



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la
Producción y de la Salud Animal**

***B. abortus* S19 como vector de una vacuna génica contra la rabia**

Tesis

**Para optar por el grado de
Doctora en Ciencias**

Presenta

MC. Nidia Gary Pazos Salazar

Tutor

Dr. José Álvaro Aguilar Setién
Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS

Comité tutor

Dr. Efrén Díaz Aparicio
CENID-Microbiología, INIFAP
Dr. Rigoberto Hernández Castro
Hospital General Dr. Manuel Gea González. SS

Ciudad de México. Septiembre 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Te respeto y te honro por haberme enseñado
que sobre este importante logro hay otro doctorado.

Se llama ***Vivir***

Quédate a mi lado porque te voy a seguir necesitando.

Gracias Vida

Agradecimientos

Porque hay dos personas en el mundo que serían capaces de dar la vida por mí y me regalaron vida de su vida misma, dándome fuerza sin perder la sensibilidad.

Juana María y Emilio.

Lo han hecho muy bien. Gracias papás!!!!

Miro hacia atrás y agradezco, me ubico en el presente y vivo. ¿Y el futuro? quién sabe, desde acá lo construyo.

Nidia Gary, Gracias.

Porque mi vida solo está completa cuando ustedes están en ella.

Nidia Arelly y Naschielly. Gracias hijas

Quería decirles mucho y no encontraba como, así que elegí lo más sencillo: La mejor familia del mundo me tocó a mí!!!!

Naye, Tricya y Yin. Gracias hermanos.

Nayita, Moshi, Brandon, Willy y Max. Mis hermosos sobrinos.

Existe esa familia que tenemos la bendición de elegir, los amigos.

Paty, Gloria, Anita, José Luis. Gracias

Encontré un espacio, abrigo, verdades, enseñanzas y un lugar donde me enfrento a mí misma para llegar a la mejor versión de mí.

Espíritu guerrero. Gracias

En el camino para cumplir este proyecto hubo personas que compartieron el esfuerzo, la satisfacción cuando se obtenían resultados y la desesperación cuando no se lograban.

MC. Juan Carlos Benítez Serrano

QFB. José Luis Calderón Chamorro

MC. Jesús Manuel Huerta Campos

QFB. Hugo Valencia Martínez

MC. Laura Martínez Pérez

Dra. Patricia Aguilar Alonso

Sección poblana de este trabajo. Gracias

A los compañeros del Laboratorio del CMNSXXI del IMSS en el DF.

Dra. Mónica Salas Rojas

MC. Martha García Flores

Dr. Leonardo Perea Martínez

MC. Memo Gálvez Romero

Por regalarme un espacio de su tiempo, su ayuda y orientación cada vez que llegaba “Nidia de Puebla” a invadir el laboratorio porque necesitaba sacar resultados

Al comité tutor

Dr. Álvaro Aguilar Setién

Gracias por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto para obtener el doctorado.

Dr. Efrén Díaz Aparicio

Gracias por su apoyo, amistad, por permitirme convivir con su familia y hacerme sentir que siempre conté con usted. Lo admiro como persona.

Dr. Rigoberto Hernández Castro

Gracias por motivar la mentalidad de “Si una puerta se abre; abrimos otra, si no hay; buscamos una ventana y si no la encontramos; hay que hacer un hoyo pero, encontraremos la manera de avanzar”

Al comité revisor y jurado

Dr. Francisco Suárez Güemes

Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

Dr. Juan Antonio Montaña Hirose

Dr. Humberto Ramírez Mendoza

Dr. José Álvaro Aguilar Setién

Por sus aportaciones y ayuda para mejorar esta tesis

A la **MC. Clara Aguilón García**

De quien recibí el apoyo como secretaria del posgrado, pero todavía más la comprensión como persona.

Al MVZ. Carlos Escamilla Weinman y MVZ. Francisco Ramos Collaso

Del Bioterio Claude Bernard de la BUAP. Por toda su orientación y apoyo para el manejo de los animales

A la **UNAM** y a la **BUAP**

Las dos grandes instituciones donde desarrollé este trabajo.

Índice General

Contenido.....	i
Índice de Figuras.....	iii
Índice de Tablas.....	iii
Índice de Gráficas.....	iv
Lista de abreviaturas.....	v
Artículo publicado.....	vi
Presentación de resultados en diferentes foros.....	xix
Resumen de tesis.....	xxi
Thesis Abstract.....	xxii

Contenido

Capítulo 1. El Género <i>Brucella</i>	1
1.1 Generalidades.....	1
1.2 Antígenos de <i>Brucella</i>	2
1.3 Brucelosis.....	5
1.3.1 Brucelosis bovina (BB).....	6
1.3.2 <i>Brucella abortus</i>	7
1.4 Respuesta inmune contra <i>Brucella</i>	8
1.4.1 Inmunidad innata.....	8
1.4.1.1 Células presentadoras de antígeno.....	8
1.4.1.2 Neutrófilos.....	8
1.4.1.3 Células Natural Killer.....	9
1.4.2 Respuesta inmune específica.....	9
1.4.2.1 Inmunidad celular.....	9
1.4.2.2 Inmunidad humoral.....	10
1.4.2.2.1 Anticuerpos.....	10
1.4.2.2.2 Citocinas.....	11
Capítulo 2. El virus de la Rabia	12
2.1 Ciclo de Replicación del virus de Rabia.....	14
2.2 Aspectos moleculares de las proteínas del virus rábico.....	15
2.3 La glicoproteína G.....	15
2.3.1 Estructura.....	15
2.3.2 Inmunogenicidad.....	16
2.3.3 Papel de la gpG en la patogenicidad viral.....	17
2.4 Respuesta inmune contra el virus de rabia.....	18
2.4.1 Inmunidad innata.....	18
2.4.2 Inmunidad específica.....	19
2.5 Mecanismos de evasión inmunológica del VR.....	19
2.5.1 El VR provoca la muerte de células migratorias e impide su acción en el SN.....	19
2.6 La rabia.....	20
2.6.1 Reservorios.....	21
2.6.2 Rabia paralítica bovina (RPB).....	22
2.6.3 El murciélago hematófago y su relación con RPB.....	22
Capítulo 3. Vacunación contra Rabia y Brucelosis en Ganado bovino	24

3.1 Cepas vacunales para BB.....	24
3.1.1 Cepa RB51.....	24
3.1.2 Cepa S19.....	24
3.2 Administración de cepas vacunales para BB en México.....	24
3.3 Aspectos moleculares de la cepa <i>Brucella abortus</i> S19.....	25
3.4 Prevención de RPB.....	26
Capítulo 4. Vacunas de ADN.....	28
4.1 Características de un plásmido vacunal.....	28
4.2 Vacunación génica antirrábica.....	29
4.3 Bacterias intracelulares como acarreadores de ADN Vacunal.....	31
4.4 <i>Brucella abortus</i> como sistema de expresión heteróloga.....	31
Capítulo 5. Diseño del estudio.....	33
5.1 Planteamiento del problema.....	33
5.2 Justificación.....	33
5.3 Hipótesis.....	33
5.4 Objetivo General.....	34
5.4.1 Objetivos específicos.....	34
5.6.5 Esquema general de trabajo.....	35
Capítulo 6. Material y Metodología.....	36
6.1 Cepas.....	36
6.2 Plásmidos.....	36
6.3 Ratones.....	36
6.4 Construcción del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ codificante de la glicoproteína G del virus de rabia para transformar <i>Brucella</i>	37
6.5 Transformación de <i>B. abortus</i> S19.....	38
6.6 Curvas de crecimiento bacteriano.....	39
6.7 Cuantificación de Unidades formadoras de colonia (UFC).....	39
6.8 Estabilidad <i>in vitro</i> de la cepa <i>B. abortus</i> S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+.....	39
6.9 Expresión <i>in vitro</i> del gen G por la cepa <i>B. abortus</i> S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+.....	39
6.10 Estabilidad <i>in vivo</i> de la cepa <i>B. abortus</i> S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+.....	40
6.11 Transfección de células BHK-21 con el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+...	40
6.12 Preparación del inóculo bacteriano para inmunización.....	40
6.13 Inmunización de ratones.....	40
6.14 Obtención de suero.....	40
6.15 Determinación de Ac anti- <i>Brucella</i>	41
6.16 Determinación de AAN.....	41
6.17 Evaluación de la protección <i>in vivo</i>	41
6.18 Análisis estadístico.....	41
Capítulo 7. Resultados.....	43
Capítulo 8. Discusión.....	61
Capítulo 9. Conclusiones.....	68
Capítulo 10. Perspectivas.....	69
Bibliografía.....	70
Anexo 1.....	83
Anexo 2.....	84

Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática de la membrana externa de <i>Brucella spp</i>	4
Figura 2. Estructura del virus de la rabia.....	12
Figura 3. Genoma del virus de la rabia.....	13
Figura 4. Ciclo de replicación del virus de rabia.....	15
Figura 5. Estructura de la glicoproteína del virus de la rabia.....	17
Figura 6. Modelo comparativo del tráfico intracelular entre las cepas <i>B. abortus</i> 2308 y S19.....	26
Figura 7. Esquema de los requerimientos básicos de un vector plasmídico de ADN.....	30
Figura 8. Esquema de los plásmidos de trabajo.....	37
Esquema 1 Diagrama de construcción del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+...	38
Figura 9. Caracterización del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ mediante restricción enzimática.....	43
Figura 10. Alineamiento entre la secuencia del gen G del aislado HQ01-IMSS y las cepas CVS y PV del virus rábico.....	46
Figura 11. Secuencia peptídica en el aislado HQ01-IMSS.....	47
Figura 12. Alineamiento entre la secuencia peptídica de la gpG del aislado HQ01-IMSS y las cepas CVS y PV del virus rábico.....	48
Figura 13. Identificación de la cepa transformada.....	49
Figura 14. Estabilidad in vitro del plásmido pBBR4CMV-GSV40+ en la cepa <i>B. abortus</i> S19 pBBR4CMV-GSV40+ bajo diferentes condiciones.....	50
Figura 15. Expresión in vitro del gen G en <i>B. abortus</i> S19.....	51
Figura 16. Estabilidad in vivo del plásmido pBBR4CMV-GSV40+.....	52
Figura 17. Expresión de la glicoproteína G del virus de rabia a partir del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ en células eucariotas.....	53
Figura 18. Identificación simultánea del plásmido pBBR4-CMV-gpG-SV40+ y de la delación del operón <i>ery</i> en colonias recuperadas de bazo de ratones infectados con diferentes cepas de <i>B. abortus</i> S19.....	59

Índice de Tablas

Tabla 1. Características de Identificación entre las diferentes especies de <i>Brucella</i>	3
Tabla 2. Clasificación de las especies virales del Género <i>Lyssavirus</i>	13
Tabla 3. Dosis de cepas vacunales de <i>B. abortus</i> aplicadas según la edad	25
Tabla 4. Comparación de diferentes tipos de vacunas.	29
Tabla 5. Comparación entre las secuencias consenso y la secuencia preliminar en el aislado HQ01-IMSS, para los sitios antigénicos en la glicoproteína G del virus de rabia.	47
Tabla 6. Cepa de <i>B. abortus</i> S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ aislada de bazo y peso del bazo de ratones BALB/c experimentalmente infectados a 7 días post infección.	52
Tabla 7. Peso del bazo en ratones hembras BALB/c de 6- 8 semanas de edad inmunizadas con diferentes antígenos.	53
Tabla 8. Concentración de bacterias recuperadas de ratones hembras BALB/c de 6- 8 semanas de edad inmunizadas con diferentes antígenos	55
Tabla 9. Resultados de la prueba de Rosa bengala en ratones hembras BALB/c de 6- 8 semanas de edad inmunizadas con diferentes antígenos.	56

Tabla 10. Niveles de AAN en ratones hembras BALB/c de 6-8 semanas de edad inmunizadas con diferentes antígenos.	57
Tabla 11. Porcentaje de sobrevivencia en ratones desafiados con virus CVS [†] inmunizados con diferentes antígenos	60

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Curvas de Crecimiento de las cepas <i>B. abortus</i> S19 y <i>B. abortus</i> S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+	49
Gráfica 2. Peso del bazo en ratones ratones hembras BALB/c de 6- 8 semanas de edad inmunizados con diferentes antígenos	54
Gráfica 3. Concentración de bacterias recuperadas de bazo en ratones ratones hembras BALB/c de 6- 8 semanas de edad inmunizadas con diferentes antígenos.	55
Gráfica 4. Nivel de AAN en ratones hembras BALB/c de 6-8 semanas de edad inmunizados con diferentes antígenos.	58
Gráfica 5. Bacterias recuperadas de bazo en ratones desafiados con la cepa <i>B. abortus</i> 2308 inmunizados con diferentes antígenos.	60

Lista de Abreviaturas

a.a. aminoácidos

AAN Anticuerpos antirrábicos neutralizantes

Ac anticuerpos

CMV Citomegalovirus

CVS Challenge Virus Strain

DLR50 Dosis letal en ratón al 50%

gpG glicoproteína G del virus rábico

IM Intramuscular

PV Cepa del virus Pasteur

REDIPRA Reunión de Directores de Programas Nacionales de Control de la Rabia en América Latina

RFFIT Prueba *rápida de inhibición de focos fluorescentes*

RPB Rabia paralítica bovina

SAGARPA Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación

SBF Solución amortiguadora de fosfatos

SNC Sistema Nervioso Central

VR Virus rábico

Stability of the *B. abortus* S19 vaccine strain with a eukaryotic expression plasmid encoding the G glycoprotein from the rabies virus

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 AnimalFacultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
Av. Universidad 3000, 04510, DF, México^b Departamento de MicrobiologíaFacultad 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 InvestigaciónDisciplinaria en Microbiología
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales,
Agrícolas y Pecuarias
Carretera Federal México-Toluca km 15.5,
Cajalalpa, 05110, DF, México^e Hospital de PediatríaUnidad de Investigación Médica en Inmunología
Coordinación de Investigación Médica
Instituto Mexicano del Seguro Social
Centro Médico Nacional Siglo XXI
06720, DF, México

*Corresponding author:

Tel: + 52 22-2229-5500 ext. 7379, 7390

Fax: + 52 22-2244-3106

Email address: nidianaye@hotmail.com

Received: 2015-03-12

Accepted: 2015-06-29

Published: 2015-06-30

Additional information and declarations
can be found on page 11

© Copyright 2015 Nidia G. Pazos Salazar et al.



Distributed under Creative Commons CC-BY 4.0

Abstract

Brucella abortus S19 is an intracellular vaccine strain against bovine brucellosis. Rabies is a lethal disease in cattle. Plasmids encoding the G glycoprotein from the rabies virus induce a protective immune response in different animal species. A vector called pBBR4-CMV-Ggp-SV40+, which encodes the G gene, regulated by the cytomegalovirus eukaryotic expression promoter, and which can be used to transform the *B. abortus* S19 vaccine strain, was constructed. The stability of the transformant strain was tested both *in vitro* and *in vivo*. In the *in vitro* assays, *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ was grown for 5 sequential passages, and for the *in vivo* assays, female BALB/c mice were infected. Colony-forming unit counting and plasmid identification were performed in each passage and in the spleens at 7 days post-infection. To test the plasmid stability in the strain, all parameters were determined with and without antibiotic. The bacterial concentration was lower with antibiotic than without it, but the bacterial growth was more homogeneous. The plasmid was identified in antibiotic- and non-antibiotic-treated isolated colonies under both *in vitro* and *in vivo* conditions. The plasmid construct was also transfected into BHK-21 cells, which express the G glycoprotein. The *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ strain showed stability, representing a suitable candidate vector for developing a bivalent vaccine against brucellosis and rabies. This is the first time that a *Brucella* species has been transformed with a eukaryotic expression plasmid.

Keywords: G glycoprotein; Rabies virus; *Brucella abortus* S19; CMV promoter.

Introduction

Rabies and brucellosis are considered as major zoonotic diseases. These diseases affect cattle, constitute an animal health problem, and have repercussions for human health (Monath *et al.*, 2013).

Bovine brucellosis (BB) is mainly caused by the intracellular bacterium *Brucella abortus* (Díaz, 2013). There are different vaccine strains for BB prevention. *B. abortus* RB51 is a rough strain that lacks the O-chain in its lipopolysaccharide (LPS),

and for this reason, it does not induce detectable antibodies in diagnostic tests, which helps to differentiate vaccinated from infected animals (Schurig *et al.*, 2002). However, this vaccine strain's level of protection is still controversial. *B. abortus* S19 is an attenuated smooth strain due to the presence of LPS with the O-chain, which induces antibodies that are detectable in serological assays. This feature is a major problem associated with vaccination with the S19 strain; there is also a 2-3% risk of abortion. Nevertheless, the strain forms a highly immunogenic vaccine that has proven to be the most effective vaccine against BB (Nicoletti, 1990). The vaccine's attenuation capability has been associated with a deletion in the *ery* operon that is detected by PCR (Sangari *et al.*, 1994), amplifying a 361-bp fragment that distinguishes the *B. abortus* S19 strain from other *B. abortus* vaccines and field strains, in which a 1063-bp amplicon has been identified (Mukherjee *et al.*, 2005). In Mexico, 3- to 6-month-old calves are vaccinated with the S19 vaccine at a classical dose of 10^{10} colony-forming units per mL (CFU/mL) of reconstituted vaccine (equivalent to 5 mL), whereas heifers older than 6 months are administered a reduced dose (3×10^8 CFU/mL).

The etiologic agent of bovine paralytic rabies (BPR) is an RNA-enveloped virus of the *Lyssavirus* genus, which is divided into at least 11 genotypes (Rupprecht and Plotkin, 2013). Genotype 1 is distributed worldwide and includes the classical rabies virus; other genotypes are limited to specific geographic regions. On the American continent, only genotype 1 exists. The main transmitter of the virus in cattle is the hematophagous bat (*Desmodus rotundus*), which inhabits tropical and subtropical areas (Lee *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2014). The rabies virus contains the G glycoprotein (Ggp), an envelope protein that has been recognized as the main viral antigen because it induces protective neutralizing antibodies (Cox *et al.*, 1977; Ross *et al.*, 2008). The Ggp is the only outer protein of the virus, and it contains 524 amino acids, which form several antigenic sites. Antigenic site I is formed by both linear and conformational epitopes, antigenic site II is discontinuous, and antigenic site III is a continuous conformational antigenic epitope. Another important site is referred to as G5: this linear epitope includes antigenic site IV, described as containing only one amino acid (Kuzmina *et al.*, 2013). DNA vaccine plasmids encoding the Ggp are useful for inducing an anti-rabies immune response (Perrin *et al.*, 2000). The pGQH plasmid contains a G gene directed by the cytomegalovirus (CMV) eukaryotic expression promoter, which produces a high antibody titer, protects against rabies in mice and dogs (Tesoro *et al.*, 2006), and is also efficient as post-exposure prophylaxis in rabbits and mice (Tesoro *et al.*, 2008).

Because the main measure of control for both diseases is vaccination, alternatives to facilitate vaccine management are currently being studied. Several issues have been considered in the development of a new option:

1. Intracellular attenuated bacteria are useful as vectors to deliver DNA plasmids directly to professional antigen-presenting cells (APC), such as macrophages and dendritic cells (Dietrich *et al.*, 2001). *B. abortus* is an intracellular bacterium, and virulent strains are able to survive inside macrophages. The *B. abortus* S19 vaccine strain is destroyed by phagocytic cells (Arenas *et al.*, 2000; Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998), but it possesses the characteristics of a bacterial vector, and thus, *B. abortus* S19 offers the possibility of delivering a plasmid to APCs after intracellular disintegration of the strain.

2. DNA vaccine plasmids encode an antigen controlled by a eukaryotic promoter, such as the pGQH plasmid described before. *B. abortus* can be stably transformed with prokaryotic plasmids of the pBBR1MCS family (Elzer *et al.*, 1995), but it has never been transformed with a eukaryotic expression plasmid.

Therefore, the objectives of this study were as follows: (1) to construct a plasmid encoding the Ggp from the rabies virus regulated by the CMV promoter and to use it to transform the *B. abortus* S19 vaccine strain and (2) to evaluate the *in vitro* and *in vivo* stability of the transformant strain and to assess the protein expression resulting from the plasmid construct. If these goals were achieved, the initial stage of the development of a bivalent vaccine against rabies and brucellosis would be accomplished.

Materials and Methods

Plasmids

The pGQH plasmid described by Tesoro *et al.* (2008) contains a G gene (1576-bp) flanked by the *Xba*I site. The gene used in the present study was obtained from the brain of a person who died from rabies transmitted by a hematophagous bat (isolate HQ01-IMSS). Plasmid pBBR1MCS-4 is a moderate-copy plasmid maintained as an extra-chromosomal element. This plasmid is a member of the pBBR1MCS plasmid family but differs based on marker selection: pBBR1MCS is *cmr*^r, and pBBR1MCS-4 is *amp*^r (Kovach *et al.*, 1995).

Bacterial strains and culture conditions

The *B. abortus* S19 strain and *Escherichia coli* TOP-10 (*F-mcrAΔ* (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139Δ* (*ara-leu*) 7697 *galE15 galK16 rpsL* (*Str*) *endA1 λ-*) were grown in tryptic soy broth (TSB) at 37°C with orbital shaking or in tryptic soy agar (TSA). Medium containing 100 µg/mL ampicillin (Amp) was used when needed.

Plasmid construction

Plasmid pGQH was digested with the *Bam*HI and *Bgl*II restriction enzymes, with compatible site ends. The fragment containing the G gene regulated by the CMV promoter was excised and ligated into pBBR1MCS-4, which was previously digested with *Bam*HI (Fig. 1). The insert to be cloned also included a region referred to as the SV40 enhancer/promoter. This region, which contains the origin of replication for eukaryotic cells and which induces episomal plasmid replication, was incorporated into the insert to keep the plasmid present in the host.

The resulting DNA construct was transformed in *E. coli* TOP-10. The new plasmid construct was characterized by enzyme restriction: *Bam*HI linearized it, and *Xba*I released the G gene. The recombinant plasmid was called pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ and was purified using the EndoFree Plasmid Giga Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. The G gene was sequenced from the pure plasmid using the outer primers Ggp1 and Ggp2 as well as the in-

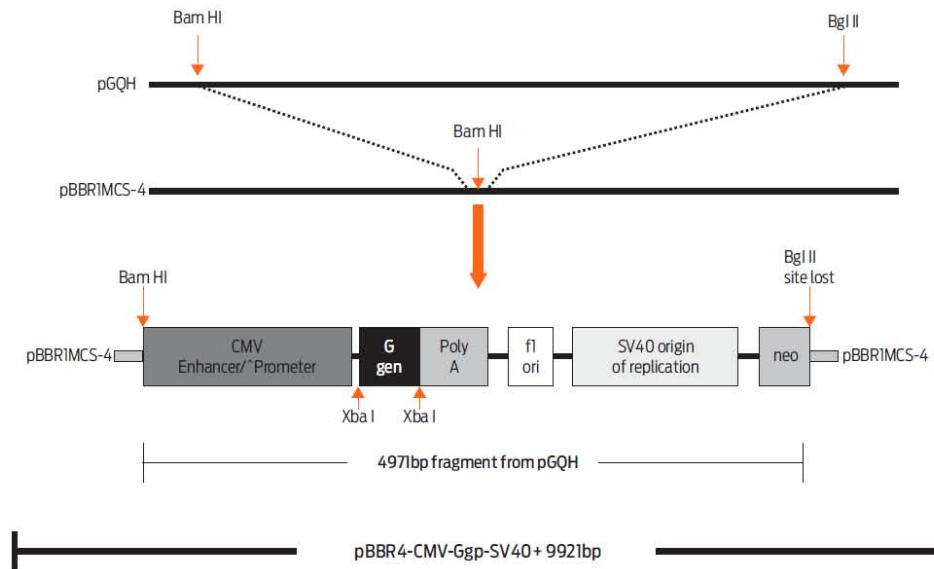


Figure 1. Plasmid pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ construction diagram.

ner primers Gli1 and Gli2. For the designed inner primers, the amplified fragment, which was 736-bp in size, included most of the glycoprotein's antigenic sites.

Transformation of *B. abortus* S19

Plasmid pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ was electroporated into the *B. abortus* S19 strain by applying a 2.5-Kv pulse and using 3 µg of plasmid. Amp-resistant (Amp^r) colonies were analyzed by PCR using pBBR primers (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' and 5'-CGAGGTCGACGGTATCG-3') to amplify a 5100-bp fragment, corresponding to the insert ligated in pBBR1MCS-4. The amplification protocol was as follows: denaturation at 96°C for 1 min, 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 64°C for 45 sec, extension at 72°C for 5 min, and a final incubation at 72°C for 10 min. The same colonies were analyzed using the *ery* primers described by Sangari *et al.* (1994) and Mukherjee *et al.* (2005) to identify the 361-bp amplicon of the deleted *ery* operon as an attenuation genetic marker. The following reaction controls were included: the *B. abortus* RB51 strain for the non-deleted *ery* operon and *E. coli* harboring pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ as the negative *ery* control and the positive plasmid control, respectively. The transformant strain was called *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+.

In vitro stability of plasmid pBBR4-CMV-Ggp-SV40+

The stability of *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ was evaluated following the method referenced by Elzer *et al.* (1995). The strain was grown in TSB-Amp

for 48 h. A total of 100 μ L of the culture was transferred to 5 mL of either TSB or TSB-Amp and incubated for 48 h to obtain passage 1. The process was successively repeated until passage 5. Serial dilutions of each passage were performed to determine the CFU/mL in triplicate under 3 conditions: 1) bacteria cultivated in TSB and isolated in TSA (TSB/TSA); 2) bacteria cultivated in TSB and isolated in TSA-Amp (TSB/TSA-Amp); and 3) control culture, consisting of bacteria cultivated in TSB-Amp and isolated in TSA-Amp (TSB-Amp/TSA-Amp). Randomly sampled colonies from each condition were tested by PCR to identify the 5100-bp amplicon from pBBR4-CMV-Ggp-SV40+.

Inoculation of BALB/c mice with the strain B. abortus S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+

Three 6- to 8-week-old female BALB/c mice were inoculated intraperitoneally (i.p.) with 0.25 mL of PBS containing $\sim 10^6$ CFU of *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ or 0.25 mL of PBS only (control group). The animals were sacrificed by cervical dislocation 7 days later. Their spleens were weighed and homogenized in 1 mL of PBS and plated on either TSA or TSA-Amp, and the CFU/spleen value was determined by serial dilution. A multiplexed PCR was applied to the spleen colonies to simultaneously identify the deleted *ery* operon and the G gene. In the case of the rabies protein, the following inner primers were used: Gli1, forward 5'-ACA-CAATCCGTACCCTGACT-3', and Gli2, reverse 5'-CCCGTTTACATGAGGATGAC-3'. Both amplicons of the G gene (736-bp) and of the *ery* operon deletion (361-bp) were obtained as follows: denaturation at 96°C for 1 min, 30 cycles of denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 64°C for 45 sec, extension at 72°C for 1 min, and a final incubation at 72°C for 10 min.

All experimental procedures and animal care were performed in compliance with the *Guide for the care and use of laboratory animals* (2011), NOM-062-ZOO-1999, which enforces the proper use and care of laboratory animals in Mexico, and with the approval of Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (license BCB/CCUAL/118/2013).

Glycoprotein expression in eukaryotic cells

BHK-21 cells were cultured in Eagle's minimal essential medium (MEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS) during the growth phase. Cells in the logarithmic growth phase were harvested, and 1×10^6 cells were transfected by electroporation with 15 μ g of the pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ plasmid. A pulse of 140 V for 25 msec was applied to a 0.2-cm cell containing 0.1 mL of cellular suspension. Protein expression was monitored at 24, 48 and 72 h post-transfection; a control of non-transfected cells was also included. A polyclonal human IgG containing 150 IU/mL anti-rabies neutralizing antibodies was employed as a primary antibody at a 1:50 dilution. The protein was revealed with a 1:100 dilution of goat anti-human IgG-FITC.

Statistical analysis

The CFU data were log-transformed and after examining the residuals, the variances appeared homogeneous within the range of the treatment means. The data from

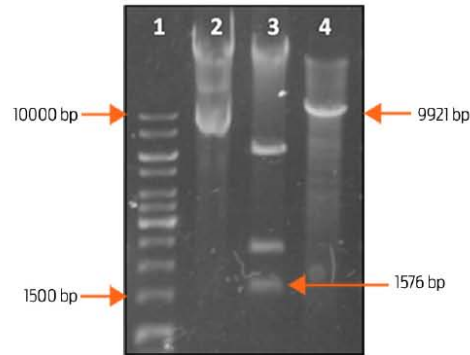


Figure 2. Digestion of plasmid pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ with two restriction enzymes. Lanes: 1, 1 Kb DNA ladder; 2, purified pBBR4-CMV-Ggp-SV40+; 3 and 4, plasmid restricted with *XbaI* and *BamHI*, respectively. The 9921-bp fragment corresponds to the expected size of the construct. The 1576-bp fragment was released from the plasmid and corresponds to the G gene.

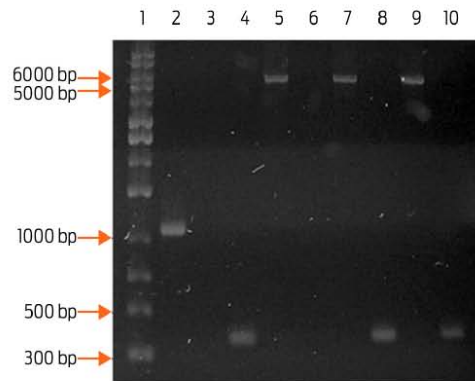


Figure 3. Identification of the *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+-transformed strain. Individual PCRs with pBBR and *ery* primers were applied to *B. abortus* S19 candidates. The 5100-bp fragment corresponds to the plasmid; the 361-bp fragment, to the deleted *ery* operon; and the 1063-bp fragment, to the non-deleted *ery* operon. Lanes: 1, 1 Kb DNA ladder; 2, *B. abortus* RB51 as a control for the non-deleted *ery* operon; 3, *E. coli* TOP-10 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ as a negative control for the *ery* operon; 4, *B. abortus* S19 with the deleted *ery* operon; 5, *E. coli* TOP-10 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ as a plasmid control; 6, *B. abortus* S19 as a negative plasmid control; 7 and 8, candidate 1 tested by PCR for the presence of the plasmid and the *ery* operon, respectively; 9 and 10, candidate 2 tested by PCR for the presence of the plasmid and the *ery* operon, respectively.

the *in vitro* assays were analyzed by one-way ANOVA with Dunnett's post-test, and the bacterial loads in the *in vivo* assays (CFU/spleen) were analyzed with Student's t-test using the software associated with GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, USA). A value of $P < 0.05$ was considered significant for both tests.

Results

Construction of the recombinant plasmid and transformation of the *B. abortus* S19 strain with plasmid pBBR4-CMV-Ggp-SV40+

After extraction, plasmid pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ was digested with *BamHI* and *XbaI* to verify the size of the construct and to release the G gene, respectively. Digestion with *XbaI* released 3 fragments of 6057-, 2283-, and 1576-bp in size. The last one corresponded to the G gene (Fig. 2). Digestion with *BamHI* produced a 9921-bp linearized plasmid, which indicated loss of the *BglII* site (Fig. 2). The complete sequence of the G gene was obtained, and preliminary results showed that Mexican isolate HQ01-IMSS maintained the amino acids considered to be invariable in all of the Ggp's antigenic sites. Figure 3 shows the deletion of the *ery* operon and the presence of the recombinant plasmid in the *B. abortus* S19 strain after electroporation.

Plasmid pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ was stable under *in vitro* conditions in the *B. abortus* S19 strain

The bacterial concentrations in each medium (\log_{10} CFU/mL) were as follows:

- Control culture (TSB-Amp/TSA-Amp) = 8.54
- TSB/TSA-Amp culture = 8.44
- TSB/TSA culture = 9.13.

The bacterial concentration was higher ($P < 0.05$) in the TSB/TSA culture than under the other two culture conditions (Fig. 4a). Whereas no differences in the bacterial concentration were observed among passages in the TSB-Amp/TSA-Amp culture ($P > 0.05$), variability was observed in both the TSB/TSA and the TSB/TSA-Amp cultures (Fig. 4b). In particular, in the

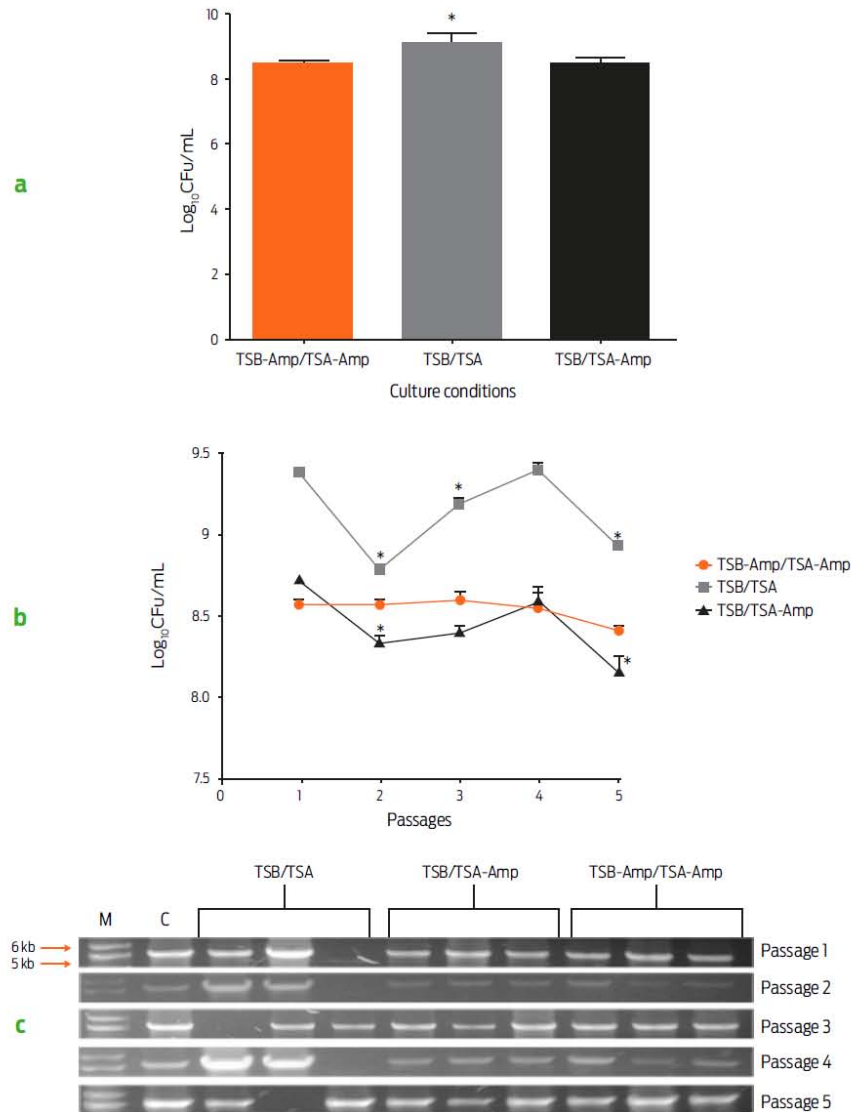


Figure 4. *In vitro* stability of plasmid pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ under different conditions. (a) Mean concentration of *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ after 5 passages in culture with or without antibiotic; * significant difference ($P < 0.05$) relative to TSB-Amp/TSA-Amp. (b) Bacterial concentration in each passage under different conditions; * significant difference ($P < 0.05$) relative to passage 1. (c) Identification of the pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ plasmid in *B. abortus* S19 colonies; M, molecular weight marker; 1 Kb DNA ladder; C, control: *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ strain; TSB, tryptic soy broth; TSA, tryptic soy agar; Amp: ampicillin (100 $\mu\text{g/mL}$).

Table 1. Spleen weight (wt) and bacterial concentrations of the *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ strain isolated from experimentally infected BALB/c mice.

	Inoculation with	
	PBS	<i>B. abortus</i> S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+
Spleen wt (g)	0.120 ± 0.009	0.100 ± 0.014
Log ₁₀ CFU/spleen		
TSA-Amp		2.8 ± 1.2
TSA		4.0 ± 1.1

Mice were inoculated i.p. with 0.25 ml of PBS containing ~10⁶ CFU of the strain or 0.25 mL of PBS only (control group). The results are the mean ± standard deviation for three mice.

TSB/TSA culture, the bacterial concentration showed a statistically significant difference (P<0.05) in passages 2, 3 and 5 relative to passage one, and in the TSB/TSA-Amp culture, a statistically significant difference (P<0.05) was found in the bacterial concentration in passages 2 and 5 relative to passage one. In addition, plasmid pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ was identified in all TSA-Amp colonies and in different TSA colonies (Fig. 4c).

Plasmid stability in the B. abortus S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ strain was maintained during BALB/c mouse infection

Table 1 shows the results from the spleen homogenates. No statistically significant difference was found between the bacterial concentrations in antibiotic- and non-antibiotic-complemented media. All analyzed colonies from both media were positive for the deleted *ery* operon. All analyzed colonies isolated in the presence of the antibiotic were positive for the G gene, and only one colony isolated in the absence of the antibiotic was positive for the G gene (Fig. 5). The plasmid was extracted from all G gene-positive colonies (data not shown).

Plasmid pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ induced the expression of the Ggp from the rabies virus in eukaryotic cells

After BHK-21 transfection, the Ggp was detected at 24, 48 and 72 h. The glycoprotein was not detected in the control cells. Figure 6 shows protein expression at 48 h (expression at 24 and 72 h is not shown). This result indicates that the viral protein was properly expressed in eukaryotic cells with the pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ plasmid.

Discussion

Vaccine plasmids consist of a gene of interest controlled by a strong eukaryotic expression promoter; the mRNA transcripts are stabilized by a polyadenylation sequence, and resistance genes for bacterial selection are included (Gurunathan *et*

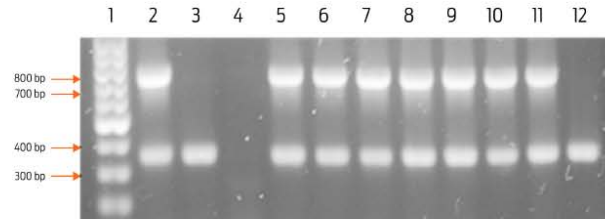


Figure 5. *In vivo* stability of plasmid pBBR4-CMV-Ggp-SV40+. Female BALB/c mice were infected with *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+. Seven days later, spleen homogenates were plated, and a multiplexed PCR was applied to isolated colonies to simultaneously detect the deleted *ery* operon (361-bp) and the G gene (736-bp). Lanes: 1, 100 bp DNA ladder; 2, *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+; 3, *B. abortus* S19; 4, *E. coli*; 5-10, TSA-Amp colonies; 11 and 12, TSA colonies.

al., 2000). We have constructed plasmid pBBR4-CMV-Ggp-SV40+, which encodes the most immunogenic protein from the rabies virus, or the Ggp, which is ligated to the CMV promoter to strengthen gene expression in eukaryotic cells. A polyadenylation sequence and the SV40 origin of replication were also included to maintain plasmid replication in the host. The plasmid construct is based on pBBR1MCS-4, a plasmid used to transform *Brucella* species (*Kovach et al., 1995*). The G gene sequence (isolate HQ01-IMSS) is 1575-bp in size and codes for a 524 amino-acid protein containing the sequences for antigenic sites.

Employment of intracellular attenuated bacteria improves the delivery of vaccine plasmids to a host (*Dietrich et al., 2001*). The *B. abortus* S19 vaccine strain is both intracellular and attenuated, and it was transformed with the plasmid construct with the purpose of generating *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+, which maintained the marker of attenuation, or the *ery* operon deletion. The *B. abortus* S19 strain has already been transformed with plasmids encoding heterologous

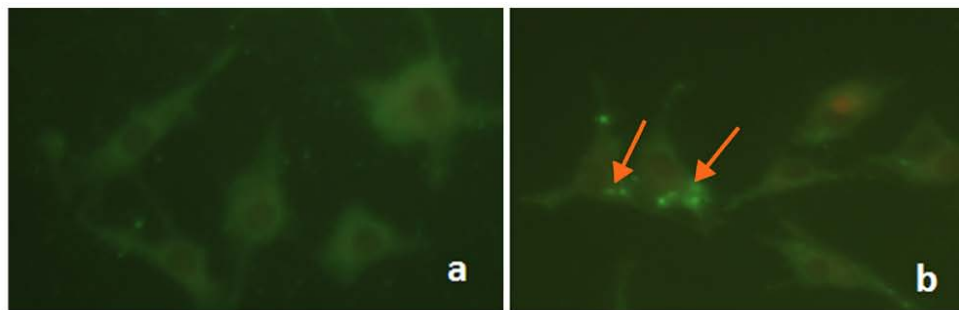


Figure 6. Expression of the rabies virus Ggp from plasmid pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ in eukaryotic cells. BHK-21 cells were transfected with 15 µg of the plasmid construct. The protein was detected at 24, 48 and 72 h with polyclonal anti-rabies human IgG. **a** and **b**, non-transfected BHK-21 cells and transfected BHK-21 cells, respectively, both at 48 h (24 and 72 h not shown). The arrows indicate the Ggp.

proteins (Comerci *et al.*, 1998; Sabio y García *et al.*, 2008; Sabio y García *et al.*, 2010), but in all cases, protein expression depended on a prokaryotic promoter. This is the first report of transformation of *B. abortus* involving a eukaryotic expression promoter.

To evaluate the stability of the plasmid construct that encodes the G gene, *in vitro* and *in vivo* assays were performed. The strategy of culturing bacteria by successive passaging in media with or without a selection factor was previously established when evaluating the stability of plasmid pBBR1MCS in different *Brucella* species (Elzer *et al.*, 1995). The *in vitro* stability assays in the current study showed a significantly lower concentration of *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ in the antibiotic-complemented medium than in the medium without antibiotic, although the bacterial growth in the antibiotic-complemented cultures was homogeneous. The plasmid that we constructed is 9921-bp in size, so it might be too heavy to allow transformed bacteria to replicate. However, the variability observed in the growth of the transformant strain as well as the identification of the plasmid when these bacteria were cultured in medium without antibiotic may indicate that the plasmid confers the ability to resist adverse circumstances, although the plasmid is not essential for viability because *Brucella* does not naturally contain it (Crista *et al.*, 2008). Therefore, without selective pressure, a spontaneous loss of plasmid could occur in part of the population.

The results of the *in vivo* assays of the concentration of transformed bacteria recovered from the spleen homogenates were similar to those reported elsewhere (Comerci *et al.*, 1998, Sabio y García *et al.*, 2008). The fact that the multiplexed PCR used was able to identify the plasmid and the *ery* operon deletion in colonies with or without antibiotic may indicate that this is a useful diagnostic tool to differentiate between the *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ strain and field strains and to help to differentiate infected animals from animals vaccinated with the *B. abortus* S19 strain (Pacheco *et al.*, 2012). These results also demonstrate the stability of plasmid pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ in the transformed *B. abortus* S19 vaccine strain in the absence of selective pressure.

Plasmid transfection in BHK-21 cells showed that the plasmid construct expressed the Ggp from the rabies virus, evidencing the functionality of pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ in a eukaryotic model. This result is encouraging because we can now hypothesize that *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ could deliver the plasmid to macrophages after destruction of the bacteria, and simultaneous stimulation of the anti-*Brucella* response inherent to this strain and of the immune response against the viral protein could occur.

Further studies are required to produce a bivalent vaccine, and we know that current vaccine strategies for both brucellosis and rabies are working properly. However, the idea of exploiting the intracellular nature of *B. abortus* by using the S19 strain to act as a vector that delivers a plasmid encoding the main antigen of the rabies virus directly to APCs is in itself worth pursuing. Cell culture infection assays using a macrophage line to show Ggp expression from plasmid delivered by the bacterium as well as immunization studies in mouse models will be necessary to pursue this idea, and even to perform a field study in cattle although there may be regulatory hurdles. A major benefit of a bivalent vaccine would be an increase in the number of animals immunized in official vaccination campaigns because farmers would be able to have their animals vaccinated against two diseases in one

roundup. Another benefit would be a lower production cost for the vaccine because the inert media required to produce bacterial vaccines are inexpensive compared to animal tissue cultures and infrastructure necessary to produce a viral vaccine. We have shown that *Brucella* can accept and maintain a eukaryotic expression plasmid that encodes a viral protein; this knowledge could be used to develop vaccines for other diseases, such as viral bovine diarrhea or infectious bovine rhinotracheitis, in which the main antigens are glycoproteins (Brodersen, 2014; Suman *et al.*, 2013).

Conclusions

The *B. abortus* S19 strain was successfully transformed with plasmid pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ to induce expression of the Ggp from the rabies virus and showed *in vivo* and *in vitro* stability. In addition, evidence indicated that the plasmid constructed induces expression of the Ggp in eukaryotic cells.

Funding

This research was funded by Fondo de Investigación en Salud from Instituto Mexicano de Seguro Social, project No FIS/IMSS/PROT/1266.

Acknowledgments

Nidia Pazos Salazar had the support of a PROMEP scholarship from the Ministry of Public Education and of scholarship 366670 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México. We are grateful to veterinarian Carlos Escamilla Weimman from Bioterio Claude Bernard of the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla for his guidance and excellent animal care.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Author contributions

Nidia G. Pazos Salazar: conceived the study, performed all assays, and wrote the manuscript.

José A. Aguilar Setién: conceived the study.

Juan C. Benítez Serrano and José L. Calderón Chamorro: helped with the construction of the plasmid.

Rigoberto Hernández-Castro and Efrén Díaz Aparicio: helped with all assays with *B. abortus* S19.

References

- 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, Frasch 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) Diaz 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-Maürer A, Simone S, Manfred S, Werner G, Ivaylov 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 SA. 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.



CERTIFICATE *of* PRESENTATION

THIS IS TO CERTIFY THAT

Pazos Salaazar, Nidia Gary; Benitez Serrano, Juan Carlos; Calderon Chamorro, Jose Luis; Valencia, Martinez Hugo; Hernandez Castro, Rigoberto; Diaz Aparicio, Efren; Aguilar Setien, Jose Alvaro

HAS PARTICIPATED AT THE XXIV RABIES IN THE AMERICAS
INTERNATIONAL MEETING (RITA 2013)
OCTOBER 27-31, 2013 IN TORONTO, ONTARIO, CANADA

(17.5 hours of continuous professional development were allocated during this conference)

Dr. Jan Sargeant
Chair of the RITA XXIV Organizing Committee
Centre for Public Health and Zoonoses (CPHAZ)
Ontario Veterinary College, University of Guelph

Charles E. Rupprecht

Dr. Charles Rupprecht
President, RITA Inc. and
Director of Research, Global Alliance for Rabies Control

Mexico/UK
Workshop:
*“Brucellosis: the
use of
biotechnology in
molecular
epidemiology,
diagnosis and
vaccine
development”.*

México City,
16 to 20 June
2014.

24 hrs.



RESEARCHER
LINKS



THIS CERTIFIES THAT

Nidia G. Pazos Salazar

Has presented the following lecture at the Workshop:

“Bivalent vaccine against brucellosis and rabies”

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Adrian Whatmore".

DR. ADRIAN WHATMORE
UNITED KINGDOM

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Francisco Suárez Gúemes".

DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES
MÉXICO

Resumen de Tesis

Brucella abortus S19 es una cepa vacunal intracelular contra brucelosis bovina. La rabia es una enfermedad mortal en ganado bovino. Los plásmidos que codifican la glicoproteína G (gpG) del virus rábico inducen una respuesta inmune protectora en diferentes especies animales. Se construyó un vector llamado pBBR4-CMV-Ggp-SV40+, útil para transformar la cepa vacunal *B. abortus* S19 y que codifica el gen G regulado por el promotor de Citomegalovirus para la expresión en células eucariotas. Se evaluó la estabilidad *in vitro* e *in vivo* de la cepa transformante. Para los ensayos *in vitro*, la cepa *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ se hizo crecer durante cinco pasajes seriados y para los ensayos *in vivo* se infectaron ratones hembras BALB/c. Se realizó la identificación del plásmido y el conteo de Unidades formadoras de colonia (UFC) de la bacteria transformada en cada pasaje, y en los bazo a los 7 días post infección (d.p.i). Todas las pruebas se hicieron con y sin antibiótico para comprobar la estabilidad del plásmido en la bacteria. La concentración bacteriana fue más baja con antibiótico que sin él, sin embargo el crecimiento de la bacteria fue más homogéneo. La cepa *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ mostró estabilidad *in vitro* como *in vivo* y también la capacidad de expresar el ARNm del gen G. Se inmunizaron tres grupos experimentales de ratones hembras BALB/c con *B. abortus* S19, pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ y *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+. A los 7, 14, 21, 28, 30, 60 y 90 d.p.i, se tomaron muestras de suero así como los bazo; en cada grupo se determinaron anticuerpos antirrábicos neutralizantes (AAN), la serología anti-*Brucella* y las UFC/bazo. El plásmido construido se transfectó en células BHK-21. Se encontró expresión de la gpG en células eucariotas. El plásmido indujo AAN por arriba de 0.5 UI/mL (considerado como protector por la OMS) desde el día 7 en el ratón pero afectó la viabilidad y antigenicidad de la cepa vacunal puesto que *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ mostró un perfil de crecimiento similar al de cepas no virulentas así como una débil y tardía respuesta anti-*Brucella* comparada con *B. abortus* S19. La cepa transformante indujo AAN en niveles protectores al día 90. Se requieren aún más estudios para producir una vacuna bivalente, sin embargo resulta interesante la idea de aprovechar la naturaleza intracelular de *B. abortus* para usar la cepa S19 como vector para entregar un plásmido codificante del principal antígeno del virus rábico directamente a las células presentadoras de antígeno. Esta es la primera vez que una especie de *Brucella* se transforma con un plásmido de expresión eucariota.

Thesis Abstract

Brucella abortus S19 is an intracellular vaccine strain against bovine brucellosis. Rabies is a lethal disease in cattle. Plasmids encoding the G glycoprotein (Ggp) from the rabies virus induce a protective immune response in different animal species. A vector called pBBR4-CMV-Ggp-SV40+, which encodes the G gene, regulated by the cytomegalovirus eukaryotic expression promoter, and which can be used to transform the *B. abortus* S19 vaccine strain, was constructed. The stability of the transformant strain was tested both *in vitro* and *in vivo*. In the *in vitro* assays, *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ was grown for 5 sequential passages, and for the *in vivo* assays, female BALB/c mice were infected. Colony-forming unit (CFU) counting and plasmid identification were performed in each passage and in the spleens at 7 days post-infection (d.p.i). To test the plasmid stability in the strain, all parameters were tested with and without antibiotic. The bacterial concentration was lower with antibiotic than without it, but the bacterial growth was more homogeneous. The *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ strain showed stability under both *in vitro* and *in vivo* conditions, and showed to express G gene RNA. Three experimental groups of female BALB/c mice were immunized with *B. abortus* S19, pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ and *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+. Sera samples as well as spleen were taken at 7, 14, 21, 28, 30, 60 and 90 d.p.i; rabies neutralizing antibodies (RNAb), anti-Brucella serology and CFU/spleen were determined for each group. The plasmid construct was also transfected into BHK-21 cells, Ggp expression was found in eukaryotic cells, plasmid induced RNAb up to 0.5 UI/mL (considered as protective by WHO) since day 7 in mice, but it affected viability and antigenicity of vaccine strain since *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ showed a growth profile similar to non-virulent strains, and a weak and late anti-Brucella response compared with *B. abortus* S19. Transformant strain was able to induce RNAb at protective levels at day 90. Further studies are required to produce a bivalent vaccine; however, the idea of exploiting the intracellular nature of *B. abortus* by using the S19 strain to act as a vector that delivers a plasmid encoding the main antigen of the rabies virus directly to APCs is in itself worth pursuing. This is the first time that a *Brucella* species has been transformed with a eukaryotic expression plasmid.

Capítulo 1

El Género *Brucella*

1.1 Generalidades

Este género incluye bacterias en forma de coccobacilos gram-negativos de 0.5-0.7 μ de diámetro por 0.6-1.5 μ de largo, pequeños e inmóviles, que carecen de cápsula, flagelos o plásmidos y no generan esporas. Son microorganismos intracelulares obligados, pueden replicarse dentro de macrófagos y de otras células fagocíticas no-profesionales (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998a). Se encuentra dentro de la subdivisión α -2 de la clase *Proteobacteria* orden Rhizobiales, familia *Brucellaceae* que tiene una cercana relación filogenética con *Agrobacterium*, *Rickettsia*, *Rhizobium* y *Rhodobacter* (Moreno *et al.*, 1990).

Diez especies forman al género *Brucella* y se clasifican según los hospederos que infectan; ocho de ellas afectan animales terrestres y son: *B. melitensis* (cabras), *B. abortus* (bovinos), *B. suis* (cerdos), *B. ovis*, (ovejas) *B. canis* (perros), *B. neotomae*, *B. microti* (roedores) y *B. inopinata* (hombre), más dos nuevas especies, *B. pinnipedialis* y *B. ceti* que se han adaptado de hospederos marinos, focas y ballenas respectivamente; pueden afectar también especies animales distintas a su huésped principal. Las características que permiten identificar a las especies del género *Brucella* se presentan en la Tabla 1. (Pappas *et al.*, 2005, Scholz *et al.*, 2008, Scholz *et al.*, 2010). Las tres primeras especies se reconocen como clásicas y se dividen en biotipos, en las restantes solo se presenta un biotipo dentro del género. Estudios de hibridación de ADN han mostrado una homología mayor al 95% entre cepas de todas las especies, por lo que se propuso que el género solo está formado por la especie *melitensis* y las demás son biovarias de ésta (Verger *et al.*, 1985), sin embargo debido a las diferencias de reservorios, a la severidad en la enfermedad clínica provocada, y a las altas diferencias entre los proteomas de las especies (DelVecchio *et al.*, 2002b), esta propuesta no ha sido bien aceptada. En el 2003, la subcomisión en Taxonomía de *Brucella* del Comité Internacional en Sistemática de Procariontes (International Committee on Systematics of Prokaryotes (ICSP)) acordó unánimemente establecer la clasificación taxonómica utilizada previa al año 1986, con la aprobación de las seis especies de *Brucella* y sus biovarias (Osterman y Moriyón, 2006).

El genoma es similar entre las diferentes especies del género *Brucella*, el tamaño promedio es de 3.29 Mb y está conformado por dos cromosomas circulares, siendo el

cromosoma I de aproximadamente 2.11 Mb con un contenido de G+C de 57.2 %, mientras el cromosoma II es de 1.18 Mb, con un porcentaje de G+C de 57.3 (DelVecchio *et al.*, 2002a; Halling *et al.*, 2005; Paulsen *et al.*, 2002, Crasta *et al.*, 2008).

Los miembros del género *Brucella* spp poseen sistemas de secreción tipo IV, que está tipificado por el operón *virB*, el cual codifica para un complejo multiprotéico de 12 proteínas que son responsables de la secreción de macromoléculas bacterianas a través de la envoltura y se ha sugerido que *Brucella* lo utiliza para la translocación de factores de virulencia hacia las células de mamífero, este sistema de secreción tipo IV es indispensable para que *Brucella* adquiera membranas del RE, como un paso necesario para su sobrevivencia dentro del macrófago (Celli *et al.*, 2003)

1.2 Antígenos de *Brucella*

Brucella spp contiene dos tipos de componentes con importancia antigénica, el Lipopolisacárido (LPS) y las proteínas que se ubican en su membrana externa (OMP). El LPS se encuentra en la membrana externa (Fig. 1), la composición de esta estructura influye directamente en la morfología de las cepas, en particular se asocia con la presencia o ausencia de la cadena O en el lipopolisacárido (LPS), las cepas denominadas como lisas (S), del inglés *smooth* poseen cadena O, mientras las llamadas rugosas (R) de *rough*, carecen de dicha cadena. El LPS de *Brucella* spp es muy diferente al de otras bacterias gram-negativas. El LPS clásico de *Escherichia coli* se compone de un lípido A formado por una estructura básica de glucosamina que contiene grupos acilo de 12 a 14 carbonos ligado al core por enlaces de tipo éster y amida. En contraste la estructura básica del Lípido A en *Brucella* spp, es de diaminoglucosa con grupos acilo más largos de 18, 19 y 28 carbonos unidos solamente por enlaces tipo amida (Lapaque *et al.*, 2005).

Tabla 1. Características de Identificación entre las diferentes especies de Brucella

Especie	Descrita por	Reservorio	Virulencia para el hombre	Biotipo	Pruebas de identificación							
					Crecimiento en colorantes			Requerimiento de CO ₂	Producción de H ₂ S	Lisis por fagos		
					Tionina	Fuscina	Ureasa			Tiblisi	Weybridge	
<i>B. melitensis</i>	Bruce 1887	Cabras, ovejas, camellos, bovinos	++++	1-3	+	+	+	-	-	-	-	
<i>B. abortus</i>	Bang 1897	Bovinos, cabras (donde no hay <i>B. melitensis</i>) camellos, búfalos	+++++	1	-	+	+	+	+	+	+	+
				2	-	-	+	+	+	+	+	+
				3	+	+	+	+	+	+	+	+
				4	-	+	+	+	+	+	+	+
				5	+	+	+	-	-	+	+	+
				6	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>B. suis</i>	Traum 1914	Cerdo, liebre, caribú, reno, roedores silvestres	+	1-5	+	-	(3)	+	-	+	-	+
<i>B. canis</i>	Carmichael y Bruner 1968	Cánidos	+	----	+	-/+	+	-	-	-	-	-
<i>B. ovis</i>	Van Drimmelen 1953	Ovejas	-	----	+	-/+	-	+	-	-	-	-
<i>B. neotomae</i>	Stoenner y Lackman 1957	Roedores	-	----	-	-	+	-	+	+/-	+	+
<i>B. pinnipedialis</i> y <i>B. ceti</i>	Ewalt y Ross 1994	Focas, elefantes marinos y morsas. Ballenas, delfines, y marsopas.	+	----	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>B. microti</i>	Scholz 2008	Ratón de campo	¿?	----	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>B. inopinata</i>	Scholz 2010	Hombre	+	----	+	+	+	-	+	+/-	ND	ND

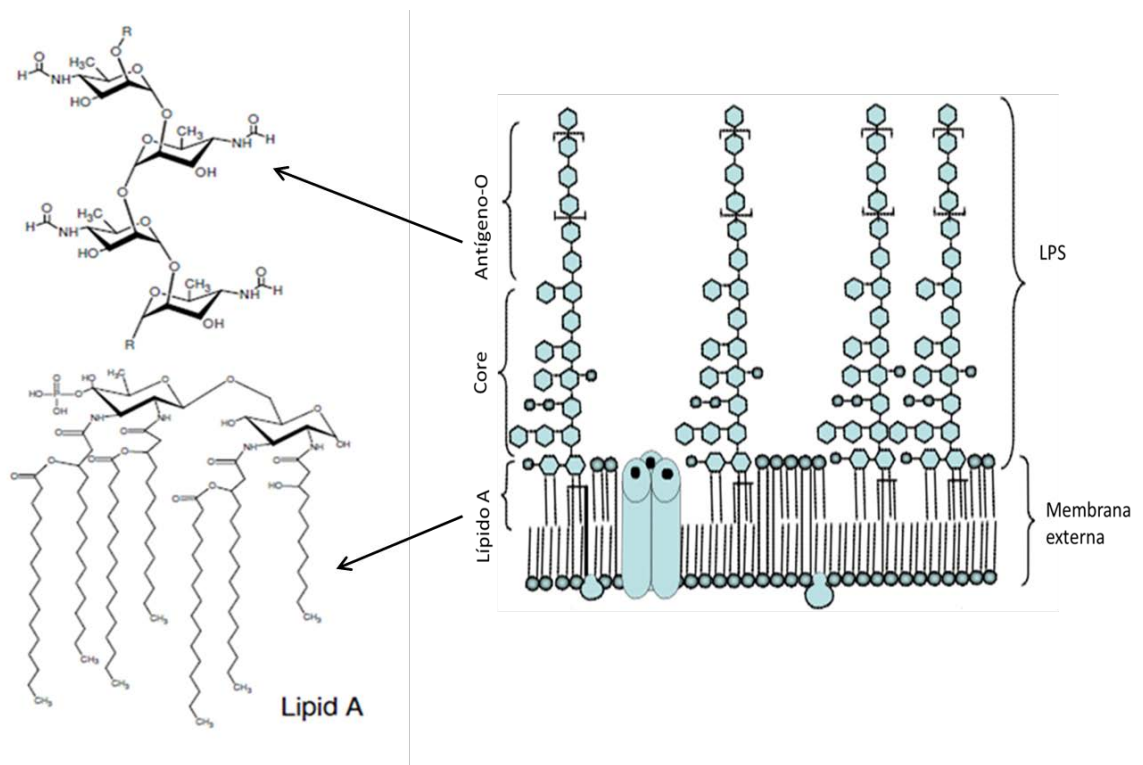


Figura 1. Representación esquemática del LPS de *Brucella* spp., modificado de Gomes Cardoso et al., 2006

La cadena O del LPS es la estructura antigénica más expuesta de esta bacteria, en el extremo terminal del LPS de *Brucella* (cepa lisa) se presentan moléculas de manosa que favorecen la adherencia a los fagocitos mononucleares del huésped, ya que éstos tienen los receptores de manosa. Además de los fagocitos mononucleares, las células de la placenta contienen gran cantidad de receptores de manosa, lo que sumado al tropismo de estas bacterias por el eritritol placentario de bovino, aumenta las probabilidades de abortos, debido a la presencia de la bacteria en ese tejido (Pontow *et al.*, 1992).

Las proteínas relevantes en *Brucella* spp se han descrito como proteínas de membrana externa, proteínas de ubicación citoplasmática y proteínas de choque térmico.

Las proteínas de membrana externa se clasifican en tres grupos: Grupo I, están relacionadas con la biosíntesis de la envoltura y tienen un peso molecular entre 88 a 94 kDa; Grupo II, equivalentes a las porinas de otras bacterias, con un peso entre 35 a 40

kDa y las del Grupo III, que interactúan fuertemente con el LPS y tienen un peso entre 25 a 30 kDa. (Rivers *et. al.*, 2006)

Entre las proteínas citoplasmáticas se encuentran la proteína superóxido dismutasa Cu/Zn (SOD) y la catalasa. La SOD Cu/Zn forma parte del sistema de defensa antioxidante de *Brucella* spp, para protegerla de los intermediarios reactivos del oxígeno, ya que transforma los radicales superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno gaseoso (O_2); la enzima catalasa ayuda a la proteína SOD Cu/Zn a detoxificar el ambiente bacteriano, actuando sobre el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado al interior del macrófago después de la fagocitosis de la bacteria, transformándolo en agua y oxígeno (Ko y Splitter 2003). La expresión de estas enzimas favorecería la permanencia de *Brucella* en el interior del fagocito.

El rol de las proteínas de choque térmico en la patogénesis de *Brucella* spp es incierto, entre estas se encuentran GroEL, GroES y HtrA; las proteínas GroEL y GroES son chaperonas relacionadas con el plegamiento correcto de proteínas, mientras HtrA; es una proteasa que degrada proteínas dañadas oxidativamente, por lo que aumenta la resistencia de *Brucella* spp a la destrucción por los fagocitos causada por el daño oxidativo (Bae y col 2002).

1.3 Brucelosis

Es la enfermedad causada por miembros del género *Brucella*, afecta a diferentes especies incluyendo al hombre, por lo que se le considera una zoonosis, de manera que representa un problema de salud pública animal y humana.

El hombre adquiere la infección principalmente por la ingestión de productos contaminados, especialmente lácteos no pasteurizados o debido al contacto con secreciones o tejidos de animales infectados, se considera una enfermedad ocupacional en pastores, trabajadores de rastros, veterinarios y personal de laboratorio. Las especies de *Brucella* que pueden infectar al hombre son; *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. ceti* y *B. pinnipedialis*, la mayoría de casos de brucelosis humana a nivel mundial se deben a *B. melitensis* seguido por *B. abortus* por lo que ambas especies se consideran virulentas para el hombre, aun que no existen diferencias entre las manifestaciones clínicas causadas por ambas (Pappas *et al.*, 2005). Dado que la brucelosis humana es una enfermedad zoonótica, la prevención y control de brucelosis animal es esencial para erradicar la brucelosis en el hombre. La enfermedad se presenta en todo el mundo, excepto en los países donde se ha erradicado la BB causada por *B. abortus*. Esta

enfermedad es de notificación obligatoria en muchos países, sin embargo, las estadísticas oficiales no reflejan el número real de personas infectadas, y son diversos los factores que influyen en ello, la aplicación de programas zoonos sanitarios, intereses socioeconómicos y políticos e incluso la reciente migración internacional de la población (Pappas *et al.*, 2006). La incidencia anual de brucelosis humana por cada 100,000 habitantes se calcula desde menos de 0.03 en países como Canadá, Inglaterra y el norte de Estados Unidos, hasta más de 160 en Irán, Iraq y Mongolia entre otros (Seleem *et al.*, 2010, Pappas *et al.*, 2006).

La distribución geográfica de las especies de *Brucella* se relaciona con las áreas donde se produce y comercializa el ganado con el que se asocia. Por ejemplo, *B. abortus* se encuentra en todo el mundo con excepción de los países donde ha sido erradicada, como; Japón, Canadá, Suecia, Dinamarca, Australia, Nueva Zelanda e Israel (EFSA 2010), de las siete biovariedades, la biovariedad 1 es la más frecuente en América Latina. *B. melitensis* es particularmente común en el Mediterráneo, Medio Oriente y América Latina (Samaha *et al.*, 2008), es la especie más virulenta dentro del género. Con respecto a *B. suis*, los biovares 1, 2 y 3 son la causa de brucelosis porcina, 1 y 3 se encuentran en la mayoría de las zonas donde se manejan cerdos en el mundo y la biovariedad 2 es la causa principal de brucelosis porcina en Europa (Godfroid *et al.* 2011).

La infección en animales induce a abortos en las hembras y en los machos afecta los órganos reproductores, causa orquitis y epididimitis que pueden llegar a derivar en infertilidad. Estas bacterias se multiplican abundantemente en los cotiledones y el corion placentarios, donde causan lesiones en la pared del órgano provocando endometritis ulcerosa en los espacios intercotiledonarios y destrucción de las vellosidades, que causan la muerte y la expulsión del feto (Díaz Aparicio 2013).

1.3.1 Brucelosis bovina (BB).

Es causada principalmente por la bacteria *Brucella abortus*, el ganado bovino puede infectarse transitoriamente por los biovares 1 y 3 de *B. suis* y más comúnmente por *B. melitensis*. El principal síntoma en vacas preñadas es el aborto, la producción de leche se reduce en un 25 % en las vacas infectadas, la brucelosis provoca que nazcan terneros débiles, e infertilidad en vacas y toros en los que causa orquitis que se asocia con vesiculitis seminal y epididimitis (Acha y Zsyfres, 2001).

A nivel mundial, la brucelosis causa un impacto económico negativo que no solamente afecta la producción animal, también repercute en la salud pública humana, debido al

costo del tratamiento y la pérdida de productividad. En Latinoamérica, se estima que las pérdidas anuales debidas a BB son de aproximadamente 600 millones y aunque los programas de erradicación de brucelosis requieren de una fuerte inversión por parte de los gobiernos, el costo es menor que las pérdidas económicas causadas por la enfermedad; en EUA el programa nacional de erradicación de BB aplicado entre 1934 y 1997 tuvo un costo de 3.5 billones de dólares, mientras los costos asociados a la producción reducida de leche y abortos solo en el año 1952 fueron de 400 millones (Acha y Zsyfres, 2001, Seleem *et al.*, 2010).

1.3.2 *Brucella abortus*

B. abortus infecta a una variedad de ganado de interés comercial como bovino, cerdos, ovejas y cabras o animales de fauna silvestre como búfalos, alce y diferentes tipos de camélidos (Díaz Aparicio 2013)

La infección inicia en el tracto gastrointestinal, posteriormente la bacteria alcanza los nódulos linfáticos locales donde se replica dentro de macrófagos. Después se produce la bacteremia que favorece la colonización del útero grávido, órganos genitales masculinos y glándula mamaria (Carvalho *et al.*, 2010)

B. abortus tiene un alto tropismo hacia el útero durante el último trimestre de gestación y esto se debe a la alta concentración de eritritol y hormonas esteroidales, el eritritol es una fuente de carbono y energía que puede ser metabolizada por la bacteria (Samartino y Enright, 1996). La multiplicación de *Brucella* spp induce la infiltración de células inflamatorias, necrosis trofoblástica vasculitis y ulceración, estos eventos afectan el intercambio metabólico materno fetal resultando en aborto (Anderson *et al.*, 1986). Las principales fuentes de infección son; fetos abortados, membranas fetales y secreciones uterinas, la leche contaminada también contiene bacterias y el semen contaminado es una fuente potencial de infección.

Un paso crucial en la patogénesis de *B. abortus* es la capacidad de sobrevivir en células fagocíticas y no fagocíticas. La bacteria opsonizada se interna en los fagocitos a través de receptores de complemento o Fc, mientras que los organismos no opsonizados invaden mediante la interacción con receptores de lectina y fibronectina (Campbell *et al.*, 1994). Las bacterias fagocitadas por opsonización usualmente mueren en el macrófago activado dentro del fagolisosoma antes de que alcancen sitios de replicación intracelular, contrariamente los organismos no opsonizados tienen más posibilidades de sobrevivir y replicar (Gorvel y Moreno 2002). Las cepas atenuadas se adhieren e invaden las células

huésped pero no sobreviven intracelularmente (Pizarro-Cerdá *et al.*, 2000, Gorvel y Moreno 2002). Más adelante se presenta un esquema comparativo del tráfico intracelular entre cepas virulentas y atenuadas de *B. abortus*.

1.4 Respuesta inmune contra *Brucella*

Las bacterias del género *Brucella* se reconocen como bacterias intracelulares, para resolver la infección se necesita la participación de la respuesta inmune inespecífica o innata y específica o adaptativa, así como la interacción coordinada entre las respuestas celular y humoral específica de antígeno.

1.4.1 Inmunidad innata

En las primeras etapas de infección por *Brucella* spp, la respuesta innata ayuda a reducir significativamente el número de bacterias induciendo una respuesta Th1 específica (Zhan *et al.*, 1993). Los macrófagos, neutrófilos, células Natural Killer (NK) y el complemento participan en esta fase.

1.4.1.1 Células presentadoras de antígeno

La primera línea de defensa está constituida por las células presentadoras de antígeno (CPA), que incluyen macrófagos y células dendríticas que se activan después de interactuar con la bacteria. Las CPA reconocen a la bacteria mediante receptores celulares de reconocimiento de patrones (PRR por sus siglas en inglés) de los cuales los más estudiados son los receptores de tipo Toll (TLR's por sus siglas en inglés) (Medzhitov y Janeway, 1997) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP'S por sus siglas en inglés), que se encuentran en la pared celular bacteriana y el LPS. Se ha postulado que dentro de los TLR's, el TLR9 es el receptor con la participación más importante durante la infección por *Brucella* spp (Gomes *et al.*, 2012). Después del reconocimiento la bacteria es internalizada y las CPA se activan por transducción de señales que induce la producción de citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 que activan aún más a las CPA, la bacteria es eliminada y la función bactericida de los macrófagos se centra en las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Oliveira *et al.*, 2002).

1.4.1.2 Neutrófilos

Esas células también participan en las etapas tempranas de infección, sin embargo después de ingerida, la bacteria es capaz de neutralizar la acción bactericida por ello el neutrófilo se considera es de baja eficiencia contra *Brucella* spp e incluso propicia

la diseminación de la bacteria a otros órganos desarrollando una infección persistente (Rivers *et al.*, 2006)

1.4.1.3 Células Natural Killer

B. abortus activa a las células NK mediante la IL-12 producida por las CPA, la IL-12 induce a que las células NK produzcan $IFN-\gamma$ que ayuda a potenciar su actividad bactericida y a que se establezca una respuesta de tipo Th1 (Golding *et al.*, 2001).

1.4.2 Respuesta inmune específica

Esta respuesta se desarrolla después de la activación de la CPA, los elementos que participan en la respuesta específica se dividen en humorales y celulares.

1.4.2.1 Inmunidad celular

Esta es la principal línea de defensa en la infección por *Brucella* spp, los Ac que se producen contra diferentes antígenos pueden otorgar alguna protección en las etapas iniciales de la infección, sin embargo dado que la bacteria es intracelular la fase bactericida coincide con el inicio de la inmunidad mediada por células. El principal activador de los macrófagos es el $IFN-\gamma$ secretado por los LT CD4+ y CD8+ (Jiang y Baldwin, 1993).

Después de que la bacteria es eliminada dentro de la CPA los antígenos bacterianos se procesan en péptidos que se asocian con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y II, sobre la superficie de las células CPA que migraran desde la periferia hasta los órganos linfoides donde estimularan a las células T mediante la interacción entre diversas moléculas; por ejemplo el receptor de la célula T (TCR) con los complejos MHC-péptido, CD28 de las células T con B7.1 y B7.2 en monocitos humanos, además *B. abortus* también estimula la expresión de ICAM-1 en los monocitos facilitando la adherencia entre CPA y células T (Zaitseva *et al.* 1996). Estas interacciones proveen las señales requeridas para la activación de las células T específicas de antígeno

Las células T consiste principalmente de dos poblaciones, las células T ayudadoras (Th) CD4+, y las células T citotóxicas (Tc) CD8+. En experimentos con ratones deficientes en TCD4+ y TCD8+, se demostró que en los ratones deficientes en CD8+, la infección se exacerbó, en contraste con los deficientes en CD4+ donde la infección se pudo resolver (Oliveira y Splitter, 1995). De este modo se estableció que las

células T citotóxicas son críticas para alcanzar protección contra *B. abortus*, no así las células T ayudadoras

Los TCR corresponden a un heterodímero compuesto de cadenas α/β o γ/δ . Los receptores α/β se asocian a la molécula co-receptora CD4 o CD8. Las células α/β se expanden clonalmente en respuesta a una infección o a la vacunación. Aún no se ha establecido el papel de los linfocitos γ/δ , los bovinos poseen aproximadamente un 50% de esta población y también producen IFN- γ y TNF- α (Wyckoff, 2002).

Las células CD4+ y CD8+ reconocen antígenos presentados por las CPAs. Las células CD4+ reconocen antígenos en contexto de moléculas MHC II, y las células CD8+ en contexto MHC I. En el caso de *Brucella*, ambas poblaciones celulares son estimuladas dado que los antígenos son presentados por las dos vías de presentación. Esto se debe a que un porcentaje de las bacterias internalizadas, una vez fagocitadas, son capaces de re direccionarse al tráfico intracelular y replicar en compartimentos derivados del retículo endoplásmico (RE) (Wyckoff, 2002).

B. abortus también induce que las células T citotóxicas CD8+ produzcan IFN- γ , así se diferencian en células Tc1 de memoria y matan a células infectadas que expresan los complejos MHC I-péptido (Golding *et al.*, 2001).

1.4.2.2 Inmunidad humoral

1.4.2.2.1 Anticuerpos

Los Ac contra *Brucella* spp se producen desde los primeros días de la infección y permanecen en el suero durante años. La naturaleza intracelular de *Brucella* impide que los Ac controlen la infección, sin embargo colaboran con otros elementos de la respuesta inmune para eliminar a la bacteria. Estos Ac se dirigen contra los antígenos superficiales de *Brucella*, especialmente el LPS y su detección es útil en el diagnóstico de la infección y en el control de la enfermedad (Nicoletti, 2010).

Las células T estimulan a las células B mediante la interacción entre moléculas como el ligando CD40L en la célula T con CD40, las citosinas liberadas ayudan al cambio de isotipo de IgM a IgG, Las células Th ayudan a que las células B produzcan Ac, la clase de Ac producidos dependen del tipo de citocina secretada. El IFN- γ induce a un encendido genético donde predomina la IgG2a, mientras la IL-4, promueve el encendido hacia la IgG1 e IgE. (Golding *et al.*, 2001). El LPS de *Brucella* spp es un prototípico antígeno

independiente de células T, dado que puede activar a las células B para producir los Ac IgG3 e IgM sin la ayuda de las células Th (Betts et al., 1993).

Los Ac tienen la capacidad de opsonizar, activar el complemento para matar a las bacterias, aglutinar bacterias para su eliminación, mediar la citotoxicidad celular dependiente de Ac (ADCC, por sus siglas en inglés) y unirse a receptores bacterianos evitando la adherencia de las bacterias a las células hospedadoras.

1.4.2.2.2 Citocinas

Las citocinas clave para el control de la infección con *Brucella* spp son el IFN- γ , IL-12 y TNF- α y el balance de citoquinas producidas por las células T. Las células B y los macrófagos secretan IL-12 que funciona como un pivote que induce a la inmunidad específica de antígeno en una respuesta de tipo Th1 (Jiang y Baldwin 1993). La IL-12 induce a que las células T se diferencian de células vírgenes (Th0) a células efectoras y de memoria que secretan diferentes patrones de citocinas. Así, las células Th1 y Tc1 secretan principalmente IFN- γ , mientras las Th2 y Tc2 secretan principalmente IL-4 e IL-5 (Zhan y Cheers, 1995). IFN- γ es la principal citosina efectora para la activación de macrófagos y la actividad citotóxica de los linfocitos T, ambas células son esenciales para la inhibición de patógenos microbianos intracelulares. Existen evidencias que sugieren que la producción de IFN- γ previene que *Brucella* spp se establezca en su nicho, pero una vez que el brucelosoma se ha establecido esta citocina no produce ningún efecto en la limitación del número de bacterias (Baldwin y Goenka, 2006).

El TNF- α contribuye a la resistencia contra la infección por *B. abortus*, se ha visto que la depleción de esta citocina con Ac, exagera la infección con *B. abortus* S19 en el modelo de ratón (Zhan et al., 1996)

Capítulo 2

El virus de la Rabia

Es un miembro del orden de los *Mononegavirales*, de la familia *Rhabdoviridae*, del género *Lyssavirus*. Es un virus de ARN lineal de cadena sencilla, no segmentado, de polaridad negativa, envuelto que tiene una forma ojival truncada (bala) y mide 180 nm de largo por 75 nm de ancho (Fig. 2). El virus obtiene la envoltura que por gemación a través de la membrana plasmática de la célula hospedera. Su genoma (Fig. 3) mide aproximadamente 12 Kb y comprende cinco genes que ordenados de 3'-5' codifican para las siguientes proteínas virales: la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), la proteína matriz (M), glicoproteína G (gpG) y la RNA polimerasa viral (L), entre el gen G y L se encuentra una región no codificante que originalmente se consideró un pseudogen que se denominó Ψ , de longitud variable entre los distintos genotipos (Marston *et al.*, 2007).

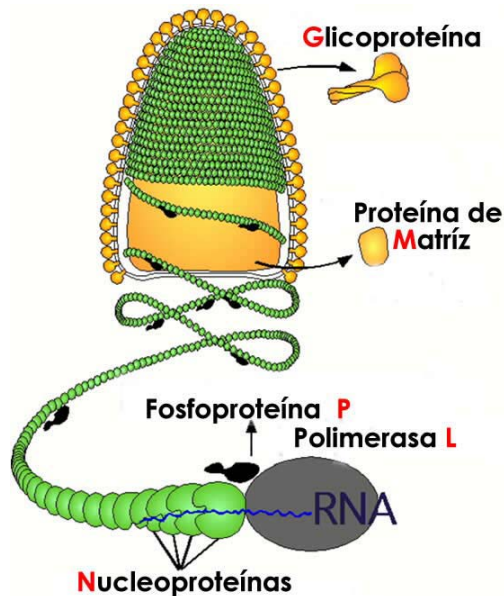


Figura 2. Estructura del virus de la rabia. Tomado de Aréchiga 2010, tesis de doctorado.

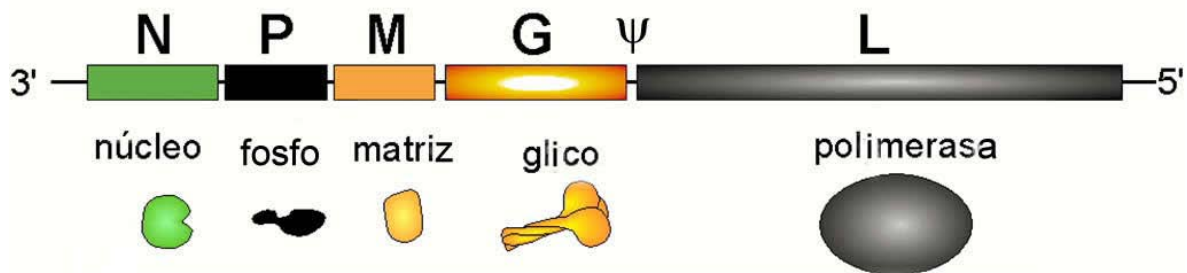


Figura 3. Genoma del virus de la rabia. Tomado de Aréchiga 2010, tesis de doctorado. Según el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV por sus siglas en inglés), el género *Lyssavirus* incluye 13 especies que se clasifican en 3 Filogrupos, 7 genotipos y 4 serotipos de acuerdo con la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la proteína N, y la secuencia nucleotídica de la gpG (Tabla 2).

Filogrupo	Genotipo	Serotipo	Especie (Abreviatura según ICTV)
I	1	1	Virus Rabia (RABV)
	4	4	Virus Duvenhage (DUVV)
	5	?	Virus del murciélago europeo tipo I EBLV-1
	6	?	Virus del murciélago europeo tipo II EBLV-2
	7	?	Virus del murciélago Australiano (ABLV)
	?	?	Virus Aravan (ARAV)
	?	?	Virus Khujand (KHUV)
	?	?	Virus Irkut (IRKV)
II	2	3	Virus del murciélago de Lagos (LBV)
	3	2	Virus Mokola (MOKV)
	?	?	Virus del murciélago Shimoni (SHIBV)
III	?	?	Virus del murciélago caucásico del oeste (WCBV)
	?	?	<i>Lyssavirus</i> Ikoma (IKOV)

Información recopilada de ICTV; <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Hace tres años en España se describió el virus Liérida, un nuevo Lyssavirus cercano al filogenético II (Aréchiga et al 2013).

Existe una alta neutralización serológica entre miembros de un Filogenético, sin embargo entre los Filogenéticos la neutralización es muy limitada. El genotipo 1 o virus de la rabia clásico es el más distribuido en el mundo y es el único detectado en América, es muy importante desde el punto de vista epidemiológico debido a su asociación con un gran número de casos de rabia tanto en el ser humano como en animales domésticos y silvestre; los otros genotipos tienen una distribución geográfica más local y el espectro de las especies que afectan es más restringido, aunque algunos de ellos han mostrado reactividad inmunológica cruzada con el virus de rabia son suficientemente diferentes por lo que se clasifican como virus “relacionados con rabia” (Rupprecht y Plotkin 2013).

2.1 Ciclo de Replicación del virus de Rabia

Este ciclo se ilustra en la Figura 4. Una vez que el virus penetra en el huésped, se adsorbe a las células musculares o nerviosas mediante trómeros de glicoproteína que se unen a receptores celulares (paso 1), posteriormente es endocitado (paso 2). Al disminuir el pH del endosoma se induce un cambio conformacional en la glicoproteína viral, que conduce a la fusión de la envoltura viral con la bicapa lipídica del endosoma liberándose la nucleocápside en el citosol (pasos 3 y 4). Antes de iniciar la replicación del RNA viral (paso 5) ocurre la transcripción del genoma (paso 6). La glicoproteína del virus se sintetiza sobre los ribosomas adosados al retículo endoplásmico (paso 7), luego es transportada hacia el aparato de Golgi donde es modificada (paso 8). La glicoproteína madura es transportada por vesículas hacia la membrana plasmática de la célula huésped, con la que se fusiona (paso 9). Por otro lado, se sintetizan las proteínas de la matriz y de la nucleocápside (paso 10), se ensamblan (paso 11) y se asocian con la membrana plasmática que contiene las glicoproteínas transmembranales (paso 12). Finalmente, la membrana plasmática se pliega al rededor de la nucleocápside y los viriones son liberados por gemación (paso 13).

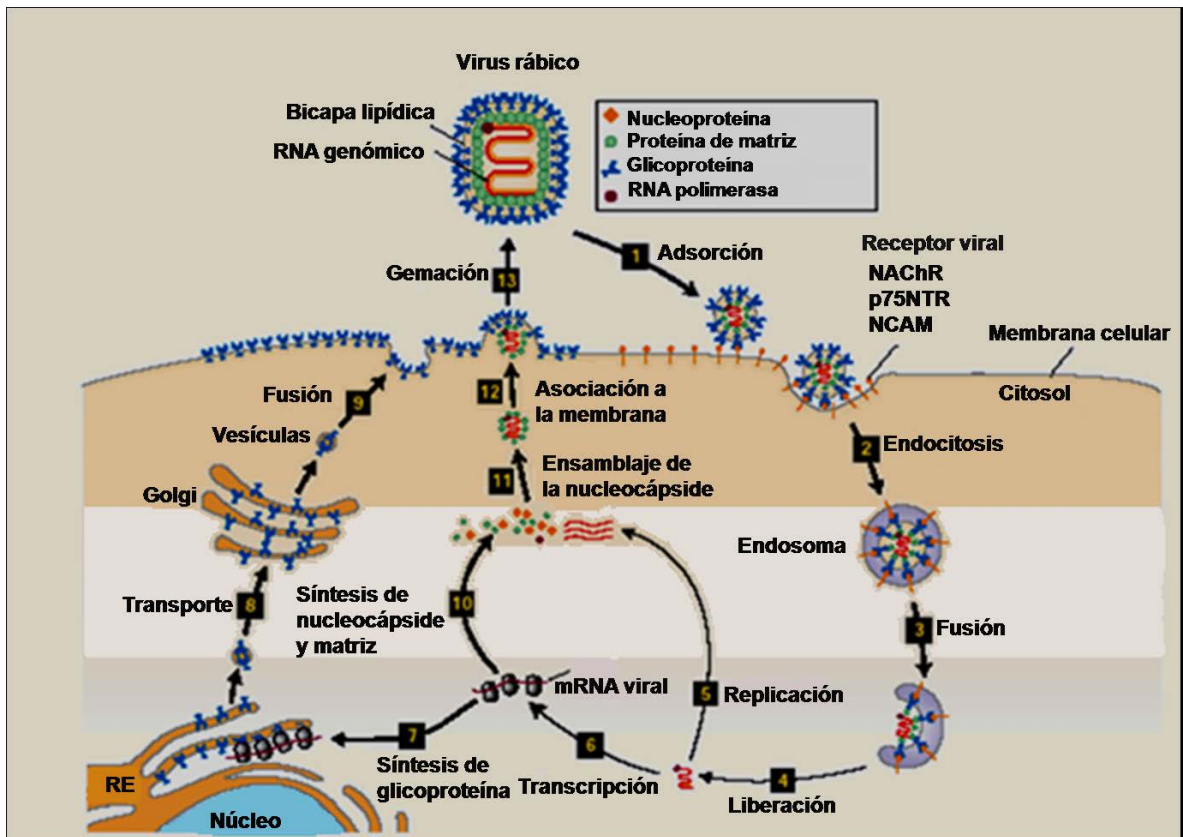


Figura. 4 Ciclo de replicación del virus de rabia. Tomado de Aréchiga 2010, tesis de doctorado.

2.2 Aspectos moleculares de las proteínas del virus rábico

El genoma de ARN queda "encapsidado" y protegido por la proteína N formando el complejo ribonucleoproteico (RNP) de estructura helicoidal, el RNP es el molde para la polimerasa viral que está formada por las proteínas L (de large en inglés) y P, juntas forman el complejo necesario para transcribir y replicar el genoma, L es una RNA-polimerasa RNA-dependiente enzimáticamente activa, mientras P es el cofactor de L. Las proteínas P y L se asocian con la RNP helicoidal, durante la salida del virus las RNPs quedan cubiertas por una envoltura formada por la membrana celular que contiene una capa de la proteína M en la cara citoplásmica de la membrana, y espículas transmembranales de la proteína G (Albertini et al., 2008).

2.3 La glicoproteína G

2.3.1 Estructura

La gpG del virus de rabia es la más estudiada de las proteínas rábicas. La proteína madura tiene un peso de 65-67 Kd, se asocia en trímeros para formar las espículas que se proyectan sobre la superficie viral, se estima que en cada envoltura existen 600 espículas que corresponden a 1800 monómeros asociados en trímeros (Montano y Mata; 1996). Después de la traducción del ARNm, el polipéptido resultante (Fig. 5) contiene de 522 a 524 aa, en el extremo N-terminal los primeros 19 aa son hidrofóbicos y representan un péptido señal que posteriormente es removido de la estructura proteica. La proteína madura está compuesta de 504 a 505 aa dependiendo de la cepa, y contiene tres dominios que del extremo amino al extremo carboxilo son: ectodominio de 438 aa, un dominio transmembranal de 22 aa y un dominio citoplásmico de 44 aa. El ectodominio contiene los sitios funcionales relacionados con la patogenicidad, inmunogenicidad y glicosilación, el dominio transmembranal contiene aa hidrofóbicos y sirve para que la proteína se mantenga anclada a la envoltura, finalmente el dominio citoplasmático es hidrofílico e interactúa fuertemente con la proteína M de la nucleocápside viral (Rupprecht y Plotkin, 2013, Ross *et al.*, 2008).

2.3.2 Inmunogenicidad

La gpG del virus de rabia induce la producción de anticuerpos antirrábicos neutralizantes (AAN) que impiden la infección *in vitro* y protegen contra la infección experimental (Cox *et al.*, 1977). La inmunogenicidad de la gpG depende de la secuencia primaria de aa, de la conformación tridimensional de su estructura secundaria y terciaria, y finalmente de modificaciones post traduccionales como la glicosilación de residuos. Mediante Ac monoclonales se ha definido la conformación antigénica de la gpG, así se han reconocido dos sitios antigénicos principales: el sitio antigénico II es discontinuo y está formado por los segmentos de los residuos de aminoácidos 34-42 y 198-200 que se unen mediante puentes disulfuro y logran el plegamiento entre las dos regiones (Prehaud *et al.*, 1988). Por otro lado el sitio antigénico III, es continuo y se localiza entre los aminoácidos 330 y 338, se reconoce como el principal determinante de patogenicidad (Dietzschold *et al.*, 1983; Seif *et al.*, 1985). Cercano al sitio antigénico III y separado por tres aa se encuentra un epítope formado por los aa 342-343, se identifica como el sitio menor a y no se traslapa con el sitio III (Benmansour *et al.*, 1991). La gpG posee de dos a cuatro sitios potenciales de glicosilación de tipo N -acetilgalactosamina; asparagina-X-treonina o asparagina-X-serina, que son importantes para el plegamiento de la proteína. (Montano y Mata; 1996, Ross *et al.*, 2008).

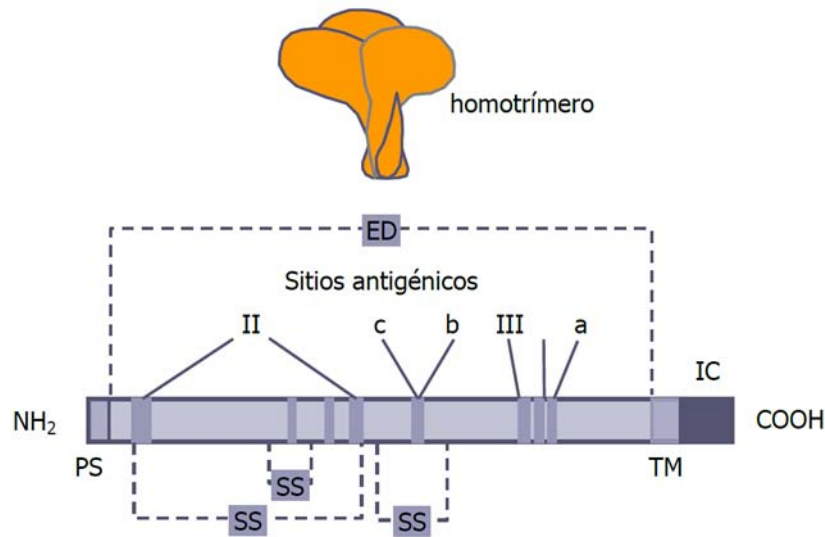


Figura 5. Estructura de la glicoproteína del virus de la rabia. En la imagen superior se representa su posible conformación como homotrímero y en la imagen inferior se muestra la representación lineal con sus dominios II y III y sitios antigénicos a b y c. PS: péptido señal, ED: ectodominio, TM: dominio transmembranal, IC: dominio intracitoplásmico, NH₂ extremo amino, COOH extremo carboxilo; SS puentes disulfuro. Tomado de Aréchiga, 2010, tesis de doctorado.

2.3.3 Papel de la gpG en la patogenicidad viral

La gpG es la única proteína viral expuesta y tiene un papel multifuncional; participa en la patogenicidad viral, en la invasión del virus al sistema nervioso central (SNC), se reconoce como el principal antígeno del virus y también como ligando viral y a que reconoce específicamente a los receptores celulares.

En la neuropatogenicidad, la gpG se une a receptores como; el receptor nicotínico de acetilcolina, (NACHR) (Lentz *et al.*, 1984; Gastka *et al.*, 1996; Castellanos *et al.*, 1997), el receptor de neurotrofinas p⁷⁵ (NTRp⁷⁵) (Tuffereau *et al.*, 1998) y moléculas de adhesión neuronal (NCAM (CD56)) (Thoulouze *et al.*, 1998). Células no-neuronales de diferentes especies también han sido infectadas *in vitro*, demostrando que pueden existir receptores ubicuos (Reagan y Wunner, 1985). Existe una fuerte homología entre la secuencia del asa tóxica de la neurotoxina del veneno de serpiente y la gpG rábica, donde la mayor similitud se encuentra entre los aa de la neurotoxina que se unen a NACHR, con los residuos 189-200 de la proteína viral (Lentz *et al.*, 1984). Después de reconocer al receptor la gpG presenta modificaciones estructurales dependientes del pH que promueven la entrada del

virus a la célula y la fusión de membranas (Albertini *et al.*, 2012). La integridad de la gpG también se requiere durante la liberación celular del virus, mutantes truncadas en el dominio citoplasmático o carentes de él, presentan un efecto de atenuación y a que disminuyen sus títulos de infectividad, esto se asocia con una deficiencia en la producción del virus más que con el reconocimiento del receptor (Mebatsion *et al.*, 1999)

Otro factor importante en la patogenicidad viral es la capacidad de inhibir la apoptosis, este evento es el principal mecanismo de daño mediado por la gpG, y se asocia con el grado de atenuación de la cepa. En células neuronales infectadas con diferentes cepas del virus rábico que sobre expresan la glicoproteína, se incrementó la inducción de apoptosis con respecto a las neuronas infectadas con cepas de baja expresión de gpG y se comportaron como cepas atenuadas en el ratón después de la administración periférica (Faber *et al.*, 2002). Estas evidencias sugieren que la expresión controlada de la gpG tiene una función de soporte para promover la propagación del virus, una expresión menor de gpG ayuda a evadir la activación de la respuesta inmune fuertemente desencadenada por la apoptosis, puesto que la destrucción de las células primariamente infectadas o de los mecanismos de transporte axonal del virus pueden reducir el acceso del virus al SNC previniendo la infección.

El transporte axonal retrogrado es clave para la llegada del virus a SNC durante la infección natural. Se ha demostrado que vectores retrovirales pseudotipados con proteína G rábica realizan transporte axonal después de ser administrados vía periférica (Mazarakis *et al.*, 2001), estableciendo entonces que la sola presencia de G en la envoltura confiere neurotropismo.

2.4 Respuesta inmune contra el virus de rabia

Durante el curso de la infección, el virus de rabia (VR) enfrentará la respuesta inmune en dos momentos importantes, cuando es inoculado en la periferia después de la mordedura y en el Sistema Nervioso (SN) durante la propagación del virus por el transporte axonal.

2.4.1 Inmunidad innata

Los mecanismos de defensa innatos son capaces de detectar la presencia del VR en el ambiente extracelular mediante receptores como los TLR tanto en la periferia como en el SN, en la periferia por ejemplo los receptores TLR 2 y 4 cumplen con esta función; mientras en SN las neuronas centrales expresan TLR 1-4 y los plaxos nerviosos periféricos expresan TLR4. Otros receptores de reconocimiento de patrones como los RLRs se expresan en el citoplasma o bien en vesículas endosomales, como el TLR-3,

TLR 7-9 y TLR-13 (Lafon 2008). El TLR-3 detecta RNAs con una longitud mayor a 40-50 pb (Liu *et al.*, 2008), mientras los RLRs detectan los ARNs virales en citoplasma que contienen un trifosfato en el extremo 5' (Hornung *et al.*, 2006). La acción de estos receptores dirige la producción de quimiocinas, citocinas inflamatorias y moléculas con actividad antiviral como los interferones

2.4.2 Inmunidad específica

La respuesta inmune específica contra un patógeno se desencadena en los órganos linfoides como nódulos o bazo y ocurre en la periferia aun cuando se trate de un virus neurotrópico. Se ha visto que no existe diferencia entre las respuestas inmunes adaptadas (respuesta de células T CD8+, CD4+ y AAN) inducidas en ratones inyectados con cepas virulentas o con cepas menos patogénicas (Roy y Hooper, 2007). Además esta respuesta se induce después que el virus ha entrado al SN, lo que explica por que los pacientes que mueren de rabia presentan AAN en suero (Hunter *et al.*, 2010)

2.5 Mecanismos de evasión inmunológica del VR

La respuesta inflamatoria inducida por el VR es transitoria, el virus puede evadir esta respuesta por varios mecanismos:

- 1) reduce la entrada de leucocitos mononucleares y macrófagos al SN al mantener impermeable la BHE, cepas no patógenas favorecen una apertura transitoria de BHE, lo que no ocurre con cepas patógenas (Phares *et al.*, 2006; Roy y Hooper, 2007).
- 2) induce en el SN la expresión de moléculas anti-inflamatorias como los receptores 1 y 2 de TNF (Chopy *et al.*, 2011), así como de los supresores de señalización de citocinas, (Nuovo *et al.*, 2004).
- 3) dispara la expresión de moléculas que ejercen un efecto que limita la inflamación tisular como HLA-G y B7-H1. B7-H1 reduce la expresión de moléculas pro-inflamatorias como iNOS y TNF- α (Phares *et al.*, 2010), por otro lado HLA-G dirige el balance de citocinas hacia un patrón TH2 promoviendo la secreción de IL-4, IL-3 y IL-10 y reduciendo la producción de IFN- γ y TNF- α (Carosella, *et al.*, 2001).
- 4) bloquea puntos de la ruta de expresión de IFN, la proteína N limita la cascada de señalización bloqueando los RLRs (Masatani *et al.*, 2010), mientras la proteína P inhibe la fosforilación de los factores reguladores de IFN 3 y 7 (Rieder *et al.*, 2011).

2.5.1 El VR provoca la muerte de células migratorias e impide su acción en el SN

Una vez activados en la periferia, las células T, B y los macrófagos expresan moléculas de adhesión y son capaces de entrar al SN, sin embargo después de pocos días, los cerebros infectados con una cepa encefalítica mostraron aumento de células apoptóticas T migratorias CD3+ (Baloul y Lafon, 2003). Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que en neuronas infectadas por el VR se sobre expresan moléculas inmunosubversivas como B7-H1, Fas-L y HLA-A aumentando la muerte de células T activadas. (Lafon, *et al.*, 2008). Por otra parte la entrada de células B al SN así como la secreción local de AAN ayudan a resolver la infección por una cepa atenuada (Hooper *et al.*, 2009), sin embargo durante la infección por una cepa encefalítica las células B en el cerebro son casi indetectables (Kojima *et al.*, 2010), sugiriendo que una entrada restringida o bien la destrucción de células B migratorias contribuyen a la virulencia de VR. Con todos estos estudios se observa que entre más patógena sea la cepa de VR, más débil es la respuesta inflamatoria desencadenada.

De esta forma se preserva no solamente la integridad de la red neuronal sino la vida del huésped ayudando al virus a alcanzar el tallo cerebral y las glándulas salivales antes de la muerte del huésped. Además de los mecanismos de evasión citados, el VR también se beneficia del efecto inmunosupresor que se deriva de un reflejo neuronal controlado por el SNC como respuesta al exceso de citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 β o IL-6 en la periferia (Johnston y Webster, 2009).

2.6 La rabia

La rabia es una encefalomiелitis viral contagiosa que afecta a las especies de mamíferos, se considera un problema de salud en todo el mundo. El virus de rabia se transmite principalmente por mordedura o lamedura de un animal infectado, esporádicamente también por inhalación del virus en aerosoles (Gibbons, 2002). Excepcionalmente se puede propagar de persona a persona por medio del trasplante de órganos (Rupprecht y Plotkin, 2013).

El virus entra cuando fluidos como la saliva que lo contiene entran en contacto con soluciones de continuidad (cortadas, rasguños o heridas), cuando alcanza los tejidos periféricos tiene un primer periodo de replicación hasta que alcanza los ganglios espinales periféricos en la unión del nervio con el músculo o el nervio con el tendón, desde ahí realiza el transporte axonal dirigiéndose al SNC por diseminación centrípeta a razón de 8 a 20 mm/ día en los roedores (Rupprecht y Plotkin 2013) y en humanos, a una velocidad de 50–100mm/ día (Tsiang *et al.*, 1991), hasta que alcanza la medula espinal y llega a

cerebro, en tonces tiene un segundo periodo de replicación para después transportarse por vía centrífuga hacia los tejidos periféricos como la córnea, glándulas salivales médula suprarrenal, riñón, pulmón, hígado, músculo esquelético, piel y corazón (Hemachudha *et al.*, 2002).

El síndrome rabioso en humanos consiste de los siguientes estados: periodo de incubación, prodrómico, fase neurológica aguda, coma y muerte o en casos muy raros recuperación, estos periodos pueden traslaparse, se ha reportado que el periodo de incubación en humanos puede ser tan corto como 5-6 días o tan largo como de más de 6 años (Hemachudha *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 1991), pero en promedio varía de 20 a 60 días, los síntomas duran de 5 a 10 días y aparecen más rápidamente entre más cercano esté el sitio de inoculación del virus con la cabeza. Durante el periodo de incubación no hay síntomas ni modo de diagnóstico, posteriormente aparecen los signos prodrómicos con fatiga, anorexia dolor de cabeza y fiebre. Cuando el virus se encuentra ya en SNC el paciente presenta contracciones espásticas de tipo respiratorio, puede haber contracciones, vómito, irritabilidad al tacto a la luz y al sonido. En este momento la rabia se puede presentar en dos formas clínicas: la rabia furiosa y la rabia parálitica. En la rabia furiosa se presentan los síntomas más severos, con periodos de excitabilidad, alucinaciones visuales y olfatorias, crisis convulsivas y el paciente en todo momento es consciente de su gravedad, las contracciones pueden llevar a paro respiratorio coma y muerte. Esta forma de rabia es usualmente transmitida por mordedura de perro. El síntoma clásico de hidrofobia no se presenta en todos los enfermos con rabia, se refiere a contracciones de la faringe y la laringe desencadenadas por la ingestión de líquidos produciendo un dolor profundo que el paciente desarrolla un miedo tan grande al recordar dicho dolor que la sola mención del líquido o verlo causa una aversión incontrolada. La rabia parálitica o rabia tranquila, es frecuente en los casos transmitidos por murciélago, su duración es más larga y no se presentan convulsiones pero sí contracciones musculares, estupor y parálisis flácida. (Rupprecht y Plotkin, 2013)

2.6.1 Reservorios

El origen de los Lyssavirus, incluido el virus de la rabia son los quirópteros, estos son los reservorios originales. Por medio del fenómeno denominado en inglés “Spillover” o derrame los quirópteros pueden contaminar a mamíferos terrestres. Cuando el virus circula por generaciones en una sola especie sucede el fenómeno que en inglés se denomina “Host switching” o cambio de huésped, entonces el perro, el zorro, mapache o

zorrillo que fueron contaminadas por el quiróptero se convierten a su vez en reservorios (Badrane y Tordo, 2001). El humano, y especies como bovinos, cerdos, ovejas, cabras y caballos, son huéspedes incidentales y debido a sus hábitos de alimentación no transmiten activamente el virus, solo lo pueden transmitir pasivamente y son siempre fondos saco epidemiológicos (Loza y Aguilar 1998). Durante un estudio realizado en la zona de las Américas de 1993 -2002 se encontró que el perro fue el principal transmisor de rabia humana seguido del murciélago hematófago (Belotto *et al.*, 2005), por otro lado este quiróptero es el principal transmisor del virus a diferentes especies de importancia ganadera (Lee *et al.*, 2012).

2.6.2 Rabia paralítica bovina (RPB)

En los bovinos, la rabia se manifiesta con alteraciones de la conducta como una rabia furiosa, el animal puede embestir a otros bovinos, se aleja del hato, hay ansiedad, se muestra atemorizado, no toma agua (hidrofobia), también se presentan taquicardia, hay dificultad para deglutir la saliva, por lo que el animal babea abundantemente, disminuye la producción láctea, se exagera la conducta sexual (ninfomanía), se esconde en lugares oscuros (fotofobia), posteriormente se desarrolla una fase paralítica que inicia en las extremidades posteriores, adopta una postura parecida a un perro sentado (ganado derrengado) y evoluciona hasta quedar en decúbito lateral, en ocasiones hay pataleo, como si estuviera corriendo y muere por la parálisis de los músculos respiratorios (Batalla y Flores-Crespo, 1998).

La RPB es un problema de salud animal de atención prioritaria por las pérdidas económicas que causa en la ganadería, se ha estimado que la mortalidad anual causada por RPB, es cercana a las 50,000 cabezas de ganado, lo que sumado a las pérdidas indirectas de carne y leche y la devaluación de pieles por mordeduras de vampiros, significaría una pérdida anual superior a los US \$ 44 millones (Acha y Szifres, 2003). Un estudio presentado en 2007 por el Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) de México, mostró que durante los años de 2001 a 2006 se presentó un promedio de 843 casos de muerte por RPB por año, lo cual se reflejó en pérdidas económicas directas por más de 4 000,000 millones de pesos en promedio/año, todo esto en zonas endémicas.

2.6.3 El murciélago hematófago y su relación con RPB

El *Desmodus rotundus* o murciélago hematófago comúnmente conocido como vampiro, es el principal mamífero volador transmisor de rabia, es endémico de las zonas tropicales o subtropicales de América Latina, se distribuye desde el norte de México hasta la zona central de Argentina y en Trinidad y Tobago, el hábitat adecuado para este quiróptero es un ambiente húmedo, oscuro, en temperaturas nunca menores a 15°C y a menos de 2000 metros sobre el nivel del mar. El vampiro se alimenta de la sangre de animales de pastoreo, de modo que las colonias de vampiros se establecen en cuevas cercanas a las zonas de diversos tipos de ganado, por ello, la distribución del vampiro coincide con la incidencia de casos de RPB, de modo que el control de las poblaciones de murciélago ayuda sustancialmente a reducir la incidencia de casos en animales silvestres, y las pérdidas económicas en la ganadería desde México hasta Argentina (Lee *et al.*, 2012; Jhonson *et al.*, 2014).

Capítulo 3

Vacunación contra Rabia y Brucelosis en Ganado bovino

3.1 Cepas vacunales para BB

3.1.1 Cepa RB51

En el Instituto Politécnico de la Universidad de Virginia en E.U.A se obtuvo la cepa rugosa atenuada *B. abortus* RB51 a partir de la cepa 2308, a partir de sucesivos pasajes de la cepa patógena *B. abortus* 2308 en un medio que contenía rifampicina y ampicilina (Schurig *et al.*, 1991). La ventaja principal de esta cepa es que no producen Ac contra el antígeno O del LPS por lo que durante el diagnóstico se pueden diferenciar animales infectados de vacunados. Su utilización como vacuna contra la BB se permitió en Estados Unidos de Norteamérica desde 1996, así como en México, Chile, Argentina y Venezuela en 1997 y, en Costa Rica, Colombia y Paraguay en 1999. (Schurig *et al.*, 2002) Esta cepa es estable sin embargo, aún existen controversias con respecto a su eficiencia (Moriyón *et al.*, 2004) y sólo se recomienda en países que tienen baja prevalencia de la enfermedad (Nicoletti 2010).

3.1.2 Cepa S19

Fue aislada en 1923 por el Dr. John Buck de la leche de una vaca llamada Matilda que a pesar de haber sido infectada tuvo tres becarras sin abortar, su atenuación resultó espontáneamente y el 19 es el número de cultivo inmunogénico menos patógeno que el cultivo original (Buck, 1930). Es la cepa vacunal viva de mayor uso contra la BB, todos los programas que han tenido éxito en el control de BB la han empleado en sus campañas; confiere entre un 70-80% de protección contra el aborto y 50-60% contra la infección frente al desafío con cepas patógenas (Godfroid *et al.* 2011), además los animales inmunizados con esta cepa producen Ac del tipo IgG1, IgG2b e IgM específicos contra la cadena O del LPS (Vemulapalli *et al.*, 2000b), por otro lado es capaz de conferir inmunidad hasta por ocho partos, que es la vida productiva de una vaca. *B. abortus* S19 es estable, sin embargo presenta algunas desventajas; puede inducir abortos, aunque sea con una tasa menor al 1% (Moriyón *et al.*, 2004), es patógena para el humano y principalmente los Ac por vacunación hacen difícil diferenciar entre bovinos vacunados e infectados con cepas silvestres de *B. abortus* (Schurig *et al.*, 2002).

3.2 Administración de cepas vacunales para BB en México

En México, la cepa S19 se ha empleado y utilizado desde 1951; para 1997 se autorizó el uso de la cepa RB51, sin embargo la cepa S19 continúa siendo la vacuna de

elección en nuestro país y en otros países de alta prevalencia. La dosis de la cepa S19 de *B. abortus* varía con respecto de la edad de los animales, en hembras de 3 a 6 meses de edad se aplica la dosis llamada clásica y en hembras mayores a 6 meses incluso gestantes se administra la denominada dosis reducida, En cuanto a la aplicación de la cepa RB51 en bovinos, la dosis autorizada en los países donde se utiliza, coincide con la dosis que se aplica en becerras de 3 a 6 meses con S19, pero se permite aplicar desde los 3 hasta los 12 meses. En la Tabla 3 se presenta el esquema de vacunación para ambas cepas (NOM-041-ZOO-1995)

Tabla 3. Dosis de cepas vacunales de <i>B. abortus</i> aplicadas según la edad		
Cepa	Edad	Dosis/ Volumen
RB51	Becerra	1 a 3 X 10 ¹⁰ UFC/2 ml
	Vaca	1 a 3 X 10 ⁹ UFC/ 2 ml
S19	Becerra	6 a 12 X 10 ¹⁰ UFC/ 5 ml
	Vaca	3 X 10 ⁸ a 3 X 10 ⁹ UFC/ 2 ml
En todos los casos se administran cepas vivas por vía subcutánea en el tercio medio del cuello		

3.3 Aspectos moleculares de la cepa *Brucella abortus* S19.

El defecto genético que permite la atenuación de esta cepa aún no ha sido definido, en 2008 se presentó la secuencia de su genoma (Crastra *et al.*), identificando 24 posibles genes involucrados en la atenuación, de los cuales, cuatro son relevantes; uno codifica para una proteína de membrana y esta deletada en la cepa vacunal pero también en algunas cepas virulentas por lo que es poco probable que esté involucrada en la atenuación, los otros tres corresponden a proteínas relacionadas con el metabolismo de eritritol. El operón de eritritol contiene 4 marcos de lectura para *eryA*, *eryB*, *eryC* y *eryD*, en la cepa S19 se observa una delección de 703 ntd que interrumpe la región entre *eryC* y *eryD* afectando el extremo C terminal de la proteína *eryC* y el N-terminal de la proteína *eryD*, esto comparado con las cepas 2308, 9-941 de *B. abortus*. Esto complementa la información previa de que el crecimiento de S19 se ve inhibido en presencia de eritritol (Sangari *et al.*, 1994), sin embargo la delección en el operón *ery* no es el único factor relacionado con la atenuación (Sangari *et al.*, 1998). Por otro lado la cepa S19 de *B. abortus* carece de factores para la sobrevivencia dentro del macrófago. La Figura 6 ilustra eventos durante el tráfico intracelular de la cepa virulenta 2308 y la cepa atenuada S19.

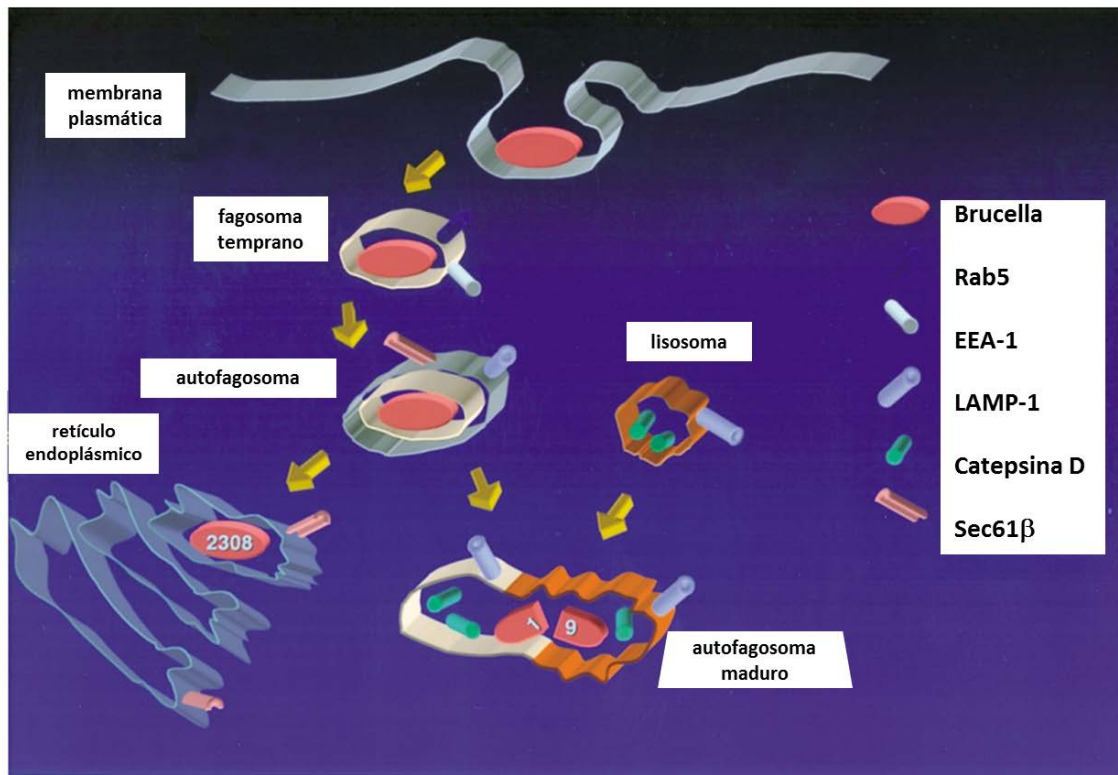


Figura 6. Modelo comparativo del tráfico intracelular entre las cepas *B. abortus* 2308 y S19 (Modificado de Pizarro-Cerdá *et al.*, 2000). La sobrevivencia intracelular de *B. abortus* depende de su capacidad para resistir el ambiente ácido dentro del fagosoma y de inhibir la fusión fagosoma-lisosoma. *B. abortus* entra a la célula mediante un mecanismo dependiente de LPS, de 5-10 min después de la invasión, ambas cepas interaccionan con los endosomas tempranos y se encuentran en una vacuola que contiene a *Brucella* (VCB) que expresa los marcadores Rab5 y EEA-1, posteriormente la vacuola cambia a un autofagosoma que presenta los marcadores LAMP-1 y sec61 β . En los estados tardíos de infección la cepa atenuada S19 es degradada dentro de un autofagosoma maduro que contiene cathepsina D, en contraste; la cepa virulenta 2308 redirige el proceso de maduración del fagosoma bloqueando la fusión de los lisosomas con los fagosomas que contienen la bacteria y se mantiene en un compartimento negativo a cathepsina D que conserva el marcador sec61 β (Pizarro- Cerdá *et al.*, 1998a), que sirve como marcador del retículo endoplásmico, la VCB interacciona entonces con el RE formando un organelo derivado del RE donde la cepa virulenta puede proliferar (Celli *et al.*, 2003; Pizarro- Cerdá *et al.*, 1998a).

3.4 Prevención de RPB

La vacunación es la forma más eficiente para prevenir RPB, con este fin se han utilizado diversas cepas, en México por ejemplo las primeras vacunas aplicada contenían virus inactivo producidas en animales de laboratorio, para 1957 se introduce la cepa F lury, elaborada con virus vivo a partir de pasajes en embrión de pollo, sin embargo en 1965 se tienen noticias de su ineficacia para detener un brote de derriengue, puesto que los

animales no produjeron AC después de seis meses de vacunación. En 1967 y 1968 se prueba una vacuna conteniendo la cepa ERA, producida en cultivos primario de riñón de cerdo y que mostró ser adecuada para prevenir RPB. Paralelamente a estos trabajos y gracias a un proyecto coordinado FAO/INIP, se desarrolló una vacuna antirrábica a partir del aislamiento viral V-319 originado de vampiro, este aislamiento se designó posteriormente como cepa Acatlán (Hernández-Baumgarten, 1972)

Actualmente para la prevención de RPB en México se aplican versiones de virus vivo e inactivo de las cepas; ERA, Roxane, SAD, Acatlán V-319 que están contenidas en vacunas producidas por laboratorios privados, además la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (Pronabive) dependiente de SAGARPA produce la vacuna Derri A Plus que contiene la cepa de virus rábico activo Acatlán V-319; y Derri Plus constituida por la cepa inactiva del virus Pasteur (PV). Ambas administradas vía IM

La NOM-067-ZOO-2007, sobre la Campaña nacional para la prevención y control de la rabia en bovinos y especies ganaderas indica que la vacunación antirrábica será obligatoria en zonas o regiones donde se tienen plenamente identificada la presencia de la RPB (Áreas enzóticas) y en lugares donde se presenten casos clínicos y/o confirmados por laboratorio. Se establece también que el esquema de vacunación antirrábica para bovinos y especies ganaderas mayores de un año, se realizará en el área endémica de rabia y cuando las acciones de Campaña se encuentren en la zona, mientras que para animales menores a un año se aplica una primera dosis al mes de edad con refuerzos a los tres y seis meses; en todos los casos la vacuna se aplica conforme a la vía de administración y dosis indicada por el laboratorio fabricante. Para el control de un foco de rabia en el ganado bovino y otras especies ganaderas, se deben aplicar vacunas antirrábicas de tipo virus activo modificado y/o de tipo virus inactivado, además de realizar actividades de control del transmisor.

En el caso del ganado, por motivos económicos o de otra índole, muchas veces no se vacuna cada año, y en ocasiones se pretende vacunar en el momento en que surge el brote, esta práctica resulta poco eficaz pues la vacunación sólo actúa cuando los animales se han inmunizado previamente y se ha demostrado que la vacunación en un animal que incubaba el virus patógeno, acelera el desarrollo de la enfermedad (Pastoret *et al.*, 1997).

Capítulo 4

Vacunas de ADN

La idea de vacunación génica surge desde los primeros ensayos que demostraron que la administración de ADN recombinante *in vitro* e *in vivo* resultaba en la expresión de la proteína codificada, esta opción se fortaleció al demostrar la producción de Ac contra la hormona de crecimiento humano en ratones vacunados con plásmidos conteniendo el gen de dicha proteína regulado por distintos promotores eucarióticos (Tang *et al.*, 1992). La administración de ADN desnudo mostró su potencial como vacuna gracias a los trabajos de Robinson *et al.* (1993) y Ulmer *et al.* (1993) donde se evidenció que la aplicación de plásmidos codificantes de la Hemaglutinina del virus Influenza en pollos y ratones respectivamente, fue capaz de proteger a los animales frente al reto con el virus completo.

Las vacunas de ADN ofrecen diferentes ventajas en comparación con las vacunas actuales (Tabla 4).

a) estimulan la respuesta de células T CD8⁺ asociada a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I como ocurre con las vacunas atenuadas; sin manejar al agente patógeno y eliminando la posibilidad de reversión, en contraste las vacunas basadas en proteínas no estimulan este tipo de respuesta.

b) su producción y mantenimiento no requiere la cadena fría necesaria para la estabilidad de las vacunas convencionales.

4.1 Características de un plásmido vacunal

Estructuralmente los plásmidos vacunales contienen regiones necesarias para realizar su producción y lograr estimular eficientemente la respuesta inmune (Fig. 7). Estas regiones se encuentran en dos elementos básicos; una unidad transcripcional que contiene las secuencias necesarias para la expresión óptima de la proteína, así el gen en cuestión está controlado por un promotor fuerte generalmente viral; CMV o SV40 son los más utilizados y se le incorporan secuencias de poliadenilación estabilizadoras de ARNm como la de la hormona de crecimiento bovino (BGH) o SV40. El otro elemento, la unidad adyuvante contiene regiones como el origen de replicación, necesario para la propagación del plásmido en la bacteria que lo alberga y el gen de selección que ayuda a identificar las bacterias que lo contienen. En la unidad adyuvante también se encuentran motivos inmunoestimuladores, que consisten de nucleótidos no metilados citosina-fosfato-guanosina (CpG) específicos de bacterias, que no están presentes en células eucariotas y

que son potentes estimuladores de células B, activando además células asesinas naturales (NK) y células T (Gurunathan *et al.*, 2000).

Tabla 4. Comparación de diferentes tipos de vacunas. Traducido de Gurunathan y et al., 2000

		Vacuna de ADN	Vacuna atenuada	Vacuna inactiva o de Subunidad proteica
Respuesta Inmune				
Humoral	Células B	++	+++	+++
Celular	CD4+	+++Th1a	+/-Th1	+/- Th1
	CD8+	++	+++	-
	Presentación del antígeno por	MHC class I & II	MHC class I & II	MHC class II
Memoria	Humoral	+++	+++	+++
	Celular	++	+++	+/-
Producción	Facilidad de desarrollo y producción	+++	+	++
	Costo	+++	+	+
	Almacén y transporte	+++	+	+++
Seguridad		+++	++	++++

4.2 Vacunación génica antirrábica.

Los estudios sobre la inmunización con ADN contra el virus de rabia, involucran diferentes proteínas virales como la N o P, sin embargo la glicoproteína G del virus rábico es la única capaz de inducir la producción de AAN, por lo que representa el inmunógeno ideal y en ella se han enfocado los esfuerzos para desarrollar las vacunas llamadas de cuarta generación diseñadas por ingeniería.

En el trabajo de Wiktor *et al.* (1984), se construye un virus vaccinia recombinante conteniendo la glicoproteína G del virus de rabia (V-RG), la inoculación de V-RG en ratones y conejos indujo niveles altos de AAN logrando la protección contra el reto con cepas de virus silvestre. El V-RG se ha aplicado exitosamente para la vacunación oral de fauna silvestre que ingieren cebos donde se coloca el virus recombinante (Pastoret 1996).

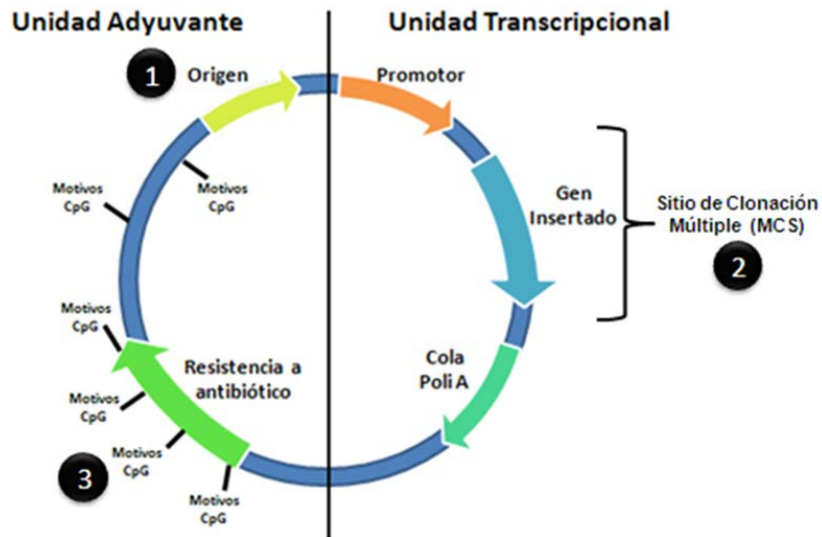


Figura 7. Esquema de los requerimientos básicos de un vector plasmídico de ADN. (Modificado y traducido de Gurunathan y col; 2000)

Se han construido diferentes plásmidos vacunales conteniendo el DNAC del gen G, el nivel de expresión de la proteína y la magnitud de la respuesta inmune inducida por el plásmido, depende de ciertos factores donde el más importante es el tipo de promotor que dirige la expresión en mamíferos, en este sentido los promotores virales de SV40 y Citomegalovirus (CMV) son los más utilizados. Por ejemplo el plásmido pSG5-ERA contiene el gen G de la cepa ERA regulado por el promotor SV40 (Xiang *et al.*, 1994). En los laboratorios *Lyssavirus*, del Instituto Pasteur en Francia se usó por primera vez el vector pCIneo para clonar el gen G controlado por el promotor CMV para la expresión en mamíferos, logrando inducir la producción de AAN, células T ayudadoras, T citotóxicas y NK en ratón (Bahloul *et al*; 1998).

Trabajos desarrollados en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI a cargo del Dr. Álvaro Aguilar Setién han demostrado que la administración del plásmido vacunal pPRG induce a la formación de AAN en perros de la raza Beagle por vía intramuscular (Perrin *et al*; 2000). Posteriormente este mismo grupo emplea la cepa atenuada de *Salmonella typhimurium* SL3261 transformada con el plásmido pPRG, administrada por vía oral en ratones induciendo la formación de AAN, demostrando la utilidad de esta bacteria intracelular como acarreador del plásmido vacunal atirrábico (Salas; 2005 ; Tesis de Maestría). Recientemente se

construyó el plásmido vacunal (pGQH), basado en el vector comercial pCI-neo en el que se insertó el gen G del aislado HQ01-IMSS proveniente del cerebro de un niño que murió de rabia transmitida por un quiróptero hematófago, este plásmido fue administrado a ratones BALB/c adultos vía intramuscular (IM), observando seroconversión superior a las 0.5 unidades UI a partir del día 30 postvacunación, los ratones también resistieron el desafío con virus CVS (Challenge Virus Strain) vía intracerebral (Aguilar-Setién *et al.*; 2008). Este mismo plásmido se administró por vía nasal como tratamiento post-exposición en ratones y conejos, mostrando una supervivencia del 100% contra el reto de virus de rabia CVS. (Tesoro *et al.*; 2008).

4.3 Bacterias intracelulares como acarreadores de ADN Vacunal

Diferentes cepas bacterianas de tipo intracelular se han utilizado como vehículos vivos para inducir respuestas inmunes contra ellos mismos y contra los antígenos heterólogos que expresan. A partir de mediados de los años 90s, también se han utilizado vectores bacterianos como transportadores de vacunas ADN (Sizemore *et al.*, 1995), entre las bacterias más utilizadas se encuentran del grupo de Gram negativas; *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Shigella* spp., y de las Gram positivas *Mycobacterium* spp., *Listeria Monocytogenes*. (Dietrich *et al.*, 2001, Hense *et al.*, 2001). La bacteria se convierte solamente en el vehículo de un ADN plasmídico, que contiene un gen regulado por un promotor eucarionte.

4.4 *Brucella abortus* como sistema de expresión heteróloga

B. abortus naturalmente no posee plásmidos, sin embargo se ha demostrado que es capaz de aceptar y transferir plásmidos *in vitro* e *in vivo* en modelo murino (Verger *et al.*, 1993; Elzer *et al.*, 1995). En los años 90s se desarrollaron plásmidos replicativos en *B. abortus*, el primero se denominó pB BR1MCS y confería resistencia a Cloranfenicol (Kovach *et al.*, 1994), de éste se derivaron otros cuatro que de acuerdo con el antibiótico al que conferían resistencia se designaron como; pBBR1MCS-2 para Kanamicina, pBBR1MCS-3 para Tetraciclina, pBBR1MCS-4 para Ampicilina y finalmente pBBR1MCS-5 para Gentamicina (Kovach *et al.*, 1995). La existencia de esta familia de plásmidos abrió la posibilidad de utilizar este microorganismo como sistema de expresión heteróloga.

Comercio y colaboradores (1998), expresaron por primera vez un antígeno heterólogo en la cepa vacunal de *B. abortus* S19, para ello construyeron un plásmido conteniendo la secuencia regulatoria y la secuencia del péptido señal del gen *bcs31* de *Brucella* spp fusionado con una quimera de un antígeno repetitivo de *T. cruzi*, se logró

generar una buena respuesta de Ac específica contra la proteína heteróloga). La cepa vacunal RB51 también se utilizó en estos ensayos de expresión, las proteínas HSP65 de *Mycobacterium bovis* y β -galactosidasa de *E. coli* se fusionaron con los promotores de *sod* y *groE* de *B. abortus* generando una respuesta contra las proteínas heterólogas sin afectar la atenuación de la cepa (Vemulapalli *et al.*, 2000a). Por su parte la cepa de *B. abortus* S19 es capaz de inducir una fuerte respuesta inmune humoral y celular *in vivo* en ratones BALB/c contra proteínas heterólogas como la proteína RAP1 del parásito *Babesia bovis* (Sabio y García *et al.*, 2008) o el antígeno MPB83 de *Mycobacterium bovis* (Sabio y García *et al.*, 2010) sin alterar su eficacia protectora contra la infección de *B. abortus* virulenta. Los estudios anteriores se han realizado empleando como base plásmidos de la familia pBBRM1CS con promotores de genes codificados por *Brucella* spp. Sin embargo, no se ha probado si *B. abortus* S19 es capaz de funcionar como vector de un plásmido con promotor eucariótico.

Capítulo 5

Diseño del estudio

5.1 Planteamiento del problema

La RPB y la BB son enfermedades que afectan al ganado bovino, constituyen un problema de salud animal que impacta en la salud humana y causan pérdidas económicas severas. La vacunación es la principal medida de prevención, por lo que es necesario desarrollar alternativas que faciliten las condiciones en que se realiza la vacunación y optimicen sus beneficios.

5.2 Justificación

La RPB y la BB son enfermedades prevenibles por vacunación. *B. abortus* S19 es una cepa atenuada que ha mostrado ser la más eficiente para proteger contra BB, esta bacteria intracelular se ha empleado como vector de plásmidos recombinantes. Por otro lado la glicoproteína G del virus rábico está reconocida como su principal antígeno y se ha demostrado que plásmidos vacunales de expresión eucariota, codificantes de la gpG, inducen la producción de AAN en animales inmunizados que los protegen contra el desafío. Además diferentes bacterias intracelulares han mostrado ser útiles para entregar plásmidos vacunales, la cepa atenuada de *Salmonella typhimurium* SL3216 ha servido como vector de un plásmido vacunal de gpG en el modelo de ratón. Si la cepa *B. abortus* S19 se transforma con un plásmido vacunal antirrábico, representa un producto potencialmente útil como vacuna bivalente contra Brucelosis y Rabia para ganado bovino.

Hipótesis

La cepa *B. abortus* S19, se puede transformar con un plásmido codificante del gen de la glicoproteína G del virus de rabia ligado al promotor de CMV, y puede mantenerse estable *in vivo* e *in vitro* para inducir la expresión simultánea de AAN y anti-Brucella en el modelo de ratón.

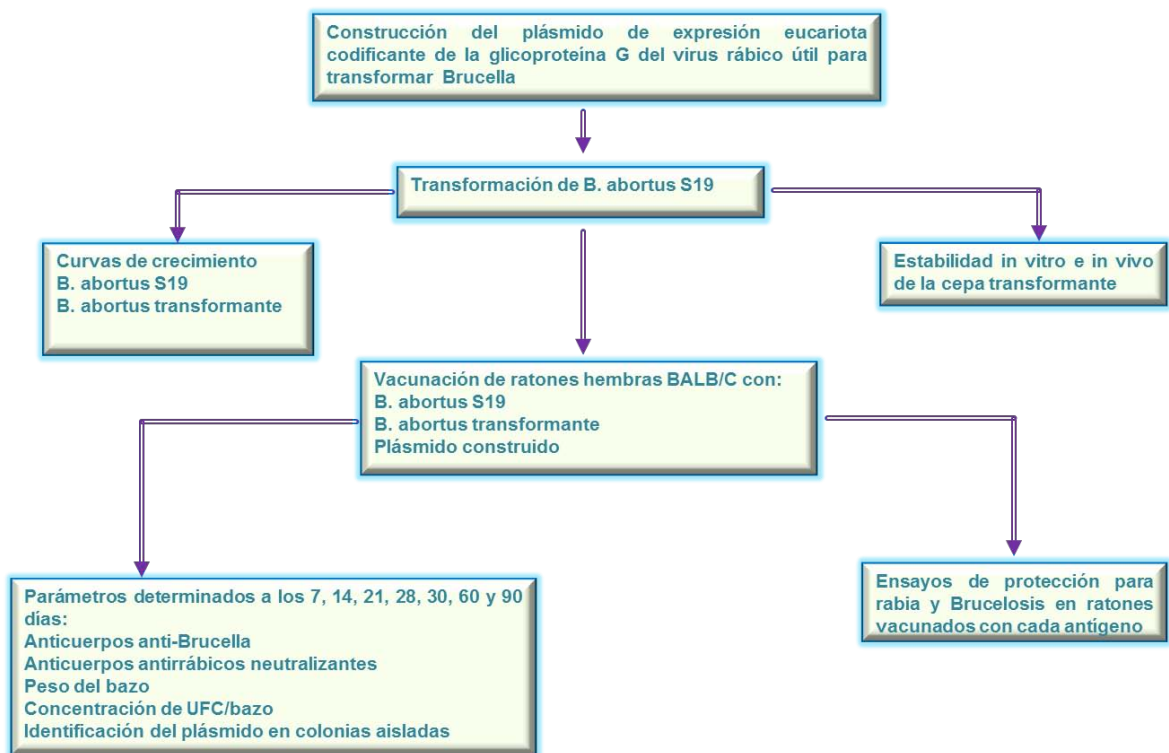
5.4 Objetivo General

Transformar la cepa *B. abortus* S19, con un plásmido codificante del gen de la glicoproteína G del virus de rabia ligado al promotor de CMV, determinando su estabilidad *in vivo* e *in vitro* y evaluar su utilidad para inducir la expresión simultánea de AAN y anti-Brucella.

5.4.1 Objetivos específicos

1. Construir un plásmido codificante del gen de la glicoproteína G del virus de rabia ligado al promotor de CMV útil para transformar *Brucella abortus*.
2. Transformar la cepa vacunal de *Brucella abortus* S19 con el plásmido recombinante construido.
3. Determinar la estabilidad *in vivo* e *in vitro* de la cepa *B. abortus* S19 transformante.
4. Evaluar el nivel de AAN y anti-Brucella en ratones BALB/c inmunizados con la cepa transformante.
5. Determinar el nivel de protección inducido contra Rabia y Brucelosis en los ratones inmunizados.

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



Capítulo 6

Material y Metodología

6.1 Cepas: *E. coli* DH10B; contiene al plásmido pGQH y fue donada por el Dr. Álvaro Aguilar Setién (Laboratorio de Inmunología de Hospital de Pediatría del CMN-SXXI), *E. coli* TOP10; se utilizó para propagar todas las construcciones de este trabajo y fue donada por el Dr. Rigoberto Hernández Castro (Departamento de Ecología de Agentes Patógenos, Hospital General “Dr. Manuel Gea González,” Secretaría de Salud), *B. abortus* S19; es una cepa vacunal contra BB y fue donada por el Dr. Rigoberto Hernández Castro. Todas las cepas se hicieron crecer en caldo Soya Trypticaseína (CST) a 37 °C con agitación orbital a 200 rpm, o en Agar Soya Trypticaseína (AST), cuando fue necesario se agregó ampicilina en los medios a una concentración de 100 µg/mL. Las cepas se conservaron en congelación en CST con glicerol al 10% a -70°C.

6.2 Plásmidos: pGQH; se deriva del pCI-neo (Promega E1841, Fig. 13 A), contiene en el sitio *Xba*I un fragmento de 1576 pb que codifica para el gen de la glicoproteína G del virus de la rabia (cepa HQ01-IMSS) y ha sido previamente utilizado como plásmido vacunal (Aguilar-Setién et al., 2008; Tesoro et al., 2008), pBBR1MCS-4; es un vector de moderado número de copias, con amplio rango de huésped entre bacterias Gram negativas, confiere resistencia a ampicilina y se ha demostrado que puede ser aceptado y establemente mantenido en diferentes cepas de *Brucella* (Kovach et al., 1994). Los plásmidos B y C presentados en la Fig. 8, se utilizaron para la construcción del plásmido recombinante pBBR4-CMV-Ggp-SV40+.

6.3 Ratones. Se utilizaron ratones (*mus musculus*) BALB/c AnNHsd, hembras de 6-8 semanas de edad que se obtuvieron del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (licencia BCB/CCUAL/118/2013). Los ratones fueron colocados en cajas con agua y alimentación *ad libitum* y fueron aclimatados una semana antes de comenzar con los experimentos. Todos los procedimientos experimentales y el cuidado de los animales se realizaron de acuerdo con la guía para el uso y cuidado de animales de laboratorio y con la NOM-062-ZOO-1999 que rige el uso y cuidado de animales de laboratorio en México

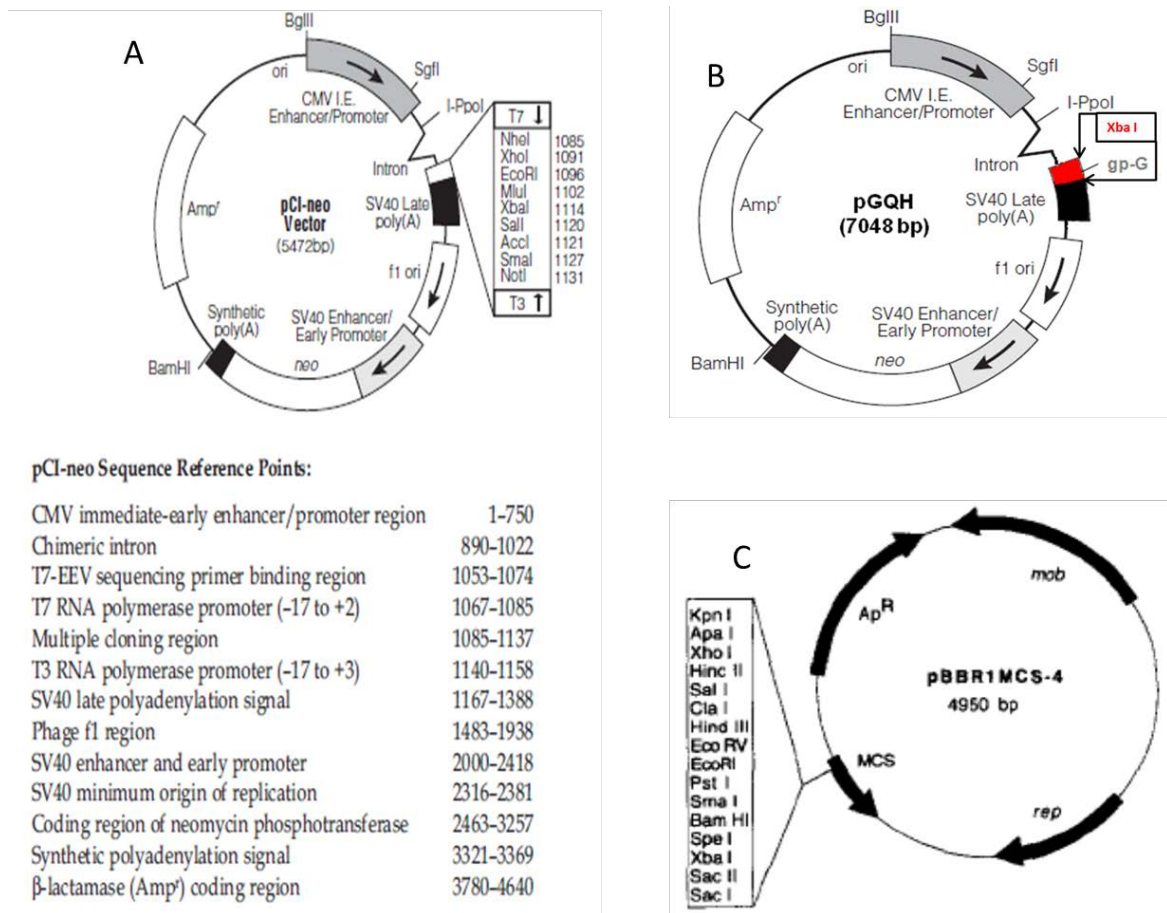
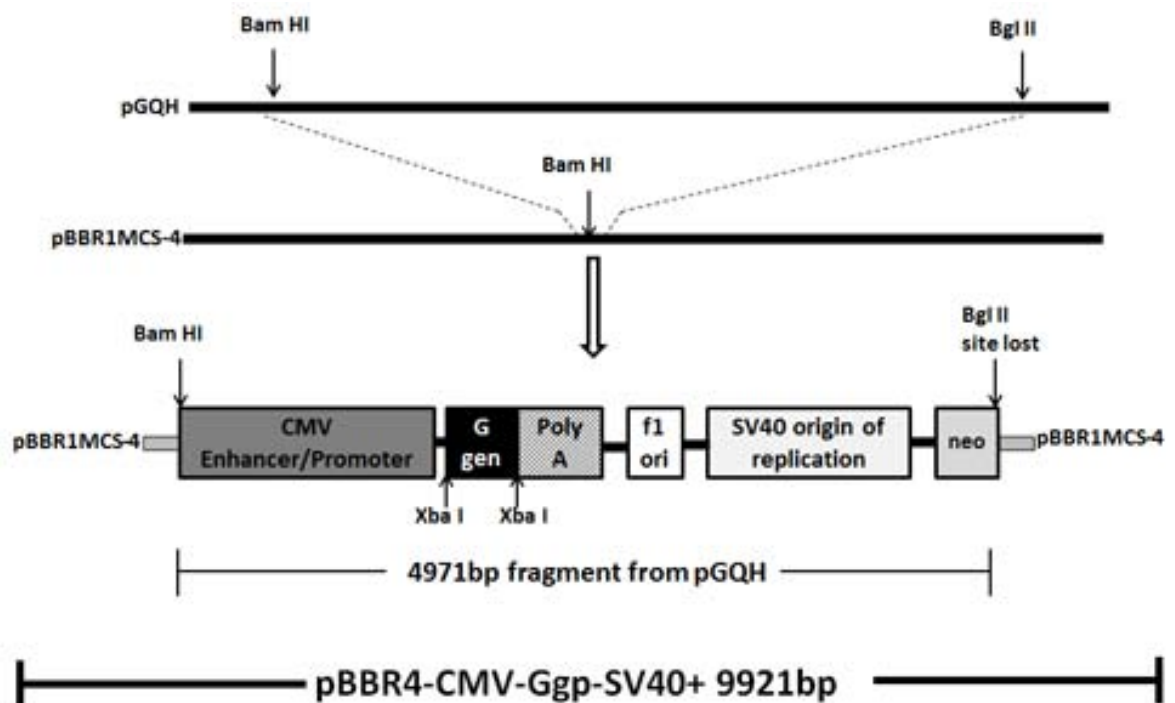


Figura 8. Esquema de los plásmidos de trabajo.

6.4 Construcción del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ codificante de la glicoproteína G del virus de rabia para transformar *Brucella abortus*. El diseño para construir este plásmido se presenta en el esquema 1. El plásmido pGQH se restringió con las enzimas *Bam*HI y *Bgl*II, el fragmento que contiene el gen G regulado por el promotor de CMV se liberó y se ligó en el plásmido pBBR1MCS-4 que previamente se restringió con *Bam*HI. Con el producto de ligación se transformó la cepa de *E. coli* TOP-10. De las colonias resistentes a ampicilina (Amp^r) se extrajo el plásmido que se restringió con *Bam*HI para verificar el tamaño esperado en la construcción y con *Xba*I para liberar el gen G. El plásmido recombinante se purificó con el Kit Endofree Plasmid Giga (Qiagen, Hilden, Germany), de acuerdo con las especificaciones del fabricante y se denominó pBBR4-CMV-Ggp-SV40+. El gen G se secuenció a partir del plásmido puro usando iniciadores externos; Ggp1 y Ggp2 e internos; Gli1 y Gli2. Los iniciadores internos se designaron

considerando un fragmento que incluye la mayoría de los sitios antigénicos de la glicoproteína G



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

6.5 Transformación de *B. abortus* S19. La cepa de *B. abortus* S19 se transformó por electroporación empleando 3 μ g del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ puro, aplicando un pulso de 2.5 K v, las colonias Amp^r se analizaron mediante reacciones de PCR independientes, para identificar al plásmido y al operón *ery* deletado. Para el plásmido se amplificó un fragmento de 5100 pb que corresponde al inserto clonado usando los iniciadores pBBR; sentido 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' y antisentido 5'-CGAGGTGACGGTATCG-3', aplicando el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 96°C por 1min, 35 ciclos de; desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento a 64°C por 45 seg, extensión a 72°C por 5 min; y una incubación final a 72°C por 10 min. Para la delección en el operón *ery* se emplearon iniciadores previamente reportados (Sangari *et al.*, 1994; Mukherjee *et al.*, 2005), que generan un amplicón de 361 pb. La cepa transformante se nombró *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+.

6.6 Curvas de crecimiento bacteriano. Una semilla de las cepas de *B. abortus* S19 y *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ se cultivó por separado en 20 ml de CST y CST-Amp respectivamente, hasta alcanzar una $DO_{600} = 1$, posteriormente se tomaron muestras cada hora hasta que el cultivo alcanzó la $DO_{600} = 2$. De cada muestra se cuantificó UFC/ml para localizar el momento correspondiente a la fase logarítmica tardía para cada cepa. El proceso se realizó por triplicado. La preparación de las semillas se describe en el Anexo 1

6.7 Cuantificación de Unidades formadoras de colonia (UFC). La determinación de UFC se realizó mediante diluciones decuples con BSF (Buffer salino de fosfatos) de la muestra correspondiente. Para los ensayos *in vitro* la muestra fue el cultivo de cada cepa determinando UFC/mL, para los ensayos *in vivo* se determinó UFC/bazo, en homogeneizados de bazo infectados con cada cepa, las muestras de *B. abortus* S19 y *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ se sembraron en AST y AST-Amp respectivamente.

6.8 Estabilidad *in vitro* de la cepa *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+. La cepa *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ se hizo crecer en CST-Amp por 48 h, posteriormente se transfirieron 100 μ L del cultivo a 5 ml de CST y CST-Amp, y se incubaron nuevamente por 48 h para obtener el pasaje 1. El proceso se repitió sucesivamente hasta el pasaje 5. De cada pasaje se determinó el número de UFC/mL, bajo tres condiciones: 1) bacteria cultivada en CST y aislada en AST (CST/AST), 2) bacteria cultivada en CST y aislada en AST-Amp (CST/AST-Amp), y 3) cultivo control, bacteria cultivada en CST-Amp y aislada en AST-Amp (CST-Amp/AST-Amp). De cada condición se seleccionaron al azar colonias para identificar por PCR al plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ usando los iniciadores pBBR.

6.9 Expresión *in vitro* del gen G por la cepa *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+. Las cepas de *B. abortus* S19 y *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ se hicieron crecer en CST y CST-Amp respectivamente durante 48 hrs y se extrajo el RNA total usando el método de Trizol (GIBCO BRL, USA). Las muestras se trataron con DNAsa antes de la síntesis de DNAc y posteriormente se realizó la retrotranscripción con la enzima Omniscript RT (Qiagen, Hilden, Germany) y Oligo dT (Invitrogen, USA). Una reacción de PCR se desarrolló empleando los iniciadores Gli1 y Gli2; sentido 5'-ACACAATCCGTACCCTGACT-3' y antisentido 5'-CCCGTTTACATGAGGATGAC-3', para amplificar un fragmento de 736 pb, que incluye los sitios antigénicos; I, IIa, III, G1 y G5, aplicando el siguiente protocolo de amplificación: desnaturalización inicial a 96°C por

1min, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento a 64°C por 45 seg, extensión a 72°C por 1 min, con una incubación final a 72°C por 10 min.

6.10 Estabilidad *in vivo* de la cepa *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+. Tres ratones se inocularon vía intraperitoneal (i.p.) con $\sim 10^6$ UFC de *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+, siete días después los animales se sacrificaron, los homogeneizados de bazo se sembraron en AST y AST-Amp y se determinó el número de UFC/bazo; en colonias aisladas de cada medio se aplicó una PCR múltiple, para identificar la delección en el operón *ery* y el gen G aplicando el protocolo para los iniciadores de G.

6.11 Transfección de células BHK-21 con el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+. Las células BHK-21 se hicieron crecer en medio mínimo esencial (MEM) complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Se cosecharon células en fase logarítmica de crecimiento y 1×10^6 células se transfectaron por electroporación con 15 μ g del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ aplicando un pulso de 140 V durante 25mseg en una celda de 0.2 cm. La expresión de la glicoproteína se monitorea a las 24, 48 y 72 hrs post transfección y se incluyó un control de células no-transfectadas. Como anticuerpo primario se utilizó IgG humana policlonal con 150 UI/mL de AAN en una dilución 1:50 y la proteína se reveló con una dilución 1:100 de anticuerpo de cabra anti-humano conjugado a fluoresceína.

6.12 Preparación del inóculo bacteriano para inmunización. Las cepas de *B. abortus* S19 y S19 *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ se cultivaron hasta la fase logarítmica tardía, los cultivos se lavaron tres veces con SBF mediante centrifugación por 30 min a 4500 rpm, la pastilla se resuspendió en 5 mL de SBF y se cuantificaron las UFC/ml, el proceso se realizó por triplicado; con el promedio de los datos se estimó la preparación del inóculo para cada cepa.

6.13 Inmunización de ratones. Se formaron grupos de trabajo con 21 ratones cada uno y se inmunizaron con tres diferentes antígenos, plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+, bacteria transformante *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ y cepa vacunal *B. abortus* S19. Tres ratones de cada grupo se sacrificaron en los días 7, 14, 21, 28, 30, 60 y 90 post-inmunización (d.p.i.) para determinar peso del bazo, UFC/bazo, Ac anti-Brucella, AAN, identificación del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ y delección del operón *ery* en colonias aisladas de los grupos B y C.

6.14 Obtención de suero. Los ratones se anestesiaron con una mezcla de Ketamina/Xilacina a una dosis de 0.1 mL/10 g de peso vía i.p., la sangre se obtuvo

mediante punc ión del pl exo retro-orbital c on tubo c apilar, el s uero s e s eparó en dos partes, para AAN se al macenó a -30°C has ta su us o y par a Ac anti-Brucella se us ó inmediatamente.

6.15 Determinación de Ac anti-Brucella. En una placa de vidrio se colocaron 30 μL de suero y 30 μL del reactivo de Rosa de bengala (SAGARPA B-0653-009), se mezclaron mediante movimiento circular durante 4 minutos, la prueba se leyó con una buena fuente de luz y sobre un fondo claro buscando aglutinación, el resultado se reporta como positivo o negativo, las muestras se compararon con sueros control.

6.16 Determinación de AAN. Los s ueros pr oblemas e ev aluaron mediante la prueba RFFIT (prueba rápida *de* inhibición *de* focos fluorescentes, por sus siglas en inglés), que consiste en determinar la capacidad de un s uero para inhibir el número de focos fluorescentes producidos por una muestra v iral c on título c onocido de focos, comparándolo con l a c apacidad i nhibitoria de un s uero de r eferencia. El m étodo s e describe en el A nex o 2. El t ítulo de cada s uero se c alculó por el método de Reed y Muench.

6.17 Evaluación de la protección *in vivo*. Se t rabajó c on tres grupos de r atones manejados en las mismas condiciones descritas para los ensayos de inmunización. Para la prueba de desafío de rabia, 9 ratones de cada grupo se inocularon vía intracerebral con virus CVS en un título de $10^{5.52}$ DLR₅₀ 90 d.p.i., y se observaron durante un periodo de 21 días r egistrando el por centaje de s obrevivencia. P ara l a prueba de p rotección c ontra brucelosis no se administró plásmido y se incluyó un grupo con solución amortiguadora de fosfatos (SBF) como control, diez ratones de c ada grupo fueron desafiados con l a cepa virulenta *B. abortus* 2308 a una concentración de 5×10^4 UFC/ml por vía i.p 45 d.p.i. Dos semanas después del desafío los ratones fueron s acrificados por dislocación c ervical, a éstos se les colectó el bazo y se homogenizaron en 1 m l de SBF realizando diluciones décuples para determinar UFC/bazo.

6.18 Análisis estadístico. Los datos de UFC se normalizaron por transformación logarítmica, par a l os ensayos de es tabilidad *in vitro* los dat os s e analizaron mediante ANOVA de una vía con la prueba de Dunnett, la carga bacteriana (UFC/bazo) en medios con y sin antibiótico para los ensayos de estabilidad *in vivo*, se analizó con la prueba de t student, esta prueba también se aplicó para el ensayo de protección contra brucelosis. El peso de los bazos y la carga bacteriana en los muestreos post inmunización se analizaron mediante ANOVA de dos vías con la prueba de Dunnett. En todos los análisis se utilizó el

software GraphPad Prism6 (GraphPad Inc., CA, USA). Los valores de $P < 0.05$ se consideraron significativos en todos los casos.

Capítulo 7

Resultados

Construcción del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ codificante de la glicoproteína G del virus de rabia para transformar *Brucella*. Después de realizar el proceso descrito en metodología y de acuerdo con el esquema 1, el plásmido puro se restringió con *Xba*I y *Bam*HI. La restricción con *Xba*I libera tres fragmentos de 6057 pb, 2283 pb y 1576 pb cada uno, siendo éste último el que corresponde al gen G, la restricción con *Bam*HI linearizó el plásmido y mostró una sola banda compatible con el tamaño esperado de 9921 pb para la construcción y confirmó la pérdida del sitio *Bgl*II. (Fig. 9).

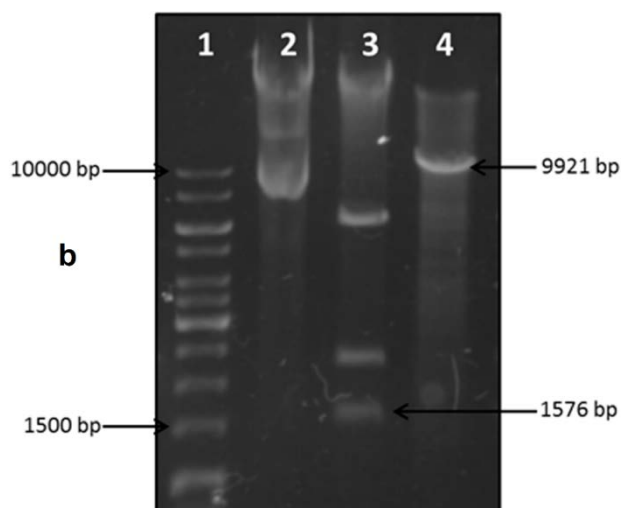


Figura 9. Caracterización del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ mediante restricción enzimática. Carriles: 1, DNA ladder 1Kb; 2, pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ puro; 3 y 4, plásmido restringido con *Xba*I y *Bam*HI respectivamente. El fragmento de 9921 pb corresponde al tamaño esperado de la construcción, el fragmento de 1576 pb corresponde al gen G liberado del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+.

Secuenciación del gen G clonado en el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+. Los resultados preliminares mostraron que el gen G del aislado mexicano HQ01-IMSS, tiene un tamaño de 1575 pb, que codifica para una proteína de 525 aa. La secuencia nucleotídica del aislado se alineó con las secuencias de las cepas PV (Numero de acceso AF233275.1) y CVS (Numero de acceso AF406694.1), encontrándose una identidad del

99 y 98 % respectivamente, el alineamiento y la ubicación donde la secuencia entre las cepas es diferente se presenta en la Fig. 10

```

CVS      -----ATGGTTCCCTCAGGCTCTCCTGTTTGTACCCCTTCTGGTTTTTCC 44
HQ01    -----ATGGTTCCGCAGGCTCTCCTGTTTGTACCCCTTCTGGTTTTTCC 44
PV       ----GCTGCAGGAAAGATGGTTCCCTCAGGCTCTCCTGTTTGTACCCCTTCTGGTTTTTCC 56
          *****

CVS      ATTGTGTTTTGGGAAATTCCCTATTTACACGATACCAGACAAGCTTGGTCCCTGGAGCCC 104
HQ01    ATTGTGTTTTGGGAAATTCCCTATTTACACGATACCAGACAAGCTTGGTCCCTGGAGCCC 104
PV       ATTGTGTTTTGGGAAATTCCCTATTTACACGATACCAGACAAGCTTGGTCCCTGGAGCCC 116
          *****

CVS      GATTGACATACATCACCTCAGCTGCCCAAACAATTTGGTATGGAGGACGAAGGATGCAC 164
HQ01    GATTGACATACATCACCTCAGCTGCCCAAACAATTTGGTATGGAGGACGAAGGATGCAC 164
PV       GATTGACATACATCACCTCAGCTGCCCAAACAATTTGGTATGGAGGACGAAGGATGCAC 176
          *****

CVS      CAACCTGTCAGGGTTCCTACATGGAACCTTAAAGTTGGATACATCTCAGCCATAAAAAAT 224
HQ01    CAACCTGTCAGGGTTCCTACATGGAACCTTAAAGTTGGATACATCTCAGCCATAAAAAAT 224
PV       CAACCTGTCAGGGTTCCTACATGGAACCTTAAAGTTGGATACATCTCAGCCATAAAAAAT 236
          *****

CVS      GAACGGGTTCACTTGACAGGCGTTGTGACGGAGGCTGAAACCTACACTAACTTCGTTGG 284
HQ01    GAACGGGTTCACTTGACAGGCGTTGTGACGGAGGCTGAAACCTACACTAACTTCGTTGG 284
PV       GAACGGGTTCACTTGACAGGCGTTGTGACGGAGGCTGAAACCTACACTAACTTCGTTGG 296
          *****

CVS      TTATGTCACAACCACGTTCAAAGAAAGCATTTCGCCCAACACCAGATGCATGTAGAGC 344
HQ01    TTATGTCACAACCACGTTCAAAGAAAGCATTTCGCCCAACACCAGATGCATGTAGAGC 344
PV       TTATGTCACAACCACGTTCAAAGAAAGCATTTCGCCCAACACCAGATGCATGTAGAGC 356
          *****

CVS      CGCGTACAACCTGGAAGATGGCCGGTGACCCAGATATGAAGAGTCTCTACACAATCCGTA 404
HQ01    CGCGTACAACCTGGAAGATGGCCGGTGACCCAGATATGAAGAGTCTCTACACAATCCGTA 404
PV       CGCGTACAACCTGGAAGATGGCCGGTGACCCAGATATGAAGAGTCTCTACACAATCCGTA 416
          *****

CVS      CCCTGACTACCACTGGCTTCGAACTGTAAAAACCACCAAGGAGTCTCTCGTTATCATATC 464
HQ01    CCCTGACTACCACTGGCTTCGAACTGTAAAAACCACCAAGGAGTCTCTCGTTATCATATC 464
PV       CCCTGACTACCACTGGCTTCGAACTGTAAAAACCACCAAGGAGTCTCTCGTTATCATATC 476
          *****

CVS      TCCAAGTGTGGCAGATTTGGACCCATATGACAGATCCCTTCACTCGAGGGTCTTCCCTAG 524
HQ01    TCCAAGTGTGGCAGATTTGGACCCATATGACAGATCCCTTCACTCGAGGGTCTTCCCTAG 524
PV       TCCAAGTGTGGCAGATTTGGACCCATATGACAGATCCCTTCACTCGAGGGTCTTCCCTAG 536
          *****

CVS      CGGGAAGTGCCTCAGGAGTAGCGGTGTCTTCTACCTACTGCTCCACTAACCACGATTACAC 584
HQ01    CGGGAAGTGCCTCAGGAGTAGCGGTGTCTTCTACCTACTGCTCCACTAACCACGATTACAC 584
PV       CGGGAAGTGCCTCAGGAGTAGCGGTGTCTTCTACCTACTGCTCCACTAACCACGATTACAC 596
          *****

CVS      CATTGGATGCCCGAGAATCCGAGACTAGGGATGTCTTGTGACATTTTACCAATAGTAG 644

```

HQ01 **CATTTGGATGCCCCGAGAATCCGAGACTAGGGATGTCTTGTGACATTTTTACCAATAGTAG** 644
 PV CATTGGATGCCCCGAGAATCCGAGACTAGGGATGTCTTGTGACATTTTTACCAATAGTAG 656

CVS AGGGAAGAGAGCATCCAAAGGGAGTGAGACTTGC GGCTTTGTAGATGAAAGAGGCCTATA 704
HQ01 **AGGGAAGAGAGCATCCAAAGGGAGTGAGACTTGC GGCTTTGTAGATGAAAGAGGCCTATA** 704
 PV AGGGAAGAGAGCATCCAAAGGGAGTGAGACTTGC GGCTTTGTAGATGAAAGAGGCCTATA 716

CVS TAAGTCTTTAAAAGGAGCATGCAAAC TCAAGTTATGTGGAGTTC TAGGACTTAGACTTAT 764
HQ01 **TAAGTCTTTAAAAGGAGCATGCAAAC TCAAGTTATGTGGAGTTC TAGGACTTAGACTTAT** 764
 PV TAAGTCTTTAAAAGGAGCATGCAAAC TCAAGTTATGTGGAGTTC TAGGACTTAGACTTAT 776

CVS GGATGGAACATGGCTCGCGATGCAAACATCAAATGAAACCAAATGGTGCCCTCCCCGATCA 824
HQ01 **GGATGGAACATGGCTCGCGATGCAAACATCAAATGAAACCAAATGGTGCCCTCCCCGATCA** 824
 PV GGATGGAACATGGCTCGCGATGCAAACATCAAATGAAACCAAATGGTGCCCTCCCCGATCA 836

CVS GTTGGTGAACCTGCACGACTTTTCGCTCAGACGAAATTGAGCACCTTGTGTAGAGGAGTT 884
HQ01 **GTTGGTGAATTTGCACGACTTTTCGCTCAGACGAAATTGAGCACCTTGTGTAGAGGAGTT** 884
 PV GTTGGTGAATTTGCACGACTTTTCGCTCAGACGAAATTGAGCACCTTGTGTAGAGGAGTT 896

CVS GGTCAPAGAAGAGAGAGGAGTGTCTGGATGCACTAGAGTCCATCATGACCACCAAGTCAGT 944
HQ01 **GGTCAPAGAAGAGAGAGGAGTGTCTGGATGCACTAGAGTCCATCATGACCACCAAGTCAGT** 944
 PV GGTCAPAGAAGAGAGAGGAGTGTCTGGATGCACTAGAGTCCATCATGACCACCAAGTCAGT 956

CVS GAGTTTCAGACGTCTCAGTCAATTAAGAAAACCTGTCCCTGGGTTTGGAAAAGCATATAC 1004
HQ01 **GAGTTTCAGACGTCTCAGTCAATTAAGAAAACCTGTCCCTGGGTTTGGAAAAGCATATAC** 1004
 PV GAGTTTCAGACGTCTCAGTCAATTAAGAAAACCTGTCCCTGGGTTTGGAAAAGCATATAC 1016

CVS CATATTCAACAAGACCTTGATGGAAGCCGATGCTCACTACAAGTCAGTCAGAACTTGGAA 1064
HQ01 **CATATTCAACAAGACCTTGATGGAAGCCGATGCTCACTACAAGTCAGTCAGAACTTGGAA** 1064
 PV CATATTCAACAAGACCTTGATGGAAGCCGATGCTCACTACAAGTCAGTCAGAACTTGGAA 1076

CVS TGAGATCAATCCCTTCAAAGGGTGTTTAAGAGTTGGGGGGAGGTGTCATCCTCATGTGAA 1124
HQ01 **TGAGATCAATCCCTTCAAAGGGTGTTTAAGAGTTGGGGGGAGGTGTCATCCTCATGTGAA** 1124
 PV TGAGATCAATCCCTTCAAAGGGTGTTTAAGAGTTGGGGGGAGGTGTCATCCTCATGTGAA 1136

CVS CGGGGATTTTTCAATGGTATAATATTAGGACCTGACGGCAATGTCTTAATCCCAGAGAT 1184
HQ01 **CGGGGATTTTTCAATGGTATAATATTAGGACCTGACGGCAATGTCTTAATCCCAGAGAT** 1184
 PV CGGGGATTTTTCAATGGTATAATATTAGGACCTGACGGCAATGTCTTAATCCCAGAGAT 1196

CVS GCAATCATCCCTCCTCCAGCAACATATGGAGTTGTTGGATCCTCGGTTATCCCCCTTAT 1244
HQ01 **GCAATCATCCCTCCTCCAGCAACATATGGAGTTGTTGGATCCTCGGTTATCCCCCTTAT** 1244
 PV GCAATCATCCCTCCTCCAGCAACATATGGAGTTGTTGGATCCTCGGTTATCCCCCTTAT 1256

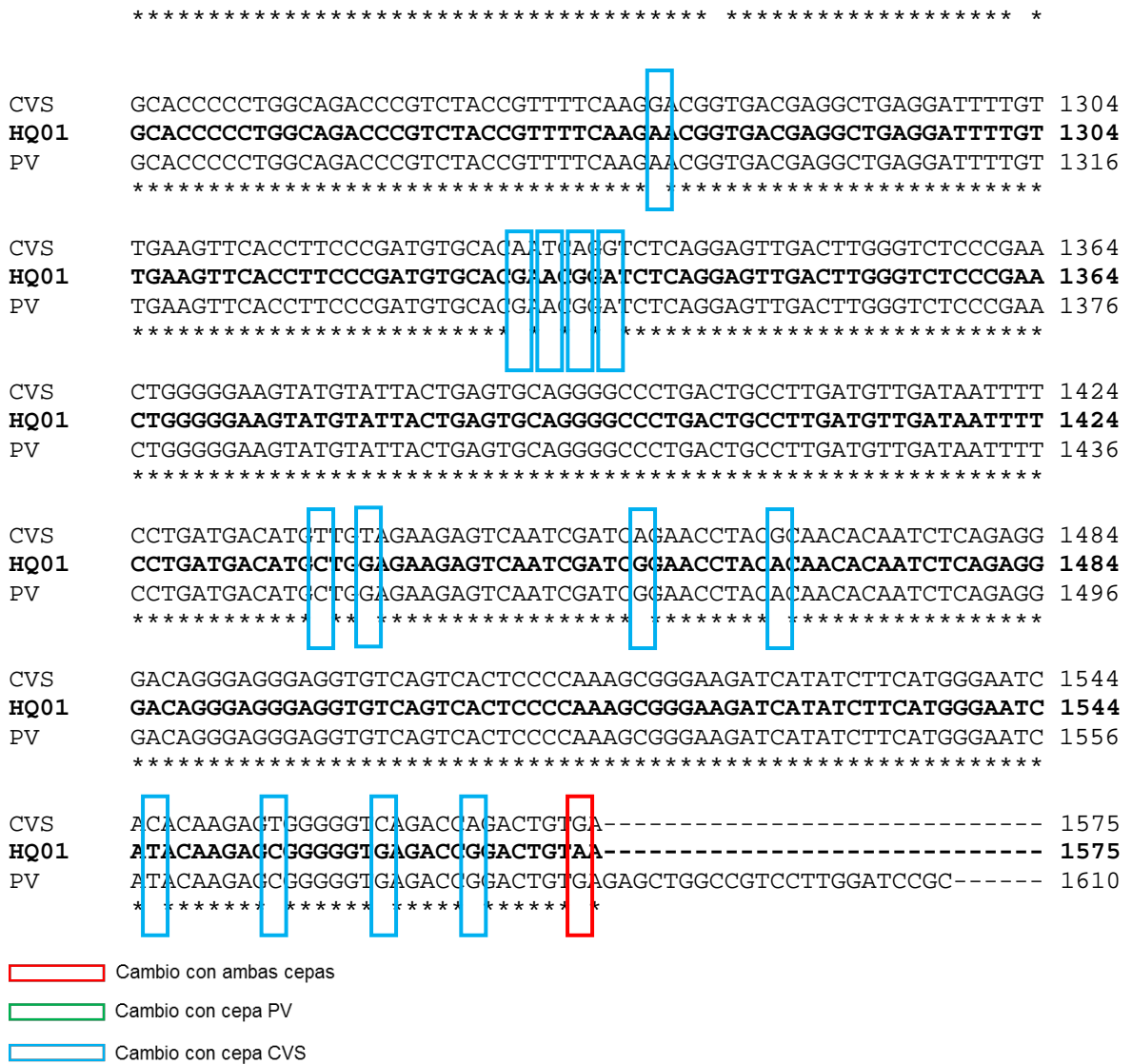


Figura 10. Alineamiento entre la secuencia del gen G del aislado HQ01-IMSS y las cepas CVS y PV del virus rábico.

La secuencia peptídica del aislado HQ01-IMSS (Fig. 11) también se alineó con las secuencias de las cepas PV (Número de acceso AAF40476.1) y CVS (Número de acceso AAP81751.1) y se encontró una identidad del 99 y 96 % respectivamente (Fig. 12). Con respecto a la secuencia consenso de los sitios antigénicos de la glicoproteína G; en el sitio I, el aislado contiene glicina en lugar de lisina y en el sitio G5, se encontró arginina en el aislado en lugar de histidina (Tabla 5); además todos los sitios antigénicos del aislado contienen los aa considerados como invariables (Kuzmina *et al.*, 2013).

MVPQALLFVPLLVFPLCFGKFPIYTIPTDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNLSGF
 SYMELKVGYISAIKMNGFTCTGVVTEAETYTNFVGYVTTTTFKRKHFRPTPDACRAAYNWK
 MAGDPRYEESLHNPYPDYHWRRTVKT~~TKESLVI~~I~~SPSVADLDPYDRSLHSRVFPGGKCSG~~
 VAVSSTYCSTNHDYTIWMPENPRLGMSCDIFTNSRGKRA~~SKGSETCGFVDERGLYKSLKG~~
 ACKLQ~~LCGVLGLRLMDGTWASMQTSNETKWCPPGQLVNLHDFRSDEIEHLVVEELVKKRE~~
 ECLDALESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPGFGKAYTIFNKTLMEADAHYKSVRTWNEIIPS
 KG~~CLRVGGRCHPHVNGVFFNGIILGPDGNVLIPEMQSSLLQOHMELLVSSVIPLMHPLAD~~
 PSTVFKNGDEAEDFVEVHLPDVHERISGVDLGLPNWGKYVLLSAGALTALMLIIFLMTCW
 RRVNRSEPTQHNLRG~~TGREVSVTPQSGKIISSWESYKSGGETGL~~

Figura 11. Secuencia peptídica en el aislado HQ01-IMSS. **MVPQALLFVPLLVFPLCFG**, péptido señal; **VLLSAGALTALMLIIFLMTCW**, dominio transmembranal; **RVNRSEPTQHNLRG~~TGREVSVTPQSGKIISSWESYKSGGETGL~~**, dominio citoplasmico; las secuencias subrayadas corresponden a los sitios antigénicos. La zona resaltada en negritas corresponde a la región amplificada por RT-PCR en este trabajo.

Tabla 5. Comparación entre las secuencias consenso y la secuencia preliminar en el aislado HQ01-IMSS, para los sitios antigénicos en la glicoproteína G del virus de rabia.

Sitio antigénico	Consenso	HQ01-IMSS
I	<u>KLCGVL</u>	<u>QLCGVL</u>
Ila	<u>KRA</u>	KRA
Ilb	GCTNLSG <u>FS</u>	GCTNLSGFS
III	KSVRT <u>W</u> NEI	KSVRTWNEI
G1	KG	KG
G5	<u>HDFH</u>	HDF <u>R</u>

Secuencias subrayadas corresponden a a.a. considerados como invariables

```

CVS      MVPQALLFVPLLVFPLCFGKFPIYTIPTDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNLSGF 60
HQ01    MVPQALLFVPLLVFPLCFGKFPIYTIPTDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVVEDEGCTNLSGF 60
PV      MVPQALLFVPLLVFPLCFGKFPIYTIPTDKLGPWSPIDIHHLSCPNNLVLEDEGCTNLSGF 60
*****:*****

CVS      SYMELKVGYILAAIKMNGFTCTGVVTEAETYTNFVGYVTTTTFKRKHFRPTPDACRAAYNWK 120
HQ01    SYMELKVGYISAAIKMNGFTCTGVVTEAETYTNFVGYVTTTTFKRKHFRPTPDACRAAYNWK 120
PV      SYMELKVGYISAAIKMNGFTCTGVVTEAETYTNFVGYVTTTTFKRKHFRPTPDACRAAYNWK 120
*****:*****

CVS      MAGDPRYEESLHNPYPDYHWRRTVKTTKESLVIISPSVADLDPYDRSLHSRVFPGGKCSG 180
HQ01    MAGDPRYEESLHNPYPDYHWRRTVKTTKESLVIISPSVADLDPYDRSLHSRVFPGGKCSG 180
PV      MAGDPRYEESLHNPYPDYHWRRTVKTTKESLVIISPSVADLDPYDRSLHSRVFPGGKCSG 180
*****:*****
  
```

```

CVS      VAVSSTYCSTNHDTIWMPEPRLGMSCDIFTNSRGKRA SKGSETCGFVDERGLYKSLKG 240
HQ01    VAVSSTYCSTNHDTIWMPEPRLGMSCDIFTNSRGKRA SKGSETCGFVDERGLYKSLKG 240
PV      VAVSSTYCSTNHDTIWMPEPRLGMSCDIFTNSRGKRA SKGSETCGFVDERGLYKSLKG 240
*****

CVS      ACKIKLCGVLGLRLMDGTWVAMQTSNETKWCPEDQLVNLHDFRSSDEIEHLVVEELVRKRE 300
HQ01    ACKIQLCGVLGLRLMDGTWASMQTSNETKWCPEGQLVNLHDFRSSDEIEHLVVEELVKKRE 300
PV      ACKIKLCGVLGLRLMDGTWVAMQTSNETKWCPEGQLVNLHDFRSSDEIEHLVVEELVKKRE 300
*****

CVS      ECLDALESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPGFGKAYTIFNKTLMEADAHYKSVRTWNEIILPS 360
HQ01    ECLDALESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPGFGKAYTIFNKTLMEADAHYKSVRTWNEIILPS 360
PV      ECLDALESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPGFGKAYTIFNKTLMEADAHYKSVRTWNEIILPS 360
*****

CVS      KGCLRVGGRCHPHVNGVFFNGIILGPDGNVLIPEMQSSLLQQHMELIESSVIPLMHPLAD 420
HQ01    KGCLRVGGRCHPHVNGVFFNGIILGPDGNVLIPEMQSSLLQQHMELIESSVIPLMHPLAD 420
PV      KGCLRVGGRCHPHVNGVFFNGIILGPDGNVLIPEMQSSLLQQHMELIESSVIPLMHPLAD 420
*****

CVS      PSTVFKNGDEAEDFVEVHLPDVHNOVSGVDLGLPNWGKYVLLSAGALTALMLIIFLMTCC 480
HQ01    PSTVFKNGDEAEDFVEVHLPDVHERISGVDLGLPNWGKYVLLSAGALTALMLIIFLMTCW 480
PV      PSTVFKNGDEAEDFVEVHLPDVHERISGVDLGLPNWGKYVLLSAGALTALMLIIFLMTCW 480
*****

CVS      RRVNRSEPTQHNLRGTGREVSVTPQSGKIISSWESHKSGGQTRL 524
HQ01    RRVNRSEPTQHNLRGTGREVSVTPQSGKIISSWESYKSGGETGL 524
PV      RRVNRSEPTQHNLRGTGREVSVTPQSGKIISSWESYKSGGETGL 524
*****

```

- Cambio con ambas cepas
- Cambio con cepa PV
- Cambio con cepa CVS

Figura 12. Alineamiento entre la secuencia peptídica de la gpG del aislado HQ01-IMSS y las cepas CVS y PV del virus rábico.

Transformación de la cepa *B. abortus* S19. Después de la electroporación de la cepa *B. abortus* S19 con el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+, diferentes candidatos Amp^r se analizaron por PCR de colonia y se demostró la presencia del plásmido y la delección en el operón *ery* (Fig. 13)

Curvas de crecimiento bacteriano. La cepa transformada *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ y la cepa vacunal *B. abortus* S19, se cultivaron por triplicado en medio líquido con y sin antibiótico respectivamente y el crecimiento se monitoreó durante un rango de DO₆₀₀=1-2. La cantidad de UFC/mL se determinó cada hora a partir de que la DO₆₀₀ para cada cepa fuera igual a 1, la cepa vacunal alcanzó dicha densidad a las 14 h

con un valor promedio de Log10 UFC/mL de 9.81 mientras la cepa transformada alcanzó la misma densidad hasta la 19 h con un valor promedio de Log10 UFC/mL de 8.86. El monitoreo terminó cuando cada cepa llegó a una $DO_{600}=2$, la cepa vacunal lo hizo a las 21 h mientras para la cepa transformada a las 26 h (Graf. 1). La fase logarítmica tardía se estableció en 19 h para la cepa *B. abortus* S19 y en 25 h para *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+.

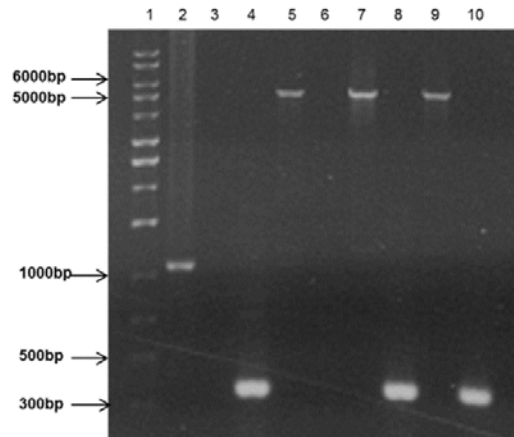
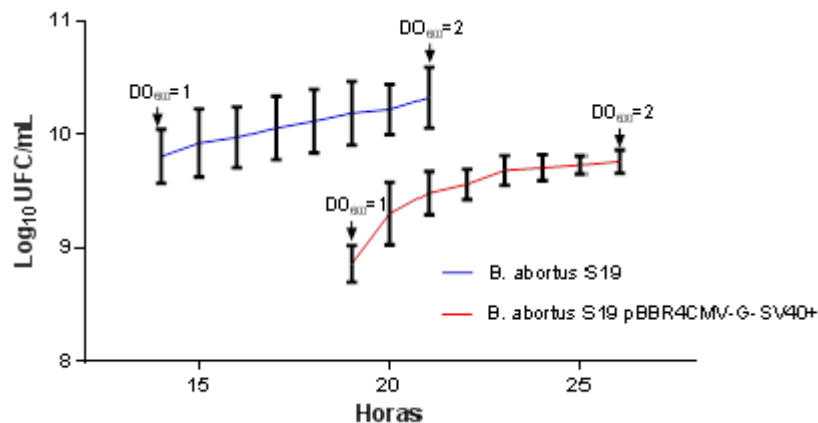


Figura 13. Identificación de la cepa transformada. Los candidatos Amp^r se analizaron por reacciones individuales de PCR de colonia con primers pBBR y ery, los fragmentos de 5100 pb y 361 pb corresponden al plásmido y al operón ery delatado respectivamente, el fragmento de 1063 pb al operón ery no delatado. Carriles: DNA ladder 1 Kb; 2, *B. abortus* RB51 como control de operón ery no delatado; 3, *E. coli* TOP-10 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ como control negativo de operón ery; 4, *B. abortus* S19 con operón ery delatado; 5, *E. coli* TOP-10 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ como control de plásmido; 6, *B. abortus* S19 como control negativo de plásmido; 7 and 8 candidato 1 evaluado para el plásmido y ery respectivamente; 9 and 10 candidato 2 evaluado para el plásmido y ery respectivamente.



Gráfica 1. Curvas de Crecimiento de las cepas *B. abortus* S19 y *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+. Las UFC/mL son el promedio de ensayos realizados por triplicado durante un seguimiento de DO_{600nm} de 1 a 2. La cepa *B. abortus* S19 se cultivó en TSB y *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ en TSB-Amp.

Estabilidad *in vitro* de la cepa *B. abortus* S19 pBBR4CMV-G SV40⁺. La cepa transformada se cultivó en medio líquido durante cinco pasajes sucesivos en tres diferentes condiciones y se cuantificó el número de UFC/mL en medio sólido.

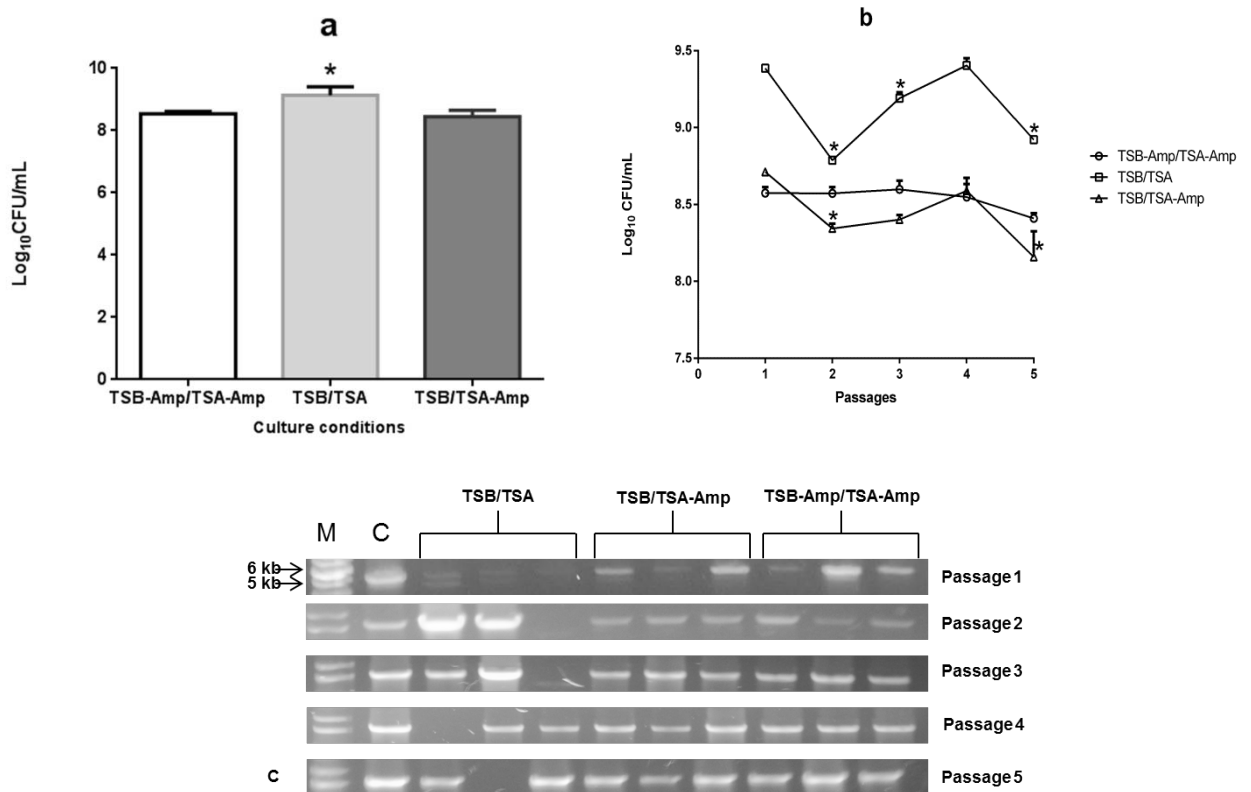


Figura 14. Estabilidad *in vitro* del plásmido pBBR4CMV-GSV40⁺ en la cepa *B. abortus* S19 pBBR4CMV-GSV40⁺ bajo diferentes condiciones. (a) Concentración media de *B. abortus* S19 pBBR4CMV-GSV40⁺ durante 5 pasajes en cultivos con y sin antibiótico, * diferencia significativa ($P < 0.05$) con CST-Amp/AST-Amp, (b) Concentración bacteriana en cada pasaje de cada condición * diferencia significativa ($P < 0.05$) con el pasaje 1. (c) Identificación del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40⁺ en colonias de *B. abortus* S19. M, DNA ladder 1 Kb; C, control: cepa *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40⁺. Panel 1, colonias de CST/AST; panel 2, colonias de CST/AST-Amp; panel 3, colonias de CST-Amp/AST-Amp. CST: caldo soya tripticaseína; AST: agar soya tripticaseína; Amp: ampicilina (100 µg/ml).

El promedio de la concentración de bacterias de los cinco pasajes, expresado en Log₁₀ UFC/mL fue: cultivo control (CST-Amp/AST-Amp); 8.54, cultivo CST/AST-Amp; 8.44 y cultivo CST/AST, 9.13. La concentración de bacterias en el cultivo TSB/TSA mostró una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) con respecto a las otras dos condiciones (Fig. 14a). Se encontró una variabilidad en la concentración bacteriana de los cultivos

TSB/TSA y TSB/TSA-Amp mostrando una diferencia estadísticamente significativa entre los pasajes 2-4 con respecto al pasaje 1 ($P < 0.05$) para ambos cultivos (Fig. 14b), no se presentó diferencia entre los pasajes del cultivo TSB-Amp/TSA-Amp. Por otro lado el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ se identificó en todas las colonias aisladas en TSA-Amp y en diferentes colonias aisladas en TSA (Fig. 14c).

La cepa *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ expresa el gen G en condiciones in vitro. Mediante retrotranscripción se amplificó el fragmento de 736 pb correspondiente al gen G a partir de ARN total de la cepa *B. abortus* S19 pBBR4CMV-G SV40+ cultivada en medio líquido, en contraste no se obtuvo amplificación en el cultivo de *B. abortus* S19 (Fig. 15). Este resultado indica que la cepa transformada transcribe el ARNm de la glicoproteína G e indica que expresa el gen.

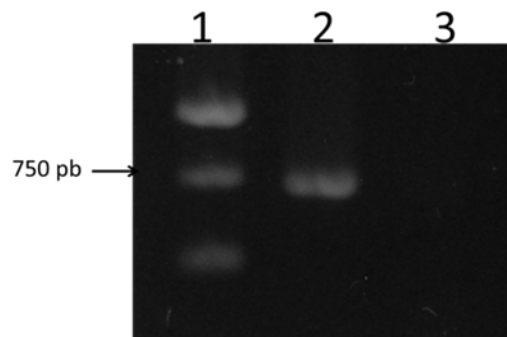


Figura 15. Expresión in vitro del gen G en *B. abortus* S19. Carriles: 1, DNA ladder, 2 y 3; RT-PCR de *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ y *B. abortus* S19 cultivadas en CST-Amp y CST respectivamente. El fragmento de 736 pb corresponde al gen G.

Estabilidad in vivo de la cepa *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+. Siete días después de la infección de ratones BALB/c hembras con *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ o con SBF los bazos se extrajeron, pesaron y homogeneizaron. Las bacterias se recuperaron en medio sólido con y sin antibiótico. El peso del bazo y la cantidad de $\text{Log}_{10}\text{UFC/bazo}$, se presenta en la Tabla 6. No se encontró diferencia significativa en la concentración de bacterias recuperada en los medios empleados. Todas las colonias evaluadas de ambos medios fueron positivas para *ery*, con respecto al gen G; todas las

colonias evaluadas de medio con antibiótico y solo una de las colonias evaluadas de medio sin antibiótico fueron positivas (Fig. 16).

Tabla 6. Cepa de *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40⁺ aislada de bazo y peso del bazo de ratones BALB/c experimentalmente infectados a 7 días post infección.

Ratones inoculados con			
SBF	<i>B. abortus</i> S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40 ⁺		
Peso del bazo (g)	Peso del bazo (g)	Log10 UFC/bazo en TSA-Amp	Log10 UFC/bazo en TSA
0.120	0.124	2.8 ± 1.2	4.0 ± 1.1

Los ratones se inocularon vía intraperitoneal (i.p.) con 0.25 ml de SBF conteniendo ~10⁶ UFC de la cepa o 0.25 ml de SBF solamente (grupo control). Los resultados son el promedio de tres ratones ± la desviación estándar.

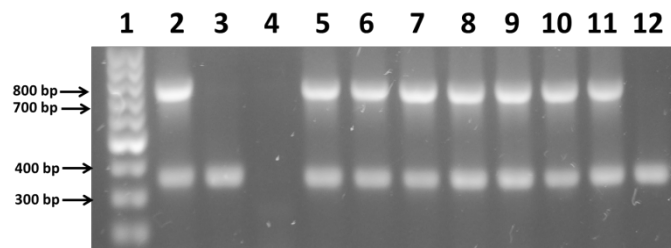


Figura 16. Estabilidad in vivo del plásmido pBBR4CMV-GSV40⁺. Ratones hembras BALB/c se infectaron con la cepa *B. abortus* S19 pBBR4CMV-GSV40⁺, siete días después se recuperaron los bazos. PCR múltiple de colonia para detectar el operón ery (361 pb) y el gen G (736 pb). Carriles: 1, DNA ladder 100 pb; 2, *B. abortus* S19 pBBR4CMV-GSV40⁺; 3, *B. abortus* S19; 4, *E. coli*; 5-10, colonias aisladas en AST-Amp; 11 y 12, colonias aisladas en AST.

El plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40⁺ induce la expresión de la glicoproteína G del virus de rabia en células eucariotas. Después de la transfección de células BHK-21 la glicoproteína G se detectó a las 24h, 48h y 72h, no se detectó glicoproteína en las células control. La Figura 17 muestra la expresión de la proteína a las 48 h (no se muestra la expresión a las 24h y 72h). Con esto se demostró que la proteína viral se expresa adecuadamente en células eucariotas a partir del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40⁺ demostrando su utilidad para este propósito.

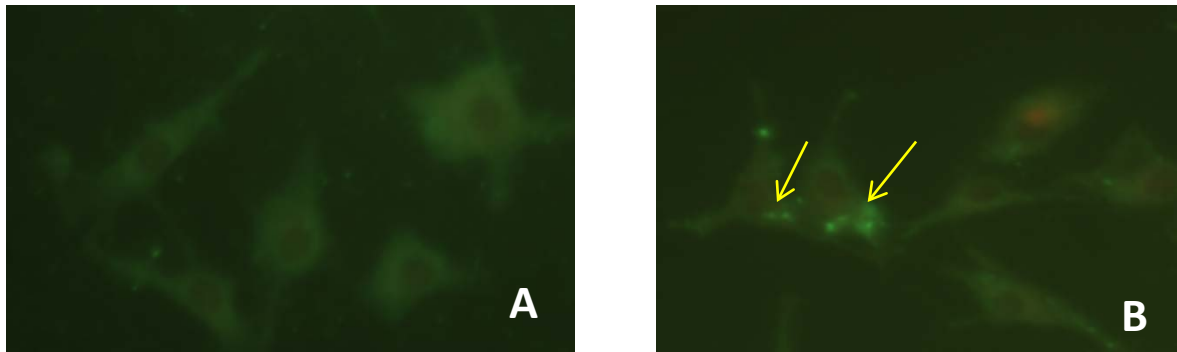


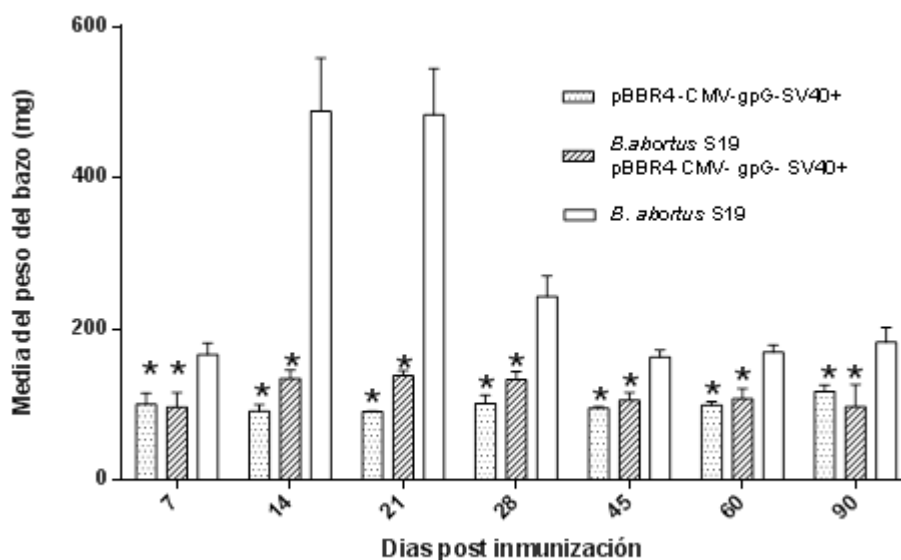
Figura 17. Expresión de la glicoproteína G del virus de rabia a partir del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ en células eucariotas. Las células BHK-21 se transfectoron con 15 µg de plásmido, la detección de proteína se hizo a la 24h, 48h y 72 h con IgG humano antirrábico policlonal. A y B; células BHK-21 transfectoradas y no transfectoradas respectivamente, ambas a 48 h. Las flechas indican la glicoproteína G.

Inmunización de ratones.

Entre los tres grupos experimentales, el peso de los bazo fue más alto en los ratones inmunizados con la cepa vacunal *B. abortus* S19, el peso de los bazo extraídos del grupo inmunizado con plásmido pBBR4 –CMV-gpG-SV40+ y con bacteria transformante *B. abortus* S19 pBBR4 –CMV-gpG-SV40+, mostró una diferencia significativa con respecto al de la cepa vacunal ($P < 0.05$), esto en todos los puntos de muestreo. Para los grupos de cepa vacunal y transformante se observó un incremento en el peso del bazo del día 7 al 14 y de éste al día 21, el peso disminuyó a partir del día 28, no se observó este comportamiento en el grupo de plásmido (Tabla 7, Gráfica 2).

Tabla 7. Peso del bazo en ratones hembras BALB/c de 6- 8 semanas de edad inmunizadas con diferentes antígenos									
Días Post Inmunización	Grupo y Antígeno								
	pBBR4 –CMV-gpG-SV40+			<i>B. abortus</i> S19 transformante pBBR4 –CMV-gpG-SV40+			<i>B. abortus</i> S19		
	No. ratón	Peso del bazo (mg)	\bar{x}	No. ratón	Peso del bazo (mg)	\bar{x}	No. ratón	Peso del bazo (mg)	\bar{x}
7	36	102.9		1	87.1		68	149.2	
	37	113.3	100.13	2	83	96.27	69	178.3	166.3
	38	84.2		3	118.7		70	171.4	
14	39	99.1		4	143.6		71	463.9	
	40	81.4	90.93	6	122.6	129.6	72	567.3	488.13
	41	92.3		7	137.4		73	433.2	
21	42	91.2		8	145.5		74	487.4	
	43	90.3	90.5	9	133.7	137.87	75	542.5	483.23
	44	90.0		10	134.4		76	419.8	
28	45	113.6		11	142.4		77	274.2	
	46	93.5	101.46	12	134.3	132.63	78	229.5	242.93

	47	97.3		13	121.5		79	225.1	
45	48	97.3		14	102.5		80	171.6	
	49	95.1	95.2	15	97.4	105.73	81	163.7	162.57
	50	93.2		16	117.3		82	152.4	
60	51	94.8		17	106.2		83	170.1	
	52	104.7	98.83	18	94.7	107.6	84	178.1	169.3
	53	97.0		19	121.9		85	159.8	
90	54	127.1		20	74.3		86	162.5	
	55	113.3	117.2	22	130.3	96.97	87	201.6	182.36
	56	111.4		24	86.3		88	183.0	

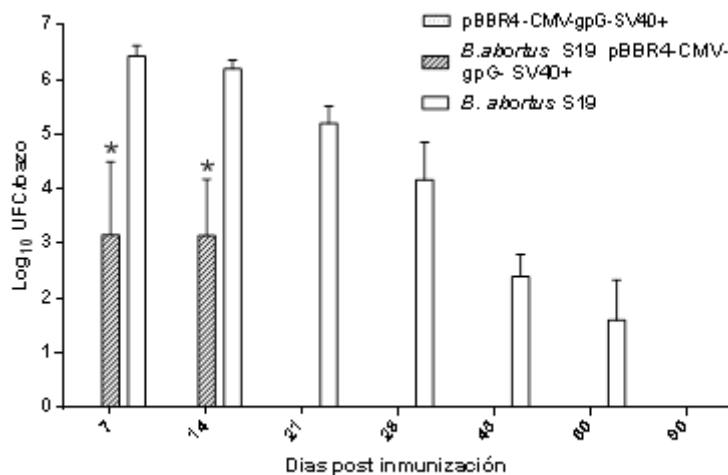


Gráfica 2. Peso del bazo en ratones hembras BALB/c de 6- 8 semanas de edad inmunizados con diferentes antígenos. Los valores son el promedio de ensayos realizados por triplicado \pm desviación estándar, * diferencia significativa con *B. abortus* S19.

Con respecto a las bacterias recuperadas de bazo, la cepa transformante sólo se aisló en los días 7 y 14, mientras que la cepa vacunal se aisló desde el día 7 y hasta el 60. El valor de UFC/bazo recuperadas de cepa transformante fue menor con respecto a las UFC/bazo de cepa vacunal con una diferencia significativa ($P < 0.05$), tanto al día 7 como 14 (Tabla 8, Gráfica 3).

Tabla 8. Concentración de bacterias recuperadas de ratones hembras BALB/c de 6- 8 semanas de edad inmunizadas con diferentes antígenos						
Días Post Inmunización	Grupos y Antígeno					
	<i>B. abortus</i> S19 transformante pBBR4 –CMV-gpG-SV40+			<i>B. abortus</i> S19		
	No. Ratón	Log ₁₀ UFC/bazo [†]	\bar{x}	No. ratón	Log ₁₀ UFC/bazo [†]	\bar{x}
7	1	3.978	3.164	68	6.659	6.434
	2	1.623		69	6.336	
	3	3.890		70	6.307	
14	4	3.325	3.151	71	6.140	6.204
	6	4.087		72	6.386	
	7	2.041		73	6.087	
21	8		0	74	5.163	5.204
	9			75	4.911	
	10			76	5.539	
28	11		0	77	3.382	4.171
	12			78	4.652	
	13			79	4.479	
45	14		0	80	2.151	2.399
	15			81	2.870	
	16			82	2.177	
60	17		0	83	1.854	1.600
	18			84	2.177	
	19			85	0.771	
90	20		0	86	0.000	0
	22			87	0.000	
	24			88	0.000	

† Los valores de UFC se expresan en Log₁₀



Gráfica 3. Concentración de bacterias recuperadas de bazo en ratones hembras BALB/c de 6- 8 semanas de edad inmunizadas con diferentes antígenos. Los valores se normalizaron por Log₁₀ y son el promedio de ensayos realizados por triplicado ± desviación estándar, * diferencia significativa con *B. abortus* S19.

La respuesta serológica contra *Brucella* se evaluó por la prueba de Rosa de Bengala (Tabla 9). Los ratones administrados con cepa vacunal fueron positivos desde el día 7 y la seropositividad se mantuvo durante todo el tiempo de muestreo, el patrón de aglutinación de los sueros fue comparable con el del suero positivo fuerte, los ratones del grupo manejado con cepa transformante fueron negativos en los días 7 y 14, la seropositividad se presentó en los días 21, 28, 45 y 60 y para el día 90 los sueros resultaron negativos, la aglutinación de los sueros fue similar al del suero positivo débil, para el caso del grupo plásmido los sueros fue negativo en todos los puntos de muestreo.

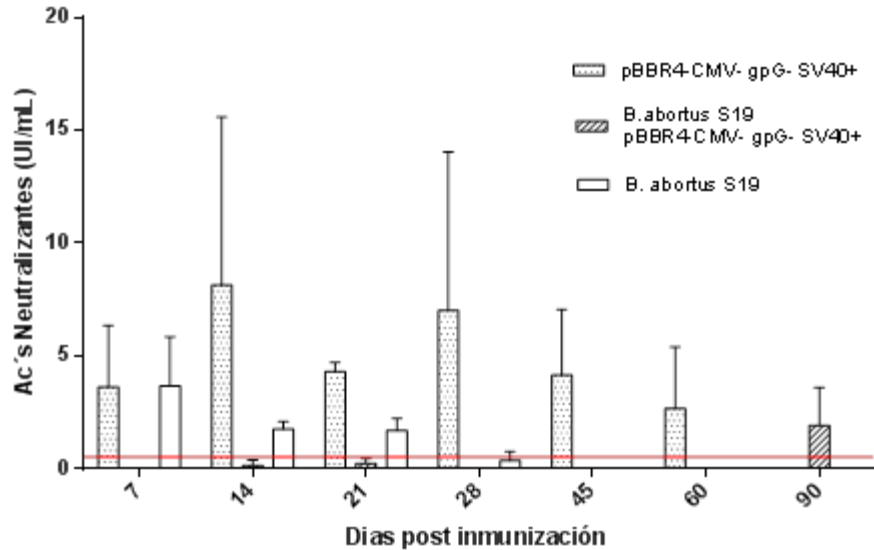
Tabla 9. Resultados de la prueba de Rosa de bengala en ratones hembras BALB/c de 6- 8 semanas de edad inmunizadas con diferentes antígenos.						
Días Post Inmunización	Grupo y Antígeno					
	pBBR4 –CMV-gpG-SV40+		<i>B. abortus</i> S19 transformante pBBR4 –CMV-gpG-SV40+		<i>B. abortus</i> S19	
	No. ratón	Resultado	No. ratón	Resultado	No. Ratón	Resultado
7	36	-	1	-	68	-
	37	-	2	-	69	+
	38	-	3	-	70	+
14	39	-	4	-	71	+
	40	-	6	-	72	+
	41	-	7	-	73	+
21	42	-	8	-	74	+
	43	-	9	+	75	+
	44	-	10	+	76	+
28	45	-	11	+	77	+
	46	-	12	+	78	+
	47	-	13	-	79	+
45	48	-	14	+	80	+
	49	-	15	+	81	+
	50	-	16	+	82	+
60	51	-	17	+	83	+
	52	-	18	+	84	+
	53	-	19	+	85	+
90	54	-	20	-	86	+
	55	-	22	-	87	+
	56	-	24	-	88	+

+ aglutinación similar a un suero positivo fuerte, + aglutinación similar a un suero positivo débil

La serología contra el virus de rabia se valoró por la prueba de RFFIT tomando como referencia que la OMS considera protector un nivel de AAN superior a 0.5 UI; los ratones manejados con el plásmido pBBR4 –CMV-gpG-SV40+ presentaron un nivel promedio de AAN superior a 0.5 UI desde el día 7, al igual que el grupo manejado con la cepa vacunal *B. abortus* S19, con valores similares en ambos grupos, mientras que el grupo administrado con cepa transformante *B. abortus* S19 pBBR4–CMV-gpG-SV40+ fue negativo en este punto de muestreo. El nivel de AAN para cada grupo mostró un comportamiento diferente durante el seguimiento post inmunización (Tabla 10, gráfica 4); en el grupo de ratones donde se administró el plásmido el valor de los aumentó para el día 14 y se mantuvo por arriba del nivel protector hasta el día 60, en contraste el grupo manejado con la cepa vacunal mostró una disminución en el valor de AAN al día 14 y para el día 28 se encontró por debajo del nivel protector siendo negativo a partir del día 45, para el grupo inmunizado con la cepa transformante se detectaron AAN en los días 14 y 21 con un valor menor al protector, siendo hasta el día 90 cuando se superó el valor de 0.5 UI.

Tabla 10. Niveles de AAN en ratones hembras BALB/c de 6-8 semanas de edad inmunizadas con diferentes antígenos.									
Días Post Inmunización	Grupo y Antígeno								
	pBBR4 –CMV-gpG-SV40+			<i>B. abortus</i> S19 transformante pBBR4 –CMV-gpG-SV40+			<i>B. abortus</i> S19		
	No. ratón	Ac's (UI/mL)	\bar{x}	No. ratón	Ac's (UI/mL)	\bar{x}	No. ratón	Ac's (UI/mL)	\bar{x}
7	36	3.7	3.62	1	0	0	68	1.3	3.6
	37	0.87		2	0		69	4.1	
	38	6.3		3	0		70	5.6	
14	39	1.72	8.14	4	0	0.136	71	1.4	1.7
	40	6.4		6	0.409		72	1.9	
	41	16.3		7	0		73	2.0	
21	42	4.7	4.3	8	0	0.240	74	1.1	1.7
	43	3.9		9	0.351		75	2.1	
	44	4.3		10	0.370		76	1.9	
28	45	14.7	7.02	11	0	0	77	0	0.36
	46	5.4		12	0		78	0.3	
	47	0.96		13	0		79	0.8	
45	48	6.4	4.15	14	0	0	80	0	0
	49	5.2		15	0		81	0	
	50	0.87		16	0		82	0	
60	51	1.4	2.6	17	0	0	83	0	0
	52	0.8		18	0		84	0	
	53	5.8		19	0		85	0	
90	54	0	0	20	1.1	1.91	86	0	0

	55	0		22	0.8		87	0	
	56	0		24	3.85		88	0	



Gráfica 4. Nivel de AAN en ratones hembras BALB/c de 6-8 semanas de edad inmunizados con diferentes antígenos. Los valores son el promedio de ensayos realizados por triplicado \pm desviación estándar. La línea representa el valor de 0.5 UI/mL.

El plásmido pBBR4-CMV-gpG-SV40+ y la delección en el operón *ery* se detectaron simultáneamente mediante PCR múltiple en colonias aisladas de baños de ratones infectados con la cepa transformante *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-gpG-SV40+ o con la cepa vacunal *B. abortus* S19. El plásmido y la delección del operón *ery* se identificaron en todas las colonias evaluadas de los días 7 (Fig. 18a) y 14 (Fig. 18b) post inmunización aisladas de ratones administrados con la cepa transformante; las colonias evaluadas se tomaron al azar de diferentes ratones. Para el grupo inmunizado con la cepa *B. abortus* S19; la delección en el operón *ery* se detectó en todas las colonias evaluadas en los días 7, 14, 21, 28, 45 y 60 post inmunización (Fig. 18c, 18d y 18e) y todas las colonias fueron negativas para el plásmido, en este grupo se evaluó una colonia de cada ratón en cada punto de muestreo.

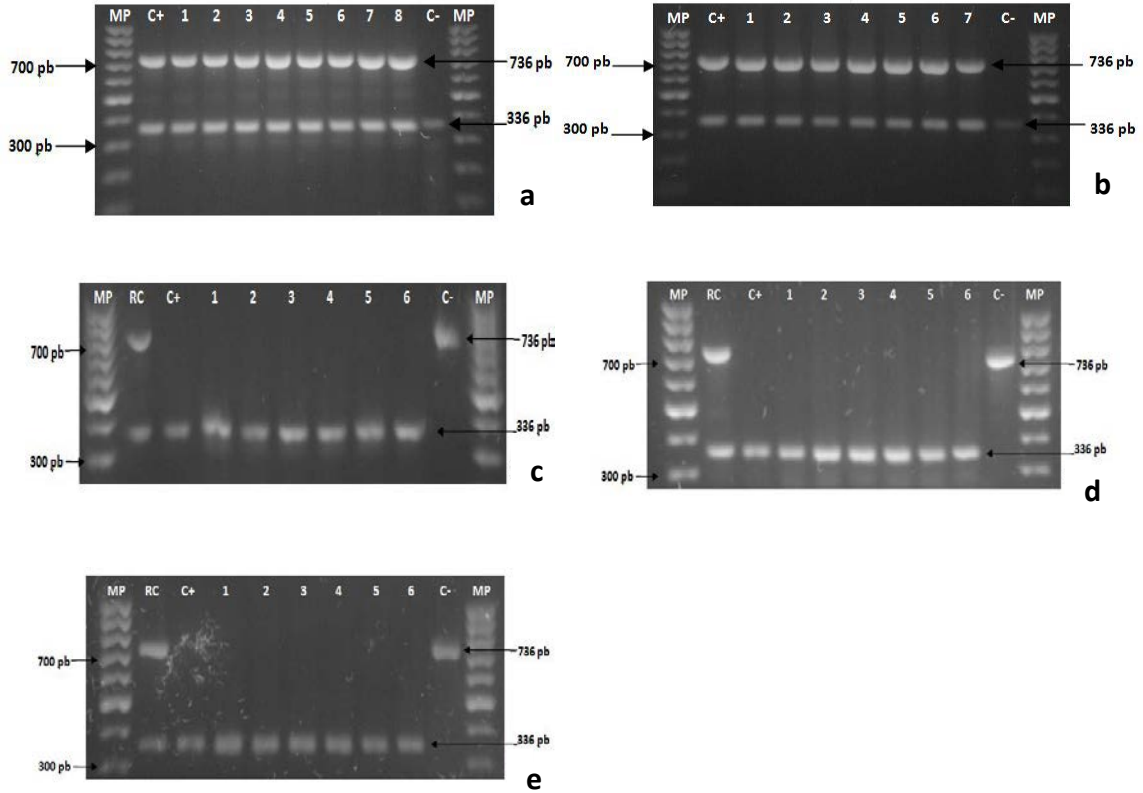


Figura 18. Identificación simultánea del plásmido pBBR4–CMV-gpG-SV40+ y de la delección del operón *ery* en colonias recuperadas de bazo de ratones infectados con diferentes cepas de *B. abortus* S19. El fragmento de 736 pb identifica el plásmido y el de 361 pb la delección en *ery*. Fig. a y b) Colonias aisladas de bazos con *B. abortus* S19 pBBR4–CMV-gpG-SV40+ a los 7 y 14 d.p.i. respectivamente. Carriles: MP; DNA ladder 100 pb, C+; *B. abortus* S19 pBBR4–CMV-gpG-SV40+ (control positivo de plásmido y de *ery*) C-; *B. abortus* S19 (control negativo de plásmido), 1-8 en a y 1-7 en b colonias de diferentes ratones. Fig. c, d y e) Colonias aisladas de bazos con *B. abortus* S19 en diferentes d.p.i. En c: colonias aisladas a 7 y 14 d.p.i., carriles 1-3 y 4-6 respectivamente, en d: colonias aisladas a 21 y 28 d.p.i., carriles 1-3 y 4-6 respectivamente, en e: colonias aisladas a 45 y 60 d.p.i., carriles 1-3 y 4-6 respectivamente. Carriles: MP; DNA ladder 100 pb, RC; *B. abortus* S19 pBBR4–CMV-gpG-SV40+ (control positivo de plásmido y de *ery*), C+; *B. abortus* S19 (control positivo de *ery*), C-; *E. coli* pBBR4–CMV-gpG-SV40+ (control negativo de *ery*).

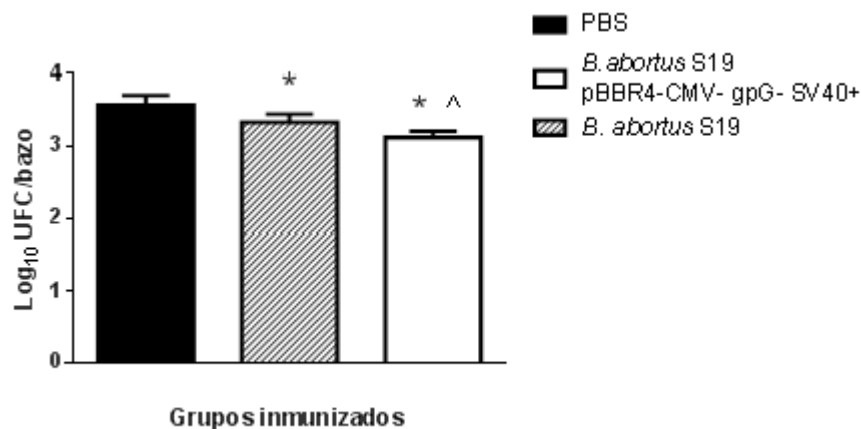
Ensayos de protección. Con los mismos antígenos y aplicando las mismas condiciones de inmunización, se formaron otros grupos de ratones para evaluar la protección *in vivo* contra rabia y Brucelosis. Para el desafío de rabia se administró la cepa virulenta CVS vía intracerebral y se determinó el % de sobrevivencia para cada grupo. En el grupo administrado con el plásmido pBBR4–CMV-gpG-SV40+ se obtuvo una sobrevivencia de 83.3%, seguido del grupo manejado con cepa transformante *B. abortus* S19 pBBR4–

CMV-gpG-SV40+ con 71.4%, mientras que la sobrevivencia más baja correspondió al grupo tratado con la cepa vacunal *B. abortus* S19 con 66.6% (Tabla 11). En la prueba de protección para brucelosis, los ratones inmunizados se infectaron con la cepa virulenta *B. abortus* 2308 y se cuantificó la cantidad de UFC recuperadas de bazo después del desafío. El promedio de Log UFC/bazo, para cada grupo de diez ratones fue: SBF como control; 3.572 ± 0.04309 , cepa transformante; 3.338 ± 0.03466 y cepa vacunal; 3.127 ± 0.02741 (Gráfica G). Se encontró diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el grupo control y los grupos de cepa vacunal y transformante, así como entre estos dos últimos.

Tabla 11. Porcentaje de sobrevivencia en ratones desafiados con virus CVS[†] inmunizados con diferentes antígenos

pBBR4-CMV-gpG-SV40+	<i>B. abortus</i> S19 pBBR4-CMV-gpG-SV40+	<i>B. abortus</i> S19
83.3 (5/6)	71.4 (5/7)	66.6 (6/9)

† $10^{5.52}$ DLR₅₀ vía intracerebral



Gráfica 5. Bacterias recuperadas de bazo en ratones desafiados con la cepa *B. abortus* 2308 inmunizados con diferentes antígenos. * Diferencia significativa ($P < 0.05$) con SBF, ^ diferencia significativa ($P < 0.05$) con *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-gpG-SV40+.

Capítulo 8

Discusión

La rabia y la brucelosis se consideran de las principales enfermedades zoonóticas, afectan al ganado, constituyen un problema de salud animal y repercuten en la salud humana (Monath *et al.*, 2013). La B B es causada principalmente por la bacteria intracelular *B. abortus* (Díaz, 2013). El agente etiológico de la RPB es un virus de ARN que contiene en su envoltura la gpG, que induce la formación de AAN (Cox *et al.*, 1977; Ross *et al.*, 2008). Las dos enfermedades causan severas pérdidas económicas en el ganado bovino, ambas son prevenibles por vacunación; para B B la cepa S19 de *B. abortus* es la vacuna más eficiente (Nicoletti, 2010) mientras que la RPB se previene con vacunas de virus vivo o atenuado (Rupprecht y Plotkin, 2013).

En el presente proyecto se planteó desarrollar una alternativa de vacunación aprovechando dos circunstancias; por un lado, la generación de un plásmido codificante del gen de la gpG regulado por un promotor para la expresión en células eucariotas que además fuera útil para transformar *Brucella abortus*, y aprovechar la naturaleza intracelular de la cepa S19 de *B. abortus* para utilizarla entonces como vector para entregar dicho plásmido en las células fagocíticas que la bacteria infecta naturalmente.

Los plásmidos vacunales codifican un gen de interés que está regulado por un promotor fuerte para la expresión en células eucariotas, los ARNm transcritos se estabilizan mediante una secuencia de poli-A, además incluyen genes de resistencia necesarios para la selección de las bacterias transformadas (Gurunathan *et al.*, 2000). En este trabajo se construyó el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ que codifica para la proteína más inmunogénica del virus de rabia, la gpG, el gen está ligado al promotor de CMV para potenciar la expresión en células eucariotas. En la construcción se incluyó una secuencia de poliadenilación y el origen del virus SV40 para mantener la replicación del plásmido en el huésped. El plásmido construido tiene la estructura básica del pBBR1MCS-4, un plásmido que se ha empleado para transformar diferentes especies de *Brucella* (Kovach *et al.*, 1995).

El gen G clonado proviene del aislado HQ01-IMSS que se obtuvo del cerebro de un niño que murió de rabia transmitida por murciélago hematófago (Tesoro *et al.*, 2008). Los resultados de secuenciación mostraron que el gen G HQ01-IMSS, tiene un tamaño de 1575-pb que codifica para una proteína de 524 aminoácidos que contienen la secuencia de los sitios antigénicos.

La cepa vacunal *B. abortus* S19 se transformó exitosamente con el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ sin perder su marcador de atenuación, la delección en el operon *ery*, la cepa transformante se denominó *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+. La cepa S19 ya se ha transformado 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 se encuentra bajo la regulación de un promotor procariota. Como resultado de estas investigaciones se transformó por primera vez la cepa de *B. abortus* con un promotor para la expresión en células eucariotas.

Después de la transformación se evaluó la estabilidad del plásmido mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. En los ensayos *in vitro*, la estabilidad del plásmido se determinó siguiendo la estrategia de Elzer *et al.* (1995), la bacteria transformante *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ se cultivó por pasajes sucesivos en medios con y sin el factor de selección, los resultados mostraron que la concentración de la cepa transformante fue significativamente más baja en el medio complementado con un antibiótico que sin él, sin embargo el crecimiento de la cepa fue homogéneo cuando se cultivó en presencia de antibiótico. El tamaño del plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ es de 9921 pb, posiblemente es demasiado pesado para que la cepa S19 lo replique debido al efecto de carga metabólica que se produce en las bacterias que portan un plásmido, se sabe que entre más grande es el tamaño del plásmido se consume más energía para mantenerlo y en consecuencia se reduce el crecimiento de la célula (Glick 1995). Cuando la cepa transformante se cultivó en un medio sin antibiótico, se observó variabilidad en su crecimiento, así como en la identificación del plásmido, esta variabilidad puede deberse a que si bien el plásmido confiere la habilidad para resistir circunstancias adversas no es esencial para la viabilidad de la bacteria, puesto que *Brucella* spp no contiene plásmidos de forma natural (Crasta *et al.*, 2008), de manera que en ausencia de presión selectiva puede ocurrir una pérdida en parte de la población.

En cuanto a los ensayos de estabilidad *in vivo*, la concentración de la bacteria transformante recuperada de bazo fue similar a los reportados anteriormente a los 7 d.p.i. (Comerci *et al.*, 1998, Sabio y García *et al.*, 2008). La identificación simultánea del plásmido y de la delección del operón *ery* en colonias aisladas con y sin antibiótico, se realizó mediante la prueba de PCR Múltiple que se desarrolló en este trabajo y puede aprovecharse como una herramienta útil para el diagnóstico diferencial entre la cepa *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ y cepas de campo, así como para diferenciar entre

animales infectados y vacunados con la cepa S19 de *B. abortus*. La identificación del plásmido pB BR4-CMV-Ggp-SV40+ en colonias aisladas en medios sin antibiótico demuestra su estabilidad en la cepa vacunal *B. abortus* S19 aún en ausencia de presión selectiva

Se demostró la expresión de la gpG del virus rábico en células BHK-21 transfectadas con el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+, este resultado es alentador pues todo que la cepa transformante entregará un plásmido funcional a los macrófagos después de su destrucción, de manera que se puede esperar un estímulo simultáneo de la respuesta anti-*Brucella* inherente a esta cepa y de la respuesta inmune contra la proteína viral. Para evaluar esta idea, hace falta realizar ensayos de infección en una línea de macrófagos y determinar si la gpG se expresa a partir del plásmido entregado por la bacteria.

En el ensayo de inmunización de ratones se pudo observar que la concentración de bacterias recuperada del bazo así como el peso de este órgano fueron significativamente menores en los ratones infectados con la cepa transformante que en los ratones manejados con cepa vacunal, además la persistencia de la bacteria transformante en los ratones fue más corta que la de la cepa vacunal. Dado que la actividad del sistema inmune para resolver la infección por *Brucella* spp se concentra en el bazo (Golding *et al.*, 2001), la infección causada por la cepa *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ no demandó una respuesta inmune intensa para ser eliminada.

La serología contra *B. abortus* se evaluó mediante la prueba de rosa de bengala que revela Ac contra el LPS (Alton *et al.*, 1988), la respuesta humoral anti-*Brucella* inducida por la cepa transformante se presentó tardía y leve a los 21 d.p.i., en contraste con la respuesta fuertemente positiva desde 7 d.p.i. que indujo la cepa vacunal. La membrana externa de *B. abortus* es marcadamente resistente a los péptidos catiónicos presentes en los lisosomas y fluidos corporales, se sabe que mutantes deficientes en la cadena O del LPS resultan más sensibles a la lisis por complemento (Ko y Splitter 2003), y se ha observado que cepas mutantes en el sistema de dos componentes BvrR-BvrS, que controla la resistencia a las poliketones asociada al core del LPS, reducen su multiplicación y persistencia en el bazo de ratón (Sola-Landa *et al.*, 1998). La infección causada por la cepa *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ mostró un patrón de replicación similar al de cepas no virulentas mutantes en BvrS en el modelo de ratón (Grilló *et al.*, 2012).

La baja respuesta serológica contra *B. abortus*, junto con el crecimiento reducido de la cepa transformante con respecto a la cepa vacunal parental, muestran que el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ afecta la viabilidad y antigenicidad de la cepa S19 de *B. abortus*. Cuando una bacteria se transforma con un plásmido, se produce un efecto negativo debido a la carga metabólica que consume la energía y los precursores requeridos para la replicación del plásmido, la transcripción del ARNm y la traducción de la proteína codificada, de manera que la síntesis de los metabolitos propios de la célula queda limitada, incluso la expresión genética puede resultar en agregados de la proteína o de sus productos hidrolizados que se vuelven tóxicos para la bacteria (Glick 1995). La cepa *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ es capaz de expresar el ARNm de la glicoproteína G, sin llegar a producir la proteína en el cultivo, posiblemente la glicoproteína se expresa pero se degrada y algún fragmento de degradación pudiera estar interfiriendo con la síntesis del LPS o bloquear los sistemas de sobrevivencia. Además el plásmido es de 9921 pb, más grande que el tamaño promedio de 5 Kb, de los plásmidos recombinantes con que se ha transformado la cepa S19 en otros trabajos (Comerci et al., 1998; Sabio y García et al., 2008; Sabio y García et al., 2010).

Con respecto a la respuesta inmune antirrábica, el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ demostró ser capaz de inducir la producción de AAN en todos los ratones en un nivel mayor a 0.5 UI desde los 7 d.p.i., esto es congruente con el ensayo de células BHK-21 transfectadas con dicho plásmido donde se demostró la expresión de la glicoproteína G en células eucariotas, y concuerda con otros estudios donde el 75% de los ratones mostraron seroconversión 7 días después de la vacunación génica antirrábica y todos a los 14 días (Bahloul et al., 1998). El nivel de AAN en el grupo de ratones manejados con la cepa transformante *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ se presentó hasta 90 d.p.i., el perfil de replicación de esta cepa hace pensar que la carga bacteriana se reduce rápidamente fuera de la célula y que la bacteria restante es fácilmente destruida dentro de la célula infectada, de modo que la glicoproteína G expresada a partir del plásmido disponible representa un estímulo antigénico que requiere más tiempo para inducir una respuesta. Sería necesario determinar el nivel de expresión de la glicoproteína G en macrófagos infectados con la cepa transformante, como se ha hecho para evaluar la utilidad de *S. typhimurium* y *Y. pseudotuberculosis* como vectores de plásmidos reporteros, demostrando que solo el 0.07% de células dendríticas infectadas expresan la proteína verde fluorescente (Dietrich et al., 2001). Los ratones donde se administró la

cepa vacunal *B. abortus* también presentaron niveles de AAN mayores a 0.5 UI desde 7 d.p.i., este efecto neutralizante pudiera deberse a mediadores de la respuesta inmune como IFN- γ y TNF- α que se liberan durante el estado de inflamación aguda inducido durante la infección por *Brucella* spp (Jiang y Baldwin 1993) y que ayudan también a reducir la replicación activa del virus (Chai *et al.*, 2014; Barkhouse *et al.*, 2015; Faber *et al.*, 2005). Esto llevaría a preguntarse si la neutralización encontrada en los ratones administrados con la cepa transformante, se debe al mismo efecto de protección cruzada, sin embargo, se presentó esplenomegalia leve, la neutralización se encontró hasta el día 90 y, desde 21 d. p.i. se dejó de recuperar bacteria de bazo, por lo que se puede considerar que el efecto de neutralización se debe a AAN inducidos después de la expresión de la glicoproteína a partir del plásmido entregado por la bacteria.

Para la prueba de desafío contra rabia se encontró un 83.3% de sobrevivencia en el grupo manejado con el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+, de mostrando que es capaz de inducir una respuesta inmune protectora contra rabia, aun que de forma parcial. Este resultado se pudo asociar con la concentración de plásmido, en estas ensayos se administraron 30 μ g de pBBR4-CMV-Ggp-SV40+, comparado con el trabajo de Bahloul *et al.* (1998) que obtiene un 100% de sobrevivencia al reto vacunando con 50 μ g de plásmido, sin embargo, Aguilar Setién *et al.* (2008) obtiene un 100% de sobrevivencia con solo 20 μ g. Bahloul *et al.* (1998), demostraron también que el título de AAN aumenta en proporción a la concentración de plásmido administrado, es probable entonces que el nivel de AAN inducidos por el plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ alcance para neutralizar al virus en el ensayo *in vitro*, pero sea insuficiente para resolver la infección por una cepa virulenta. En los ratones vacunados con la cepa *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ la sobrevivencia fue de 71.4%, esta protección se puede asociar a la respuesta inducida por la glicoproteína G expresada a partir del plásmido entregado por la bacteria y no por una protección cruzada puesto que esta cepa no desencadenó una respuesta inflamatoria severa. Este resultado muestra que la cepa *B. abortus* S19 funciona como vector de un plásmido vacunal antirrábico, no obstante considerando que el plásmido *per se*, es de moderado número de copia (Kovach *et al.*, 1995), es necesario determinar lo que está afectando la viabilidad de la cepa para aumentar la cantidad de plásmido entregado al interior de la célula. Para los ratones manejados con la cepa vacunal S19 se encontró una sobrevivencia de 66.6%, que se puede relacionar con el efecto de neutralización mostrado

por los sueros de estos ratones y probablemente se deba a un efecto de protección cruzada como el que fue demostrado Mackaness (1964), donde ratones infectados con la cepa de *B. abortus* S19 quedaron protegidos contra la infección con *Listeria monocytogenes* y que los macrófagos de estos ratones resolvieron la infección in vivo posterior al reto con *Listeria*. El efecto neutralizante no se limita a bacterias, puesto que macrófagos humanos activados con IFN- γ o LPS incrementan el grado de endocitosis y degradación de HIV-1 con respecto a los macrófagos no activados (Gobeil *et al.*, 2012).

La prueba de desafío para *Brucella* evaluó la capacidad de resolver la infección con una cepa virulenta, los resultados mostraron que el grupo con el mayor nivel de protección fue vacunado con la cepa vacunal *B. abortus* S19, lo cual era de esperarse dado el reconocido nivel protector contra Brucelosis para la cepa S19 (Nicoletti 2010), la menor protección la presentó el grupo control manejado con SBF. La cepa transformante *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+, indujo una protección menor a la de la cepa parental y esto se relaciona con la baja respuesta serológica contra el LPS que se encontró en la prueba de rosa de bengala. La cepa S19 de *B. abortus* ha mostrado tener el mayor nivel protector sobre otras cepas vacunales, por lo que se ha empleado en todas las campañas que han tenido éxito en el control de BB, y su eficiencia se debe a que induce Ac contra el LPS que protegen contra el aborto (Godfroid *et al.* 2011), el comportamiento de la cepa transformante representa una desventaja para los fines de utilizarla como vacuna bivalente, es necesario entonces determinar la manera en que el plásmido afecta la integridad de la membrana externa.

Se requiere realizar más estudios para producir una vacuna bivalente y sabemos que las estrategias de vacunación actuales para ambas enfermedades están funcionando adecuadamente, sin embargo vale la pena la idea de aprovechar la naturaleza intracelular de la cepa S19 de *B. abortus* para actuar como vector para entregar un plásmido codificante del principal antígeno del virus rábico directamente a las células presentadoras de antígeno

Además una vacuna bivalente ayudaría a aumentar la cobertura de las campañas de vacunación y a que los animales podrían quedar vacunados contra dos enfermedades aprovechando el momento en que el ganadero los reúne. Otro beneficio adicional sería una reducción en los costos de producción, es más económico producir una vacuna bacteriana que solo se requiere medios inertes, en comparación con la infraestructura para manejar cultivos de tejidos animales que necesita una vacuna viral.

Los resultados experimentales demostraron que *Brucella* spp puede aceptar y mantener un plásmido de expresión eucariota que codifica una proteína viral, este conocimiento se puede aprovechar para desarrollar vacunas contra otras enfermedades como diarrea viral bovina o rinoatraqueitis infecciosa bovina en las cuales los principales antígenos son glicoproteínas (Brodersen, 2014; Suman *et al.*, 2013).

Capítulo 9

Conclusiones

1. El plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ construido en este trabajo, es eficiente para inducir la expresión de la gpG del virus de rabia en células eucariotas.
2. La cepa *B. abortus* S19 se transformó con el pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ y lo mantiene establemente *in vitro* e *in vivo*.
3. La cepa transformante *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ presenta un crecimiento más lento y en menor concentración que la cepa parental *B. abortus* S19.
4. La cepa transformante *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ expresa el gen de la gpG del virus rábico en condiciones *in vitro*.
5. El plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ afecta la viabilidad de la cepa *B. abortus* S19 ya que ésta presentó un perfil de replicación similar al de cepas no-virulentas en el modelo de ratón.
6. El plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ afecta la antigenicidad de la cepa *B. abortus* S19 puesto que la cepa transformante indujo una respuesta anti-*Brucella* débil y tardía en el modelo murino en comparación con la cepa vacunal *B. abortus* S19.
7. El plásmido pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ induce la producción temprana de anticuerpos antirrábicos neutralizantes en ratones BALB/c y genera una alta respuesta protectora contra el desafío de rabia.
8. La cepa *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ induce tardíamente la producción de anticuerpos antirrábicos neutralizantes y genera una protección intermedia contra el desafío de rabia.

Capítulo 10

Perspectivas

Se requiere comprobar la expresión de la gpG del virus rábico en células en cultivo infectadas con la cepa transformante *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+ para evaluar su utilidad como vector.

Es necesario determinar la ubicación de la gpG en las células infectadas con la bacteria *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-Ggp-SV40+, los resultados ayudarían a conocer si la gpG está interfiriendo con la síntesis de la membrana externa de *B. abortus* S19 y explicaría la débil respuesta anti-Brucella inducida por la cepa transformante.

Bibliografía

1. Acha N P, Szyfres B . 2001. Bacterioses and Mycoses I n: Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals, 3rd ed. Vol. 1. Pan American Health Organization (PAHO), Washington, DC.
2. Acha PN y Szyfres, B. 2003. Clamidiosis, rickettsiosis y virosis. En: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales 3^a ed. Vol. II. Organización panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. Washington DC.
3. Aguilar S A, Tesoro C E, Salas R M, Alonso MRF. 2008. Las vacunas génicas (ADN): ¿Pueden sustituir a las convencionales para el control de la rabia?. *Bioquímica* 33: 147-154..
4. Albertini AAV, Baquero E, Ferlin A and Gaudin Y . 2012. Molecular and Cellular Aspects of Rhabdovirus Entry. *Viruses* 4: 117-139.
5. Albertini AAV, Schoehn G, Weissenhorn W and Ruigrok RWH. 2008. Structural aspects of rabies virus replication. *Review Cell. Mol. Life Sci.* 65: 282 – 294.
6. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris.
7. Anderson TD, Meador VP, Cheville NF. 1986. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. I. Gross and histologic lesions. *Veterinary Pathology* 23: 219–226.
8. Aréchiga CNG. 2010. Identificación de una nueva variante de virus de la rabia aislada en coatis de nariz blanca (*Nasua narica*) de la Península de Yucatán relacionada con murciélagos no hematófagos. Tesis de doctorado. México, D.F., Instituto Politécnico Nacional.
9. Aréchiga CN, Vázquez MS, Berciano JM, Nicolás O, Aznar LC, Juste J, Rodríguez NC, Aguilar SA and Echevarría JE. 2013. Novel Lyssavirus in Bat, Spain. *Emerg Infect Dis.* 19: 793-795.
10. Badrane H and Tordo N. 2001. Hot Switching in *Lyssavirus* History from the Chiroptera to the Carnivora Orders. *J Virol* 75: 8096-8104.
11. Bae JE, Schurig GG, Toth TE. 2002. Mice immune responses to *Brucella abortus* heat shock proteins. Use of baculovirus recombinant-expressing whole insect cells, purified *Brucella abortus* recombinant proteins, and a vaccinia virus recombinant as immunogens. *Vet Microbiol.* 88(2):189-202.

12. Bahloul C, Jacob Y, Tordo N and Perrin P. 1998. DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses. *Vaccine* 16: 417-425.
13. Baldwin CL, Goenka R. 2006. Host immune responses to the intracellular bacteria *Brucella*: does the bacteria instruct the host to facilitate chronic infection? *Crit Rev Immunol.* 26(5):407-442.
14. Baloul L and Lafon M. 2003. Apoptosis and rabies virus neuroinvasion. *Biochimie,* 85: 777–788.
15. Barkhouse DA, Garcia SA, Bongiorno EK, Lebrun A, Faber M, Hooper DC. 2015. Expression of interferon gamma by a recombinant rabies virus strongly attenuates the pathogenicity of the virus via induction of type I interferon. *J Virol* 89: 312-22.
16. Batalla CD y Flores-Crespo R. 1998. Rabia parálitica bovina. En: La rabia en las diferentes especies, sus transmisores y su control. Flores-Crespo. Primera edición, INIFAP. México, D.F.
17. Belotto A, Leanes LF, Schneider MC, Tamayo HC, Correa F. 2005. Overview of rabies in the Americas. *Virus Res* 111: 5–12.
18. Benmansour A, Leblouis H, Coulon P, Tuffereau C, Gaudin Y, Flahaud A and Lafay, F. 1991. Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J Virol* 65: 4198-203.
19. Betts M, Beining P, Brunswick M, Inman J, Angus RD, Hoffman T, Golding B. 1993. Lipopolysaccharide from *Brucella abortus* behaves as a T-cell-independent type 1 carrier in murine antigen-specific antibody responses. *Infect Immun.* 61(5):1722-1729.
20. Brodersen BW. 2014. Bovine viral diarrhoea virus infections: manifestations of infection and recent advances in understanding pathogenesis and control. *Veterinary Pathology,* 51:453-464.
21. Buck JM. 1930. Studies of vaccination during calthood to prevent bovine infectious abortion. *J of Agric. Research.* 41:667-689.
22. Campbell GA, Adams LG, Sowa BA. 1994. Mechanisms of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 41:295-306.
23. Carosella ED, Moreau P, Aractingi S and Rouas-Freiss N. 2001. HLA-G: A shield against inflammatory aggression. *Trends Immunol* 22: 553–555.

24. Carvalho Neta AV, Mol JPS, Xavier MN, Paixão TA, Lage AP, Santos RL. 2010. Pathogenesis of bovine brucellosis. *The Veterinary Journal* 184:146–155.
25. Castellanos J E, C astañeda D R, V elandia A E and H urtado H . 19 97. Partial inhibition of the in vitro infection of adult mouse dorsal root ganglion neurons by rabies virus using nicotinic antagonists. *Neurosci Lett* 229: 198-200.
26. Celli J, Ch astellier C, F ranchini DM, P izarro-Cerdá J, Moreno E , and G orvel JP. 2003. Brucella Evades Macrophage Killing via Vir-B-dependent Sustained Interactions with the Endoplasmic Reticulum. *J. Exp. Med.* 198 (4): 545-556.
27. Chai Q, He WQ, Zhou M, Lu H, Fu ZF. 2014. Enhancement of Blood-Brain Barrier Permeability and Reduction of Tight Junction Protein Expression Are Modulated by Chemokines/ Cytokines I nduced by R abies V irus I nfection. *J Virol* 88: 4698 – 4710.
28. Chopy D , Pothlichet J, Lafage M , Megret F, Fiette L, Si-Tahar M and Lafon M. 2011. Ambivalent role of the innate immune response in rabies virus pathogenesis. *J Virol* 85: 6657–6668..
29. Comerci DJ, Pollevick GD, Vigliocco AM, Frasch ACC, Ugalde RA. 1998. Vector Development for the Expression of Proteins in the Vaccine Strain *Brucella abortus* S19. *Infect. Immun.* Aug 66:3862-3866.
30. Cox J H, D ietzschild B and S chneider LG . 1977. R abies v irus g lycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infect. Immun.* 16: 754-759.
31. Crasta OR, Folkerts O, Fei Z, Mane SP, Evans C, Martino-Catt S, Bricker B, Yu G, Du L, Sobral BW. 2008. Genome Sequence of *Brucella abortus* Vaccine Strain S19 Compared t o Virulent S trains Y ields C andidate Virulence G enes. *PLoS O ne.* 3(5):e2193.
32. DelVecchio V G, K apatral V , R edkar R J, P atra G , M ujer C , Los T, Ivanova N , Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A., Reznik G., Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letteson J J, Haselkorn R, Kyripides N, Overbeek R. 2002a. The Genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:443-448.
33. DelVecchio VG, Wagner MA, Eschenbrenner M, Horn T, Kraycer JA, Estock F, Elzer P, Mujer CH. 2002b. *Brucella* proteomes- a review. *Vet. Microbiol.* 90: 593-603..

34. Díaz Aparicio E. 2013. Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 32 (1): 43-51.
35. Dietrich G, Annette KM, Simone S, Manfred S, Werner G, Ivaylo G. 2001. Gram-positive and Gram-negative bacteria as carrier systems for DNA vaccine. *Vaccine* 19; 2506–2512.
36. Dietzschold B, Wunner W, Wiktor T, Lopes D, Lafon M, Smith C and Koprowski H. 1983. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc Natl Acad Sci* 80: 70-4.
37. Elzer PH, Kovach ME, Phillips RW, Robertson GT, Peterson K, Kenneth M and Roop RM. 1994. In vivo and in vitro stability of the Broad-Host-Range Cloning Vector pBBR1MCS in six *Brucella* Species. *Plasmid* 33: 51-57.
38. European Food Safety Authority. 2010. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal*, 8: 1496.
39. Faber M, Pulmanusahakul R, Hodawadekar SS, Sipsin S, McGettigan JP, Schnell MJ and Dietzschold B. 2002. Overexpression of the Rabies Virus Glycoprotein results in enhancement of Apoptosis and Antiviral Immune Response. *J. Virol* 76: 3374-3381.
40. Faber M, Bette M, Preuss MA, Pulmanusahakul R, Rehnelt J, Schnell MJ, Dietzschold B, Weihe E. 2005. Overexpression of tumor necrosis factor alpha by a recombinant rabies virus attenuates replication in neurons and prevents lethal infection in mice. *J Virol* 79: 15405-16.
41. Gastka M, Horvath J and Lentz T. 1996. Rabies virus binding to the nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit demonstrated by virus overlay protein assay. *J Gen Virol* 77: 2437-40.
42. Gibbons RV. 2002. Cryptogenic rabies, bats, and the question of aerosol transmission. *Annals of Emergency Medicine* 39: 528-536.
43. Glick BR. 1995. Metabolic load and heterologous gene expression. *Bio-technol Adv* 13: 247– 261.
44. Gobeil LA, Lodge R and Tremblaya MJ. 2012. Differential HIV-1 Endocytosis and Susceptibility to Virus Infection in Human Macrophages Correlate with Cell Activation Status. *J Virol* 86: 10399 –10407.

45. Godfroid J, Scholz HC, Barbier T, Nicolas C, Wattiau P, Fretin D, Whatmore AM, Cloeckaert A, Blasco JM, Moriyon I, Saegerman C, Muma JB, Al Dahouk S, Neubauer H & Letesson J. 2011. Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st Century. *Prev. vet. Med.*, 102: 118–131.
46. Golding B, Scott DE, Scharf O, Huang LY, Zaitseva M, Lapham C, Eller N, Golding H. 2001. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect.* 3:43-48.
47. Gomes CP, Costa MG, Azevedo V and Costa OS. 2006. Brucella spp noncanonical LP S: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microbial Cell Factories* 5:13 doi:10.1186/1475-2859-5-13.
48. Gomes MTR, Campos PC, De Almeida LA, Oliveira FS, Costa MMS, Marim FM, Pereira GSM and Oliveira SC. 2012. The role of innate immune signals in immunity to *Brucella abortus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* doi: 10.3389/fcimb.2012.00130.
49. Gorvel JP, Moreno E. 2002. Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology* 90: 281–297.
50. Grilló MJ, Blasco JM, Gorvel JP, Moriyón I, Moreno E. 2012. What have we learned from brucellosis in the mouse model? *Vet Res* 13: 43:29.
51. Gurnathan S, Klinman DM and Seder RA. 2000. DNA VACCINES: Immunology, Application, and Optimization. *Annu. Rev. Immunol.* 18:927–974
52. Halling SM, Peterson-Burch BD, Bricker BJ, Zuerner RL, Qing Z, Li L, Kapur V, Alt DP, and Olsen SC. 2005. Completion of the Genome Sequence of *Brucella abortus* and Comparison to the Highly Similar Genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *J. Bacteriol.* 187 (8): 2715-2726.
53. Hemachudha T, Laothamatas J and Rupprecht CE. 2002. Human rabies: a disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. *Lancet Neurology* 1: 101–09.
54. Hense M, Domann E, Krusch S, Wachholz P, Dittmar KEJ, Rohde M, Wehland J, Chakraborty T and Weiss S. 2001. Eukaryotic expression plasmid transfer from the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* to host cells. *Cellular Microbiology*. 3(9), 599-609.
55. Hooper DC, Phares TW, Fabis MJ and Roy A. 2009. The production of antibody by invading B cells is required for the clearance of rabies virus from the central

- nervous system. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(10): e535 .
doi:10.1371/journal.pntd.0000535
56. Hornung V , E llegalst J , K im S , B rzożka K , J ung A , K ato H , et al . 2006. 5' - Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314: 994–997.
 57. <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
 58. <http://www.pronabive.gob.mx/prod/vacbac/PDERRAP.aspx>.
 59. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=19832>, consultado el 24 de marzo de 2014.
 60. Hunter M, Johnson N, Hedderwick S, McCaughey C, Lowry K, McConville J, et al. 2010. Immunovirological correlates in human rabies treated with therapeutic coma. *J Med Virol* 82: 1255–1265.
 61. Johnston GR and Webster NR. 2009. Cytokines and the immunomodulatory function of the vagus nerve. *Br J Anaesth* 102: 453–462.
 62. Jiang X, Baldwin C. 1993. Effects of Cytokines on Intracellular Growth of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 61 (1):124.
 63. Johnson N , A réchiga CN, A guilar S A. 2014 . Vampire bat rabies: ecology, epidemiology and control. *Viruses*: 1911-1928.
 64. Ko J , G Splitter. 2003. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clin Microbiol Rev* 16, 65-78.
 65. Kojima D, Park CH, Tsujikawa S, Kohara K, Hatai H, Oyamada T. et al. 2010. Lesions of the central nervous system induced by intracerebral inoculation of BALB/c mice with rabies virus (CVS-11). *J Vet Med Sci* 72: 1011–1016.
 66. Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM. and Peterson KM. 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175-176.
 67. Kovach, ME, Phillips, R W, Elzer, P H, Roop, R M II, Peterson, K M. 1994. pBBR1MCS: A broad-host-range cloning vector. *Biotechniques*. 16: 800-802.
 68. Lafon M. 2008. Immune evasion, a critical strategy for rabies virus. *Dev Biol Basel* 131: 403–409.
 69. Lapaque N, Moriyon I, Moreno E and Gorvel JP. 2005. *Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor. *Current Opinion in Microbiology*, 8:60–66.

70. 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*, doi:10.1371/journal.pone.0042466.
71. Lentz T, Wilson PT, Hawrot E, Speicher DW. 1984. Amino acid sequence similarity between rabies virus glycoprotein and snake venom curaremimetic neurotoxins. *Science* 226: 847-8.
72. Liu L, Botos I, Wang Y, Leonard JN, Shiloach J, Segal DM, et al. 2008. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* 320: 379–381. doi: 10.1126/science.1155406.
73. Loza Rubio E y Aguilar-Setién A. 1998. Estudio de la variabilidad molecular del virus de la rabia en México. *Ciencia veterinaria*. 8: 51-84.
74. Mackaness GB. 1964. The immunological basis of acquired cellular resistance. *J. Exp. Med.* 120: 105–120.
75. Marston DA, McElhinney LM, Johnson N, Müller T, Conzelmann KK, Tordo N and Fooks AR. 2007. Comparative analyses of the full genome sequence of European bat Lyssavirus type 1 and type 2 with other Lyssaviruses and evidence for a conserved transcription termination and polyadenylation motif in the G-L 3' non translated region. *Journal of General Virology*. 88: 1302-1314.
76. Masatani T, Ito N, Shimizu K, Ito Y, Nakagawa K, Abe M, et al. 2011. Amino acids at positions 273 and 394 in rabies virus nucleoprotein are important for both evasion of host RIG-I-mediated antiviral response and pathogenicity. *Virus Res* 155: 168-174.
77. Mazarakis ND, Azzouz M, Rohll JB, Ellard FM, Wilkes FJ, Olsen AL, Carter EE, Barber RD, Baban DF, Kingsman SM, Kingsman AJ, O'Malley K and Mitrophanous KA. 2001. Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system after peripheral delivery. *Hum. Mol. Genet* 10: 2109–2121.
78. Mebatsion T, Weiland F and Conzelmann KK. 1999. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J. Virol* 73: 242–250.
79. Medzhitov R, Janeway CA Jr. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*. Feb 9:4-9.

80. Montano HJA y Mata VAE. 1996. Estructura antigénica y mecanismos de infección del virus de la rabia. *Ciencia Veterinaria* 7: 67-102.
81. Moreno E, Stackebrandt E, Dorsch M, Wolters J, Busch M and Mayer H. 1990. *Brucella abortus* 16S rRNA and Lipid A Reveal a Phylogenetic Relationship with Members of the Alpha-2 Subdivision of the Class Proteobacteria. *J Bacteriol.* 172: 3569-3576.
82. Moriyón I, Grilló MJ, Monreal D, González D, Marín C, López-Goñi I, Mainar-Jaime RC, Moreno E, Blasco JM. 2004. Rough vaccines in animal brucellosis: structural and genetic basis and present status. *Vet Res.* 35:1-38.
83. Nicoletti P. 2010. Brucellosis: Past, present and future. *Contributions. Sec. Biol. Med. Sci.* 1: 21–32.
84. NOM 041. Norma Oficial Mexicana [08 no v 1995] . NOM-041-ZOO-1995. “Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales”. México: DOF-Sagarpa..
85. NOM-067. Norma Oficial Mexicana [20 mayo 2011] . NOM-067-ZOO-2007. Campaña nacional para la prevención y control de la rabia en bovinos y especies ganaderas. México: DOF-Sagarpa.
86. 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.
87. Nuovo G J, DeFaria D L, Chanona-Vilchi J G and Zhang Y . 2004. Molecular detection of rabies encephalitis and correlation with cytokine expression. *Mod Pathol* 18: 62-67.
88. Oliveira S, N Soeurt, G Splitter. 2002. Molecular and cellular interactions between *Brucella abortus* antigens and host immune responses. *Vet Microbiol* 90: 417-424.
89. Oliveira S, Splitter GA. 1995. CD8+ type 1 CD44hi Cd45lo lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice. *Eur. J. Immunol.* 25: 2551–2557.
90. Osterman B, Moriyón I. 2006. International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. Minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 56:1173–1175.
91. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M and Tsianos E. 2005. Brucellosis. *N Engl J Med:* 352:2325-36.

92. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos VE. 2006. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis*: 6: 91–99.
93. Pastoret PP and Brochier B. 1996. The development and use of a vaccinia-rabies recombinant oral vaccine for the control of wildlife rabies; a link between Jenner and Pasteur. *Epidemiol. Infect* 116: 235-240.
94. Pastoret PP, Brochier B, Aguilar SA and Blancou J. 1997. Vaccination against rabies. In: Pastoret P.P, Blancou J, Vannier P Verschuereen C. (eds) *Veterinary Vaccinology*. Elsevier Publishers, Amsterdam.
95. Paulsen, IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, et al. 2002. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:13148–13153.
96. Perrin P, Jacob Y, Aguilar-Setién A, Loza-Rubio E, Jallet C, Desmézieres E, Aubert M, Cliquet F and Tordo N. 2000. Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine* 18: 479-486.
97. Phares TW, Kean RB, Mikheeva T and Hooper DC. 2006. Regional differences in blood-brain barrier permeability changes and inflammation in the pathogenic clearance of virus from the central nervous system. *J Immunol* 176: 7666–7675.
98. Phares TW, Shtolman SA, Hinton DR, Atkinson R and Bergmann CC. 2010. Enhanced antiviral T cell function in the absence of B7-H1 is insufficient to prevent persistence but exacerbates axonal bystander damage during viral encephalomyelitis. *J Immunol* 185: 5607–5618.
99. Pizarro-Cerdá J, Méresse S, Parton RG, Van Der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goni I, Moreno E, Gorvel JP. 1998a. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. *Infect. Immun.* 66: 5711–5724.
100. Pizarro-Cerdá J, Moreno E, Sanguedolce V, Mege JL, Gorvel JP. 1998b. Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect. Immun.* 66: 2387-2392.
101. Pizarro-Cerdá, J., Moreno E., Gorvel J.P. 2000. Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. *Microbes and infection* 2, 829-835.
102. Pontow S, Kery V, Stahl D. 1992. Mannose receptor. *Int Rev Cytol* 137: 221-224.
103. Prehaud C, Coulon P, LaFay F, Thiers C. and Flamand A. 1988. Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence. *J. Virol* 62: 1-7.

104. Reagan KJ and Wunner WH. 1985. Rabies virus interaction with various cell lines is independent of the acetylcholine receptor. *Arch. Virol* 84: 277–282.
105. Rieder M, Brzozka K, Pfaller CK, Cox JH, Stitz L and Conzelmann KK. 2011. Genetic dissection of interferon-antagonistic functions of rabies virus phosphoprotein: Inhibition of interferon regulatory factor 3 activation is important for pathogenicity. *J Virol* 85: 842–852.
106. Rivers R, Andrews E, González-Smith A, Donoso G, Oñate A. 2006. *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. *Arch. Med. Vet.* 38: 7-18.
107. Robinson HL, Hunt LA, Webster RG. 1993. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haem agglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* 11:957–60.
108. Ross BA, Favic MA and Vásquez VA. 2008. Glicoproteína del virus rábico. Estructura, inmunogenicidad y rol en la patogenicidad. *Rev Chil Infect* 25: 14-18.
109. Roy A and Hooper DC. 2007. Lethal silver-haired bat rabies virus infection can be prevented by opening the blood-brain barrier. *J Virol* 81: 7993–7998.
110. 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.
111. 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.
112. 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.
113. Salas RM. 2005. Respuesta inmune de una vacuna génica contra el virus de la rabia empleando *Salmonella typhimurium* SL3261 como vector y con la ayuda de la Pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae*. Tesis de maestría. México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México.
114. Samaha H, Al-Rowaily M, Khouhair RM, Ashour HM. 2008. Multicenter study of brucellosis in Egypt. *Emerging Infectious Diseases* 14: 1916–1918.

115. Samartino LE, Enright FM. 1996. *Brucella abortus* differs in the multiplication within bovine chorionic membrane explants from early and late gestation. *Comp. Immun. Microbiol. Infec. Dis.* 19: 55–63.
116. Sangari FJ, García Lobo JM, Blasco JM, Agüero J. 1994. The *Brucella abortus* vaccine strain B 19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiol. Letters* 121:337-342.
117. Sangari FJ, Grilló MJ, Jiménez de Bagüés MP, González-Carreró MI, García Lobo JM, Blasco JM, Agüero J. 1998. The defect in the metabolism of the *Brucella abortus* B 19 vaccine strain is unrelated with its attenuated virulence in mice. *Vaccine.* 16:1640-1645.
118. Scholz HC, Hubalek Z, Sedláček I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kämpfer P, Neubauer H et al. 2008. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 375–382.
119. Scholz Holger C, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, et al. 2010. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60: 801–808.
120. Schurig G, N Sriranganathan, M Corbel. 2002. Brucellosis vaccines: past, present and future. *Vet Microbiol* 90: 479-496.
121. Schurig GG, Rupp R M, Bagchi T, Boyle S, Sriranganathan N. 1991. Biological properties of RB51: a stable rough strain of *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* 28:171-188.
122. Seif I, Coulon P, Rollin P and Fliamand A. 1985. Rabies virulence: Effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *J Virol* 53: 926-34.
123. Seleem MN, Boyle S M, Sriranganathan N. 2010. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Vet Microbiol.* 140:392-398.
124. Sizemore DR, Branstrom AA and Sadoff JC. 1995. Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* 270: 299–303.
125. Smith JS, Fishbein DB, Rupprecht CE and Clark K. 1991. Unexplained rabies in three immigrants in the United States: a virologic investigation. *N Engl J Med* 324: 205–11. Sola-Landa, A., J. Pizarro-Cerda, M. J. Grillo, E. Moreno, I. Moriyon, J. M. Blasco, J. P. Gorvel, and I. Lopez-Goni. 1998. A two-component regulatory system

- playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Mol. Microbiol.* 29:125–138.
126. 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.
 127. Tang DC, De Vit M, Johnston SA. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356:152–54.
 128. Tesoro CE, Feria RIA, López MJG, Orozco SS, Hernández GR, Blanco FF, Pérez TA and Aguilar SJA. 2008. Efficient post-exposure prophylaxis against rabies by applying a four-dose DNA vaccine intranasally. *Vaccine* 26: 6936–6944.
 129. Thoulouze M, Lafage M, Schaschner M, Hartmann U, Cremer H and Lafont M. 1998. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *J Virol* 72: 7181-7190.
 130. Tsiang H, Ceccaldi PE and Lycke E. 1991. Rabies virus infection and transport in human sensory dorsal root ganglia neurons. *J. Gen. Virol* 72: 1191–1194.
 131. Tuffereau C, Benejean J, Blondel D, Kieffer B and Flamand A. 1998. Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO J.* 17, 7250–7259.
 132. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dworkin RJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt DM, Friedman A, Hawe LA, Leander KR, Martinez D, Perry HC, Shiver JW, Montgomery DC, Liu MA. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259:1745–49.
 133. Vemulapalli R, He Y, Boyle SM, Sriranganathan N, and Schurig GG. 2000a. *B. abortus* strain RB51 as a vector for heterologous protein expression and induction of specific Th1 type immune responses. *Infect. Immun.* 68: 3290–3296.
 134. Vemulapalli R, He Y, Buccolo LS, Boyle SM, Sriranganathan N, Schurig GG. 2000. Complementation of *Brucella abortus* RB51 with a functional *wboA* gene results in O-antigen synthesis and enhanced vaccine efficacy but no change in rough phenotype and attenuation. *Infect Immun.* 68:3927-3932.
 135. Verger JM, Gayon M, Chaslus-Dancla E, Meurisse M and Lafont JP. 1993. Conjugative transfer and in vivo / in vitro stability of the broad-host-range IncP R751 plasmid in *Brucella* spp. *Plasmid* 29: 142-146.

136. Verger J M, Grimont F, Grimont P A, Grayon M . 1985. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. *Int J Syst Bacteriol* 35:292-5.
137. Wiktor TJ, MacFarfan RI, Reagan KJ, Dietzschold B, Curtis PJ, Wunner WH, et al. 1984. Protection from rabies by a vaccine virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81: 7194-7198.
138. Wyckoff III J H. 2002. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* 90: 395-415.
139. Xiang ZQ, Spitalnik S, Tran M, Wunner W H, Cheng J and Ertl HC. 1994. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* 15: 199, 132-40.
140. Zaitseva MB, Golding H, Manischewitz J, Webb D, Golding B. 1996. *Brucella abortus* as a potential vaccine candidate: Induction of interleukin-12 secretion and enhanced B7.1, B7.2, and intercellular adhesion molecule 1 surface expression in elutriated monocytes stimulated by heat-inactivated *B. abortus*. *Infect. Immun.* 64: 3109–3117.
141. Zhan Y, Cheers C. 1995. Endogenous Interleukin-12 Is Involved in Resistance to *Brucella abortus* Infection. *Infect Immun.* 63: 1387-1390.
142. Zhan Y, Liu Z, Cheers C. 1996. Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-12 Contribute to Resistance to the Intracellular Bacterium *Brucella abortus* by Different Mechanisms. *Infect Immun.* 64 : 2782.
143. Zhan Y, Yang JI, Cheers C. 1993. Cytokines response of T-cell subsets from *Brucella abortus* infected mice to soluble *Brucella* proteins. *Infect. Immun.* 61, 2841–2847.

Anexo 1

Preparación de semillas de *B. abortus* S19 y *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-gpG-SV40⁺.

Las cepas de *B. abortus* S19 y *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-gpG-SV40⁺ se sembraron en AST y AST -Amp r respectivamente y se incubaron hasta obtener colonias aisladas, se preparó un pre-cultivo en CST, con y sin antibiótico según la cepa, tomándose 1 colonia por cada mL de medio y se incubó por 48 hrs, posteriormente se preparó el cultivo de cada cepa en una relación 1:50 (pre-cultivo/CST) y se incubó hasta obtener una DO₆₀₀=1. Se prepararon alícuotas de 1 ml con glicerol al 10% y se conservaron en congelación a -70°C, cada alícuota se consideró una semilla. Cada cultivo se sembró en Agar Sangre de Carnero (ASC) para verificar la ausencia de contaminación. Una semana después de la congelación, se tomaron al azar tres semillas para calcular UFC/mL, el promedio se consideró el título de las semillas para todo el lote, cada semilla se sembró en ASC para descartar contaminación durante envasado. La concentración de la cepa *B. abortus* S19 fue de 319.83×10^7 UFC/mL y la de *B. abortus* S19 pBBR4-CMV-gpG-SV40⁺ fue 143×10^7 UFC/mL

Anexo 2

Determinación de Ac antirrábicos neutralizantes mediante la prueba de Reducción rápida de focos fluorescentes.

El suero obtenido para determinación de AAN fue inactivado a 64°C por 30 min. Se hicieron crecer células BHK-21 en una botella de cultivo hasta presentar una capa confluyente. Posteriormente, se despegaron con 1 mL de tripsina-verseno 0.3%, des pués se agregó 15 mL de MEM al 10% SFB para resuspender las células. De ésta suspensión se colocaron 100 µL en cada pozo de una placa de 96 pozos de fondo plano. Ésta placa se incubó por 24 horas, 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂ para obtener monocapas 100% confluentes en cada uno de los pozos. En otra placa de 96 pozos de fondo plano (placa de neutralización), se hicieron las diluciones de los sueros a titular colocando en cada pozo 100 µL de MEM sin suero como diluyente, excepto en los controles de células a los cuales se le agregaron 150 µL de MEM sin suero. Se realizaron cuatro diluciones triples (1:9, 1:27, 1:81 y 1:243). Con el suero de referencia (Ig humana antirrábica con 10 UI/mL) se hicieron ocho diluciones triples (1:9, 1:27, 1:81, 1:243, 1:729, 1:2187, 1:6561 y 1:19683). Se adicionó a cada pozo 50 µL de virus rábico cepa PV que presentaba un título de 30 –40 unidades formadoras de focos fluorescentes aproximadamente, excepto los controles de las células. La placa de diluciones se incubo por 1 hora, 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂. Se sacaron ambas placas de la incubadora y una vez que se observó que el estado de las células fuera normal y que la monocapa celular fuera confluyente, se aspiró suavemente el sobrenadante de las células y se le cambió por las diluciones de la placa de neutralización. Por último se agregaron 50 µL de MEM sin suero a cada pozo y se incubo a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂ durante 24 horas. Para fijar las células se utilizó una solución de acetona al 80% diluida con alcohol etílico (almacenada a -20°C) (aproximadamente 150 µL en cada pozo), durante 30 minutos a -20°C, des pués se desechó la acetona y se dejó secar al aire. En la tinción de los focos de replicación viral se utilizaron 40 µL de conjugado fluorescente antirrábico por pozo, se incubó por 30 minutos a 37°C en atmosfera húmeda, se lavó con agua corriente y se le adicionaron 80 µL de un líquido de montaje (50% glicerol-50% PBS pH 7.2, ajustado a pH 8.3). Se observó en el microscopio invertido de larga distancia focal con lámpara UV para realizar el

conteo de focos fluorescentes. Los datos se analizaron por el método de Reed y Muench para determinar el título de anticuerpos que presentaba cada suero.