

## DESARROLLO DE PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE OVINOS INMUNIZADOS CON VACUNAS-GFP

Zabalza<sup>1</sup>, A., San Román<sup>1</sup>, B., Muñoz<sup>2</sup>, P.M., Blasco<sup>2</sup>, J.M., Grillo<sup>1\*</sup>, M.J.

<sup>1</sup>Instituto de Agrobiotecnología (CSIC-Universidad Pública de Navarra-Gobierno de Navarra), Campus de Arrosadía, 31006 Pamplona. <sup>2</sup>CITA de Aragón, 50059 Zaragoza. \*E-mail: [mariajesus.grillo@unavarra.es](mailto:mariajesus.grillo@unavarra.es)

### INTRODUCCIÓN

La vacunación es la estrategia más utilizada para controlar las enfermedades animales. Sin embargo, las vacunas veterinarias pueden interferir en el diagnóstico serológico, dificultando la diferenciación entre los animales vacunados e infectados (DIVA). Para solucionar este problema en el ámbito de la brucelosis animal, nuestro grupo está desarrollando nuevas vacunas, marcadas genética y antigénicamente con la proteína verde fluorescente (GFP) así como tests de diagnóstico asociados. Además de permitir la identificación directa de la cepa vacunal, mediante iluminación UV o microscopía de fluorescencia, la proteína GFP presenta la ventaja de ser de origen marino y por tanto diferente antigénicamente de cualquier proteína conocida en animales de vida terrestre o bacterias, por lo que puede utilizarse como marcador xenogénico de vacunas de *Brucella* (Chacón-Díaz *et al.*, 2011). Así, la respuesta inmunológica de los animales inmunizados con vacunas-GFP podría diferenciarse de la producida en los infectados por cepas de campo, por presentar anticuerpos tanto frente a antígenos del patógeno como frente a la proteína marcadora GFP (Chacón-Díaz *et al.*, 2011). El objetivo del presente trabajo fue poner a punto dos técnicas de diagnóstico serológico, Doble Difusión en Gel (DDG-GFP) y ELISA-indirecto (ELISA-GFP), para su aplicación junto con vacunas-GFP en el control de la brucelosis ovina.

### MATERIAL Y MÉTODOS

En primer lugar, se obtuvieron dos tipos de proteína: (i) GFP-GST producida en la fracción soluble del sistema de expresión *E. coli* XL1-Blue pGEX-4T-1-*gfpmut3* (Kingston y Brent, 1990) y purificada mediante cromatografía de afinidad en columnas GE Healthcare; y (ii) GFP obtenida por escisión enzimática con trombina (37°C, 36 horas, 40 unidades/mg proteína) a partir de GFP-GST. Ambas proteínas fueron cuantificadas, mediante el test de Bradford (Bradford, 1976) y caracterizadas, mediante SDS-PAGE con tinción de Coomassie (Fairbanks *et al.*, 1971) o de Plata Alcalina (Tsai y Frasch, 1982) y Western-Blot anti-GFP (San Román *et al.*, 2012).

A continuación, ambas proteínas se utilizaron para obtener sueros ovinos hiperinmunes anti-GFP-GST y anti-GFP, para su posterior uso como controles positivos en la puesta a punto de los tests de diagnóstico serológico. Para ello, grupos de 3 corderos de 3-4 meses de edad fueron inmunizados, 3 veces consecutivas (a 0, 4 y 6 semanas) por vía subcutánea, con 375 µg/cordero de GFP-GST ó 187,5 µg/cordero de GFP, en adyuvante incompleto de Freund. Como control, se utilizó un grupo de corderos (n=3) inoculados sólo con el adyuvante diluido en PBS. Dos semanas después de la última inmunización, se obtuvo suero sanguíneo de todos los animales. La presencia y título de los anticuerpos obtenidos se determinó, mediante DDG con diferentes concentraciones de GFP-GST y GFP como antígeno.

Para la prueba de DDG-GFP, se determinó la cantidad óptima de GFP a utilizar como antígeno, como aquella que permitía detectar anticuerpos en todos los sueros hiperinmunes y generaba una banda de precipitación equidistante entre los pocillos del suero y del antígeno. El ELISA-GFP se diseñó siguiendo los protocolos descritos previamente (Crowther, 2001, Chacón-Díaz *et al.*, 2011) y analizando los siguientes parámetros: i) utilidad de ambas proteínas como antígenos, mediante tapizado de placas Maxisorp® (Nunc) con GFP-GST (10 µg/mL) o GFP (5 y 10 µg/mL) diluidas en PBS-Tween20; ii) efecto del bloqueo de reacciones inespecíficas, mediante incubación (37°C, 1 hora) con leche desnatada al 2% en PBS-Tween20; iii) dilución óptima del suero, mediante diluciones seriadas, entre 1:60 y 1:61440, de los sueros hiperinmunes; iv) dilución óptima (1:2000 ó 1:4000) del anticuerpo secundario proteína G - Peroxidasa; y v) tiempo óptimo (0, 15 ó 30 minutos) de incubación del sustrato ABTS. Como controles negativos se utilizaron los sueros de corderos (n=3) inoculados con adyuvante en PBS y de corderos sanos coetáneos (n=6) no inmunizados. Finalmente, para determinar la especificidad de la técnica, se analizó

mayor número (n=92) de sueros ovinos sanos y no inmunizados con GFP, en las condiciones del ELISA-GFP determinadas como óptimas.

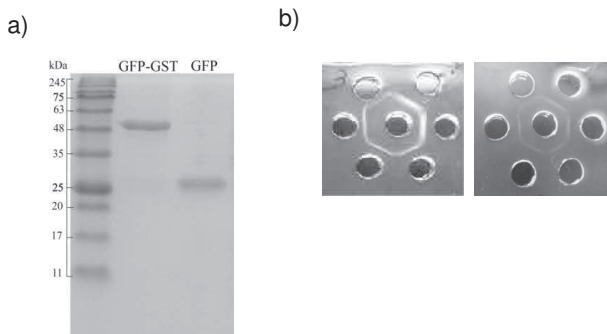
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó la presencia de abundante proteína GFP-GST tanto en el pellet como el sobrenadante de los cultivos bacterianos, obteniéndose un total de 27 mg de GFP-GST y 7 mg de GFP, a partir de la fracción soluble de 66 mL de cultivo bacteriano, lo que supone un rendimiento de producción de 400 µg/mL. Estos datos demostraron la utilidad del sistema de expresión *E. coli* XL1-Blue utilizado, a los niveles de producción descritos con otras cepas de expresión ampliamente utilizadas, como *E. coli* BL21 o BLR (Terpe, 2006). Además, mediante SDS-PAGE, se observó una única banda de 55 kDa para GFP-GST y de 29 kDa para GFP (Fig. 1a), comprobándose que ambas proteínas se habían obtenido en pureza y conformación (resultado no mostrado) adecuadas para su posterior utilización. Todos los sueros ovinos obtenidos tras la hiperinmunización mostraron una clara reacción positiva en DDG, tanto frente a la proteína homóloga como a la heteróloga, con mayor intensidad en los sueros de los corderos hiperinmunizados con GFP y enfrentados a la misma proteína (Fig. 1b). Para la DDG-GFP, la concentración óptima de antígeno fue de 31,25 µg/mL de GFP, para ambas proteínas. En el ELISA-GFP, los resultados obtenidos mostraron que la proteína GFP-GST es más adecuada que GFP, para su uso como antígeno diagnóstico. De hecho, cuando se utilizó la proteína GFP para el tapizado de las placas, todos los sueros hiperinmunes presentaron baja o nula reactividad. Este hecho podría explicarse por: i) diferencias en la conformación o presentación de epítopos de GFP, tras la ruptura enzimática de GFP-GST en los sitios para la trombina; ii) condiciones de tapizado óptimas para GFP-GST, pero no para GFP; iii) adhesión de la proteína GFP a los pocillos dejando expuestas zonas poco inmunógenas, que limitarían las reacciones antígeno-anticuerpo; y iv) la existencia de anticuerpos anti-GST en los animales inmunizados con GFP-GST. Para descartar esta última posibilidad, se realizó un ELISA anti-GST, en el que todos los animales fueron negativos. Cuando se analizó el efecto del bloqueo de la reacción con 2% de leche se observó una notable disminución de la absorbancia de los sueros negativos, lo que indica que dicho paso era necesario para evitar resultados falso-positivos. Además, se determinó que las diluciones óptimas de suero eran 1:100 y 1:200, al permitir observar las mayores diferencias de absorbancia entre los sueros negativos y positivos. Para tratar de aumentar los valores de absorbancia de los sueros positivos, se estudió el efecto de una dilución (1:2000) menor del anticuerpo secundario proteína G-Peroxidasa. Sin embargo, este parámetro no modificó los resultados anteriores, por lo que se mantuvo como óptima la dilución 1:4000 del conjugado. Por último, se analizó el efecto del tiempo de incubación del ABTS, observándose que tras 15 y/o 30 minutos, según dilución de los sueros (Fig. 2a), aumentaban significativamente las diferencias en la reacción colorimétrica entre los sueros positivos y los negativos. Finalmente, en las condiciones de trabajo fijadas (antígeno GFP-GST, bloqueo de la reacción con leche 2%, dilución de los sueros a 1:100 y 1:200 e incubación del ABTS durante 15 y 30 minutos), los 92 sueros ovinos seleccionados como controles negativos indicaron que el ELISA-GFP poseía una especificidad del 99% (Fig. 2b).

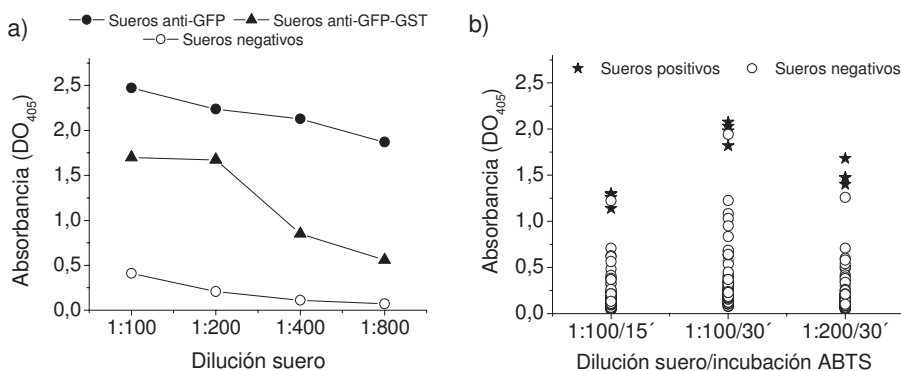
## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradford, M.M. 1976. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Chacón-Díaz, C., Muñoz-Rodríguez, M., Barquero-Calvo, E., Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E., Grilló, M. J. & Moreno, E. 2011. Vaccine 29: 577-582.
- Crowther, J. 2001. Methods in molecular biology. The ELISA guidebook. New Jersey: Human Press Inc.
- Fairbanks, G., Steck, T.L. & Wallach, D.F. 1971. Biochemistry 10 (13): 2606-2617.
- Kingston, B. & Brent, R. 1990. Current Protocols in Molecular Biology.
- Terpe, K. 2006. Applied microbiology and biotechnology 72: 211-222.
- San Román, B., Garrido, V., Muñoz, P.M., Arribillaga, L., García, B., De Andrés, X., Zabaleta, V., Mansilla, C., Farrán, I., Lasa, I., De Andrés, D., Amorena, B., Lasarte, J.J., & Grilló M.J. 2012. Vet. Res. 43(1):31.
- Tsai, C. M. & Frasch C.E., 1982. Anal. Biochem. 119(1):115-119.

**Agradecimientos:** El trabajo ha sido financiado por el Programa de Cooperación Internacional CSIC-CRUSA (ref. 2010CR0005) y CICYT/MINECO (ref. AGL2011-30453-C04). A.Z. disfruta de una beca UPNA y B.S.R. de un contrato JAE-Doc del CSIC.



**Figura 1.** a) SDS-PAGE con tinción de Coomassie de las proteínas GFP-GST y GFP; b) Titulación en DDG de los sueros de corderos hiperinmunizados con GFP frente a su antígeno homólogo (izquierda) y heterólogo (derecha), colocando diluciones seriadas del suero en los pocillos exteriores y la concentración óptima del antígeno en el pocillo interior.



**Figura 2.** a) ELISA-GFP, tras 30 minutos de incubación con ABTS; b) Especificidad (n=92) del ELISA-GFP en distintas condiciones de dilución del suero ovino e incubación con ABTS.

## DEVELOPMENT OF SEROLOGICAL TESTS FOR IDENTIFYING SHEEP IMMUNIZED WITH GFP-VACCINES

**ABSTRACT:** Serological interference in diagnostic tests is a major problem associated to the use of veterinary vaccines, hampering the differentiation between infected and vaccinated animals (DIVA). To solve this in the ovine brucellosis context, our group is developing new *Brucella* vaccines tagged with green fluorescent protein (GFP) as a xenogenic marker, to be used in combination with both classical and GFP DIVA-tests. The aim of this work was to develop serological tests (DDG-GFP and ELISA-GFP) to detect GFP antibodies in sheep. The optimal concentration of the proteins in DDG-GFP was that containing 31.25 µg/mL of GFP. In ELISA-GFP, GFP-GST fusion protein was more suitable than GFP as antigen. Moreover, other ELISA-GFP factors (blocking effect, serum and conjugate optimal dilutions, and time of ABTS substrate incubation) were evaluated, setting up an ELISA-GFP detecting all hyperimmune sera, and showing 99 % specificity when 92 negative sheep sera were tested. In conclusion, the serologic tests developed allowed to detect anti-GFP sheep antibodies, and could be useful along with recombinant GFP vaccines, as a DIVA strategy.

**Keywords:** DIVA, GFP, i-ELISA, DDG