

Estabilidad de la cepa vacunal *B. abortus* S19 portadora de un plásmido de expresión eucariota codificante de la glicoproteína G del virus de la rabia

Nidia G. Pazos Salazar^{a, b*}

0000-0002-6451-1569

Juan C. Benítez Serrano^b

0000-0002-2338-9763

José L. Calderón Chamorro^b

0000-0001-6766-0570

Rigoberto Hernández-Castro^c

0000-0002-5656-0942

Efrén Díaz Aparicio^d

0000-0002-1669-1323

José A. Aguilar Setién^e

0000-0003-1339-2931

^a Posgrado en Ciencias de la Salud y Producción Animal
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
Av. Universidad 3000, 04510, DF, México

^b Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Químicas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Av. San Claudio y 18 Sur, San Manuel, 72570
Puebla, México

^c Departamento de Ecología de Agentes Patógenos
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"
Secretaría de Salud
Tlalpan, 14080, DF, México

^d Centro Nacional de Investigación
Disciplinaria en Microbiología
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales,
Agrícolas y Pecuarias
Carretera Federal México-Toluca km 15.5,
Cuajimalpa, 05110, DF, México

^e Hospital de Pediatría
Unidad de Investigación Médica en Inmunología
Coordinación de Investigación Médica
Instituto Mexicano del Seguro Social
Centro Médico Nacional Siglo XXI
06720, DF, México

***Autor para correspondencia:**
Tel: + 52 22-2229-5500 ext. 7379, 7390
Fax: + 52 22-2244-3106
Correo electrónico:
nidianaye@hotmail.com

Recibido: 2015-03-12

Aceptado: 2015-06-29

Publicado: 2015-06-30

Información y declaraciones adicionales
en la página 11

© Derechos de autor:
Nidia G. Pazos Salazar *et al.* 2015

acceso abierto 



Distribuido bajo una Licencia Creative Commons
Atribución 4.0 Internacional (CC-BY 4.0)

Resumen

Brucella abortus S19 es una cepa vacunal intracelular contra la brucelosis bovina. La rabia es una enfermedad letal en el ganado. Plásmidos codificantes de la glicoproteína G del virus de la rabia inducen una respuesta protectora en diferentes especies animales. En este trabajo se construyó el vector pB-BR4-CMV-Ggp-SV40+, para transformar la cepa vacunal *B. abortus* S19 y que codifica el gen G regulado por el promotor de citomegalovirus para la expresión eucariótica. Se evaluó la estabilidad de la cepa transformante tanto *in vitro* como *in vivo*. Para los ensayos *in vitro*, la cepa *B. abortus* S19 pB-BR4-CMV-Ggp-SV40+ se hizo crecer durante cinco pasajes secuenciales y para los ensayos *in vivo* se infectaron ratones BALB/c hembras. Se determinaron las unidades formadoras de colonia y se identificó el plásmido en cada uno de los pasajes, así como en los bazos a los siete días post infección. Para probar la estabilidad del plásmido en la cepa, todos las variables se midieron con y sin antibiótico. La concentración bacteriana fue más baja con antibiótico que sin él, pero el crecimiento de la bacteria fue más homogéneo. El plásmido se identificó en colonias aisladas en medios con y sin antibiótico tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. Las células BHK-21 se transfectaron con el plásmido construido y expresaron la glicoproteína G. La cepa *B. abortus* S19 pB-BR4-CMV-Ggp-SV40+ mostró estabilidad y representa un candidato adecuado como vector para desarrollar una vacuna bivalente contra brucelosis y rabia. Esta es la primera vez que se transforma una especie de *Brucella* con un plásmido de expresión eucariota.

Palabras clave: Glicoproteína G; Virus de la rabia; *Brucella abortus* S19; Promotor de CMV.

Introducción

La rabia y la brucelosis están consideradas como las principales enfermedades zoonóticas. Ambas afectan al ganado, representan un problema de salud animal y repercuten en la salud humana (Monath *et al.*, 2013).

La brucelosis bovina (BB) es causada principalmente por la bacteria intracelular *Brucella abortus* (Díaz, 2013). Existen diferentes cepas vacunales para prevenir la BB. *B. abortus* RB51 es una cepa rugosa que carece de la cadena-O en

su lipopolisacárido (LPS), por lo que no induce anticuerpos detectables en las pruebas de diagnóstico y esto ayuda a diferenciar entre animales vacunados e infectados (Schurig *et al.*, 2002). Sin embargo, aún existe controversia sobre su nivel protector.

B. abortus S19 es una cepa vacunal atenuada lisa debido a la presencia de la cadena-O en su LPS, que induce anticuerpos detectables en los ensayos serológicos; éste es el mayor problema asociado a la vacunación con la cepa S19 y existe también un riesgo de aborto de 2-3%. Esta cepa es altamente inmunogénica y ha demostrado ser la más efectiva contra BB (Nicoletti, 1990). La atenuación de esta cepa se ha asociado con una eliminación en el operón *ery*, que se detecta por PCR (Schurig *et al.*, 2002): en la cepa *B. abortus* S19 se amplifica un fragmento de 361 pb mientras que para otras cepas vacunales y de campo, el amplicón es de 1063 pb (Mukherjee *et al.*, 2005). En México, las terneras de 3-6 meses de edad se vacunan con la cepa S19 usando una dosis clásica de 10^{10} unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL) de vacuna reconstituida (en 5 mL), mientras que en novillas mayores a 6 meses, se administra una dosis reducida (3×10^8 UFC/mL).

El agente etiológico de la rabia parálitica bovina (RPB) es un virus ARN envuelto, que pertenece al género *Lyssavirus*, el cual se divide en al menos 11 genotipos (Rupprecht y Plotkin, 2013). El genotipo 1 está distribuido en todo el mundo e incluye al virus de la llamada rabia clásica, mientras que otros genotipos se restringen a ciertas regiones geográficas. El genotipo 1 sólo se encuentra en el continente americano donde existen zonas tropicales y subtropicales, que son un hábitat propicio para el murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*), principal transmisor del virus en el ganado (Lee *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2014).

El virus rábico contiene, en su envoltura, la glicoproteína G (gpG), que se reconoce como su principal antígeno, puesto que induce anticuerpos neutralizantes protectores (Cox *et al.*, 1977; Ross *et al.*, 2008). La gpG es la única proteína externa del virus y contiene 524 aminoácidos que forman distintos sitios antigénicos. El sitio antigénico I está formado por epítopos lineales y conformacionales; el sitio antigénico II es discontinuo, y el sitio antigénico III es un epítipo antigénico conformacional continuo. Otro sitio importante se conoce como G5: en este epítipo lineal está incluido el sitio antigénico IV que contiene sólo un aminoácido (Kuzmina *et al.*, 2013). Diferentes plásmidos vacunales que codifican la gpG han mostrado ser útiles para inducir una respuesta inmune antirrábica (Perrin *et al.*, 2000).

El plásmido pGQH contiene el gen G regulado por el promotor de expresión eucariótica de citomegalovirus (CMV); induce la producción de un título alto de anticuerpos, que protegen contra la rabia en ratones y perros (Tesoro *et al.*, 2006), y también es eficiente como tratamiento profiláctico post-exposición en conejos y ratones (Tesoro *et al.*, 2008).

La principal medida para el control de ambas enfermedades es la vacunación y por ello se están estudiando alternativas que ayuden a mejorar el manejo de las vacunas. Para desarrollar una nueva opción se han considerado los siguientes aspectos:

1. Las bacterias intracelulares atenuadas han mostrado ser útiles como vectores para entregar plásmidos directamente a las células presentadoras de antígeno (CPA's), como macrófagos y células dendríticas (Dietrich *et al.*, 2001). *B. abortus* es una bacteria intracelular y las cepas virulentas son capaces de sobrevivir

- dentro de los macrófagos. La cepa vacunal *B. abortus* S19 posee las características de un vector bacteriano y puede ser destruida por las células fagocíticas (Arenas *et al.*, 2000; Pizarro Cerdá *et al.*, 1998), así que ofrece la posibilidad de entregar un plásmido a las CPA's después de su desintegración intracelular.
2. Los plásmidos vacunales de ADN, como el pGQH que se describió previamente, codifican un antígeno controlado por un promotor eucariótico. *B. abortus* puede transformarse de forma estable con plásmidos procarióticos de la familia pBBR1MCS (Elzer *et al.*, 1995); sin embargo, nunca se ha transformado con un plásmido de expresión eucariota.

Los objetivos del presente estudio fueron los siguientes: 1) construir un plásmido codificante de la gpG del virus rábico regulado por el promotor de CMV y utilizarlo para transformar a la cepa vacunal *B. abortus* S19, y 2) evaluar la estabilidad *in vitro* e *in vivo* de la cepa transformante, así como determinar la expresión de la proteína a partir del plásmido construido. En caso de alcanzar estas metas, se habrá cumplido con la primera etapa para desarrollar una vacuna bivalente contra brucelosis y rabia.

Materiales y Métodos

Plásmidos

El plásmido pGQH descrito por Tesoro *et al.* (2008) contiene un gen G (1576 pb) flanqueado por el sitio *Xba*I. Este gen (aislamiento HQ01-IMSS) se obtuvo del cerebro de una persona que murió de rabia transmitida por un murciélago hematófago. El plásmido pBBR1MCS-4 es un plásmido de número de copias moderadas y se mantiene como un elemento extracromosomal. Es miembro de la familia del plásmido pBBR1MCS; la diferencia está en el gen de resistencia: pBBR1MCS es *cm^r*, mientras pBBR1MCS-4 es *amp^r* (Kovach *et al.*, 1995).

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas de *B. abortus* S19 y *Escherichia coli* TOP-10 (F-*mcrA*Δ (mrr-hsdR-MS-*mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 nupG recA1 araD139*Δ (ara-leu) 7697 *galE15 galK16 rpsL* (Str) *endA1 λ-*) se hicieron crecer en caldo soya tripticaseína (CST) a 37 °C con agitación orbital, o en agar soya tripticaseína (AST). Cuando fue necesario, se agregó ampicilina (Amp) a una concentración de 100 µg/mL de medio.

Construcción del plásmido

El plásmido pGQH se restringió con las enzimas *Bam*HI y *Bgl*II, que generan extremos compatibles para liberar el fragmento que contiene el gen G regulado por el promotor de CMV. Dicho fragmento se ligó al plásmido pBBR1MCS-4, que se digirió previamente con *Bam*HI (figura 1). El inserto que se clonó también incluyó la región conocida como potenciador/promotor SV40, que contiene el origen de replicación necesario para la propagación episomal del plásmido en células eucariotas y se incorporó al inserto para mantener al plásmido en el huésped.

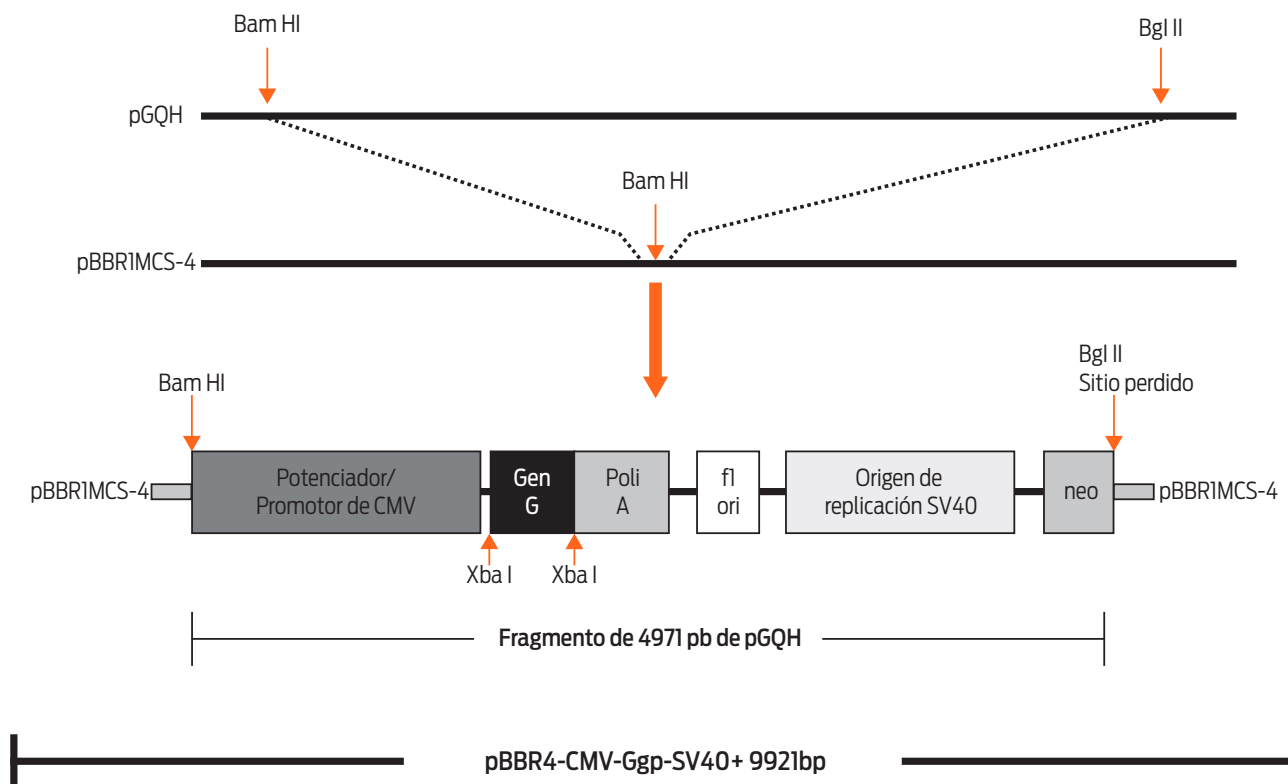


Figura 1. Diagrama de construcción del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+.

Con el ADN construido se transformó la cepa de *E. coli* TOP-10. El nuevo plásmido se caracterizó mediante restricción enzimática: *Bam*HI lo linealizó y *Xba*I liberó el gen G. El plásmido recombinante se llamó pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ y se purificó utilizando el sistema Endo Free Giga Plasmid Kit (Qiagen, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El gen G se secuenció del plásmido puro empleando los *primers* externos Ggp1 y Ggp2, así como los *primers* internos Gli1 y Gli2. Para diseñar los *primers* internos, se incluyó la mayoría de los sitios antigénicos de la glicoproteína, donde el fragmento amplificado fue de 736 pb.

Transformación de *B. abortus* S19

La cepa *B. abortus* S19 se transformó con el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ mediante electroporación. Se le aplicó un pulso de 2.5 -Kv y se utilizaron 3 μ g de plásmido. Las colonias resistentes a ampicilina (Ampr) se analizaron mediante PCR usando los *primers* 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' y 5'-CGAGGTCGACGGTATCG-3' para amplificar un fragmento de 5100 pb, que corresponde al inserto ligado en el plásmido pBBR1MCS-4. El protocolo de amplificación fue: desnaturalización a 96 °C por un minuto, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineamiento a 64 °C por 45 segundos, extensión a 72 °C por 5 minutos, y una incubación final a 72 °C por 10 minutos. Las mismas colonias se analizaron utilizando los *primers* descritos por Sangari *et al.* (1994) y Mukherjee *et al.* (2005) para identificar el amplicón de 361 pb del operón *ery* eliminado como marcador genético de atenuación. Como controles de reacción se incluyeron los

siguientes: cepa *B. abortus* RB51 para el operón *ery* no eliminado y *E. coli* conteniendo al pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ como testigo negativo de *ery* y testigo positivo del plásmido, respectivamente. La cepa transformante se llamó *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+.

Estabilidad in vitro del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+

La estabilidad de *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ se evaluó de acuerdo con el método reportado por Elzer *et al.* (1995). La cepa se hizo crecer en CST-Amp durante 48 horas; de este cultivo, 100 μ L se transfirieron a 5 mL de CST o CST-Amp y se incubaron por 48 horas para obtener el pasaje 1. El proceso se repitió sucesivamente hasta el pasaje 5. De cada pasaje se realizaron diluciones seriadas para determinar por triplicado la cantidad de UFC/mL bajo tres condiciones: 1) bacterias cultivadas en CST y aisladas en AST (CST/AST); 2) bacterias cultivadas en CST y aisladas en AST-Amp (CST/AST-Amp), y 3) cultivo testigo, constituido por bacterias cultivadas en CST-Amp y aisladas en AST-Amp (CST-Amp/AST-Amp). De cada condición se tomaron colonias al azar y se evaluaron por PCR para identificar el amplicón de 5100 pb correspondiente al plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+.

Inoculación de ratones BALB/c con la cepa *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+

Tres ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad se inocularon vía intraperitoneal (i.p.) con 0.25 mL de PBS con $\sim 10^6$ UFC de *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ o con sólo 0.25 mL de PBS (grupo testigo). Siete días después los animales se sacrificaron por dislocación. Los bazo se pesaron y homogenizaron en 1 mL de PBS, se sembraron en placas de AST y AST-Amp y se determinó la cantidad de UFC/bazo mediante diluciones seriadas.

A las colonias del bazo se les aplicó una PCR múltiple para identificar simultáneamente el operón *ery* eliminado y el gen G. Para la proteína de la rabia se utilizaron los siguientes *primers* internos: Gli1, delantero 5'-ACACAATCCGTACCCT-GACT-3', y Gli2, reverso 5'-CCCGTTTACATGAGGATGAC-3'. Ambos amplicones, el del gen G (736 pb) y el de la eliminación en el operón *ery* (361 pb), se obtuvieron como sigue: desnaturalización a 96 °C por un minuto, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 seg, alineamiento a 64 °C por 45 seg, extensión a 72 °C por un minuto, y una incubación a 72 °C por 10 minutos.

Todos los procedimientos experimentales y el cuidado de los animales se realizaron de acuerdo con la *Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio* (2011), según la NOM-062-ZOO-1999, que regula el cuidado y uso apropiado de los animales de laboratorio en México, y con la aprobación de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (licencia BCB/CCUAL/118/2013).

Expresión de la glicoproteína en células eucariotas

Se cultivaron células BHK-21 en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) con 10% de suero fetal bovino (SFB) durante la fase de crecimiento. Las células se cosecharon hasta la fase logarítmica, se transfectaron 1×10^6 células por electroporación con 15 μ g del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ y se aplicó un pulso de 140 V

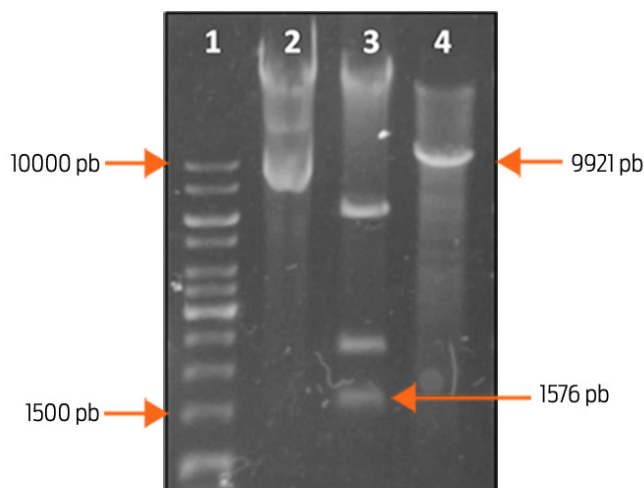


Figura 2. Digestión del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ con dos enzimas de restricción. Carriles: 1, escalera ADN de 1 Kb; 2, pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ purificado; 3 y 4, plásmido restringido con *XbaI* y *BamHI*, respectivamente. El fragmento de 9921 pb corresponde al tamaño esperado del constructo. El fragmento de 1576 pb se liberó del plásmido y corresponde al gen G.

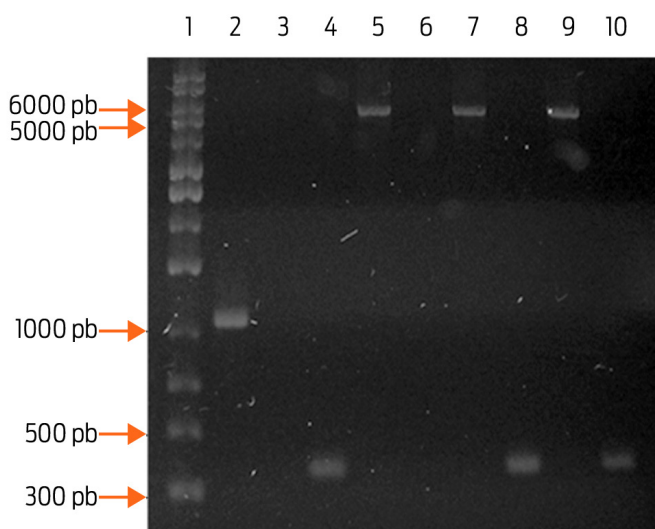


Figura 3. Identificación de la cepa transformada *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+. Se aplicaron PCR's individuales con los *primers* pBBR y *ery* a los candidatos de *B. abortus* S19. El fragmento de 5100 pb corresponde al plásmido; el fragmento de 361 pb, al operón *ery* eliminado y el fragmento de 1063 pb, al operón *ery* no eliminado. Carriles: 1, escalera de ADN de 1 Kb; 2, *B. abortus* RB51 como testigo del operón *ery* no eliminado; 3, *E. coli* TOP-10 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ como testigo negativo del operón *ery*; 4, *B. abortus* S19 con el operón *ery* eliminado; 5, *E. coli* TOP-10 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ como testigo del plásmido; 6, *B. abortus* S19 como testigo negativo del plásmido; 7 y 8, candidato 1 evaluado por PCR para detectar la presencia del plásmido y del operón *ery*, respectivamente; 9 y 10, candidato 2 evaluado por PCR para detectar la presencia del plásmido y del operón *ery*, respectivamente.

durante 25 msec en una celda de 0.2 cm que contenía 0.1 mL de la suspensión celular.

La expresión de la proteína se monitoreó a las 24, 48 y 72 h post-transfección y se incluyó un testigo de células no transfectadas. Como anticuerpo primario se empleó una IgG humana policlonal con 150 UI/mL de anticuerpos antirrábicos neutralizantes, en una dilución 1:50. La proteína se reveló con una dilución 1:100 de un suero de cabra anti humano IgG-FITC.

Análisis estadístico

Los datos de UFC se trataron por transformación logarítmica y posteriormente se examinaron los residuales. Las varianzas resultaron homogéneas dentro del rango de las medias. Los datos de los ensayos *in vitro* se analizaron mediante un ANDEVA de una vía con la prueba de Dunnett, y las cargas bacterianas en los ensayos *in vivo* (UFC/bazo) se analizaron con la prueba t de Student, empleando el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA). Un valor de $P < 0.05$ se consideró significativo para ambas pruebas.

Resultados

Construcción del plásmido recombinante y transformación de la cepa de *B. abortus* S19 con el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+

Después de la extracción, el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ se restringió con *BamHI* y *XbaI* para verificar el tamaño del constructo y para liberar el gen G, respectivamente. La digestión con *XbaI* liberó tres fragmentos de 6057, 2283, y 1576 pb, este último correspondiente al gen G (figura 2).

La digestión con *BamHI* produjo un plásmido lineal de 9921 pb, que indicó la pérdida del sitio *BglII* (figura 2). Se obtuvo la secuencia completa del gen G y los resultados preliminares mostraron que el aislamiento mexicano HQ01-IMSS mantiene los aminoácidos considerados como invariables en todos los sitios antígenicos de la gpG.

La figura 3 muestra la eliminación del operón *ery* y la presencia del plásmido recombinante en la cepa *B. abortus* S19 después de la electroporación. Mientras, el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ se mantuvo estable en la cepa *B. abortus* S19 bajo condiciones *in vitro*.

Las concentraciones bacterianas (Log_{10} UFC/mL) en cada medio fueron:

- Cultivo testigo (CST-Amp/AST-Amp)= 8.54
- Cultivo CST/AST-Amp= 8.44
- Cultivo CST/AST= 9.13

La concentración bacteriana fue más alta ($P < 0.05$) en el cultivo CST/AST que en las otras dos condiciones de cultivo (figura 4a). Mientras que no se observaron diferencias en la concentración bacteriana entre los pasajes del cultivo CST-Amp/AST-Amp ($P > 0.05$), se observó variabilidad tanto en el cultivo de CST/AST como en el de CST/AST-Amp (figura 4b). En particular, en el cultivo CST/AST, la concentración de bacterias mostró una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en los pasajes 2, 3 y 5 con respecto al pasaje 1, y en el cultivo CST/AST-Amp se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en la concentración bacteriana de los pasajes 2 y 5 con respecto al pasaje 1. Además, el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ se identificó en todas las colonias aisladas de AST-Amp y en diferentes colonias aisladas de AST (figura 4c).

La estabilidad del plásmido se mantuvo en la cepa *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ durante la infección en ratón BALB/c. El cuadro 1 muestra los resultados de los homogenizados de bazo. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la concentración bacteriana en medio con y sin antibiótico. Todas las colonias analizadas de ambos medios fueron positivas al operón *ery* eliminado. Todas las colonias aisladas en presencia de antibiótico fueron positivas al gen G y solamente una colonia aislada en ausencia de antibiótico resultó positiva al gen G (figura 5). El plásmido se extrajo de todas las colonias positivas al gen G (datos no mostrados). El plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ indujo la expresión de la gpG del virus de la rabia en células eucariotas.

Después de la transfección en células BHK-21, la gpG se detectó a las 24, 48 y 72 h. No se detectó proteína en las células testigo. La figura 6 muestra la expresión de la proteína a las 48 h (no se muestra la expresión a las 24 y 72 h). Estos resultados indican que la proteína viral se expresó apropiadamente en células eucariotas con el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+.

Discusión

Los plásmidos vacunales están formados por un gen de interés, controlado por un fuerte promotor de expresión eucariota; una secuencia de poliadenilación, que estabiliza a los ARNm transcritos, y genes de resistencia para la selección de bacterias (Gurunathan *et al.*, 2000). En este estudio se construyó el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+, el cual codifica para la proteína más inmunogénica del virus de la rabia, la gpG, que se ligó al promotor de CMV para fortalecer la expresión genética en células eucariotas. También se incluyeron la secuencia de poliadenilación y el origen de replicación de SV40 para mantener la replicación del plásmido en el huésped. El plásmido construido se basó en el pBBR1MCS-4, un plásmido empleado para transformar diferentes especies de *Brucella* (Kovach *et al.*, 1995). El gen G secuenciado (aislamiento HQ01-IMSS) tiene un tamaño de 1575 pb

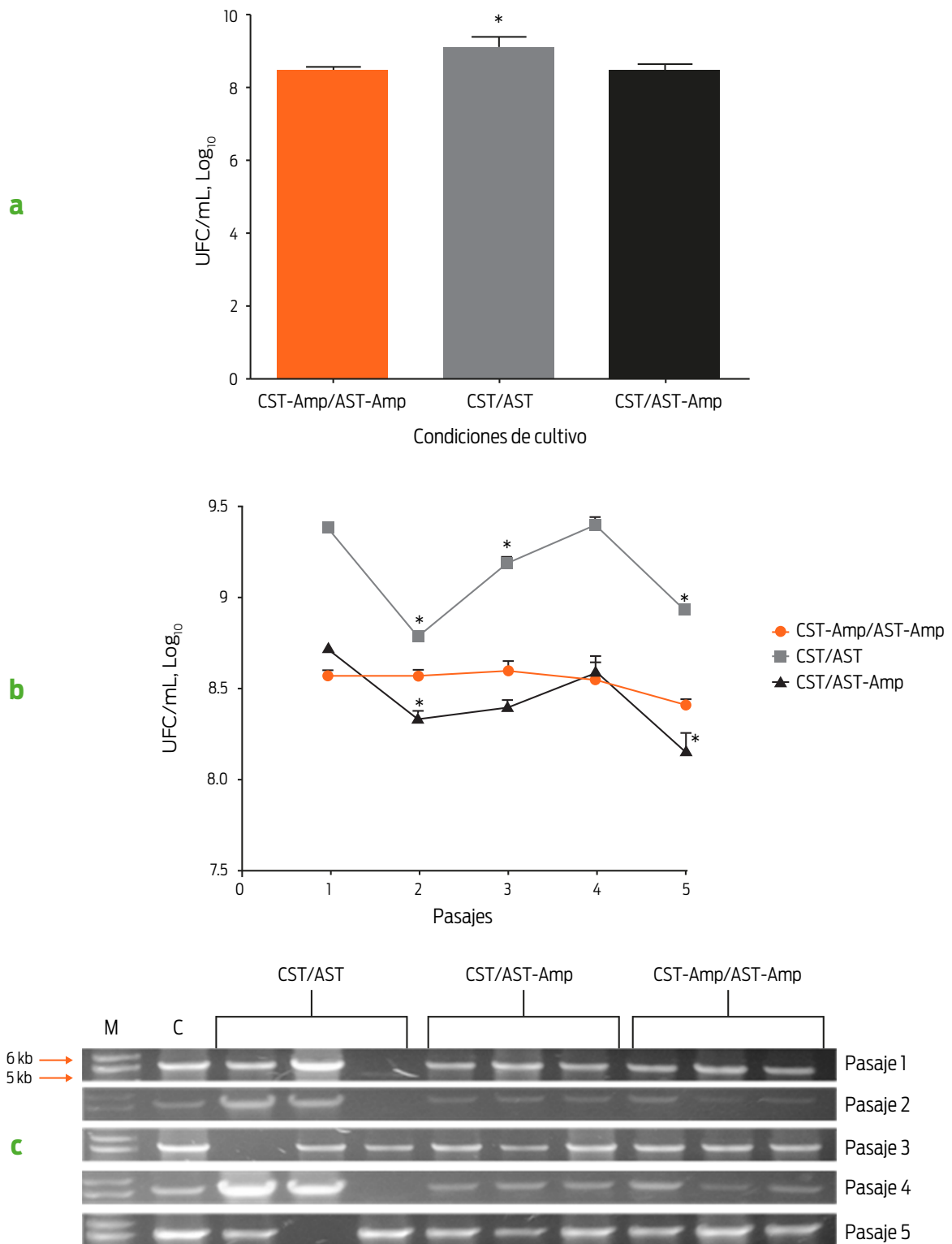


Figura 4. Estabilidad *in vitro* del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ bajo diferentes condiciones. **(a)** Concentración media de *B. abortus* pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ después de 5 pasajes en cultivo con y sin antibiótico; * diferencia significativa ($P < 0.05$) con CST-Amp/AST-Amp. **(b)** Concentración de bacterias en cada pasaje bajo diferentes condiciones; *diferencia significativa ($P < 0.05$) con pasaje 1. **(c)** Identificación del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ en colonias de *B. abortus* S19; M, marcador de peso molecular: escalera de ADN de 1 Kb; C, testigo: cepa de *B. abortus* pBBR4-CMV-Ggp-SV40+; CST, caldo soya tripticaseína; AST, agar soya tripticaseína; Amp: ampicilina (100 µg/mL).

Cuadro 1. Peso del bazo y concentración de la cepa de *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ aislada de ratones BALB/c experimentalmente infectados.

	Inoculación con	
	PBS	<i>B. abortus</i> S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+
Peso del bazo (g)	0.120 ± 0.009	0.100 ± 0.014
UFC/bazo, Log ₁₀		
AST-Amp		2.8 ± 1.2
AST		4.0 ± 1.1

Los ratones se inocularon vía intraperitoneal (i.p.) con 0.25 ml de PBS con $\sim 10^6$ UFC de la cepa o con sólo 0.25 mL de PBS (grupo testigo). Los resultados son el promedio de tres ratones \pm la desviación estándar.

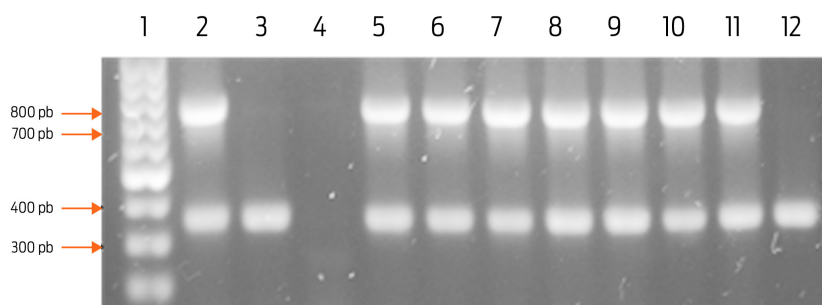


Figura 5. Estabilidad *in vivo* del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+. Ratones hembras BALB/c se infectaron con *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+. Siete días después, los bazos homogenizados se sembraron y se aplicó una PCR múltiple a las colonias aisladas para detectar simultáneamente el operón *ery* eliminado (361 pb) y el gen G (736 pb). Carriles: 1, escalera de ADN de 100 pb; 2, *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+; 3, *B. abortus* S19; 4, *E. coli*; 5-10, colonias aisladas en AST-Amp; 11 y 12, colonias aisladas en TSA.

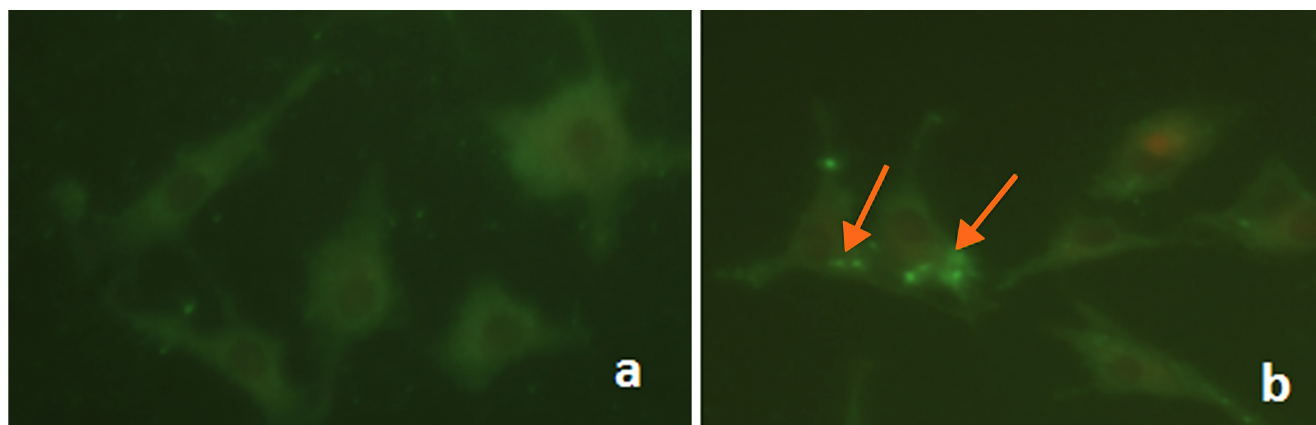


Figura 6. Expresión de la glicoproteína G del virus de la rabia a partir del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ en células eucariotas. Las células BHK-21 se transfectaron con 15 μ g del plásmido construido. La proteína se detectó a las 24, 48 y 72 h con una IgG humana policlonal antirrábica. **a** y **b**, células BHK-21 no transfectadas y transfectadas, respectivamente, ambas a las 48 h (24 y 72 h no mostradas). Las flechas señalan a la glicoproteína G.

y codifica para una proteína de 524 aminoácidos que contiene las secuencias para los sitios antigénicos.

El uso de bacterias intracelulares atenuadas mejora la entrega de plásmidos vacunales a un huésped (Dietrich *et al.*, 2001). La cepa vacunal de *B. abortus* S19 es tanto intracelular como atenuada, y se transformó con el plásmido construido para generar la cepa *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+, que mantuvo el marcador de atenuación o la eliminación del operón *ery*. La cepa de *B. abortus* S19 ya ha sido transformada con plásmidos codificantes de proteínas heterólogas (Comerci *et al.*, 1998; Sabio y García *et al.*, 2008; Sabio y García *et al.*, 2010), pero en todos los casos, la expresión de la proteína depende de un promotor procariota. Este es el primer reporte de transformación de *B. abortus* utilizando un promotor de expresión eucariota.

Para evaluar la estabilidad del plásmido construido que codifica el gen G, se realizaron ensayos *in vitro* e *in vivo*. El cultivo de la bacteria mediante pasajes sucesivos en medios con y sin un factor de selección, es una estrategia que se estableció cuando se evaluó la estabilidad del plásmido pBBR1MCS en diferentes especies de *Brucella* (Elzer *et al.*, 1995). Los ensayos de estabilidad *in vitro* mostraron una concentración significativamente menor de *B. abortus* pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ en el medio complementado con antibiótico que en el medio sin antibiótico, aunque la concentración bacteriana en los cultivos complementados con antibiótico fue homogénea. El plásmido que se construyó tiene un tamaño de 9921 pb, de modo que podría resultar muy pesado para que la bacteria transformada lo replicara. Sin embargo, la variabilidad observada en el crecimiento de la bacteria transformante y la identificación del plásmido cuando estas bacterias se cultivaron en un medio sin antibiótico podrían indicar que, aunque el plásmido confiere la habilidad de resistir circunstancias adversas, no es esencial para la viabilidad debido a que *Brucella* no contiene plásmidos naturalmente (Cresta *et al.*, 2008). Así que, en ausencia de presión selectiva, podría ocurrir una pérdida espontánea del plásmido en parte de la población.

La concentración de bacteria transformada recuperada en los ensayos *in vivo* de los bazos homogenizados resultó similar a otros resultados reportados previamente (Comerci *et al.*, 1998, Sabio y García *et al.*, 2008). La PCR múltiple utilizada en este estudio fue capaz de identificar el plásmido y la eliminación del operón *ery* en las colonias con y sin antibiótico, lo cual indica que esta prueba puede ser una herramienta de diagnóstico útil para diferenciar entre la cepa *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ y las cepas de campo, y también para diferenciar a los animales infectados de los vacunados con *B. abortus* S19 (Pacheco *et al.*, 2012). Estos resultados también demuestran que el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ se mantiene estable en la cepa transformada *B. abortus* S19 en ausencia de presión selectiva.

La transfección de células BHK-21 con el plásmido mostró que el constructo indujo la expresión de la gpG del virus de la rabia, con lo que se hace evidente la funcionalidad del pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ en un modelo eucariota. Estos resultados son alentadores, porque ahora podría esperarse que *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ entregue el plásmido a los macrófagos después de la destrucción de la bacteria y con ello se induzca una estimulación simultánea de la respuesta anti *Brucella* inherente a esta cepa y la respuesta inmune contra la proteína rábica.

Todavía se requieren más estudios para producir una vacuna bivalente y es bien sabido que las estrategias de vacunación actuales tanto para la brucelosis como para la rabia están funcionando apropiadamente. Sin embargo, valdría la pena aprovechar la naturaleza intracelular de *B. abortus* y utilizar la cepa S19 para que actúe como vector y entregue un plásmido que codifique el principal antígeno del virus de la rabia directamente a las CPA's. Para evaluar esta idea, sería necesario realizar ensayos de infección en cultivos celulares con una línea de macrófagos infectados con la cepa transformante para demostrar la expresión de la gpG a partir del plásmido entregado por la bacteria. También se tendría que estudiar la inmunización en el modelo de ratón y, si fuera posible, hacer estudios de campo en el ganado, considerando las restricciones de regulación. Una vacuna bivalente aportaría otro beneficio importante: se incrementaría el número de animales inmunizados en las campañas de vacunación, porque el ganadero conseguiría tener a sus animales vacunados contra dos enfermedades en una sola ocasión. Además, los costos de producción se reducirían, pues una vacuna bacteriana requiere medios inertes más económicos que la infraestructura necesaria para producir una vacuna viral. En este estudio se ha demostrado que *Brucella* puede aceptar y mantener un plásmido de expresión eucariota que codifica una proteína viral; este conocimiento podría usarse para desarrollar vacunas contra otras enfermedades como la diarrea viral bovina o la rinotraqueitis infecciosa bovina, en las que los principales antígenos son glicoproteínas (Brodersen, 2014; Suman *et al.*, 2013)

Conclusiones

La cepa *B. abortus* S19 se transformó exitosamente con el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ para inducir la expresión de la glicoproteína G del virus de la rabia y mostró estabilidad *in vivo* e *in vitro*. Además, las evidencias demostraron que el plásmido construido indujo la expresión de la glicoproteína G en células eucariotas.

Financiamiento

Esta investigación fue financiada por el Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano de Seguro Social, proyecto No. FIS/IMSS/PROT/1266.

Agradecimientos

Nidia Pazos Salazar contó con el apoyo de una beca PROMEP de la Secretaría de Educación Pública y de la beca 366670 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México. Agradecemos al veterinario Carlos Escamilla Weimman del Bioterio *Claude Bernard*, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por su excelente asesoría y el cuidado de los animales.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Nidia G. Pazos Salazar: concibió el estudio, desarrolló todos los ensayos y escribió el manuscrito.

José A. Aguilar Setién: concibió el estudio.

Juan C. Benítez Serrano y José Calderón Chamorro: ayudaron en la construcción del plásmido.

Rigoberto Hernández Castro y Efrén Díaz Aparicio: ayudaron en todos los ensayos con *B. abortus* S19.

Referencias

- 1) Arenas GN, Staskevich AS, Aballay A, Mayorga LS. 2000. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infection and Immunity*, 68: 4255–4263.
- 2) Brodersen BW. 2014. Bovine viral diarrhea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. *Veterinary Pathology*, 51:453-464.
- 3) Comerci DJ, Pollevick GD, Vigliocco AM, Frasc ACC, Ugalde RA. 1998. Vector development for the expression of proteins in the vaccine strain *Brucella abortus* S19. *Infection and Immunity*, 66:3862-3866.
- 4) Cox JH, Dietzscold B, Schneider LG. 1977. Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infection and Immunity*, 16:754-9.
- 5) Crasta OR, Folkerts O, Fei Z, Mane SP, Evans C, Martino-Catt S, et al. 2008. Genome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes. *PLoS ONE* 3(5):e2193. doi:10.1371/journal.pone.0002193.
- 6) Díaz AE. 2013. Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, 32:43-51.
- 7) Dietrich G, Kolb-Maüer A, Simone S, Manfred S, Werner G, Ivaylo G. 2001. Gram-positive and Gram-negative bacteria as carrier systems for DNA vaccines. *Vaccine*, 19:2506–2512.
- 8) Elzer PH, Kovach ME, Phillips RW, Robertson GT, Peterson KM, Roop RM. 1995. *In vivo* and *in vitro* stability of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS in six *Brucella* Species. *Plasmid*, 33:51-57.
- 9) National Research Council. *Guide for the care and use of laboratory animals*. 2011. 8th edition. Washington, DC, USA: The National Academies Press.
- 10) Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. 2000. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annual Review of Immunology*, 18:927–974.
- 11) Johnson N, Aréchiga CN, Aguilar S.A. 2014. Vampire bat rabies: ecology, epidemiology and control. *Viruses*, 6:1911-1928.
- 12) Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, Peterson KM. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166:175-176.
- 13) Kuzmina NA, Kuzmin IV, Ellison JA, Rupprecht CE. 2013. Conservation of binding epitopes for monoclonal antibodies on the rabies virus glycoprotein. *Journal of Antivirals and Antiretrovirals*, 5:037-043.
- 14) Lee DN, Papes, M, Van Den Bussche RA. 2012. Present and potential future distribution of common vampire bats in the Americas and the associated risk to cattle. *PLoS ONE* 7(8):e42466. doi:10.1371/journal.pone.0042466.

- 15) Monath TP. 2013. Vaccines against diseases transmitted from animals to humans: a one health paradigm. *Vaccine*, 31:5321–5338.
- 16) Mukherjee F, Jain J, Grillo MJ, Blasco JM, Nair M. 2005. Evaluation of *B. abortus* S19 vaccine strains by bacteriological tests, molecular analysis of *ery* loci and virulence in BALB/c mice. *Biologicals*, 33:153-160.
- 17) Nicoletti P. 1990. Vaccination. In: Nielsen K, Duncan JR (eds.) *Animal brucellosis*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- 18) [NOM-062] Norma Oficial Mexicana [06 dic 1999]. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México: DOF-Sagarpa.
- 19) Pacheco WA, Genovez ME, Pozzi CR, Silva LMP, Azevedo SS, Did CC, Piatti RM, Pinheiro ES, Castro V, Miyashiro S, Gambarini ML. 2012. Excretion of *Brucella abortus* vaccine B19 strain during a reproductive cycle in dairy cows. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(2):594-601.
- 20) Perrin P, Jacob Y, Aguilar-Setién A, Loza-Rubio E, Jallet C, Desmézieres E, Aubert M, Cliquet F, Tordo N. 2000. Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine*, 18:479-486.
- 21) Pizarro-Cerdá J, Méresse S, Parton RG, Goot GVD, Sola-Landa A, López –Goñi I, Moreno E, Gorvel JP. 1998. *Brucella abortus* transit through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infection and Immunity*, 66:5711-5724.
- 22) Ross BA, Favi CM, Vásquez VA. 2008. Glicoproteína del virus rábico: estructura, inmunogenicidad y rol en la patogenicidad. *Revista Chilena de Infectología*, 25:14-18.
- 23) Rupprecht CE, Plotkin SA. 2013. Rabies vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA (eds.) *Vaccines*. 6th ed. The University of Pennsylvania, PA, USA: Elsevier Saunders.
- 24) Sabio y García JV, Bigi F, Rossetti O, Campos E. 2010. Expression of MPB83 from *Mycobacterium bovis* in *Brucella abortus* S19 induces specific cellular immune response against the recombinant antigen in BALB/c mice. *Microbes and Infection*, 12:1236-1243.
- 25) Sabio y García JV, Farber M, Carrica M, Cravero S, Macedo GC, Bigi F, Sergio OC, Rossetti O, Campos E. 2008. Expression of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein 1 (RAP1) in *B. abortus* S19. *Microbes and Infection*, 10:635-641.
- 26) Sangari FJ, Garcia-Lobo JM, Agüero J. 1994. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiology Letters*, 121:337-42.
- 27) Schurig G, Sriranganathan N, Corbel M. 2002. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Veterinary Microbiology*, 90:479-496.
- 28) Suman B, Samiran B, Umesh D, Pabitra HP. 2013. Bovine herpesvirus-1 (BHV-1)—a re-emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis. *Veterinary Quarterly*, 33(2):68-81.
- 29) Tesoro CE, Feria RIA, López MJG, Orozco SS, Hernández GR, Blanco FF, Pérez TA, Aguilar SJA. 2008. Efficient post-exposure prophylaxis against rabies by applying a four-dose DNA vaccine intranasally. *Vaccine*, 26:6936–6944.
- 30) Tesoro-Cruz E, Hernández-González R, Alonso-Morales R, Aguilar-Setién A. 2006. Rabies DNA vaccination by the intranasal route in dogs. *Developmental Biology*, 125:221–31.