \times 10^{10}$ UFC de Rev1Δwzm::gfp. Se usó un grupo (n=13) sin vacunar como control. Después de eso, se evaluó la inocuidad mediante inspección clínica (temperatura corporal por vía rectal y palpación del sitio de inoculación) durante un mes después de la vacunación y mediante examen periódico del epidídimo y los testículos, todo ello a lo largo del experimento. A los 8 meses después de la vacunación, todos los corderos se expusieron de manera experimental con 2×10^9 UFC de *B. ovis* PA por las vías conjuntival y prepucial (30 μl/cada vía) y se sacrificaron 2 meses después con fines bacteriológicos. Se tomaron muestras de bazos, epidídimo, vesículas seminales y ganglios linfáticos craneales, preescapulares, femorales, ilíacos y escrotales, homogeneizados en PBS estéril y cultivados por duplicado en medio CITA (De Miguel *et al.*, 2011. Journal of Clinical Microbiology. 49(4): 1458–1463). Se determinó el número y porcentaje de animales y muestras infectados tal como se describió previamente (Grilló *et al.*, 2009. Vaccine, 27: 187-191) y se calculó el índice medio de infección como la suma de los niveles de infección asignados a cada muestra dividido por todas las muestras procesadas de cada grupo. El nivel de infección se asignó de la siguiente manera: 1 (1-5 UFC), 2 (6-25 UFC); 3 (26-125 UFC); 4 (126-300 UFC); 5 (>300 UFC). Las comparaciones estadísticas de los porcentajes y las medias se realizaron mediante las pruebas de la ji cuadrado y Kruskal-Wallis, respectivamente.

Tal como se muestra en la tabla 7, la vacunación de corderos a los 3-4 meses de edad con Rev1Δwzm::gfp induce una protección significativa frente a exposición a la infección por *B. ovis* PA a los 11-12 meses de edad, no sólo en cuanto al número de animales infectados encontrado, sino también en cuanto al número de muestras detectadas como infectadas por *B. ovis* PA. Además, el nivel de infección observado en ambos grupos vacunales fue menor que el observado en el grupo de control sin vacunar.

Tabla 7. Eficacia frente a la infección con *B. ovis* PA en carneros vacunados con Rev1Δwzm::gfp a los 3-4 meses de edad.

Grupo de vacunación ¹	N.º de animales infectados(%) / totales	N.º de muestras infectadas (%) / totales	Índice medio de infección ²
Rev1Δwzm::gfp	5/14 (35,7%) ^a	15/112 (13,4%) ^b	0,29
Sin vacunar	12/13 (92,3%)	47/104 (45,2%)	1,00

¹ Se vacunaron por vía subcutánea corderos macho de 3-4 meses de edad con 2×10^{10} UFC de Rev1Δwzm::gfp, se expusieron a los 8 meses tras la vacunación y se analizaron mediante bacteriología 2 meses después de la exposición; ² Índice medio de infección = suma de los niveles de infección asignados a cada muestra dividido entre todas las muestras procesadas de cada grupo; comparaciones estadísticas: ^a p=0,002; ^b p<0,0001.

Ejemplo 17: Los sueros inmunes de corderos vacunados con Rev1 Δ wzm son eficaces frente a las cepas virulentas *B. melitensis* H38 y *B. abortus* 2308 S-LPS.

- 5 Se ajustaron *B. melitensis* H38, *B. abortus* 2308 y *B. ovis* PA en crecimiento exponencial a 10^4 UFC/ml en PBS y se mezclaron, por triplicado en placas de microtitulación (45 μ l/pocillo), con 90 μ l/pocillo de sueros normales o tratados con calor (1 h, 56°C) extraídos de corderos que muestran anticuerpos anti-R/LPS en GDT-R/LPS (uno de ellos también era positivo en CFT) a las 2 semanas después de la inoculación con Rev1 Δ wzm. Después de 18 h de incubación a 37°C y el 10% de CO₂ para *B. ovis*, se dispensaron 65 μ l de TSB en cada pocillo, se mezcló la suspensión bacteriana y se sembraron 50 μ l en placa BAB por triplicado. Los resultados se expresaron como el
- 10 porcentaje normalizado de recuentos de bacterias con respecto al recuento inicial en los inóculos. Tal como puede observarse en la figura 12, los sueros inmunes de corderos tratados con Rev1 Δ wzm fueron capaces de destruir o bien *B. melitensis* H38, *B. abortus* 2308 o bien *B. ovis* PA.