

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

**Clonación y expresión heteróloga de un potencial
candidato vacunal contra neumonía en alpacas usando
el enfoque pan-genómico de la vacunología reversa**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología
Molecular

AUTOR

Julio Eduardo Juscamayta López

ASESOR

Lenin Maturrano Hernández

Lima – Perú

2017

*A Izumi Luciara y Cielo
Valentina, mis
amadas hijas
Y a mi esposa Ninfa,
por su apoyo y comprensión*

*“Difficult doesn't mean impossible,
impossible doesn't mean that I will give
up...”*

Anonymous

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor Dr. Lenin Maturrano Hernández de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el apoyo brindado y los consejos que me llevaron a culminar con mi trabajo, pero sobre todo por la confianza depositada.

Al Dr. Raúl Rosadio Alcántara, por permitirme desarrollar la tesis dentro de las instalaciones del Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, y por las facilidades brindadas.

A mis amigos y colegas del Laboratorio de Biología y Genética Molecular.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a todos los profesores que me brindaron una enseñanza sólida, en especial a los revisores de esta tesis, quienes atendieron mis dudas y me apoyaron con sus correcciones, sugerencias y comentarios.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido DesoxirriboNucleico
APS	Persulfato de amonio.
BAMs	Macrófagos Alveolares de Bovino
BCV	Coronavirus Bovino
BHV-1	Virus Herpes Bovino tipo 1
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BPP	Pasteurelosis Neumónica Bovina
BRSV	Virus Respiratorio Sincitial Bovino
BRSV	Virus Sincitial Respiratorio Bovino
BVDV	Virus de la Diarrea Viral Bovino
cDNA	ADN complementario
CDS	Secuencia de DNA Codificante
EMBOSS	The European Molecular Biology Open Software Suite
EST	Marcador de Secuencia Expresada
GST	Glutación S-transferasa
IBRV	Virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina
ICM	Modelo de Contexto Interpolado
IFN- γ	Interferón γ
IL-1	Interleucina-1
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa inducible
IROMPs	OMPs Reguladas por Hierro
KEEG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

Lbp	Proteína de unión a Lactoferrina
LDC	Clonación dependiente de ligación
LFA-1	Antígeno 1 Asociado a Función de Linfocito
LIC	Clonación independiente de ligación
Lkt	Leucotoxina
LPS	Lipopolisacáridos
MBP	Proteína de unión a maltosa
NF- κ B	Factor de transcripción Nuclear κ B
OMPs	Proteínas de Membrana Externa
ORF	Marco Abierto de Lectura
PIV-3	Virus Parainfluenza tipo 3
PlpE	Lipoproteína de membrana externa S1 o tipo E
RF	Clonación libre de restricción
Roary	<i>Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-sodio dodecil sulfato
SNPs	Polimorfismos de nucleótido simple
Tbp 1	Proteína de unión a Transferrina tipo 1
Tbp 2	Proteína de unión a Transferrina tipo 2
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TIGR	Instituto para la Investigación Genómica
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral α
Trx	Tiorredoxina
VR	Vacunología Reversa

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
LISTA DE TABLAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	
2.1. Pasteurelisis neumónica	3
2.1.1. Definición y alcances	
2.1.2. Etiología	
2.1.3. Clínica	
2.2. <i>Mannheimia haemolytica</i>	6
2.2.1. Definición y características	
2.2.2. Clasificación y diversidad	
2.2.3. Patogénesis y factores de virulencia	
2.2.4. Leucotoxina (LktA)	10
2.2.4.1. Organización genética de la leucotoxina	
2.2.4.2. Análisis estructural, funcional y de diversidad de LktA	
2.2.4.3. Biología molecular de la LktA: mecanismo de acción	
2.2.4.4. Regulación transcripcional del <i>cluster</i> del gen <i>lktA</i>	
2.3. Inmunidad y vacunas frente a la pasteurelisis neumónica	17
2.4. Enfoque pan-genómico de la vacunología reversa	19
2.5. Expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	22

2.5.1. Estrategias para lograr la expresión de proteínas solubles

2.5.2. Sistema de expresión *Champion pET TOPO Directional*

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis26

3.2. Objetivos26

3.2.1. Objetivo General

3.2.2. Objetivos Específicos

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Secuencias genómicas27

4.2. Análisis del pangenoma de *M. haemolytica* y selección de
candidatos vacunales representativos28

4.2.1. Cálculo del Pan-Genoma, genoma core y accesorio

4.2.2. Caracterización funcional y selección de candidatos vacunales

4.2.3. Análisis filogenómico de especies de *M. haemolytica*

4.3. Clonación y expresión de la leucotoxina como candidato vacunal29

4.3.1. Diseño de *primers*

4.3.2. Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento

4.3.3. Extracción de ADN genómico

4.3.4. Amplificación del gen *lktA* y control mediante PCR

4.3.5. Purificación de productos de PCR

4.3.6. Clonación del gen *lktA* y transformación

4.3.7. Análisis de clones recombinantes

4.3.7.1. Minipreparaciones de plásmidos y conservación

4.3.7.2. Identificación del gen control clonado con enzima de restricción

4.3.7.3. Identificación del gen *lktA* clonado por PCR colonia

4.3.8. Expresión de la proteína LktA recombinante como candidato vacunal

4.4. Análisis de la proteína recombinante LktA expresada por SDS-PAGE	
4.4.1. Preparación de las muestras y condiciones de SDS-PAGE	
4.4.2. Tinción de proteínas con nitrato de plata	
5. RESULTADOS	38
5.1. Análisis del pangenoma de <i>M. haemolytica</i> y selección de candidatos vacunales representativos	
5.1.1. Cálculo del Pan-Genoma, genoma core y accesorio	
5.1.2. Caracterización funcional y selección de candidatos vacunales	
5.1.3. Análisis filogenómico de especies de <i>M. haemolytica</i>	
5.2. Clonación y expresión de la leucotoxina como candidato vacunal	
5.2.1. Aislamiento de <i>M. haemolytica</i> y amplificación del gen <i>lktA</i>	
5.2.2. Análisis de clones recombinantes	
5.2.2.1. Clonación y minipreparación de los transformantes	
5.2.2.2. Identificación del gen control clonado con enzima de restricción	
5.2.2.3. Identificación del gen <i>lktA</i> clonado por PCR colonia	
5.2.3. Análisis de la expresión de la proteína LktA recombinante	
6. DISCUSIÓN	55
7. CONCLUSIONES	62
8. RECOMENDACIONES	63
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
10. ANEXOS	79

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Información general sobre los genomas de las 19 cepas de <i>Mannheimia haemolytica</i> usado en este trabajo.	27
Tabla 2. Reacción de clonación TOPO para el gen <i>lktA</i> , gen control (control positivo) y vector vacío (sin inserto) utilizado como un control negativo.	33
Tabla 3. Soluciones para preparación del gel de empaquetamiento y separación al 4% y 10% de acrilamida, respectivamente, para un volumen de 10 ml.	36
Tabla 4. Anotación de los genomas de las 19 cepas de <i>Mannheimia haemolytica</i> usado en este trabajo.	38
Tabla 5. Principales características del Pangenoma de <i>Mannheimia haemolytica</i> .	39
Tabla 6. Potenciales candidatos vacunales identificados en el genoma core y accesorio del pangenoma de <i>M. haemolytica</i> usando el enfoque pangenómico de la vacunología reversa.	45
Tabla 7. Colonias utilizadas en las minipreparaciones de plásmidos para el análisis de los constructos recombinantes.	51

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Pulmón de cría de alpaca con bronconeumonía extensiva/multilobal y pleuritis fibrinosa.	5
Figura 2. Organización genética del operón leucotoxina de <i>Mannheimia haemolytica</i> y dominios presentes en la secuencia de aminoácidos de la leucotoxina A (LktA).	12
Figura 3. Síntesis, activación y secreción del prototipo toxina RTX: la hemolisina de <i>E. coli</i> (HlyA).	13
Figura 4. Modelo lineal de LktA de <i>M. haemolytica</i> , representando varios dominios funcionales de la toxina RTX.	14
Figura 5. Esquema de la pleuroneumonía fibrinonecrotizante inducido por LktA en la infección de <i>M. haemolytica</i> .	15
Figura 6. Un modelo de la respuesta de calcio inducido por LPS y LktA derivado de <i>M. haemolytica</i> .	16
Figura 7. Interacción entre los diferentes enfoques de la vacunología reversa para el diseño de vacunas.	21
Figura 8. Mapa del vector de expresión pET102/D-TOPO (6315 bp).	25
Figura 9. Histograma de la prevalencia de diferentes <i>clusters</i> de genes presentes en el pangenoma de <i>Mannheimia haemolytica</i> .	40
Figura 10. Mapa circular genómico comparativo del pangenoma de 19 cepas virulentas de <i>Mannheimia haemolytica</i> (Mh).	41
Figura 11. Caracterización funcional de genes core y accesorio.	43

	Pág.
Figura 12. Árbol filogenómico basado en SNPs del genoma core contra un <i>heatmap</i> de perfiles de presencia (azul oscuro)/ausencia (azul claro) de <i>clusters</i> de genes en el pangenoma de <i>M. haemolytica</i> (<i>Mh</i>).	47
Figura 13. Aislamiento de <i>Mannheimia haemolytica</i> ATCC 3339 srt. A2 Ovino en 5% de agar sangre e incubadas a 37°C por 24 horas bajo condiciones aeróbicas.	48
Figura 14. Productos de PCR del gen leucotoxina (<i>lktA</i>) y el gen control.	49
Figura 15. Colonias transformantes con plásmidos recombinantes pET102- <i>lktA</i> y pET102-control positivo.	50
Figura 16. Plásmidos aislados mediante minipreparaciones de los transformantes.	52
Figura 17. Análisis de restricción de los plásmidos recombinantes pET102-control positivo.	53
Figura 18. Productos de PCR obtenidos por PCR colonia y PCR directo de los plásmidos recombinantes pET102- <i>lktA</i> .	54
Figura 19. Análisis SDS-PAGE de la proteína recombinante leucotoxina de <i>M. haemolytica</i> , expresada en <i>E. coli</i> .	55

RESUMEN

Mannheimia haemolytica es considerada como uno de los agentes causantes de la pasteurelisis neumónica en las alpacas. El objetivo del presente trabajo fue obtener en *E. coli* un candidato vacunal recombinante representativo del pangenoma de *Mannheimia haemolytica* para brindar una protección heteróloga contra la pasteurelisis neumónica en alpacas. Para ello, secuencias genómicas de 19 cepas de *M. haemolytica* disponibles en las bases de datos, fueron analizadas comparativamente mediante el enfoque Pan-Genómico de la vacunología reversa. En total 33 candidatos vacunales fueron seleccionados en el pangenoma, 10 en el genoma core y 23 en el genoma accesorio. Todos los genes identificados están relacionados con la patogénesis, virulencia y evasión del sistema inmune del hospedero con variación de secuencias en algunos candidatos. Además, *M. haemolytica* A2 Ovino, resultó genéticamente relacionado con un linaje altamente virulento en el análisis filogenómico basado en SNPs del genoma core. Un alelo del gen *lktA* (2856 pb) fue seleccionado. Este alelo codifica para una variante de la leucotoxina (LktA.84) y está conservado en el 84% de las 19 cepas analizadas, incluyendo *M. haemolytica* A2 Ovino. Posteriormente, esta variante fue amplificada a partir del ADN genómico de *M. haemolytica* ATCC 33396, clonado en el plásmido pET102-TOPO y expresado en forma soluble, en *Escherichia coli*, obteniendo una LktA recombinante de 105 KDa de acuerdo al análisis por SDS-PAGE. Estos resultados sugieren que posiblemente la actividad citotóxica de esta proteína este conservada, por lo tanto podrían ser una gran candidata a ser evaluada como potencial vacuna con protección cruzada contra la pasteurelisis neumónica.

Palabras clave: Candidato vacunal, *Mannheimia haemolytica*, pangenoma, pasteurelisis neumónica, vacunología reversa.

ABSTRACT

Mannheimia haemolytica is considered as one of the causative agents of pneumonic pasteurellosis in alpacas. The aim of this study was to get in *E. coli* a recombinant vaccine candidate highly representative from the pangenome of *M. haemolytica* and with potential to provide heterologous protection against pneumonic pasteurellosis in alpacas. For this, genomic sequences of 19 strains of *M. haemolytica* available on databases were analyzed comparatively by the Pan-genomic approach of the reverse vaccinology. In total, 33 vaccine candidates were selected in the pan-genome, 10 in the core genome and 23 in the accessory genome. All identified genes were related to the pathogenesis, virulence and evasion of host immune system with sequences variation in some candidates. In addition, *M. haemolytica* A2 Ovine, was genetically related to a highly virulent lineage in our phylogenomic analysis based on core genome SNPs. An allele of *lktA* gene (2856 bp) was selected. This allele coding for a variant leukotoxin (LktA.84) and it is conserved in 84% of the 19 strains analysed, including *M. haemolytica* A2 Ovine. Then, this variant was amplified from genomic DNA of *M. haemolytica* ATCC 33396, cloned into plasmid pET102-TOPO and was expressed in soluble form in *Escherichia coli*, resulting in a recombinant LktA protein of 105 kDa according to SDS-PAGE analysis. These results suggest that possibly the cytotoxic activity of this protein is conserved therefore might be a great candidate to be evaluated as a potential vaccine with cross-protective against pneumonic pasteurellosis.

Keywords: *Mannheimia haemolytica*, pangenome, pneumonic pasteurellosis, reverse vaccinology, vaccine candidate.

1. INTRODUCCIÓN

Mannheimia haemolytica es una bacteria Gram-negativa, perteneciente a la familia *Pasteurellaceae*, y el principal agente etiológico de la neumonía o pasteurelosis neumónica en bovinos y ovinos originando grandes pérdidas económicas en la industria ganadera a nivel mundial (Mohamed y Abdelsalam, 2008; Lawrence *et al.*, 2010); además ha sido asociada, junto con *Pasteurella multocida*, a casos de neumonía en camélidos sudamericanos domésticos, siendo la segunda causa más importante de mortalidad de alpacas en Perú, lo que limita su productividad y por ende el buen desarrollo económico de la actividad pecuaria en el mundo andino (Rosadio *et al.*, 2011).

M. haemolytica comprende 12 serotipos capsulares (Angen *et al.*, 1999), siendo A1 y A6 los serotipos aislados predominantes en casos neumónicos de bovinos (Davies *et al.*, 2001), y el A2 en ovinos (Saadati *et al.*, 1997) aunque también hay un incremento en la prevalencia de los serotipos A5, A6 y A7 (Ewers *et al.*, 2004); sin embargo, aún no se conoce qué serotipo está asociado en los casos neumónicos en crías de alpacas.

El uso extensivo de antibióticos utilizado como terapia contra la neumonía ha incrementado la incidencia de multidrogoresistencia de *M. haemolytica* (Kehrenberg *et al.*, 2001); por ello el control se ha enfocado más al desarrollo de vacunas a partir de la identificación de sus factores de virulencia cuyos roles en la patogenicidad han sido investigados principalmente en bovinos (Zecchinon *et al.*, 2005). Las vacunas contra la pasteurelosis neumónica están disponibles comercialmente sólo para bovinos y ovinos, sin embargo estas vacunas fallan en inducir protección a largo plazo contra la infección y no proveen una inmunidad protectora cruzada contra serotipos heterólogos de *M. haemolytica* (Lacasta *et al.*, 2015). La falta de vacunas efectivas radica principalmente en la multiplicidad de serotipos de esta especie (Gonzalez *et al.*, 2013), la existencia de diferencias genéticas y la pobre inmunogenicidad entre los factores de virulencia de cepas de un mismo serotipo (Davies *et al.*, 1997; Davies y Baillie, 2003).

En la actualidad, no se cuenta con genomas secuenciados de *M. haemolytica* aislados de alpacas. No obstante, el secuenciamiento de genomas de *M. haemolytica* de los serotipos A1, A2 y A6, aislados de bovinos y ovinos (Gioia *et al.*, 2006; Lawrence *et al.*, 2009; Eidam *et al.*, 2013; Hauglund *et al.* 2013; Hauglund *et al.* 2015), ofrecen una nueva estrategia para la identificación de candidatos vacunales denominada vacunología reversa, que ha permitido en los últimos años el desarrollo de vacunas efectivas y consiste en la predicción y obtención de potenciales antígenos utilizando

herramientas bioinformáticas y la tecnología de ADN recombinante, respectivamente (Bambini y Rappuoli, 2009).

En el presente estudio se utilizó el enfoque Pan-Genómico de la vacunología reversa con el objetivo de obtener en *E. coli* un candidato vacunal recombinante representativo del pangenoma de *Mannheimia haemolytica*, que sea “prometedor” para brindar una protección heteróloga contra la pasteurelosis neumónica en alpacas, y poder así ser empleado en el desarrollo futuro de vacunas de tercera generación que ayuden a reducir y a controlar la enfermedad.

2. ANTECEDENTES

2.1. Pasteurelisis neumónica

2.1.1. Definición y alcances

Pasteurelisis neumónica es una enfermedad infecciosa aguda causada por especies del género *Pasteurella* (Hawari *et al.*, 2008). Esta enfermedad es también conocida como mannheimiosis respiratoria y es una de las enfermedades en rumiantes más importantes económicamente, con una alta prevalencia a través de los continentes, siendo responsable de aproximadamente el 30% del total de muertes de ganados de engorde en todo el mundo (Mohamed y Abdelsalam, 2008). El impacto económico global de la enfermedad está muy bien reconocido, siendo la industria bovina y ovina de los Estados Unidos la más afectada, con más de un billón de dólares de pérdidas anuales sólo en carne (Lawrence *et al.*, 2010).

Asimismo esta enfermedad es la segunda causa más importante de mortalidad de alpacas en Perú (Rosadio *et al.*, 2011), limitando su productividad y por ende el buen desarrollo económico de la actividad pecuaria en el mundo andino (Ameghino, 1991).

2.1.2. Etiología

Muchas investigaciones han convergido en que *Mannheimia haemolytica*, antes formalmente conocida como *Pasteurella haemolytica*, es el principal agente causal de la pasteurelisis neumónica en bovinos, ovinos y otros rumiantes silvestres y domésticos, (Rice *et al.*, 2008); aunque muchos investigadores coinciden que *Pasteurella multocida* está también involucrada (Quinn *et al.*, 2002; Ayalew *et al.*, 2004); sin embargo, el rol patogénico de *P. multocida* es más evidente en ovinos donde ha sido la responsable de muchos brotes neumónicos serios (Black *et al.*, 1997). Curiosamente, tanto *M. haemolytica* como *P. multocida* son constituyentes normales de la microflora nasal y faríngea de rumiantes sanos (Mohamed y Abdelsalam, 2008). Ambos patógenos han sido frecuentemente aislados de la nasofaringe y la tráquea de animales enfermos, así como también de aparentemente sanos (Biberstein y Hirsh, 1999). Estudios iniciales en bovinos demostraron que el recuento medio nasal de colonias de *P. haemolytica*, fue mucho mayor en animales enfermos que en sanos (Thomson *et al.*, 1975), demostrando la habilidad del organismo para proliferar en una medida notablemente mayor, suficiente como para causar la infección en animales susceptibles.

Por otro lado, los estudios sobre los agentes infecciosos en las neumonías de camélidos sudamericanos, en especial las alpacas, son muy escasos, siendo los primeros estudios realizados por Rosadio *et al.* (1990), donde reportaron una alta prevalencia de *P. multocida* y *P. haemolytica*. Posteriormente, Dwan *et al.* (2008), aislaron *M. haemolytica* de un absceso laríngeo en una cría de alpaca, post mortem, confirmando la presencia de este patógeno en casos de neumonías en alpacas; no obstante, aún no está claro cual de estos patógenos es el agente causal principal de esta enfermedad, aunque en estudios recientes, se han identificado con mayor proporción a *P. multocida*, siendo la bacteria aislada con mayor frecuencia, seguida de *M. haemolytica*, en tejidos pulmonares neumónicos de crías de alpacas (Rosadio *et al.*, 2011), aunque esta diferencia no fue significativa. Esto parece indicar que *P. multocida* sería el principal agente etiológico de estos casos neumónicos en alpacas pero la presencia de *M. haemolytica*, sólo confirman que estos patógenos son los principales contribuidores de esta compleja enfermedad respiratoria (Hirsh y Biberstein, 2004).

En general, las infecciones respiratorias tanto en bovinos y ovinos, así como en camélidos sudamericanos, especialmente en alpacas, parecen ser el resultado de la interacción de múltiples factores incluyendo patógenos neumónicos virales y bacterianos, el estado inmune del hospedero y las condiciones climáticas extremas del lugar donde habitan (Rosadio, 2010; Cid y Martín, 2010). En ovinos, las enfermedades respiratorias suelen estar asociadas principalmente a dos tipos de virus: Virus Parainfluenza tipo 3 (PIV-3) y Adenovirus. El virus PI-3 es el que ha sido aislado con mayor frecuencia, sin descartar la presencia del Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRSV). Por el contrario, en bovinos la presencia de estos tres virus y otros agentes virales como Coronavirus Bovino (BCV) y el Virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBRV) están asociados a infecciones bacterianas por *P. multocida*, *M. haemolytica*, *Mycoplasma dispar* y *Haemophilus somnus* (Hartel *et al.*, 2004).

Por su parte, Rosadio *et al.* (2011), en estudios histopatológicos pulmonares de 24 casos de crías de alpacas muertas por neumonía aguda, identificaron el Virus Respiratorio Sincitial Bovino (BRSV) y el Virus Parainfluenza tipo 3 (PI-3) asociados a *P. multocida* o *M. haemolytica*.

2.1.3. Clínica

Las manifestaciones clínicas de la pasteurelisis neumónica en alpacas, es muy similar al observado en bovinos y ovinos. En general, es reconocida como una

enfermedad respiratoria febril aguda con bronconeumonía fibrinopurulenta o fibrinosa fulminante y pleuritis fibrinosa (Figura 1). Después del inicio del disturbio respiratorio, los animales infectados aparecen extremadamente deprimidos con reducción del apetito, desarrollando fiebre alta, anorexia y respiración rápida, acompañadas con abundantes descargas mucopurulentas nasales y oculares. Luego, en la mayoría de los animales infectados, por lo general presentan tos productiva, que se acentúa con el esfuerzo físico o movimiento. Además, disnea marcada con quejidos respiratorios, pueden desarrollarse en estados avanzados de la enfermedad (López, 2001; Guzmán, 2011).



Figura 1. Pulmón de cría de alpaca con bronconeumonía extensiva/multilobal y pleuritis fibrinosa. Resultados macroscópicos de tejido pulmonar muestra consolidaciones rojizas en áreas ventrales de los lóbulos craneal y cardíaco (flechas); (Tomado de Guzmán, 2011).

Los signos clínicos observables de la enfermedad respiratoria aguda, se desarrollan dentro los 10 a 14 días, en animales adultos, después de la exposición al estrés, pero una aparición más temprana es lo más común (Radostits *et al.*, 2000); sin embargo, los casos severos de animales infectados conducen a la muerte como resultado de una toxemia (12 a 24 horas), incluso antes del desarrollo de lesiones pulmonares significantes. En estos casos la muerte súbita puede ser el primer signo de un brote agudo, particularmente en crías de alpacas y en terneros jóvenes (Ameghino y De Martini, 1991; Brogden *et al.*, 1998; Mohamed y Abdelsalam, 2008).

2.2. *Mannheimia haemolytica*

2.2.1. Definición y características

Mannheimia haemolytica, antes formalmente conocida como *Pasteurella haemolytica*, es un cocobacilo anaerobio facultativo, Gram-negativo, oxidasa positivo, hemolítica débil, fermentativo, no formadora de espora y no móvil, que se caracteriza por ser un patógeno oportunista de bovinos, ovinos y otros rumiantes, además de las alpacas (Quinn *et al.*, 2002; Rosadio *et al.*, 2011).

La enfermedad más común a la que está asociada es la pasteurelosis neumónica o también llamada “fiebre de embarque” en bovinos, ovinos y alpacas, pero el organismo también puede causar septicemia y mastitis en ovinos y un número de lesiones inflamatorias no específicas en varias especies de animales domésticos (Mohamed y Abdelsalam 2008; Rosadio *et al.*, 2011).

M. haemolytica reside en la nasofaringe (Babiuk y Acres, 1984) y en las tonsilas (Frank *et al.*, 1995) de terneros sanos. En estas condiciones está presente como un organismo comensal, manteniendo una relación simbiótica con su hospedero; sin embargo, eventos desencadenantes de la enfermedad como el estrés del destete, condiciones climáticas adversas, cambios en la alimentación, transporte a grandes distancias, mezcla de ganados e infecciones con otros organismos (como virus y *Mycoplasma* sp.) causan que esta coexistencia benigna llegue a un estado fulminante de la enfermedad (Blood *et al.*, 1983).

Varios estudios han intentado comprender el mecanismo asociado al cambio de comensal a patógeno, siendo analizados el efecto del estrés por frío y transporte, en la inmunosupresión (Rice *et al.*, 2008). Como lo demuestra Fillion *et al.* (1984), en un experimento realizado con terneros, donde el estrés por destete y transporte hacia la granja de engorde, causó una elevación transitoria de los niveles de cortisol en el plasma, manteniéndose suprimida la blastogénesis de los linfocitos después de la salida de la granja y durante todo el experimento, observándose, en la mayoría de terneros, seroconversión a *P. haemolytica* (ahora *M. haemolytica*), con algunas lesiones pulmonares y casos de muerte por neumonía. La explicación de tal fenómeno, radica en el “cortisol”, primero porque se ha reportado que intensifica la replicación viral en células individuales y por ende incrementa el dosaje del mismo; segundo, debido a que reduce la eficiencia del sistema inmune, alterando las funciones de monocitos, macrófagos y

neutrófilos y por tanto rompe el equilibrio entre la homeostasis normal del animal y el organismo comensal (Rice *et al.*, 2008). Esta combinación de factores: estrés e infecciones virales, principalmente Virus Herpes Bovino tipo 1 (BHV-1), Virus de la Diarrea Viral Bovino (BVDV), Virus Sincitial Respiratorio Bovino (BRSV) y Virus Parainfluenza tipo 3 (PIV-3), provocan que los mecanismos de aclaramiento mucociliar disminuyan, así como la actividad de los linfocitos T, linfocitos B, monocitos y neutrófilos (Brown *et al.*, 1991), permitiendo que las bacterias colonicen los pulmones y se desarrolle la neumonía fibrinosa (Woldehiwet y Sharma, 1992), por lo tanto la introducción de las bacterias dentro de los pulmones parece ser crítico para la inducción de pasteurelosis neumónica.

2.2.2. Clasificación y diversidad

M. haemolytica es un miembro de la familia *Pasteurellaceae* y del género *Mannheimia*. Inicialmente recibió el nombre de *Bacterium bipolare multocidum* por Theodore Kitt (Kitt, 1885), siendo renombrado a *Pasteurella haemolytica*, en 1932, por reflejar su fenotipo hemolítico débil en placas de agar sangre de ovinos (Newsome y Cross, 1932).

Este patógeno oportunista fue históricamente clasificado en 16 serotipos, basado en una prueba de hemaglutinación indirecta utilizando antígenos de superficie capsular extraíble (Biberstein, 1978). El género fue dividido, en dos biotipos: A y T, basado en su habilidad para fermentar arabinosa y trehalosa, respectivamente (Lo y Shewen, 1991), siendo identificados 12 serotipos A y 4 serotipos T. Posteriormente, Younan y Fodor (1995), caracterizaron un nuevo serotipo de *P. haemolytica*, A17, aislado de ovinos en Siria. A través de estudios de hibridación de ADN-ADN y secuenciamiento de ARN 16S, todos los biotipos A, excepto el biotipo A11, fueron asignados bajo la categoría de especie a *Mannheimia haemolytica* (Angen *et al.*, 1999a); por el contrario, los biotipos T de *P. haemolytica* fueron renombrados como *Pasteurella trehalosi* (Bingham *et al.*, 1990), para finalmente reclasificarse como *Bibersteinia trehalosi* (Blackall *et al.*, 2007), siendo el serotipo A₁₁ remanente, renombrado como *Mannheimia glucosida* (Angen *et al.*, 1999b).

M. haemolytica comprende 12 serotipos capsulares basados en los originalmente asignados para *P. haemolytica* (A₁, A₂, A₅, A₆, A₇, A₈, A₉, A₁₂, A₁₃, A₁₄, A₁₆ y A₁₇) (Angen *et al.*, 1999b), siendo el A₁, el serotipo aislado y predominante, en bovinos, y el A₂, en ovinos, en diferentes casos neumónicos reportados (Rice *et al.*, 2008); sin

embargo, aún no se conoce qué serotipo está asociado en los casos neumónicos en crías de alpacas.

Esta asociación del serotipo A₁ en casos de neumonía de bovinos ha sido reportado en un estudio realizado por Allan *et al.* (1985), donde *P. haemolytica* (ahora *M. haemolytica*) fue el aislado más común de 80 terneros examinados en una necropsia, de los cuales la mayoría fueron diagnosticados con pasteurelisis neumónica bovina. Curiosamente en un estudio de prevalencia de *P. haemolytica* (ahora *M. haemolytica*) en terneros transportados, encontraron que el serotipo A₂ fue el aislado predominante en la granja, mientras que el A₁, lo fue en la granja de engorde y en los pulmones neumónicos de los terneros que murieron por la enfermedad respiratoria aguda, luego del transporte (Frank y Smith, 1983). Además, no sólo la frecuencia del aislamiento de *M. haemolytica* A₁ incrementa cuando los terneros son desplazados hacia la granja de engorde, sino también el número de bacterias (Frank, 1984). De esta manera cuando un número elevado de *M. haemolytica* está presente en la mucosa nasal de terneros, las bacterias son inhaladas dentro de los pulmones (Grey y Thomson, 1971); no obstante, en terneros sanos, se ha evidenciado que el aclaramiento pulmonar de *M. haemolytica* inhalados, es altamente eficiente, eliminándose el 90% dentro las 24 horas (Lillie y Thomson, 1972), por lo cual, es necesario que existan factores de estrés seguido de infecciones virales, para que el serotipo A₁ reemplace rápidamente al A₂. Este cambio, es probablemente debido a la transferencia horizontal de otros animales enfermos que activamente están eliminando organismos A₁ en secreciones nasales, aunque también se han sugerido cambios capsulares (Highlander, 2001).

Por su parte, Davies *et al.* (2001), no sólo reportaron cepas del serotipo A₁, sino también del serotipo A₆, en la mayoría de los casos de pasteurelisis neumónica bovina. Esto es respaldado con recientes estudios en Alemania (Ewers *et al.*, 2004) y los Estados Unidos (Al-Ghamdi *et al.*, 2000), donde documentaron que el serotipo A₆ constituye el 30% del total de serotipos aislados. Esto es debido a que aparte de la estructura capsular, el serotipo A₁ y A₆, son estructuralmente muy similares (Morton *et al.*, 1996).

Por otro lado, el serotipo A₂ es la causa más común de la pasteurelisis neumónica en ovinos (Shewen y Conlon, 1993), pero también hay un incremento de la prevalencia de los serotipos A₅, A₆ y A₇ (Ewers *et al.*, 2004).

2.2.3. Patogénesis y factores de virulencia

La patogénesis de la pasteurelosis neumónica sigue siendo un tema de considerable especulación y controversia, debido a la complejidad de la enfermedad y a la falta de consistencia de los resultados obtenidos por ensayos experimentales (Mohamed y Abdelsalam, 2008). En estudios tempranos, Yates (1982) revisó varios resultados de trabajos de campo, donde demostraba que *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* no puede actuar solo como el patógeno causante de la enfermedad en la ausencia de un factor de predisposición bien definido. Prueba de ello, son las fallas en la inducción de la enfermedad por inoculación directa del organismo en animales sanos, siendo atribuido al rápido aclaramiento de la bacteria por mecanismos de defensa pulmonar; no obstante, en otros estudios, se indujeron suficientes signos clínicos de pasteurelosis neumónica aguda por inoculación intratraqueal o endobronquial de un cultivo puro de *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* en bovinos (Vestweber *et al.*, 1990), ovinos (Foreyt y Silflow, 1996) y cabras (Ngatia *et al.*, 1986), sin la necesidad de un factor de predisposición.

Por otro lado, muchos investigadores coinciden que la pasteurelosis neumónica es una complicación bacteriana secundaria de una previa infección viral del sistema respiratorio (Cutlip *et al.*, 1993; 1996); sin embargo, el desarrollo secuencial de las lesiones pulmonares es mediada por interacciones complejas entre el organismo causante (existente como flora normal en el tracto respiratorio superior), el estado inmunológico del animal y el rol del factor de predisposición en la iniciación de la infección. No obstante, infecciones exógenas también pueden ocurrir por contacto directo con animales enfermos o a través de aerosoles infectados. En cualquier situación, la enfermedad es esencialmente gatillada por exposición súbita a una condición estresante y/o por infección inicial con ciertos virus respiratorios, micoplasmas o bacterias, que dañan los mecanismos de defensa pulmonar local, causando efectos deletéreos en las células ciliares y el revestimiento mucoso de la tráquea, bronquio y bronquiolos. Ante esta circunstancia, la bacteria, residente en la nasofaringe, ingresa a los bronquios ventrales, bronquiolos y alveolos por drenaje gravitacional a lo largo del piso traqueal y por ende llegan profundamente a introducirse al tejido pulmonar (Mohamed y Abdelsalam 2008). Las endotoxinas producidas por el rápido crecimiento y la multiplicación de las bacterias en los lóbulos infectados causan una trombosis intravascular extensiva de las venas pulmonares, capilares y vasos linfáticos, resultando en necrosis isquémico focal del parénquima pulmonar acompañado por una reacción inflamatoria severa dominada por exudados fibrinosos (López, 2001). Cabe destacar

que los neutrófilos cobran un papel importante en esta patogénesis, como lo demuestran Slocombe *et al.* (1985), en un experimento con terneros, donde los animales con neutrófilos disminuidos, usando hidroxiaurea, presentaron valores normales de gases de sangre, tasa respiratoria y número circulante de leucocitos, después de haber sido inoculados con solución salina o con *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Además en la necropsia, los pulmones de estos animales fueron macroscópicamente normales; por el contrario, en grupos de terneros con niveles de neutrófilos normales e inoculados con *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, presentaron hipoxemia que persistió hasta la necropsia (6 horas después de la inoculación), desarrollando también bradicardia, neutropenia y linfopenia, además de lesiones pulmonares consistentes en necrosis de la pared alveolar y un severo exudado y bronconeumonía necrotizante, con acumulación de fluidos proteináceos en alveolos y vasos linfáticos, concluyendo, por lo tanto, que los neutrófilos son requeridos para la injuria pulmonar aguda inducida por *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*.

La severidad de las lesiones, sin embargo, depende del nivel de proliferación de las bacterias y la cantidad de endotoxinas liberadas, lo que a su vez depende de la virulencia de la cepa bacteriana y el nivel en que la defensa del hospedero ha sido alterado (Dungworth, 1993).

Los factores de virulencia de *M. haemolytica* que intervienen en el desarrollo de la pasteurelisis neumónica son numerosos. Siendo el rol de estos factores de virulencia en la patogenicidad de *M. haemolytica*, extensamente investigados, principalmente en bovinos (Zecchinon *et al.*, 2005), motivo por el cual múltiples productos y componentes de *M. haemolytica* A₁ han sido analizados y propuestos como factores de virulencia incluyendo una adhesina (Jaramillo *et al.*, 2000), polisacáridos capsulares (Brogden *et al.*, 1995), fimbrias (Morck *et al.*, 1987, 1989), proteínas de membrana externa reguladas por hierro (OMPs) (Gatewood *et al.*, 1994), leucotoxina (Lkt) (Shewen y Wilkie, 1985; 1988), lipopolisacáridos (LPS) (Confer y Simons, 1986), lipoproteínas (Nardini *et al.*, 1998), neuraminidasas (Straus *et al.*, 1998), un antígeno específico de serotipo (Lo *et al.*, 1991), sialoglicoproteasas (Lee *et al.*, 1994) y proteínas de unión a transferrina (Potter *et al.*, 1999).

2.2.4. Leucotoxina (LktA): el arma principal de virulencia

La leucotoxina (LktA) de *M. haemolytica* es una proteína lábil al calor, de pH estable y soluble en agua que es producida en altas concentraciones durante la fase

logarítmica de crecimiento (Shewen y Wilkie, 1985), donde el hierro es requerido para el crecimiento óptimo de la bacteria y la producción de la leucotoxina (Gentry *et al.*, 1986). LktA es una glicoproteína altamente inmunogénica, de 102-105 KDa, y es producida por todos los serotipos y cepas no tipificables de *M. haemolytica*, aunque el peso molecular, la cantidad de LktA producida y el grado de actividad biológica varía significativamente entre los serotipos (Saadati *et al.*, 1997; Singh *et al.*, 2011).

Diversas investigaciones indican que la leucotoxina es el factor de virulencia principal que contribuye a los signos clínicos y daño pulmonar de la pasteurelosis neumónica bovina (BPP) (Jeyaseelan *et al.*, 2002). Como lo demostró Ames *et al.* (1985), en un experimento *in vivo*, en ganado, donde realizó un desafío intratraqueal con *Pasteurella haemolytica* (ahora *Mannheimia haemolytica*), determinando una elevada correlación positiva entre la severidad de la enfermedad y la cantidad de leucotoxina secretada por la cepa de *M. haemolytica*. En otros ensayos, altos niveles de anticuerpos para LktA, fueron correlacionados con resistencia en BPP experimental y natural, y las vacunas enriquecidas con LktA bioactivas fueron protectoras en modelos experimentales de desafío para BPP (Srinand *et al.*, 1996). Sin embargo, a pesar de la importancia de la leucotoxina, las cepas defectuosas en producir leucotoxinas son parcialmente atenuadas, sugiriendo que otros factores de virulencia son importantes en la patogénesis (Highlander, 2001). Lo anterior, coincide con estudios realizados por Conlon *et al.* (1991), donde las vacunas recombinantes de sólo leucotoxina de *M. haemolytica* A₁, fueron menos eficaces con respecto a las vacunas recombinantes de leucotoxina asociadas a sobrenadantes de cultivos de *Mannheimia*, lo que nos indica que existen otros factores de virulencia que asociados a leucotoxina juegan un rol principal en la inmunidad protectora contra la pasteurelosis neumónica.

2.2.4.1. Organización genética de la leucotoxina: síntesis, activación y secreción

La organización genética de la leucotoxina está compuesta por un *cluster* de genes (Figura 2). El *cluster* de genes que codifican la leucotoxina de *M. haemolytica* ha sido secuenciado y se ha expresado la toxina en *E. coli* (Highlander *et al.*, 1990). La organización genética del operón policistrónico (*lktCABD*) es similar al operón hemolisina de *E. coli*, y contiene cuatro genes. El primer gen es *lktC*, que codifica para una proteína LktC (165 aminoácidos-20KDa) que es responsable para la activación de la LktA, por acilación de ácidos grasos, siendo los grupos de ácidos grasos añadidos co o post-traduccionalmente a los residuos de lisina localizados entre las posiciones aminoacídicas 554–690 de la protoxina LktA, siendo un paso crítico para remover la

carga e incrementar la hidrofobicidad, permitiendo a la LktA insertarse a las células del hospedero y formar poros transmembrana. El segundo gen en el *cluster* es *lktA*, que codifica para la proteína estructural biológicamente inactiva, protoxina LktA (953 aminoácidos-102KDa). Las proteínas LktB/D (708 aminoácidos-80KDa y 478 aminoácidos-55KDa, respectivamente), codificadas por los genes *lktB* y *lktD*, son responsables del transporte y secreción de la LktA. Varios estudios sugieren que la LktA de *M. haemolytica* también podría ser transportada por un mecanismo similar al sistema de translocación/secreción tipo 1 de la hemolisina (HlyA) de *E. coli* (vía HlyB/HlyD/ToIC), donde un péptido señal de ~70 aminoácidos en el extremo C-terminal es importante para su eficiente transporte (Narayanan *et al.*, 2002; Jeyaseelan *et al.*, 2002); (Figura 3).

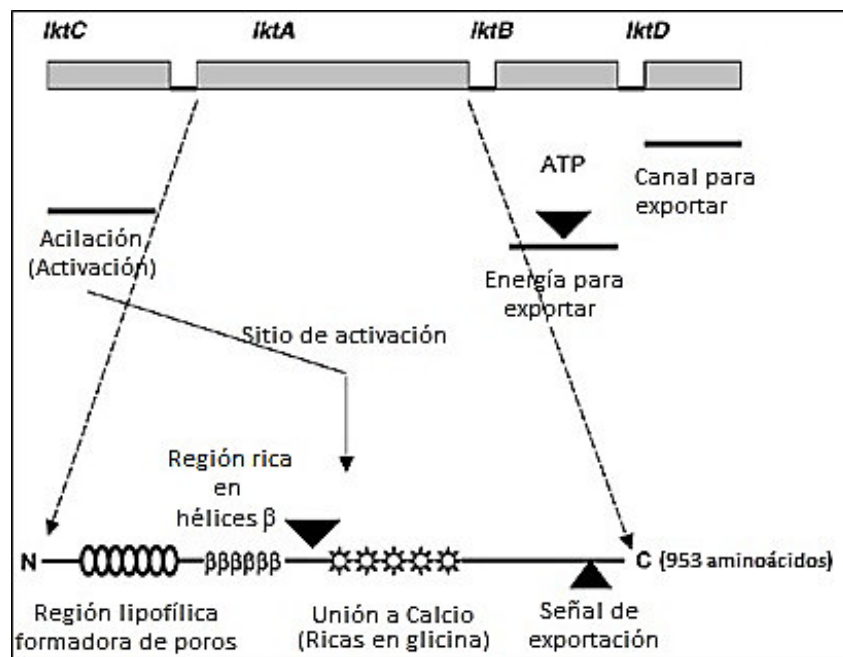


Figura 2. Organización genética del operón leucotoxina de *Mannheimia haemolytica* y dominios presentes en la secuencia de aminoácidos de la leucotoxina A (LktA); (Modificado de Narayanan *et al.*, 2002).

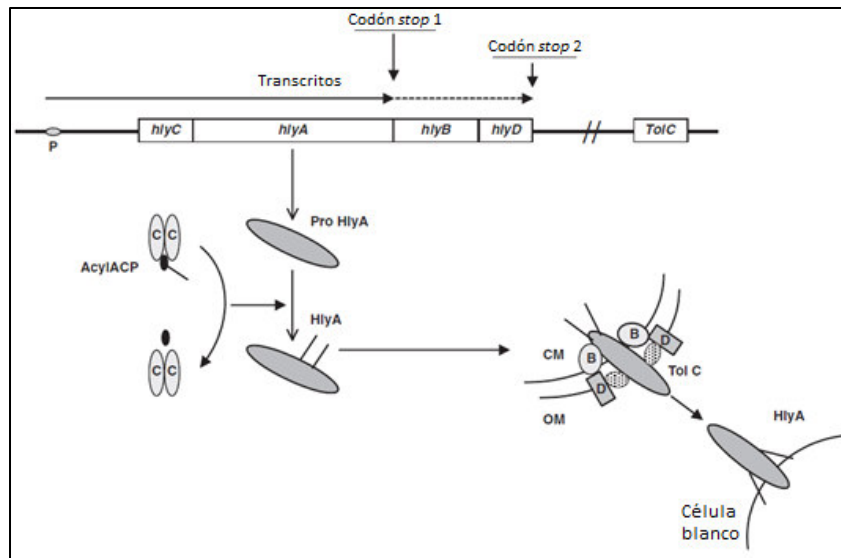


Figura 3. Síntesis, activación y secreción del prototipo toxina RTX: la hemolisina de *E. coli* (HlyA). HlyC (producto del gen *hlyC*) activa la prohemolisina inactiva (proHlyA) dirigiendo la proteína transportadora acylA (ACP) dependiente de la acilación covalente de ácidos grasos de dos residuos de lisina, lys 564-690. Un complejo de membrana celular consistente de productos de los genes *hlyB*, *hlyD* y *tolC* (B, D and Tol C) es necesario para la exportación de la proteína HlyA. P, promotor; CM, membrana citoplasmática; OM, membrana externa. (Modificado de Jeyaseelan *et al.*, 2002).

2.2.4.2. Análisis estructural-funcional y diversidad de la leucotoxina (LktA)

LktA es una exotoxina formadora de poros y miembro de la familia RTX (Repeats in ToXin) de exotoxinas multidomínios. Estas toxinas están genéticamente relacionadas y comparten un motivo común altamente conservado, consistente de una serie de repeticiones nonapéptidos de glicina-ácido aspártico (L/I/F-X-G-G-X-G-N/D-D-X) en el tercio carboxilo terminal de la molécula proteica (Jeyaseelan *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2011). Este motivo conservado está involucrado en la unión al calcio y juega un rol vital en inducir la toxicidad en el leucocito, debido a su habilidad para formar una conformación terciaria requerida para la unión celular a su hospedero-blanco (Cruz *et al.*, 1990). Este motivo, también contiene un sitio de reconocimiento requerido para el transporte de la LktA a través de la membrana biológica de la bacteria, por el sistema de secreción tipo 1 dependiente de tolC (Crosby y Kachlany, 2007). El anticuerpo neutralizante anti-LktA (MAb 601), que reconoce una región adyacente a las repeticiones ricas en glicina, suprime la unión a la célula blanca (Jeyaseelan *et al.*, 2002); (Figura 4).

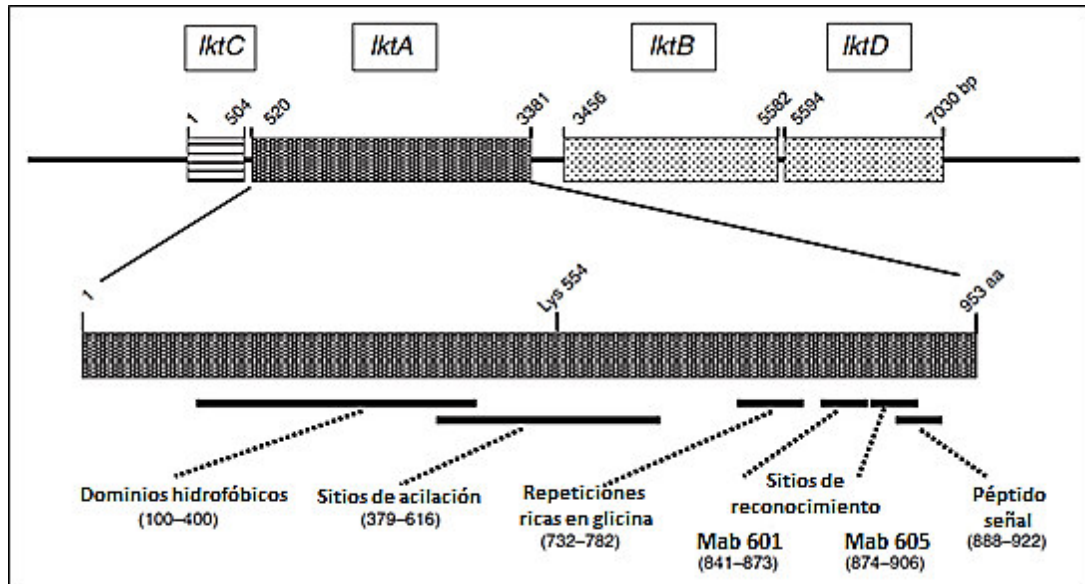


Figura 4. Modelo lineal de LktA de *M. haemolytica*, representando varios dominios funcionales de la toxina RTX. Se muestran los sitios de unión para anticuerpos monoclonales (MAB) 601 y 605. El anticuerpo neutralizante anti-LktA (MAB 601) reconoce una región proximal para repeticiones ricas en glicina y previene la unión de LktA y su efecto biológico. Sin embargo, el anticuerpo no neutralizante anti-LktA (MAB 605) reconoce una región distal para repeticiones ricas en glicina (Modificado de Jeyaseelan *et al.*, 2002).

2.2.4.3. Biología molecular de la LktA: Mecanismo de acción

LktA de *M. haemolytica*, actúa sólo en leucocitos y plaquetas de rumiantes (Clinkenbeard y Upton, 1991). Existen evidencias en varios estudios que apoyan la hipótesis de que los efectos biológicos inducidos por la LktA deben implicar tanto la unión con el antígeno 1 asociado a la función de linfocito (LFA-1; $\beta 2$ integrina heterodímero CD11a/CD18) y la activación de una cascada de señales inducidas por LFA-1, presentes en leucocitos de bovinos (Jeyaseelan *et al.*, 2001).

Experimentos *in vitro* han respaldado que la LktA cumple un rol clave en la patogénesis del daño pulmonar de BPP, donde altas concentraciones de LktA son citocidas para macrófagos alveolares de bovino (BAMs) y neutrófilos, alterando la actividad antimicrobiana y facilitando la proliferación y la supervivencia de la bacteria dentro del pulmón (Maheswaran *et al.*, 1980; Berggren *et al.*, 1981). Monómeros de estas toxinas son insertados dentro de la bicapa lipídica hidrofóbica, formando un poro hidrofílico, que permite la salida de K^+ y la entrada de Ca^{2+} , produciendo hinchazón osmótica y lisis celular. La citólisis de BAMs y neutrófilos resulta en la liberación de sus

enzimas proteolíticas y moléculas proinflamatorias, que pueden causar la degradación estructural del revestimiento alveolar (Jeyaseelan *et al.*, 2002).

A concentraciones sub-citocidas, la LktA activa macrófagos alveolares y neutrófilos, resultando en la translocación de factor de transcripción nuclear κB (NF- κB) dentro del núcleo (Hsuan *et al.*, 1999), la liberación de varios mediadores inflamatorios, incluyendo radicales libres derivados de oxígeno y proteasas que contribuyen al daño celular endotelial pulmonar bovino (Maheswaran *et al.*, 1993), así como la liberación de mediadores lipídicos (leucotrienos); (Wang *et al.*, 1998), óxido nítrico (Yoo *et al.*, 1996), citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-8); (Hsuan *et al.*, 1999) y la inducción de apoptosis (Stevens y Czuprynski, 1996); (Figura 5).

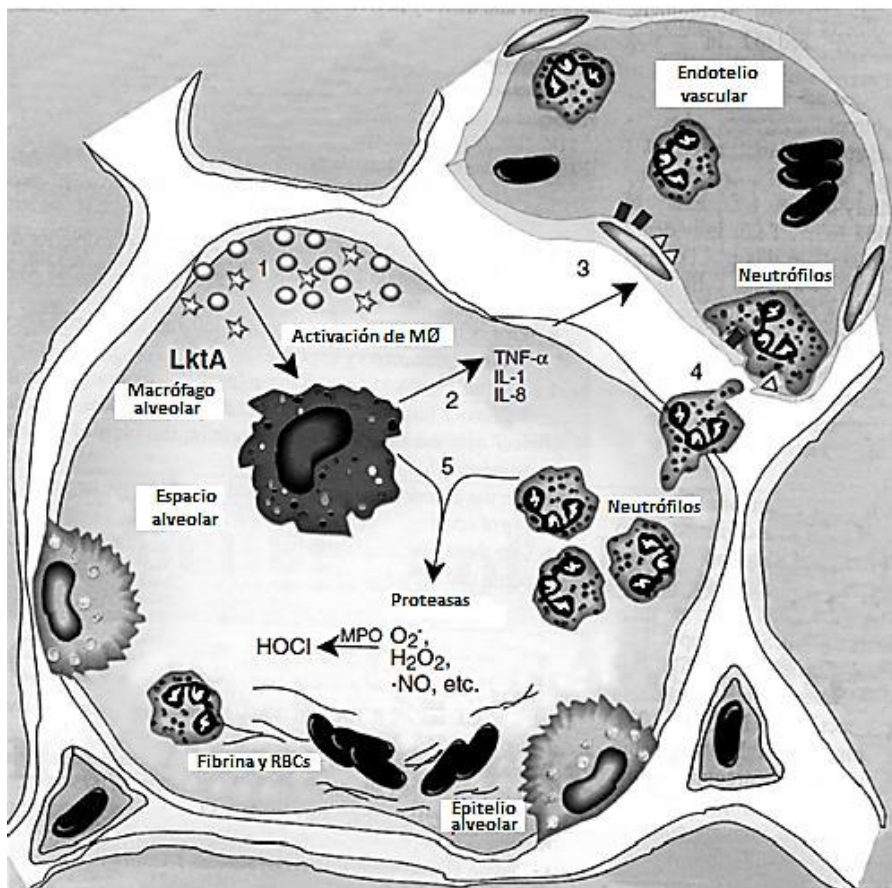


Figura 5. Esquema de la pleuroneumonía fibrinonecrotizante inducido por LktA en la infección de *M. haemolytica*. LktA inicialmente interactúa con los macrófagos alveolares bovinos residentes (BAMs) e induce la secreción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β y IL-8); (1 y 2). Estas citoquinas aumentan las moléculas de adhesión celular en el endotelio (3), permitiendo la migración de neutrófilos dentro del alveolo (4). Los neutrófilos transmigrados y BAMs son activados y citolisados por LktA (5). A su vez, estos eventos conducen la pleuroneumonía fibrinonecrotizante en pasteurelosis neumónica bovina (BPP). MPO, mieloperoxidasa; HOCl, ácido hipocloroso; RBC, glóbulos rojos. (Modificado de Jeyaseelan *et al.*, 2002).

Además, a nivel subcitolica y a altas concentraciones, LktA induce la entrada de calcio (Ca^{2+}), dependiente de concentración, hacia los BAMs (Hsuan *et al.*, 1998) y neutrófilos (Cudd *et al.*, 1999), indicando que la entrada de Ca^{2+} extracelular es necesario para producir esta respuesta celular inducida por la leucotoxina; por ende, la interacción de la LktA con BAMs y neutrófilos es necesario y suficiente para causar inflamación y subsecuente daño pulmonar en BPP (Figura 6).

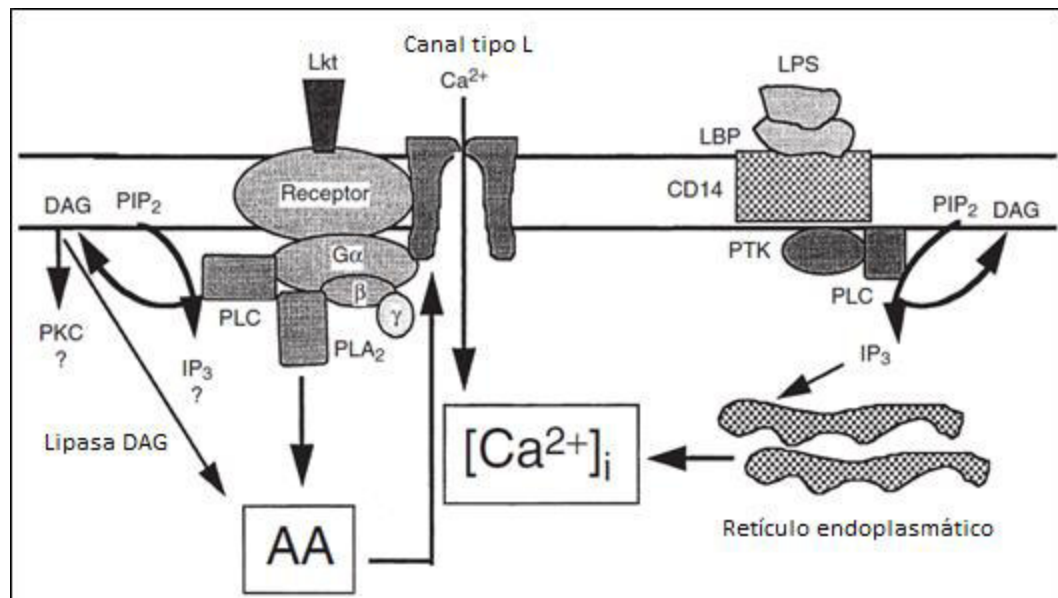


Figura 6. Un modelo de la respuesta de calcio inducido por LPS y LktA derivado de *M. haemolytica*. LPS causa elevación del calcio de almacenamiento intracelular a través de la activación de la proteína tirosin quinasa (PTK). LktA induce la elevación del calcio del medio extracelular a través de la activación de proteínas G, fosfolipasas A2 y C, resultando en liberación de ácido araquidónico (AA), que a su vez regula la entrada de calcio. DAG, diacil glicerol; IP₃, inositol 1,4,5-trisfosfato; PIP₂, fosfatidilinositol bisfosfato; PKC, proteína quinasa C; PTK, proteína tirosin quinasa (Modificado de Jeyaseelan *et al.*, 2002).

2.2.4.4. Regulación transcripcional del *cluster* del gen *lktA*

Las toxinas RTX son reguladas a nivel transcripcional por una diversidad de factores que actúan en *cis* y *trans*. El operon leucotoxina de *M. haemolytica* tiene dos promotores *upstream* del gen *lktC*, que se diferencian en 258 pb. Estos promotores producen dos distintos conjuntos de transcritos *lktC*, *lktA*, *lktB* y *lktD*. La mayoría de transcritos (90%) tienen 3.4–3.7 kb de longitud y codifican sólo para *lktCA*, mientras que el resto tienen 7.1–7.4 kb (10%), y codifican para *lktCABD*, generado por un mecanismo de antiterminación (Strathdee y Lo, 1989a; Koronakis *et al.*, 1989). Análisis de la secuencia del *cluster* de genes de la leucotoxina indica la presencia de dos señales de terminación independientes de Rho, siendo uno localizado en la región intercistrónica

entre la *lktA* y *lktB*, y el otro está en la región directamente seguida de *lktD* (Strathdee y Lo, 1989b).

La actividad promotora del operón leucotoxina llega al pico durante la fase logarítmica temprana del crecimiento bacteriano y declina durante la mitad del crecimiento logarítmico (Fedorova y Highlander, 1997). Esta observación sugiere que el crecimiento bacteriano y la expresión del operón *lktA* son co-regulados. Los factores ambientales involucrados en esta regulación incluyen cambios en la temperatura y la carencia de hierro, con secuencias claves requeridas (-10 y -35 pb desde el codón de inicio) para la actividad completa del promotor *lktA* (Marciel y Highlander, 2001).

2.3. Inmunidad y vacunas frente a la pasteurelisis neumónica

En recientes años, la administración inadecuada profiláctica y metafiláctica como control de la pasteurelisis neumónica ha conllevado al incremento de la resistencia antimicrobiana en aislados de *M. haemolytica* (72% de aislados) y *P. multocida* (50% de aislados) (Klima *et al.*, 2014), observándose aislados con patrones de coresistencia y pan-resistentes (Lubbers y Hanzlicek, 2013); por lo cual, el control se ha enfocado más al desarrollo de vacunas.

Inicialmente, el desarrollo de vacunas contra la pasteurelisis neumónica de bovinos y ovinos, se basaron en bacterias muertas, vivas o componentes celulares; no obstante, mientras algunas bacterias vivas o muertas han sido efectivas en pocos ensayos, otros fallaron para inducir inmunidad protectora (Sreevatsan *et al.*, 1996). Asimismo, con el conocimiento de la producción de la leucotoxina durante la fase de crecimiento logarítmico, se desarrollaron vacunas libres de células, basadas en sobrenadantes de cultivo de *Mannheimia haemolytica* A₁, logrando tener una eficacia de 60 a 70%, no obstante los ensayos en campo fueron variables (Rice *et al.*, 2008). Además, se han evaluado una gran variedad de vacunas de subunidades y candidatos vacunales recombinantes incluyendo leucotoxina y antígenos expresados bajo condiciones restrictivas de hierro. En un estudio donde desarrollaron vacunas de subunidades conteniendo leucotoxina (Lkt), Lipopolisacáridos (LPS), Polisacárido Capsular (CP) y Proteínas de Membrana Externa Reguladas por Hierro (IROMPs), derivadas de *M. haemolytica* A₁, evaluaron e identificaron factores de virulencia específicos que se correlacionan con una inmunidad protectora, encontrándose, en el suero de terneros, niveles de anticuerpos significativos contra Lkt, CP e IROMPs, lo cual indica que son candidatos vacunales potenciales para inducir una respuesta inmune

protectiva en la pasteurelisis neumónica experimental (Sreevatsan *et al.*, 1996). Por su parte, Potter *et al.* (1999) evaluó proteínas recombinantes de unión a transferrinas de tipo B (rTbpB), de *M. haemolytica* A₁, en terneros, indicando una correlación entre el nivel de protección y los niveles de anticuerpos anti-TbpB.

Por otro lado, recombinantes de lipoproteínas de tipo E (rPlpE), resultó ser altamente inmunogénico cuando fue inyectado subcutáneamente en bovinos, adquiriendo una marcada inmunidad que intensificó la resistencia al desafío experimental (Confer *et al.*, 2003). Un mapeo fino de epitopes en PlpE, mostraron 8 regiones, de los cuales la región (R2), resultó ser la inmunodominante, sugiriendo que un simple péptido puede ser usado como una eficaz vacuna contra los dos serotipos de *M. haemolytica* (A₁ y A₆), mayormente responsables de la pasteurelisis neumónica bovina (Ayalew *et al.*, 2004).

En recientes estudios, utilizando como modelo a ratones, se evaluaron proteínas quiméricas PlpE-LKT, conteniendo el principal epitope R2 de PlpE y el epitope neutralizante de Lkt (NLKT) de *M. haemolytica* A₁, estimulando anticuerpos anti-PlpE y anti-Lkt, lo cual demuestra que la respuesta inmune contra *M. haemolytica* puede ser inducida con proteínas quiméricas creadas de regiones inmunogénicas específicas de proteínas PlpE y Lkt (Ayalew *et al.*, 2008). Estudios posteriores en bovinos, evaluaron la capacidad inmunogénica de esta proteína quimérica modificada (SAC-89), en desafíos experimentales de *M. haemolytica* A₁; sin embargo, a pesar de que se obtuvo un 40% de reducción de la lesión neumónica en ganados vacunados con SAC-89, esto no fue significativo, lo que nos indica que antígenos superficiales adicionales son requeridos para estimular niveles aceptables de protección contra desafíos de *M. haemolytica* (Confer *et al.*, 2009).

En la actualidad, tres tipos de vacunas contra *Mannheimia haemolytica* están con licencia en Europa: 1) antígenos de células totales inactivadas, 2) el toxoide leucotoxina, y 3) antígenos de superficie celular de *M. haemolytica* propagado bajo condiciones restringidas de hierro (Lacasta *et al.*, 2015). La protección conferida por el primer tipo de vacuna está basada en antígenos de proteínas de membrana externa (OmpA) que son específicos para cada serotipo. Estas vacunas generalmente brindan adecuada protección contra serotipos homólogos pero fallan para proteger contra serotipos heterólogos (Purdy *et al.*, 1998). Por ende, las vacunas están incorporando varios serotipos con el fin de ampliar su cobertura contra más agentes infecciosos. Sin

embargo, el ompA del serotipo A2, predominante en ovinos, presenta baja inmunogenicidad debido a su estructura de ácido colomínico (Davies *et al.*, 1997).

La incorporación del toxoide leucotoxina como candidato a vacuna mejora su eficacia, alcanzando niveles de protección mayores al 80% (Sutherland *et al.*, 1989). Inclusive, la administración única de fragmentos recombinantes de leucotoxina, sin adición de bacterinas ni adjuvantes incrementa títulos de anticuerpos en ovinos y confiere protección completa contra infección experimental en ratones (Guzmán-Brambila *et al.*, 2012). En general, este tipo de vacunas promueve la producción de anticuerpos bactericidas y neutralizantes de leucotoxina resultando en buena protección de animales vacunados (Davies y Baillie, 2003).

Vacunas con proteínas reguladas por hierro (IROMPs) confieren alto grado de protección, similar que el toxoide leucotoxina (mayor al 80%). Además, estudios experimentales confirmaron protección cruzada de una vacuna multivalente conteniendo IROMPs de *M. haemolytica* A1, A2, A6, A7 y A9, administrada a corderos desafiados con *M. haemolytica* A12 (Donachie, 1995).

Finalmente, a pesar del gran repertorio de vacunas contra pasteurelisis neumónica, principalmente en bovinos y ovinos, el desarrollo de vacunas efectivas frente a *M. haemolytica*, tiene la dificultad de la multiplicidad de serotipos de esta especie y la existencia de variación antigénica intra e inter-serotipos (Davies *et al.*, 2001; Lee y Davies, 2011). Adicionalmente, en la actualidad, no se han desarrollado vacunas frente a las bacterias o virus implicados en la etiología de las neumonías específicas para los camélidos en general y para las crías de alpacas en el Perú, en particular.

2.4. Enfoque pan-genómico de la vacunología reversa

El desarrollo de tecnologías de secuenciación de siguiente generación ha permitido la rápida disponibilidad de secuencias de genomas de patógenos, completos y precisos. Además, el incremento de modernas herramientas bioinformáticas disponibles para el análisis de la “minería” de información biológica incluida en la secuencias del genoma, han disminuido rotundamente el tiempo para la investigación y el desarrollo de vacunas. De esta manera, una combinación de tecnología de ADN recombinante y secuenciación completa de genomas bacterianos ha dado lugar a nuevos enfoques para el diseño de vacunas (Scarselli *et al.*, 2005). Este enfoque

genómico para el desarrollo de vacunas ha sido denominado “vacunología reversa” (Mora *et al.*, 2003).

En ese sentido, la vacunología reversa, combinado con conocimientos de genómica comparativa y experimental, son considerados enfoques muy atractivos, proporcionando posibles antígenos conservados en el menor tiempo posible en comparación con el enfoque de la vacunología tradicional donde el *screening* es limitado a un número pequeño de antígenos basados en características conocidas de un patógeno. Además, el desarrollo de enfoques postgenómicos ha acelerado el descubrimiento de factores relacionados a la patogénesis, que son elementos claves en el diseño de nuevas vacunas (Bambini y Rappuoli, 2009; Madampage *et al.*, 2015) (Figura 7). Ejemplos de patógenos bacterianos que han sido estudiados utilizando la vacunología reversa, incluyen *Neisseria meningitidis* serogrupo B (Pizza *et al.*, 2000), *Bacillus anthracis* (Ariel *et al.*, 2002), *Streptococcus pneumoniae* (Wizemann *et al.*, 2001), *Staphylococcus aureus* (Etz *et al.*, 2002; Vytvytska *et al.*, 2002), *Chlamydia pneumoniae* (Montigiani *et al.*, 2002), *Porphyromonas gingivalis* (Käsbohrer *et al.*, 1990), *Edwardsiella tarda* (Srinivasa *et al.*, 2003), *Mycobacterium tuberculosis* (Betts, 2002), y *Leptospira interrogans* (Gamberini *et al.*, 2005).

Actualmente, un enfoque pangénomico de la vacunología reversa está siendo aplicado en diferentes estudios con el fin de identificar variaciones genéticas entre cepas de una misma especie (por ejemplo cepas virulentas y avirulentas) y, por consiguiente, determinar candidatos vacunales conservados que brinden una protección cruzada (Serruto y Rappuoli, 2006; Mosquera-Rendón *et al.*, 2016). El *Streptococcus agalactiae*, un grupo B de *Streptococcus* (GBS) responsable de la mastitis en bovinos, fue un ejemplo exitoso del enfoque pangénomico en el diseño de vacunas (Tettelin *et al.*, 2002), donde 396 proteínas putativas expuestas a superficie fueron codificadas por genes *core* y 193, fueron de genes variables. De éstos, sólo cuatro antígenos indujeron una respuesta inmune fuerte, de los cuales sólo uno fue parte del genoma *core*, mientras que los otros genes que codifican para los tres antígenos, estaban presentes en el 75% de cepas. En general los cuatro antígenos presentaron una protección universal, representando al serotipo patogénico GBS (Maione *et al.*, 2005).

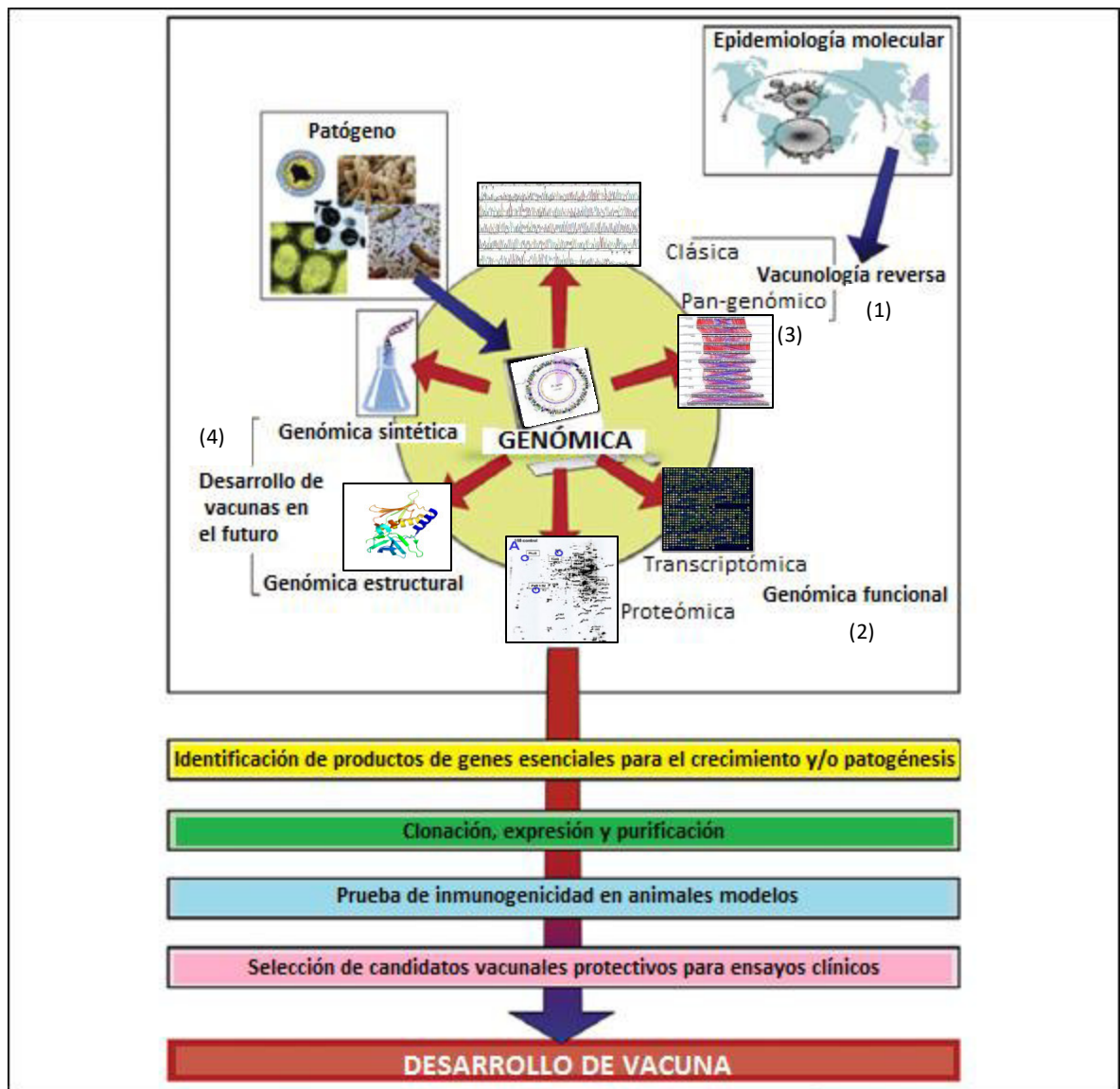


Figura 7. Interacción entre los diferentes enfoques de la vacunología reversa para el diseño de vacunas. Un conjunto de antígenos potenciales puede ser identificado por (1) análisis *in silico* de las secuencias del genoma, usando algoritmos que pueden predecir genes que codifican para proteínas asociadas a superficie, de secreción y antígenos de virulencia; (2) el enfoque genómico funcional, incluyendo el uso de técnicas proteómicas para identificar proteínas asociadas a membrana y técnicas de *microarray* de ADN para analizar expresión de genes, que ayudan a la comprensión de la interacción patógeno-hospedero; (3) el enfoque pan-genómico, comparando múltiples genomas de la misma especie bacteriana para identificar la presencia de genes y variabilidad entre aislados de la especie; (4) y recientemente por genómica estructural y sintética, podrían proporcionar las bases para la ingeniería racional de antígenos potenciales. Todas estas áreas, soportada por estudios epidemiológicos moleculares para la selección de cepas representativas de un patógeno dado, tienen el potencial de favorecer el desarrollo de las llamadas vacunas de tercera generación, a través de la selección o el diseño de potenciales candidatos vacunales y llevarlos adelante en los ensayos clínicos (Modificado de Movahedi y Hampson, 2008; Bambini y Rappuoli, 2009).

2.5. Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*

La disponibilidad de nuevos sistemas comerciales para la expresión de proteínas recombinantes junto con técnicas de purificación de proteínas ha revolucionado todos los aspectos de las ciencias biológicas y biomédicas, permitiendo estudiar cientos de nuevas proteínas, a nivel bioquímico y estructural, de una gran variedad de organismos. A pesar del desarrollo de múltiples sistemas de expresión recombinante no bacteriano (levadura, baculovirus, células mamíferos y sistemas libres de células), *Escherichia coli* es aún el hospedero preferido para la expresión de proteínas recombinantes de origen procariótico y eucariótico (Yin *et al.*, 2007), por presentar múltiples ventajas como, a) la fácil manipulación y crecimiento de este organismo utilizando equipo de laboratorio relativamente simple, b) la disponibilidad de vectores y cepas desarrollados especialmente para maximizar la expresión, y c) el amplio conocimiento generado acerca de la genética y fisiología de *E. coli*. No obstante, una limitación de este sistema es la incapacidad de *E. coli* para llevar a cabo modificaciones post-traduccionales complejas como glicosilación, fosforilación o procesamiento proteolítico específico, típicas de los eucariotes y requeridas para lograr la conformación correcta y funcionamiento de ciertas proteínas (Zhang *et al.*, 2004). Además, muchas proteínas no pueden ser expresadas en forma soluble cuando son sobreexpresadas en *E. coli* como sucede con algunas proteínas de membrana de grandes multidomios donde fallan para expresarse o se expresan en forma insoluble como cuerpos de inclusión (Vincentelli *et al.*, 2003).

Otras dificultades encontradas durante la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* incluyen bajo niveles de expresión, degradación de la proteína, toxicidad y producción de proteínas no funcionales. Éste último se debe a la falta de modificaciones post-traduccionales de tipo eucariótico.

2.5.1. Estrategias para lograr la expresión de proteínas solubles

El problema de solubilidad de la proteína expresada puede ser enfocado a tres niveles: 1) molecular, 2) celular, o 3) cultivo celular. A nivel molecular, el gen de interés puede ser clonado downstream a un marcador de fusión así como Tiorredoxina (Trx), proteína de unión a maltosa (MBP), o Glutación S-transferasa (GST) incrementando el nivel de expresión y la solubilidad de la proteína (Malhotra, 2011); (Esposito y Chatterjee, 2006). Además, la introducción de marcadores, así como GST y MBP permite la purificación de la proteína recombinante. Otra estrategia, es generar múltiples

constructos por cada proteína, cada uno expresando un diferente dominio o fragmento truncado, incrementando por ende la posibilidad de obtener una forma soluble de la proteína (Yumerefendi *et al.*, 2010).

Por otro lado, el incremento de la solubilidad a nivel celular puede ser logrado por la co-expresión del gen de interés con chaperonas moleculares (Thomas y Baneyx, 1996); (Gragerov *et al.*, 1992) o con proteínas de fusión específicas (Romier *et al.*, 2006). Una diferente estrategia para superar el problema de la solubilidad es alterar las condiciones de crecimiento o suplementar el cultivo bacteriano con varios aditivos como betaína o sorbitol (Blackwell y Horgan, 1991). En ensayos realizados por (Knapp *et al.*, 2008) donde trabajaron con cientos de proteínas recombinantes expresadas en *E. coli*, la disminución de la temperatura del cultivo entre 15-20°C durante la fase de inducción resultó en el mejoramiento de la solubilidad de muchas proteínas tanto de origen procariótico como eucariótico.

La metodología de clonación tiene un gran impacto en las características del producto proteico final, así como en el tiempo y el costo de todo el proceso involucrado. El enfoque tradicional de clonación dependiente de ligación (LDC) ha sido utilizado ampliamente en las últimas décadas. Sin embargo, en recientes años, con el establecimiento del consorcio proteómico estructural, nuevas técnicas de clonación han sido desarrollados y gradualmente adaptados, reemplazando al enfoque LDC (Knapp *et al.* 2008). Estas nuevas estrategias son principalmente técnicas de clonación independiente de ligación (LIC) que consiste básicamente en la recombinación entre el inserto y el vector utilizado (por ejemplo, *In-Fusion™* de Clontech y *Gateway* de Invitrogen®). Un diferente enfoque consiste en el uso de *overhangs* de cadena simple para combinar el vector y el inserto (Gileadi *et al.*, 2008). Un nuevo enfoque, derivada de la técnica LIC, es la clonación libre de restricción (RF). Este es un método simple y universal basado en la amplificación lineal del plásmido utilizando como *primers* a productos de PCR del gen de interés, la DNA polimerasa *PfuTurbo* y la enzima de digestión DpnI. La principal ventaja de la clonación RF es que la integración del DNA puede ser dirigida a cualquier posición dentro del plásmido y secuencias extras no son incluidas en el marco abierto de lectura (van den Ent y Löwe 2006); (Unger *et al.*, 2010).

2.5.2. Sistema de expresión *Champion pET TOPO Directional*

El sistema de expresión *Champion pET* está basado en vectores de expresión originalmente desarrollado por Studier y colaboradores (Studier y Moffatt, 1986). Es una

tecnología LIC desarrollada por Invitrogen para la expresión en *E. coli*, purificación y detección de proteínas recombinantes. El sistema consiste en una serie de vectores pET TOPO que utiliza una estrategia eficiente (*TOPO Cloning*) para la clonación direccional de productos de PCR con extremos romos dentro del vector. Esta estrategia ha sido diseñada en base a la capacidad autocatalítica de la Topoisomerasa I (TOPO) proveniente del virus *Vaccinia* (Shuman, 1994; Cheng y Shuman, 2000). La secuencia *overhang* (GTGG) adicionada al DNA con la enzima TOPO invade y se alinea al extremo 5' (CACC) de los productos de PCR permitiendo la clonación en la dirección correcta. En general, estos vectores incluyen un promotor *T7lac* para la expresión, inducible por IPTG, del gen de interés en *E. coli* (Dubendorff y Studier 1991); (Studier *et al.*, 1990); un sitio de clonación TOPO direccional para una eficiente clonación de productos de PCR con extremos romos; marcadores de fusión N-terminal o C-terminal para la purificación y detección de proteínas de fusión recombinantes; un sitio de reconocimiento de proteasa N-terminal para el clivaje del marcador de fusión de la proteína recombinante; el gen *lacI* que codifica un represor Lac para reducir la transcripción basal del promotor *T7lac* en el vector pET TOPO, y del promotor *lacUV5* en el hospedero *E. coli*; un marcador de resistencia a antibiótico para la selección y; un origen pBR322 para la replicación en bajo número de copias y mantenimiento en *E. coli* (Figura 8).

Además, el sistema de expresión incluye una cepa hospedera de *E. coli* denominada BL21 Star™(DE3) para un nivel de expresión alta y regulada de genes heterólogos bajo el promotor del bacteriófago T7 (Rosenberg *et al.*, 1987); (Studier *et al.*, 1990). Esta cepa transporta el lisógeno DE3 del bacteriófago Lambda en la cual ha sido insertado un constructo *lac*. Este constructo presenta el gen *lacI* que codifica el represor Lac; y el gen de la RNA polimerasa T7 bajo el control del promotor *lacUV5*. La proteína Lac reprime la expresión de la RNA polimerasa T7 pero en presencia de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) es inducida la expresión de la enzima a nivel del promotor *lacUV5*. En el presente trabajo se utilizó el vector de expresión pET102/D-TOPO que adicional a los elementos antes descritos, incluye un marcador de fusión N-terminal que codifica para una proteína tiorredoxina mutada que permite una adecuada purificación y, en algunos casos, mejora la solubilidad de la proteína recombinante expresada (LaVallie *et al.*, 1993).

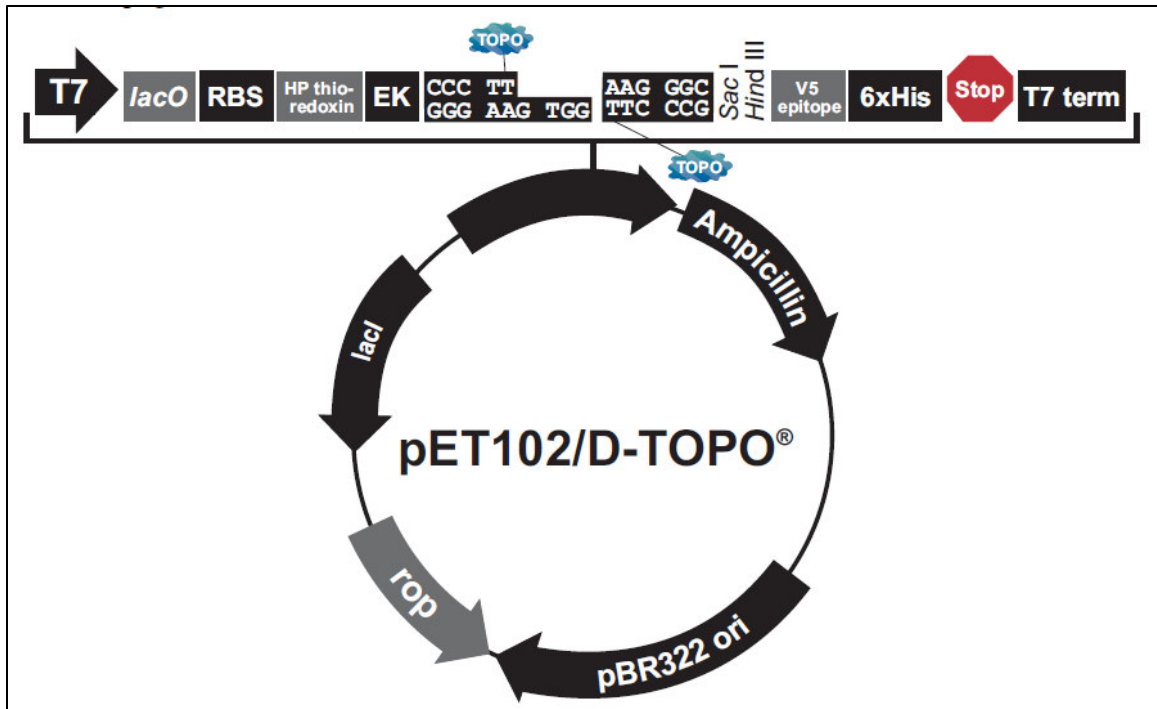


Figura 8. Mapa del vector de expresión pET102/D-TOPO (6315 bp). El tag V5 epitope y 6xHis en el vector son expresados junto a la proteína recombinante de interés, en su región N terminal, para su identificación utilizando anticuerpos específicos y purificación mediante cromatografía de afinidad, respectivamente.

En el presente trabajo se tiene como objetivo clonar y expresar un potencial candidato vacunal contra la pasteurelisis neumónica en alpacas, seleccionada del *pool* de candidatos identificados en el pangenoma que incluye a todas las cepas virulentas disponibles de *M. haemolytica*, usando como estrategia el enfoque pan-genómico de la vacunología reversa. Debido a que no se cuenta con la secuencia del genoma de *M. haemolytica* y se desconoce que serotipo prevalece en alpacas, se hipotetiza que el serotipo A2 posiblemente se haya transferido horizontalmente y adaptado a las alpacas como consecuencia de la crianza mixta con los ovinos. Por lo tanto, la obtención de un candidato vacunal recombinante mediante la expresión heteróloga en *E. coli* nos permitirá a futuro realizar diversos ensayos funcionales y determinar así su relevancia como candidato vacunal contra la pasteurelisis neumónica en alpacas.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

- ✓ Dado que *Mannheimia haemolytica* puede ser aislada de muestras de pulmones de bovinos, ovinos y alpacas que manifiestan cuadro de neumonía, es probable obtener una proteína recombinante representativa de su pangenoma, que actúe como potencial candidato vacunal contra neumonía en alpacas.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo General

- ✓ Obtener en *E. coli* un candidato vacunal recombinante representativo del pangenoma de *Mannheimia haemolytica*.

3.2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Analizar el pangenoma de *Mannheimia haemolytica* y seleccionar candidatos vacunales representativos.
- ✓ Clonar el gen codificante de un potencial candidato vacunal seleccionado.
- ✓ Expresar en forma heteróloga en *Escherichia coli* el candidato vacunal.
- ✓ Analizar el candidato vacunal recombinante expresado.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Secuencias genómicas

Las secuencias del genoma de 19 cepas de *Mannheimia haemolytica* fueron descargados a través del sistema Entrez de la base de datos del proyecto genoma del NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*); (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>): 9 secuencias genómicas completas de cepas aisladas de bovinos y 10 secuencias genómicas borrador (*draft*) de cepas aisladas de bovinos, ovinos y cerdo (Tabla 1). Todas las secuencias corresponden a cepas que fueron aisladas de animales con cuadro de neumonía.

Tabla 1. Información general sobre los genomas de las 19 cepas de *Mannheimia haemolytica* usado en este trabajo.

Cepas	Serotipo	Hospedero	Genoma	N° Accesoión GenBank
PHL213	A1	Bovino	<i>Draft</i>	AASA00000000
D193	A1	Bovino	<i>Draft</i>	ATSY00000000
USDA-ARS-USMARC-183	A1	Bovino	Completo	CP004752.1
MhBrain2012	A1	Bovino	<i>Draft</i>	ATSZ00000000
MhSwine2000	A1	Cerdo	<i>Draft</i>	ATTA00000000
D35	A2	Bovino	<i>Draft</i>	AUNK00000000
D38	A6	Bovino	<i>Draft</i>	AUNL00000000
OVINE	A2	Ovino	<i>Draft</i>	ACZX00000000
BOVINE	A2	Bovino	<i>Draft</i>	ACZY00000000
184	NS	Bovino	Completo	CP006957.1
H23	A6	Bovino	<i>Draft</i>	AOGP00000000
D174	A6	Bovino	Completo	CP006574.1
M42548-ICEmh1	NS	Bovino	Completo	CP005383.1
USMARC_2286	NS	Bovino	Completo	CP006619.1
D153	A1	Bovino	Completo	CP005972.1
D171	A2	Bovino	Completo	CP006573.1
USDA-ARS-USMARC-185	A6	Bovino	Completo	CP004753.1
MH10517	NS	Ovino	<i>Draft</i>	JPIZ01000000
89010807N	A1	Bovino	Completo	CP011098

4.2. Análisis del pangenoma de *M. haemolytica* y selección de candidatos vacunales representativos

En esta parte de la investigación se utilizó el enfoque Pan-Genómico de la vacunología reversa con el fin de identificar y seleccionar antígenos inmunoprotectivos como candidatos vacunales representativos en el pangenoma de *M. haemolytica* y con potencial para protección cruzada contra cepas virulentas que causan la pasteurelosis neumónica. Los análisis fueron llevados a cabo en un *WorkStation* Intel Core i7 sexta generación, 16GB RAM, 2 TB disco, bajo la plataforma Linux, distribución Ubuntu 14.04.

4.2.1. Cálculo del Pan-Genoma, genoma core y accesorio

Secuencias genómicas de 19 cepas de *M. haemolytica* disponibles en la base de datos del GenBank fueron analizadas comparativamente usando una estrategia pan-genómica. Todos los genomas, completos y *draft*, fueron re-annotados con el programa Prokka v1.11 (<http://www.vicbioinformatics.com/software/prokka.shtml>) (Seemann *et al.*, 2014) con el fin de homogenizar la anotación y crear archivos en formato GFF3. Estos archivos se utilizaron como *input* para la construcción del pangenoma y el cálculo del genoma core y accesorio usando el *pipeline* Roary v.3.6.0 (<https://sanger-pathogens.github.io/Roary/>). En general, Roary (*Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis*), es una herramienta que integra un conjunto de programas para generar el pangenoma de aislados bacterianos relacionados, identificando genes core y accesorios (Page *et al.*, 2015). El análisis se basa en filtrar y pre-agrupar las proteínas con CDHIT (Fu *et al.*, 2012), realizar una comparación de todo contra todo (*all-against-all*) con el programa BlastP, agrupar con MCL (Enright *et al.*, 2002) y finalmente converger los resultados de CDHIT y MCL.

Un mapa circular del pangenoma analizado fue creado con la herramienta de comparación CGView (Grant *et al.*, 2012), utilizando como cepa referencia y semilla a *M. haemolytica* A6 USDA-ARS-USMARC-185. En el análisis comparativo fue tomado en cuenta parámetros robustos como una identidad *cutoff* de 95%, cobertura 100% y un *e-value* de 1e-10.

4.2.2. Caracterización funcional y selección de candidatos vacunales

Ortología KEEG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) para la caracterización funcional de los genes core y accesorios se realizaron con el servidor de anotación automático BlastKOALA (Kanehisa *et al.*, 2016). Análisis de genes de virulencia candidatos fueron realizados en el genoma core y accesorio mediante el algoritmo desarrollado por Juscamayta (2013). En breve, para cada genoma, proteínas extracelulares y de membrana externa fueron seleccionadas. De éstas, sólo fueron considerados proteínas con hélices transmembrana ≤ 1 . Todos los antígenos mayores que 1000 aminoácidos fueron descartados. Análisis de similitud con proteínas de ratón y cerdo fueron realizados con el servidor Vaxign (He *et al.*, 2010).

4.2.3. Análisis filogenómico de especies de *M. haemolytica*

El *cluster* de genes core creados fueron alineados usando el programa PRANK (Löytynoja, 2014). Polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) fueron extraídos del alineamiento de los genes core con el programa SNP-sites (Page *et al.*, 2016). El árbol filogenómico, basado en secuencias concatenadas de SNPs en el genoma core, fue construido con el programa FastTree v2.1 utilizando el método *Maximum Likelihood* y bajo el modelo evolutivo general de tiempo reversible (GTR); (Price *et al.*, 2010).

Finalmente, un *script* en Python (*roary_plots.py*) fue utilizado para visualizar el árbol filogenómico creado contra una matriz con la presencia y ausencia de genes core y accesorio en todas las cepas.

4.3. Clonación y expresión de la leucotoxina como candidato vacunal

4.3.1. Diseño de *primers*

Los oligonucleótidos para amplificación y clonación fueron diseñados utilizando los programas Geneious v. 4.8.5, Genamics Expression y FastPCR v. 6.5.56, tomando como molde el Marco Abierto de Lectura (ORFs) de una variante de la leucotoxina identificada en el pangenoma de *M. haemolytica*, como potencial candidato vacunal. Además, adaptadores CACC fueron colocados en el extremo 5' del *primer forward*.

4.3.2. Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento

Mannheimia haemolytica ATCC 33396 fue reactivado en placas conteniendo medio agar tripticasa soya (Merk) suplementada con 5% de Agar Sangre e incubadas a 37°C por 24 horas bajo condiciones aeróbicas (Rosadio *et al.*, 2011). Plásmido PET102/D-TOPO (Invitrogen) fue usado para la clonación del gen leucotoxina seleccionado obteniendo un plásmido pET102-*lktA*. Cepas transformantes *E. coli* One Shot/TOP10 y BL21 Star™ (DE3) One Shot® (Invitrogen) fueron cultivadas en medio Luria Bertani (LB) suplementado con carbenicilina (200 µg/ml), para un crecimiento selectivo.

4.3.3. Extracción de ADN genómico

Una colonia aislada de *M. haemolytica* fue cultivado en 1 ml de medio LB e incubada a 37°C por 18-24 horas bajo condiciones aeróbicas. La extracción de ADN genómico fue llevado a cabo con el *Kit de Purificación Wizard Genomic DNA* (Promega), según el protocolo establecido con mínimas modificaciones. Previamente, las células fueron concentradas por centrifugación a 14000 RPM por 2 minutos. El ADN genómico fue almacenado a -20°C. Posteriormente, se evaluó la cantidad (concentración) y la calidad (pureza) del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa (0.8%) y utilizando el marcador fago λ Hind III (Promega).

4.3.4. Amplificación del gen *lktA* y control mediante PCR

El gen *lktA* (2856 pb) de *M. haemolytica* fue amplificado por PCR utilizando la *Pfu DNA polymerase* (Thermo Scientific) y los *primers* diseñados: *lktA*-F (5'-CAC CGG TAA TAA ATT TAC TAA TAT TTC-3') y *lktA*-R (5'-AGC TGC TCT AGC AAA TTG AAG AG-3'). Un gen control (750 pb) también fue amplificado utilizando el ADN *template* y los *primers* provisto por el *Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit* (Invitrogen).

Las concentraciones estandarizadas fueron las siguientes: dNTP's 0.2 mM, MgCl₂ 2.5 mM, *primers* 0.5 µM, 1 U de enzima *Pfu DNA polymerase*. *Pfu Buffer* 1X para el gen *lktA*; y dNTP's 0.2 mM, MgCl₂ 2.5 mM, *primers* 0.1 µg/µl, 1 U de enzima *Pfu DNA polymerase*. *Pfu Buffer* 1X, para el gen control. En ambos casos se utilizó 1µl de ADN, en un volumen final de 25 µl. Las condiciones óptimas de amplificación fueron de un ciclo de denaturación inicial a 95°C por tres minutos; 35 ciclos, de denaturación a 95°C por 30 segundos, hibridación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 5 minutos;

y un ciclo de una extensión final a 72°C por 15 minutos, para el gen *lktA*; y un ciclo de denaturación inicial a 94°C por dos minutos; 25 ciclos, de denaturación a 94°C por un minuto, hibridación a 55°C por un minuto y extensión a 72°C por un minuto; y un ciclo de una extensión final a 72°C por 7 minutos, para el gen control. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa (1% y 1.5% en 0.5X TBE) a 90 V por 1.2 h, teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y visualizados en un transiluminador UV a 320nm. El tamaño de los insertos fueron verificados con los marcadores 1kb *DNA Ladder* y 100pb *DNA Ladder* (BioLabs) y su concentración fue determinada por comparación con fragmentos de tamaño similar de una concentración determinada de *MassRuler™ DNA Ladder* (Thermo Scientific). La imagen de la electroforesis en gel de agarosa fue analizada con el programa ImageJ.

4.3.5. Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR del gen *lktA* fueron purificados utilizando el *PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Productos de PCR del gen control fueron purificados a partir del gel de agarosa (1.5%), utilizando el mismo kit. En general, el área conteniendo el fragmento de ADN fue cortado con un bisturí estéril y 100mg de este fragmento fue solubilizado con 300 µl de buffer L3 (Invitrogen) e incubado a 50°C por 18 minutos, mezclándolo en vortex cada 3 minutos. Luego, se mezcló con 100 µl de isopropanol y fue colocado en una columna dentro de un tubo colector y centrifugado a 13000 RPM por 1 minuto. Posteriormente, 500 µl de buffer de lavado W1 (Invitrogen) fue adicionado a la columna y centrifugado a 13000 RPM por 1 minuto seguido por dos centrifugaciones de 3 minutos. Finalmente, 50 µl de buffer de elución E1 (Invitrogen) fue adicionado al centro de la columna, incubado por 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugado a 13000 RPM por 1 minuto.

Los amplicones purificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa (1% y 1.5% en 0.5X TBE) a 90 V por 1.2 h, teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y visualizados en un transiluminador UV a 320nm. El tamaño de los insertos fueron verificados con los marcadores 1kb *DNA Ladder* y 100pb *DNA Ladder* (BioLabs) y su concentración fue determinada por comparación con fragmentos de tamaño similar de una concentración determinada de *MassRuler DNA Ladder, Mix* (Fermentas) y *MassRuler™ High Range DNA Ladder* (Thermo Scientific). La imagen de la electroforesis en gel de agarosa fue analizada con el programa ImageJ. El ADN purificado fue almacenado a -20°C.

4.3.6. Clonación del gen *lktA* y transformación

La clonación del gen *lktA* y control fueron llevados a cabo usando el *Champion™ pET 102 Directional TOPO® Expression Kit* (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones y a Sambrook *et al.* (1989). Previamente, sólo los productos de PCR purificados del gen control fueron diluidos en buffer Tris-EDTA (TE), pH 8 hasta una concentración final de 5ng/µl. Los fragmentos amplificados con extremos romos fueron ligados dentro del vector pET102/D-TOPO (6315 pb) con una tasa molar de 2:1 (inserto: vector). La reacción de clonación TOPO fue de acuerdo como indica la Tabla 2, con una incubación de 20 minutos (*lktA*) y 5 minutos (control positivo y negativo, respectivamente) a temperatura ambiente (22-23°C). La cantidad de inserto a clonar fue determinado en base al tamaño y cantidad del vector, relación molar, así como al tamaño del inserto, siguiendo la siguiente fórmula:

$$x \text{ ng de inserto} = \frac{2 \times \text{tamaño inserto (pb)} \times \text{cantidad de vector (ng)}}{\text{tamaño vector (pb)}}$$

Plásmidos recombinantes (pET102-*lktA* y pET102-control positivo) y el vector vacío pET102 (control negativo) fueron transformados en células químicamente competentes (*E. coli* One Shot/TOP10) e incubadas en hielo por 30 minutos. Seguidamente, fue realizado un *shock* térmico a 42°C por 30 segundos e inmediatamente transferidos a hielo. Luego, 250 µl de medio S.O.C. fueron adicionados a los transformantes e incubados con movimiento (225 RPM) a 37°C durante una hora. Posteriormente, 100 µl y 200 µl de cada transformación fueron sembrados en placas de agar LB suplementado con carbenicilina a una concentración de 200 µg/ml e incubadas a 37°C durante 18 horas.

Tabla 2. Reacción de clonación TOPO para el gen *lktA*, gen control (control positivo) y vector vacío (sin inserto) utilizado como un control negativo. Los plásmidos fueron transformados en cepas *E. coli* químicamente competentes.

Reagentes	<i>E. coli</i> químicamente competentes		
	Gen <i>lktA</i> (18ng) 2856 pb	Gen control (5ng) 750 pb	Vector vacío 6315 pb
Productos PCR	2 µl	1 µl	-
Solución salina	1 µl	1 µl	1 µl
Agua estéril	2 µl	3 µl	4 µl
Vector TOPO	1 µl	1 µl	1 µl
Volumen total	6 µl	6 µl	6 µl

4.3.7. Análisis de clones recombinantes

4.3.7.1. Minipreparaciones de plásmidos y conservación

Colonias resultantes de la transformación fueron analizadas para la presencia del correcto constructo recombinante mediante minipreparaciones de plásmidos. En general, una simple colonia fue sembrada en 5ml de medio líquido LB suplementado con carbenicilina (200 µg/ml) e incubadas con movimiento (200 RPM) a 37° por 18 horas. Posteriormente, los plásmidos fueron aislados utilizando el PureLink™ HQ Mini Plasmid Purification Kit (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. En resumen, 5 ml de cada cultivo *overnight* crecido en caldo LB más carbenicilina fueron divididos en dos tubos estériles con 1.5 ml de cultivo y centrifugados a 1, 500 xg por 15 minutos. Los *pellets* resultantes fueron resuspendidos en 240 µl de solución de resuspensión (Invitrogen) con ARNasa A (0.1mg/ml) y mezclados por pipeteo y en vortex. Luego, 240 µl de buffer lisis (Invitrogen) fueron adicionados, mezclados por inversión 8 veces e incubados a temperatura ambiente por 3 minutos. Posteriormente, se adicionaron 340 µl de buffer de neutralización/unión (Invitrogen), se mezclaron por inversión 8 veces y se centrifugaron a 17, 900 xg por 10 minutos. Cada lisado por muestra fue colocado en una columna dentro de un tubo colector dos veces y centrifugados a 14, 000 xg por 1 minuto. Luego, 650 µl de buffer de lavado (Invitrogen) fueron adicionados a las columnas y centrifugados a 14, 000 xg por 1 minuto seguido por un centrifugado adicional de 17, 900 xg por 3 minutos. Finalmente, 50 µl de buffer de elución (Invitrogen) fueron adicionados al centro de las

columnas, incubados por 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugados a 17, 900 xg por 1 minuto. Los plásmidos aislados fueron almacenados a -20°C.

Paralelamente, preparaciones de glicerol *stock* fueron realizados para conservar los clones transformantes analizados. De los 5 ml de cultivo resultante para las minipreparaciones, 0.85 ml fueron utilizados y mezclados con 0.15 ml de glicerol 100%, grado molecular (Thermo Scientific) en un criovial, para ser almacenados a -80°C.

4.3.7.2. Identificación del gen control clonado con enzima de restricción

Plásmidos con el gen control fueron analizados por digestión con la enzima de restricción PstI (Thermo Scientific), para confirmar la presencia y correcta orientación del inserto. En un tubo de 1.5 ml fueron mezclados 15 µl de agua ultrapura (Invitrogen), 2 µl de Buffer O 10X, 2 µl de plásmido y 1 µl de enzima PstI, para ser incubados a 37°C por 1.5 horas. Luego, a cada reacción se le adicionó EDTA 0.5 M, pH 8 (20 mM final) con el fin de parar la reacción de digestión.

4.3.7.3. Identificación del gen *lktA* clonado por PCR colonia

La presencia del inserto (gen *lktA*) en los transformantes *E. coli* One Shot/TOP10 fueron verificados por PCR colonia y confirmado por PCR directo a partir de los plásmidos aislados en las minipreparaciones. Para tal fin, se utilizó el *primer* de secuenciación *forward* del vector pET102-TOPO (TrxFus *Forward*: 5'-TTC CTC GAC GCT AAC CTG-3') y el *primer reverse* del gen *lktA* (5'-AGC TGC TCT AGC AAA TTG AAG AG-3'). Previamente, para la PCR colonia, las colonias transformantes conservadas en glicerol *stock* a -80°C, fueron reactivadas en placas de agar LB con carbenicilina (200 µg/ml) e incubadas a 37°C durante 18 horas, para luego ser resuspendidas en 3 µl de NaOH (10 mM) y calentadas a 99°C por 10 minutos, según la metodología de Makovets (2013). Las concentraciones estandarizadas fueron las siguientes: dNTP's 0.2 mM, *Pfu* Buffer 1X con MgSO₄ 2 mM (2.5mM para el PCR directo), *primer forward* 0.05 µg, *primer reverse* 0.2 µM (0.5 µM para el PCR directo), 1.25 U de enzima *Pfu DNA polymerase* (1U para el PCR directo), 1 ng de plásmido (para el PCR directo), en un volumen final de 22 µl (20 µl para el PCR directo). Las condiciones óptimas de amplificación fueron de un ciclo de denaturación inicial a 95°C por tres minutos; 35 ciclos (30 para el PCR directo), de denaturación a 95°C por 30 segundos,

hibridación a 52°C por 30 segundos (54°C para el PCR directo) y extensión a 72°C por 5 minutos; y un ciclo de una extensión final a 72°C por 15 minutos.

Plásmidos, productos de PCR y fragmentos digeridos con enzima de restricción fueron separados por electroforesis en gel de agarosa (1% en 0.5X TBE) a 90 V por 1.2 h, teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y visualizados en un transiluminador UV a 320nm. Los pesos moleculares utilizados fueron 1kb *plus DNA Ladder* (BioLabs) y *MassRuler High Range DNA Ladder* (Thermo Scientific). La imagen de la electroforesis en gel de agarosa fue analizada con el programa ImageJ.

4.3.8. Expresión de la proteína LktA recombinante como candidato vacunal

El plásmido pET102-*lktA* fue transformado en *E. coli* BL21 Star™ (DE3) One Shot® de acuerdo a la metodología descrita en 4.3.5. Luego, del tiempo de incubación con movimiento (225 RMP) a 37°C por 45 minutos, los transformantes fueron sembrados directamente en 10 ml de caldo LB conteniendo carbenicilina (200 µg/ml) y 1% de glucosa, para ser incubados con movimiento (225 RPM) a 37°C por 16 horas. Posteriormente, 500 µl de este cultivo fueron sembrados en 10 ml de caldo LB con carbenicilina (200 µg/ml) y 1% de glucosa e incubados con movimiento (225 RPM) a 37°C por 2.5 horas (DO_{600nm} de 0.6-0.8). Luego, el cultivo fue dividido en dos cultivos de 5 ml (inducido y no inducido), donde sólo a uno fue adicionado IPTG (1mM) para la inducción de la expresión e incubados con movimiento (225 RPM) a 37°C por 6 horas. Durante la incubación, 500 µl del cultivo inducido y no inducido fueron removidos, cada 1 hora, y centrifugados a 14, 000 RPM por 35 segundos, con el fin de determinar el tiempo óptimo de expresión. Los *pellets* fueron almacenados a -20°C. *E. coli* BL21 Star™ (DE3) fueron también transformados con 10 ng de plásmido pET102/D/lacZ y sin plásmido, para ser utilizados como control positivo y negativo en la expresión, respectivamente.

4.4. Análisis de la proteína recombinante LktA expresada por SDS-PAGE

4.4.1. Preparación de las muestras y condiciones de SDS-PAGE

Proteínas solubles e insolubles de clones recombinantes de *E. coli* fueron analizados por SDS-PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida-sodio dodecil sulfato), según el método de Laemmli (1970) en un sistema vertical discontinuo,

denaturante y reductor (*Miniprotean Cell*, BIORAD). Previamente, los *pellets* obtenidos en la expresión fueron descongelados y resuspendidos en 500 µl de buffer lisis (pH 7.8) con lisozima (1mg/ml); (Anexos). Luego, las muestras fueron congeladas a -80°C por 20 minutos, rápidamente descongeladas a 42°C y mezcladas en vortex (4 ciclos de congelamiento-descongelamiento-vortex). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 14, 000 RPM por 20 minutos. Los *pellets* obtenidos fueron resuspendidos en 500 µl de buffer de muestra SDS-PAGE 1X (Anexos), mientras que los sobrenadantes fueron solubilizados en volúmenes equivalentes de buffer de muestra SDS-PAGE 2X (Anexos). Ambas muestras fueron calentadas a 95°C por 5 minutos y 10 µl de cada uno fue cargado en el gel de poliacrilamida. El gel de empaquetamiento y separación fueron preparados a una concentración de 4% y 10% (w/v) de acrilamida, respectivamente (40% acrilamida/bisacrilamida, 37.5:1) (Tabla 3).

Tabla 3. Soluciones para preparación del gel de empaquetamiento y separación al 4% y 10% de acrilamida, respectivamente, para un volumen de 10 ml.

Componentes	Gel de empaquetamiento	Gel de separación
	4 % (para 10 ml)	10 % (para 10 ml)
40% Acrilamida/Bis	1 ml	2.5 ml
Buffer*	2.52 ml	2.5 ml
10% SDS (w/v)	100 µl	100 µl
H₂O_d	6.36 ml	4.85 ml
TEMED	10 µl	5 µl
10% APS (w/v)	50 µl	50 µl

*Buffer de gel de empaquetamiento: 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8; Buffer de gel de separación: 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8; SDS: dodecilsulfato sódico; H₂O_d: agua destilada estéril; TEMED: tetrametiletilendiamina; APS: persulfato de amonio.

La corrida electroforética fue mantenida en un sistema con buffer de corrida Tris-Glicina-SDS 1X (pH 8.3); (Anexos), consistiendo en una pre-corrida de 90 V por 10 minutos; y una corrida final de 180 V por 60 minutos. El peso molecular de las bandas fue calculado por comparación con el perfil de bandas del marcador de peso molecular de *Spectra Multicolor High Range Protein Ladder* (Fermentas).

4.4.2. Tinción de proteínas con nitrato de plata

El gel de poliacrilamida fue coloreado con Nitrato de Plata, según la metodología de Chevallet *et al.* (2006) y algunas modificaciones. Todas las incubaciones fueron con movimiento y a temperatura ambiente. En general, el gel fue inmerso en 100 ml de solución fijadora (ácido acético glacial 10%, etanol 30% y H₂O); (Anexos) y se incubó por 30 minutos. Luego, se eliminó la solución y el gel se incubó con 100 ml de solución etanol 30% por 10 minutos (2 veces). Seguido, de dos lavados con 100 ml de agua destilada estéril (H₂O) con incubación por 10 minutos. Inmediatamente, el gel fue incubado con 100 ml de solución tiosulfato de sodio 0.02% durante 1 minuto (Anexos). Luego, el gel fue lavado dos veces con 100 ml de H₂O con incubación por 1 minuto. Posteriormente, el gel fue incubado con solución de nitrato de plata (0.2%) durante 30 minutos (Anexos), seguido por un lavado con H₂O con incubación por 10 segundos. Luego, el gel fue incubado con 100 ml de solución reveladora (Na₂CO₃, formaldehído 37%, tiosulfato de sodio y H₂O); (Anexos) con agitación constante hasta evidenciar las bandas, momento en el cual la reacción fue detenida agregando la solución de parada (tris, ácido acético glacial y H₂O); (Anexos), seguido por un lavado final con H₂O por 10 segundos.

5. RESULTADOS

5.1. Análisis del pangenoma de *M. haemolytica* y selección de candidatos vacunales representativos

5.1.1. Cálculo del Pan-Genoma, genoma core y accesorio

Un total de 19 genomas disponibles de cepas virulentas de *M. haemolytica* fueron nuevamente anotados para analizar su pangenoma. El % GC de los genomas está en el rango de 40.84 - 41.30. Asimismo, los genomas varían en tamaño de 2.47Mb hasta 2.73Mb, conteniendo 2,410 – 2,780 secuencias codificantes de proteínas (Tabla 4).

Tabla 4. Anotación de los genomas de las 19 cepas de *Mannheimia haemolytica* usado en este trabajo. Los genomas fueron descargados de la base de datos del GenBank y re-anotados con Prokka v1.11.

Cepas	Serotipo	Hospedero	Genoma	Tamaño (Mb)	%GC	CDSs	ARNt	N° Accesoión GenBank
PHL213	A1	Bovino	<i>Draft</i>	2.67	41.1	2601	34	AASA00000000
D193	A1	Bovino	<i>Draft</i>	2.68	41.0	2716	57	ATSY00000000
USDA-ARS-USMARC-183	A1	Bovino	Completo	2.66	41.0	2670	65	CP004752.1
MhBrain2012	A1	Bovino	<i>Draft</i>	2.73	41.1	2765	65	ATSZ00000000
MhSwine2000	A1	Cerdo	<i>Draft</i>	2.71	41.0	2762	55	ATTA00000000
D35	A2	Bovino	<i>Draft</i>	2.49	41.3	2457	37	AUNK00000000
D38	A6	Bovino	<i>Draft</i>	2.61	40.9	2645	49	AUNL00000000
OVINE	A2	Ovino	<i>Draft</i>	2.58	41.1	2567	37	ACZX00000000
BOVINE	A2	Bovino	<i>Draft</i>	2.48	41.1	2460	48	ACZY00000000
184	NS	Bovino	Completo	2.52	41.1	2436	63	CP006957.1
H23	A6	Bovino	<i>Draft</i>	2.66	40.8	2674	46	AOGP00000000
D174	A6	Bovino	Completo	2.70	41.1	2780	66	CP006574.1
M42548-ICEmh1	NS	Bovino	Completo	2.73	41.0	2772	61	CP005383.1
USMARC_2286	NS	Bovino	Completo	2.66	41.1	2674	64	CP006619.1
D153	A1	Bovino	Completo	2.68	41.0	2717	62	CP005972.1
D171	A2	Bovino	Completo	2.50	41.1	2478	60	CP006573.1
USDA-ARS-USMARC-185	A6	Bovino	Completo	2.54	41.0	2480	61	CP004753.1
MH10517	NS	Ovino	<i>Draft</i>	2.47	40.84	2410	46	JPIZ01000000
89010807N	A1	Bovino	Completo	2.71	41.03	2728	65	CP011098

El pangenoma resultante de *M. haemolytica* contiene un total de 4391 genes no redundantes, que es 1.7 veces el promedio del número total de genes en cada uno de las 19 cepas (2621). Un subconjunto de genes del pangenoma, presentes en todas las cepas, fue calculado (genoma core), resultando en 1609 *clusters* de genes, la cual representan el 37% del pangenoma de las especies estudiadas (4391). Asimismo, un conjunto de genes que no fueron incluidos en el genoma core y/o que fueron únicos (presentes en sólo 1 genoma), fueron referidos como el genoma accesorio. Este contiene 2782 *clusters* de genes y representan el 63% de los genes encontrados en el pangenoma de *M. haemolytica* (Tabla 5).

Tabla 5. Principales características del Pangenoma de *Mannheimia haemolytica*.

Características analizadas	Pangenoma de <i>M. haemolytica</i>
Genomas	19
Total de genes	49,792
Promedio del tamaño del genoma	2621 genes
Tamaño del pangenoma (genes no redundantes)	4391
Genoma core	1609 genes
Genoma accesorio	2782 genes
Genes únicos	948 genes

La figura 9 representa la prevalencia de todos los genes del pangenoma presente en las cepas/genomas analizados. Se observa que los 4391 genes no redundantes están distribuidos de acuerdo a su frecuencia alrededor de todos los genomas, distinguiéndose tres categorías: el genoma core, el genoma accesorio (con una frecuencia variable) y los genes únicos (genes presentes en una sola cepa).

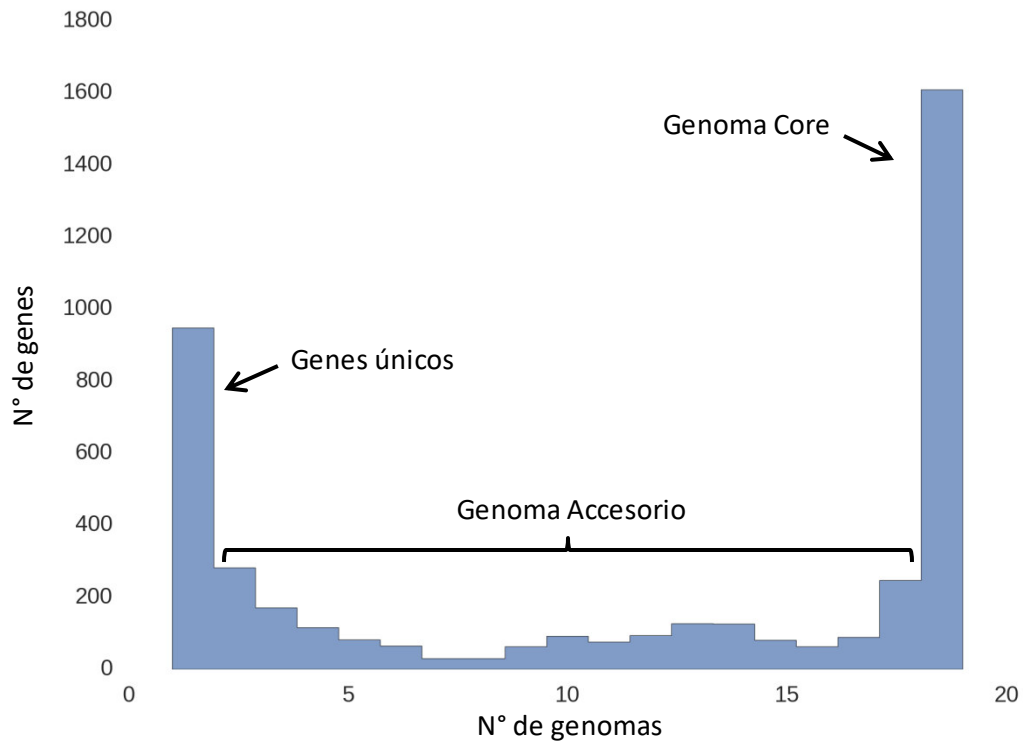


Figura 9. Histograma de la prevalencia de diferentes *clusters* de genes presentes en el pangenoma de *Mannheimia haemolytica*.

Posteriormente, se examinó la arquitectura del pangenoma de las 19 cepas de *M. haemolytica* y las ubicaciones relativas de los elementos genómico core y accesorio a través de un mapa circular genómico comparativo. Los resultados revelan un largo *gap* intermitente entre la región de 0 kpb hasta 2500 kpb y *gaps* pequeños de 50 kpb aproximadamente (genoma accesorio). Además, se observan patrones de deleciones generalizados en todas las cepas comparados con respecto a *M. haemolytica* A6 USDA-ARS-USMARC-185; y un conjunto de regiones únicas (*singletons*) y regiones compartidas en todas las cepas (genoma core), a lo largo de todo el pangenoma (Figura 10).

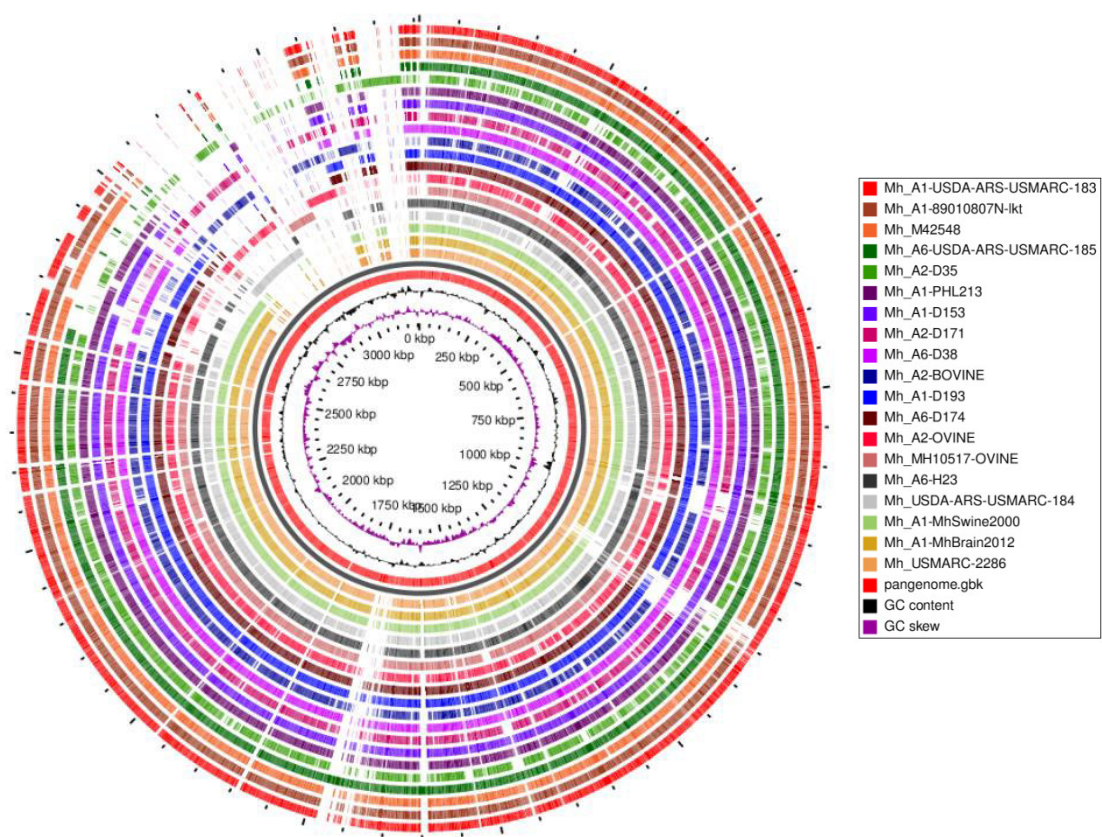


Figura 10. Mapa circular genómico comparativo del pangenoma de 19 cepas virulentas de *Mannheimia haemolytica* (Mh). El orden de los anillos del más interno al más externo es: tamaño del ADN, el GC skew (anillo morado), el contenido GC (anillo negro), el pangenoma construido usando como referencia a la cepa USDA-ARS-USMARC-185 de serotipo A6 (anillo rojo), seguido por los genomas como están listados en la leyenda.

5.1.2. Caracterización funcional y selección de candidatos vacunales

Las secuencias codificantes pertenecientes a los genomas core y accesorio fueron asignadas a posibles categorías (Figura 11A) y subcategorías (Figura 11B) funcionales mediante ortología KEEG (Kanehisa *et al.*, 2016). Aproximadamente el 50% de los genes predecidos en el genoma core son dedicados a funciones metabólicas, un 25% están asociados a funciones de procesamiento de información genética; y un 20% están relacionados a funciones de procesamiento celular y señalización. Las funciones de los genes predecidos en el 5 % restante del genoma core no están categorizado. No

obstante, en el genoma accesorio, más del 70% de sus genes presentan funciones no caracterizadas o con ortología no identificable en la base de datos de KEEG. El porcentaje restante incluye diferencialmente exotoxinas y proteínas involucradas a la resistencia antimicrobiana, así como proteínas de sistema de secreción tipo I-II; IV-V; proteínas implicadas en el sistema de dos componentes; proteínas del sistema toxina/antitoxina tipo II y III; proteínas implicadas en el sistema CRISPR tipo I y II; y proteínas de unión a glicosaminoglicano, entre las más abundantes (Figura 11).

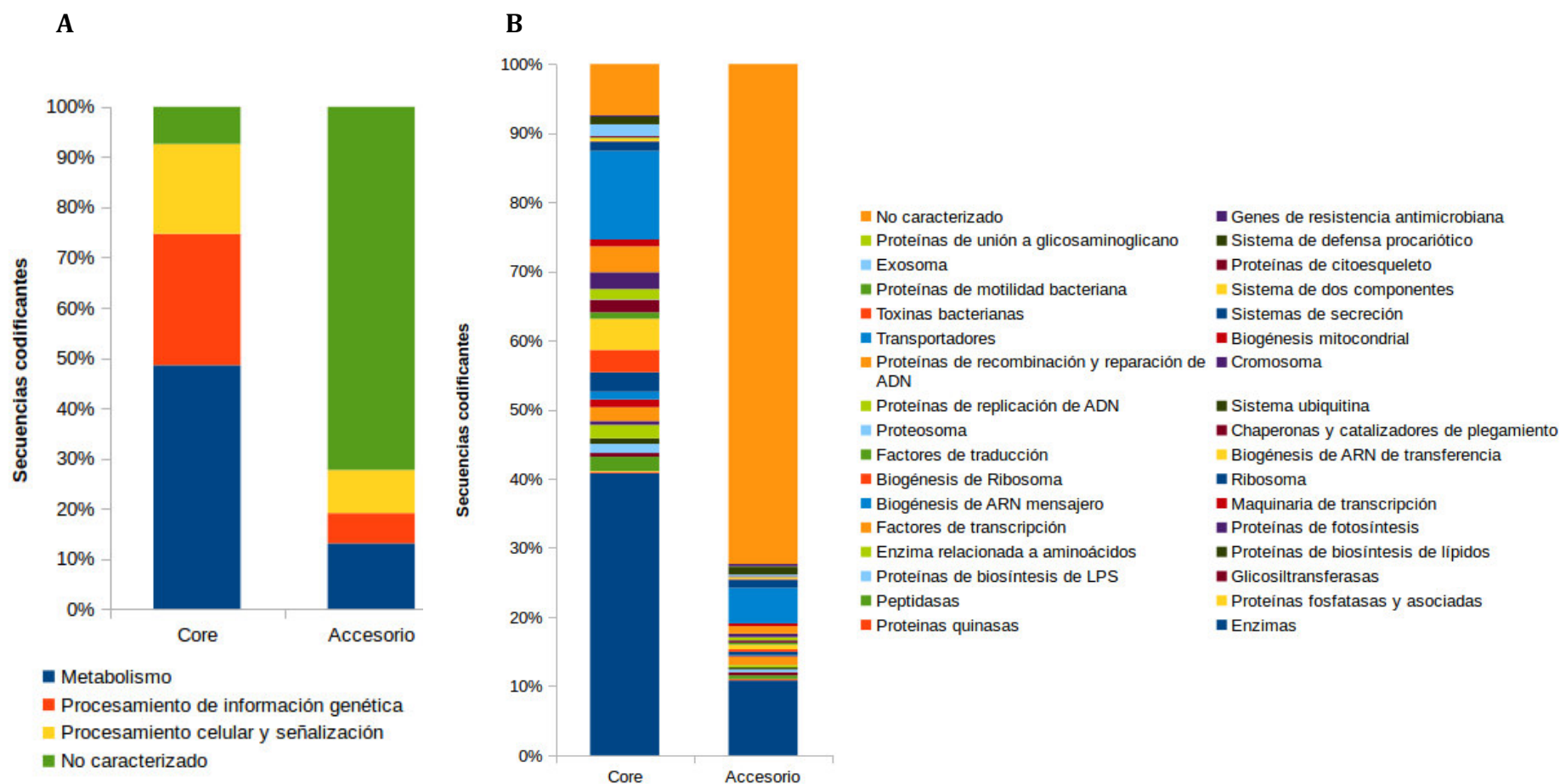


Figura 11. Caracterización funcional de genes core y accesorio. (A) Categorías KEEG y (B) subcategorías KEEG de genes predichos dentro de los genomas core y accesorio de *M. haemolytica*. Cada categoría o subcategoría es graficada como un porcentaje del número total de genes agrupados según ortología KEEG de los genomas core y accesorio.

Antígenos candidatos y con potencial protección contra cepas heterólogas fueron identificados en el pangenoma de *M. haemolytica* mediante la metodología propuesta por Juscamayta (2013). Del análisis de los 1609 genes no redundantes (nr), identificados en el genoma core, se obtuvo 10 antígenos candidatos. Todos están conservados en el 100% de las cepas y presentan una alta probabilidad de ser proteínas de membrana externa. Contrariamente, en el genoma accesorio (2782 genes nr) se seleccionaron 23 antígenos candidatos, la mayoría están asociados a membrana externa y están conservados en el 5%-95% del total de cepas. En ambos casos, antígenos que presentaron alguna similitud con proteínas de cerdo o ratón fueron descartados (Tabla 6).

5.1.3. Análisis filogenómico de especies de *M. haemolytica*

La relación de las diferentes cepas fue determinado por comparación de todas las variaciones nucleotídicas en regiones que son conservados entre los genomas comparados (polimorfismo de nucleótido simple en el genoma core; SNP-GC). En total, se identificaron 21, 863 SNPs en el genoma core de las 19 cepas en estudio. El análisis basado en estas variaciones mostró claramente tres grupos cercanamente relacionados y un grupo externo, con un valor *bootstrap* significativo y correlacionados con los perfiles obtenidos del *heatmap* (Figura 12).

Tabla 6. Potenciales candidatos vacunales identificados en el genoma core y accesorio del pangenoma de *M. haemolytica* usando el enfoque pangenómico de la vacunología reversa. El N° Cepas nos indica la cantidad de aislados en la que está conservado el antígeno candidato.

Candidato vacunal en genoma core	Localización	N° Cepas	% Cepas	Tamaño (aa)
Proteína 2 de unión a hemoglobina-haptoglobina y hemoglobina- <i>like</i>	ME	19	100	720
Proteína 2 de unión a hemoglobina-haptoglobina y hemoglobina- <i>like</i>	ME	19	100	589
Maltoporina	ME	19	100	430
Proteína LptD de ensamblaje de lipopolisacárido (LPS)	ME	19	100	778
Proteína ShIB transportadora de hemolisina- <i>like</i>	ME	19	100	599
Proteína TamA de ensamblaje y translocación	ME	19	100	612
Proteína de membrana externa 47 kDa- <i>like</i>	ME	19	100	494
Proteína CusC de sistema de flujo de cationes- <i>like</i>	ME	19	100	466
Transportador BtuB de vitamina B12- <i>like</i>	ME	19	100	629
Proteína HxuB transportadora de hemo-hemopexina- <i>like</i>	ME	19	100	563
Candidato vacunal en genoma accesorio	Localización	N° Cepas	% Cepas	Tamaño (aa)
Proteína de membrana externa P5- <i>like</i>	ME	14	74	379
Proteína de membrana externa P5- <i>like</i>	ME	4	21	373
Proteína de unión a transferrina 1 - TbpA	ME	18	95	931
Proteína de unión a transferrina 1 - TbpA	ME	1	5	937
Receptor ferricromo regulado por hierro- <i>like</i>	ME	14	74	692
Receptor ferricromo regulado por hierro- <i>like</i>	ME	9	47	692
Proteína H porina- <i>like</i>	ME	14	74	373
Proteína H porina- <i>like</i>	ME	5	26	354
Proteína C de utilización hemo-hemopexina	ME	18	95	661
Proteína C de utilización hemo-hemopexina	ME	16	84	701
Proteína C de utilización hemo-hemopexina	ME	3	16	699
Proteína C de utilización hemo-hemopexina	ME	2	11	619

Candidato vacunal en genoma accesorio (continuación)	Localización	N° Cepas	% Cepas	Tamaño (aa)
Proteína estructural leucotoxina	E	16	84	954
Proteína estructural leucotoxina	E	2	11	955
Proteína estructural leucotoxina	E	1	5	954
Porina Gram-negativa	ME	14	74	365
Proteína PilQ de competencia y biogénesis del pilus tipo IV- <i>like</i>	ME	18	95	438
Factor BamA de ensamblaje de proteína de membrana externa	ME	18	95	794
Receptor pseudobactina férrica BN7/ <i>BN8</i>	ME	15	79	568
Proteasa autotransportadora de Inmunoglobulina A1	E	13	68	951
Proteína transportadora de hemaglutinina filamentosa FhaC	ME	1	5	277
Proteína de membrana externa 47 kDa- <i>like</i>	ME	1	5	494
Proteína 2 de unión a hemoglobina-haptoglobina y hemoglobina- <i>like</i>	ME	3	16	311

ME membrana externa, E extracelular.

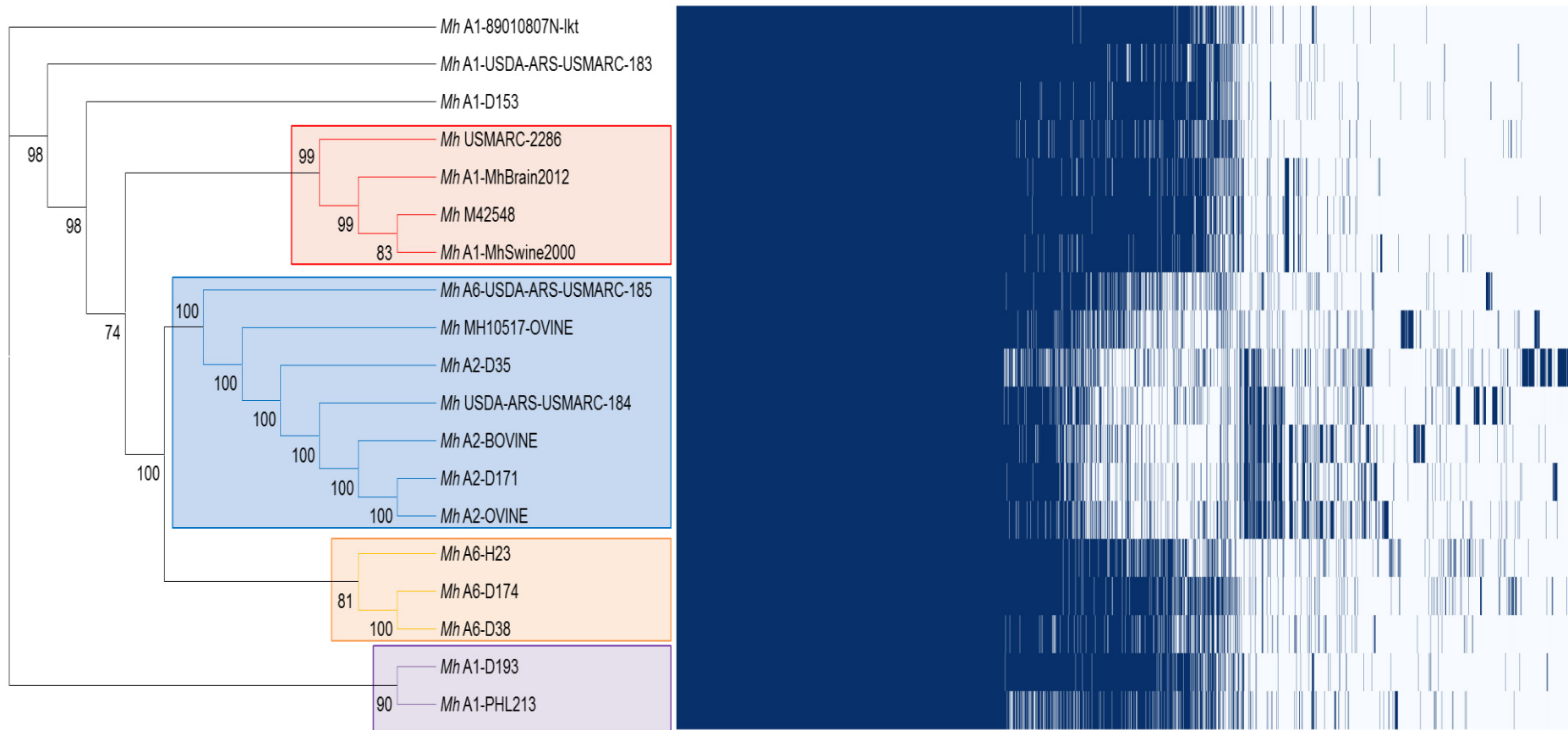


Figura 12. Árbol filogenómico basado en SNPs del genoma core contra un *heatmap* de perfiles de presencia (azul oscuro)/ausencia (azul claro) de *clusters* de genes en el pangenoma de *M. haemolytica* (*Mh*). La historia evolutiva fue inferido con el método *Maximum Likelihood* y bajo el modelo evolutivo general de tiempo reversible (GTR), con un *Bootstrap* de 1000 réplicas que soporta la topología mostrada.

5.2. Clonación y expresión de la leucotoxina como candidato vacunal

5.2.1. Aislamiento de *M. haemolytica* y amplificación del gen *lktA*

Un alelo del gen *lktA* que codifica para una variante de la leucotoxina (LktA.84), conservado en el 84% de las 19 cepas analizadas, fue amplificado a partir del ADN genómico extraído de *M. haemolytica* ATCC 33396, para su posterior clonación. La reactivación de esta cepa resultó en colonias aisladas mucoides y grisáceas con presencia de β -hemólisis débil que es característico de *M. haemolytica* (Figura 13). La tinción Gram de las colonias dio como resultado bacterias cocobacilos gramnegativos y pruebas bioquímicas fueron positivos para catalasa y oxidasa, pero negativo en la prueba indol, confirmando de esta manera el aislamiento de *M. haemolytica*.

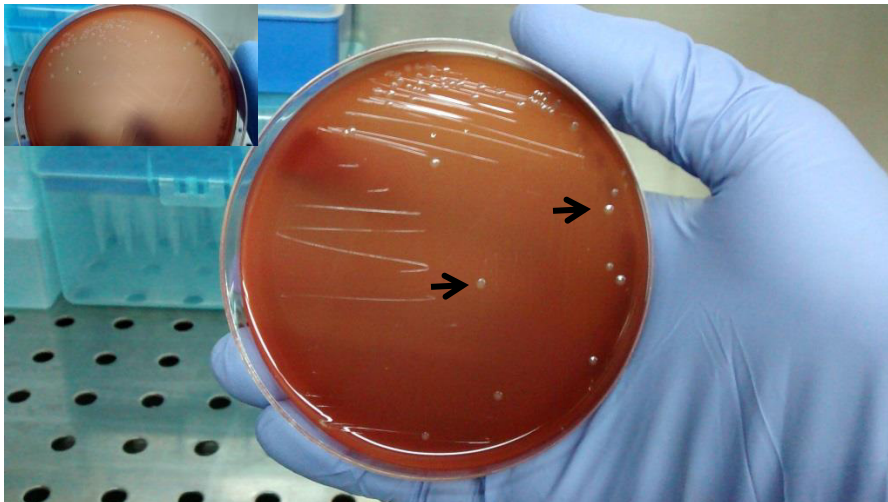


Figura 13. Aislamiento de *Mannheimia haemolytica* ATCC 3339 srt. A2 Ovino en 5% de agar sangre e incubadas a 37°C por 24 horas bajo condiciones aeróbicas. Obsérvese la β -hemólisis débil y la forma mucoides de las colonias característicos (flechas). Esta cepa fue obtenida de pulmones neumónicos de ovinos en el Reino Unido (1956).

Los productos de PCR del gen *lktA* resultaron ser específicos y del tamaño esperado (2856 pb), en las tres repeticiones; no obstante, en la amplificación del gen control se observaron amplicones inespecíficos de aproximadamente 500 pb como adicional al fragmento amplificado esperado de 750 pb (Figura 14). La purificación de los productos de PCR específicos resultó en una concentración final de 8.7ng/ μ l para el gen *lktA*, mientras que para el gen control fue de 41 ng/ μ l (Figura 14 B'), por lo cual éste último fue diluido hasta obtener una concentración final de 5 ng/ μ l.

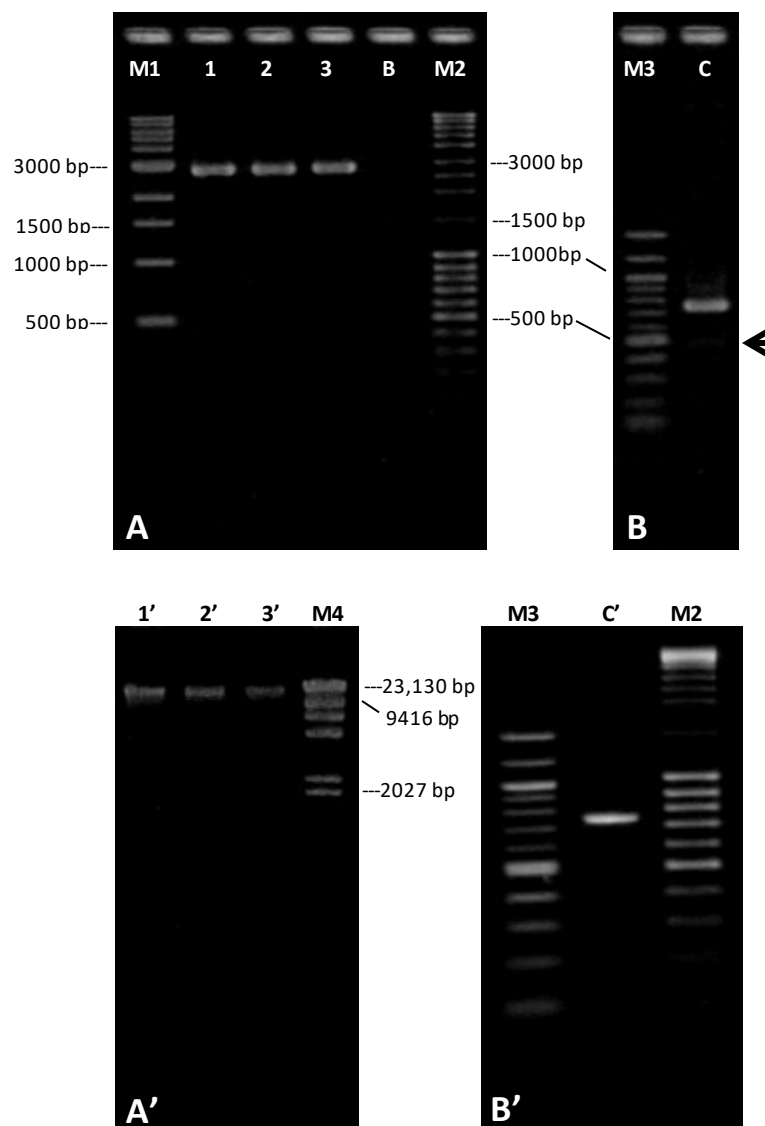


Figura 14. Productos de PCR del gen leucotoxina (*lktA*) y el gen control. (A) Amplicones específicos (2856 pb) obtenidos por PCR del gen *lktA*, en triplicado (carril 1-3). (A') ADN genómico de alto peso molecular (carril 1'-3') aislado de *M. haemolytica* ATCC 3339. (B) Amplicones específicos (750 pb) e inespecíficos (500 pb, flecha) obtenidos por PCR del gen control (carril C). (B') Amplicones específicos (750 pb) purificados del gen control a partir del gel de agarosa (1.5%) (carril C'). Carril M1: 1kb *DNA Ladder* (BioLabs); carril B: blanco (control negativo del PCR); carril M2: *MassRuler™ DNA Ladder* (Thermo Scientific); carril M3: 100pb *DNA Ladder* (BioLabs); carril M4: fago λ Hind III (Promega).

5.2.2. Análisis de clones recombinantes

5.2.2.1. Clonación y minipreparación de los transformantes

Fragmentos amplificados específicos y purificados fueron clonados en el vector pET102/D-TOPO, resultando en los plásmidos pET102-*lktA* y pET102-control positivo, la cual, junto con un vector negativo (plásmido pET102 vacío), fueron transformados en cepas de *E. coli*. La cantidad de colonias transformantes fueron proporcionales al volumen del inoculo sembrado, observándose, en ambos casos, colonias bien aisladas (Figura 15).

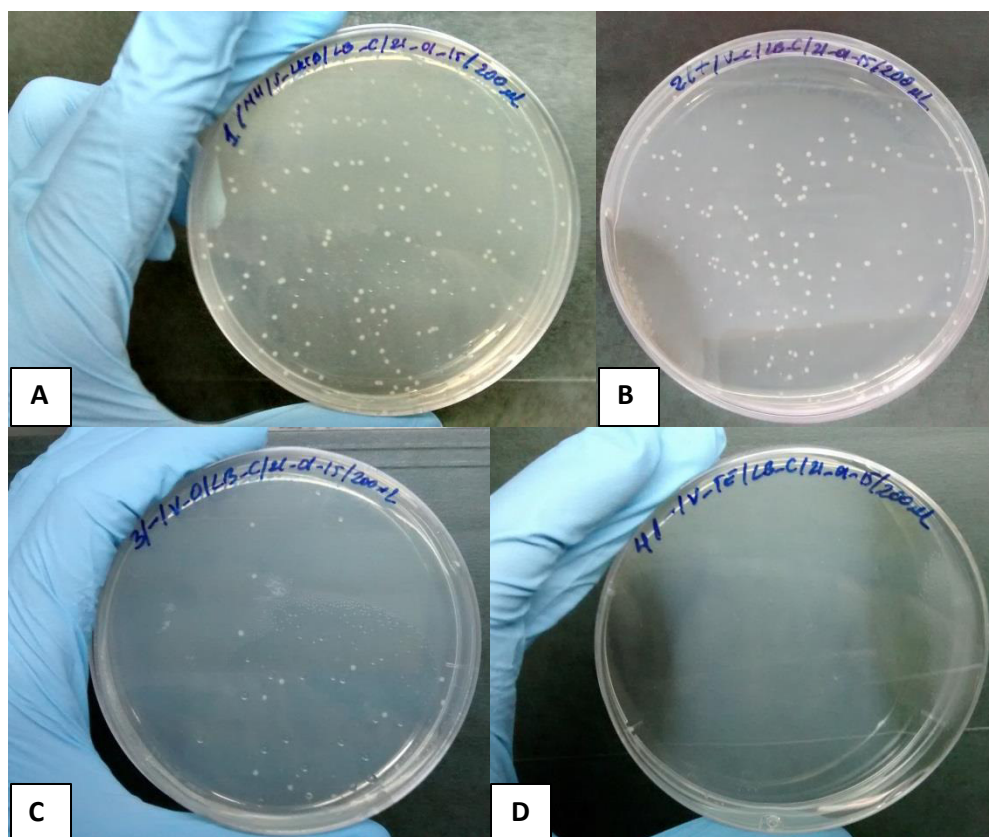


Figura 15. Colonias transformantes con plásmidos recombinantes pET102-*lktA* y pET102-control positivo. Clones recombinantes con el plásmido pET102-*lktA* (A), pET102-control positivo (B), el vector vacío pET102 (control negativo) (C) fueron sembrados en medio agar LB con carbenicilina (200 µg/ml) e incubadas a 37°C durante 18 horas. Un control negativo de la transformación fue utilizado reemplazado por agua ultrapura en lugar de plásmidos recombinantes (D).

El crecimiento de las colonias transformantes con los plásmido pET102-control positivo y pET102 (vector vacío), indicaron una adecuada reacción de clonación; así como, la actividad de resistencia a carbenicilina del vector y la viabilidad de cepas *E. coli* One Shot/TOP10 (Figura 15B y 15C).

Colonias de estas cepas sin transformar (agua en lugar de plásmidos) no crecieron, lo cual demuestra la actividad funcional de la carbenicilina en el medio (Figura 15D). Colonias transformantes con el plásmido pET102-*lktA* tuvieron significativamente más colonias que los transformantes con el vector sin inserto (Figura 15A y 15C), la cual fue utilizado como un nivel de referencia (*background*) para inferir la cantidad de colonias que no llevan el plásmido con el inserto y determinar el número de colonias necesarios para las minipreparaciones. El número de colonias utilizadas en las minipreparaciones para los 100 μ l y 200 μ l de transformantes cultivados se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Colonias utilizadas en las minipreparaciones de plásmidos para el análisis de los constructos recombinantes.

Transformante con plásmido	pET102- <i>lktA</i>		pET102-C+		pET102 (C-)	
	100 μ l	200 μ l	100 μ l	200 μ l	100 μ l	200 μ l
Inóculo	A1	A'1	A2	D2	A3	B3
	B1	B'1	B2	E2	-	-
Colonias	C1	E'1	C2	-	-	-
	D1	-	-	-	-	-
	E1	-	-	-	-	-

El análisis preliminar de los plásmidos aislados de los transformantes pET102-*lktA* reveló un peso molecular entre 8,000 pb y 10,000 pb aproximadamente, mientras que en los transformantes pET102-control positivo y pET102 (vector vacío), el tamaño de los plásmidos fueron de aproximadamente 7,000 pb y 6,000 pb, respectivamente. No obstante, en las colonias pET102-*lktA* seleccionadas del inóculo de 200 μ l, todos los plásmidos fueron menores de 7,000 pb indicando que posiblemente no presenten el inserto (Figura 16).

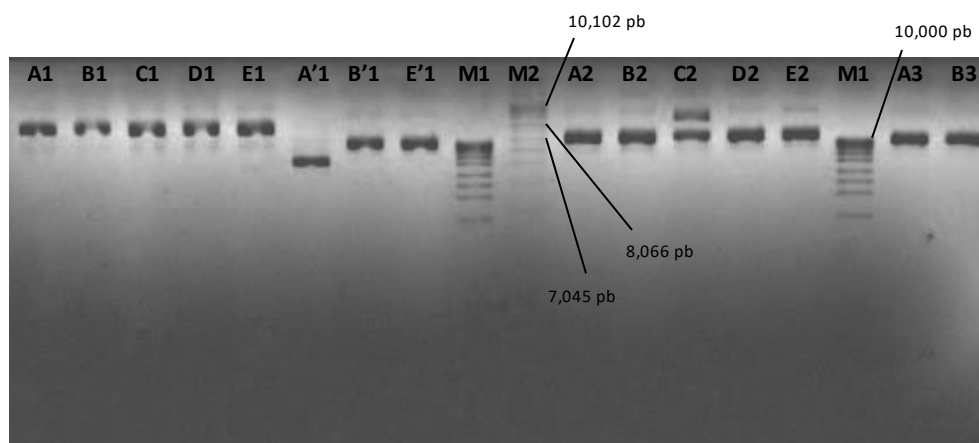


Figura 16. Plásmidos aislados mediante minipreparaciones de los transformantes. Carril A1-E1: plásmidos de los transformantes pET102-*lktA* (inóculo 100µl); carril A'1, B'1 y E'1: plásmidos de los transformantes pET102-*lktA* (inóculo 200µl); carril A2-C2: plásmidos de los transformantes pET102-control positivo (inóculo 100µl); carril D2 y E2: plásmidos de los transformantes pET102-control positivo (inóculo 200µl); carril A3 y B3: plásmidos sin insertos (controles negativos: plásmidos vacíos), de inóculos 100 µl y 200 µl, respectivamente; carril M1: *MassRuler™ High Range DNA Ladder* (Thermo Scientific); M2: *Supercoiled DNA Ladder* (Invitrogen).

5.2.2.2. Identificación del gen control clonado con enzima de restricción

El análisis de restricción de los plásmidos pET102-control positivo resultó en dos fragmentos digeridos de aproximadamente 5065 pb y 1990 pb (compatible con lo reportado), lo cual confirma la presencia y correcta orientación del inserto clonado (Figura 17). En la digestión de los plásmidos pET102-*lktA* y pET102 (vector vacío, sin inserto), utilizados como controles negativos, se obtuvieron fragmentos menores a 10,000 pb y 7,000 pb, respectivamente. Comparación del tamaño de estos plásmidos obtenidos en la figura 16 con los visualizados en la figura 17 nos indican que éstos últimos han sido linealizados por la enzima de restricción PstI. A pesar, de que esto no indica la correcta orientación de los insertos, podemos inferir que el gen *lktA* está presente en los plásmidos donde fueron clonados.

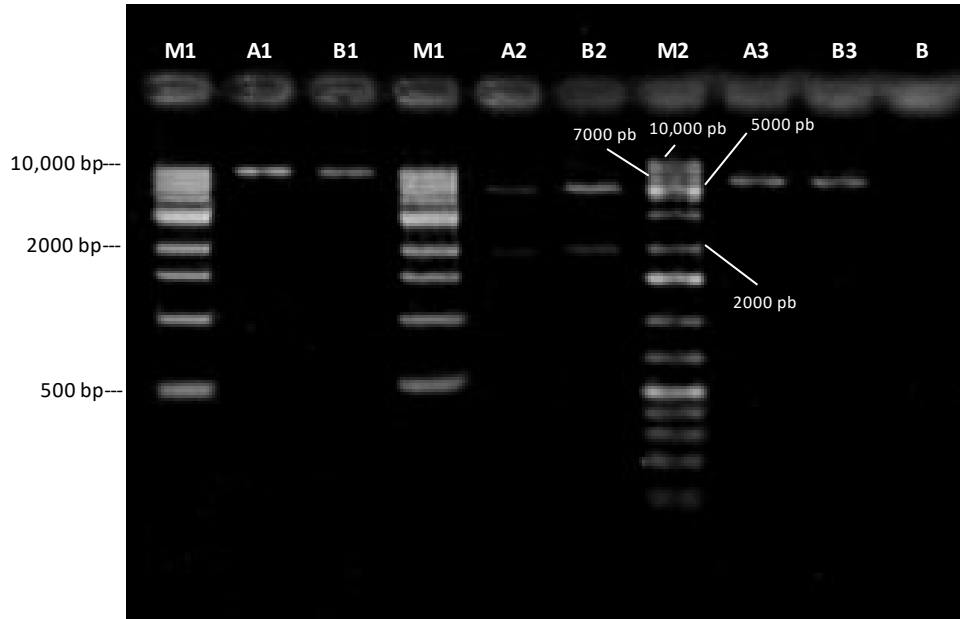


Figura 17. Análisis de restricción de los plásmidos recombinantes pET102-control positivo. Carril M1: 1kb *DNA Ladder* (New England BioLabs); carril A1 y B1: plásmidos recombinantes pET102-*lktA* linearizado con PstI; carril A2 y B2: productos digeridos con PstI de los plásmidos recombinantes pET102-gen control; carril M2: GeneRuler™ 1 kb *Plus DNA Ladder* (Thermo Scientific); carril A3 y B3: controles negativos (plásmidos vacíos, sin inserto, linearizados); carril B: blanco (control negativo de la reacción de digestión). En todos los casos, los plásmidos fueron aislados de colonias transformantes del inóculo 100 μ l, con excepción del B3 que fue aislado del inóculo 200 μ l.

5.2.2.3. Identificación del gen *lktA* clonado por PCR colonia

PCR de las colonias transformantes pET102-*lktA*, resultó en fragmentos amplificados de 2928 pb, compatibles con el tamaño predicho por los análisis (Figura 18A). No obstante, también se observaron amplicones inespecíficos muy tenues, posiblemente debido a la excesiva cantidad de ADN utilizado producto del *boiling* de los transformantes. Debido a ello, se repitió el ensayo realizando un PCR directo, utilizando plásmidos aislados y diluidos de los mismos transformantes, observándose sólo amplicones específicos esperados (Figura 18B). De esta manera, nosotros confirmamos la presencia del gen *lktA* y su correcta orientación en la clonación. Cabe destacar, que PCR directo de plásmidos aislados y diluidos de cepas transformantes pET102-*lktA* (A'1, B'1 y E'1) del inóculo 200 μ l, no presentaron amplicones específicos (Figura 18B) coincidiendo estos resultados con el PCR colonia y con el tamaño de los plásmidos observados en la figura 16, lo cual es probable que el gen *lktA* no haya sido clonado.

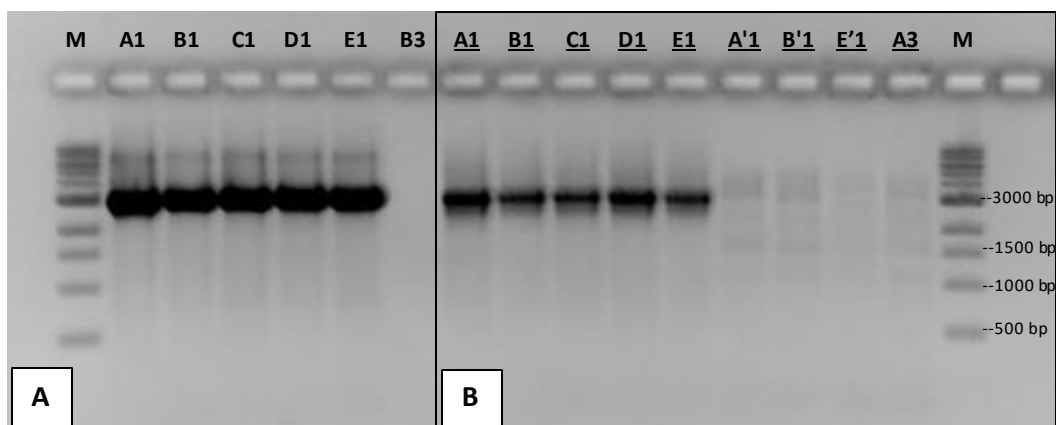


Figura 18. Productos de PCR obtenidos por PCR colonia y PCR directo de los plásmidos recombinantes pET102-*lktA*. (A) PCR colonia de las cepas transformantes pET102-*lktA* (A1-E1) del inóculo 100 μ l; B₃: PCR colonia de las cepas transformantes pET102 (vector vacío) del inóculo 200 μ l, utilizado como control negativo. (B) PCR directo de plásmidos aislados y diluidos de las mismas cepas transformantes pET102-*lktA* (A1-E1) del inóculo 100 μ l; PCR directo de plásmidos aislados y diluidos de cepas transformantes pET102-*lktA* (A'1, B'1 y E'1) del inóculo 200 μ l; A₃: PCR colonia de las cepas transformantes pET102 (vector vacío) del inóculo 100 μ l, utilizado como control negativo. M: 1kb *DNA Ladder* (New England BioLabs).

5.2.3. Análisis de la expresión de la proteína LktA recombinante

Cepas *E. coli* BL21 Star™ (DE3) One Shot® transformadas con plásmidos recombinantes positivos para el gen *lktA* por duplicado (plásmidos A1 y C1) e inducidos con IPTG, expresaron una proteína LktA recombinante de aproximadamente 121 KDa (Figura 19, flecha), incluyendo los 16 KDa de los *tags* de fusión (His-Patch tiorredoxina-N y V5-6xHis-C terminal). La leucotoxina fue identificada sólo en el sobrenadante obtenido de los lisados de estos clones, siendo el tiempo óptimo de expresión al cabo de 5 horas ($t = 5$). No obstante, bajo estas mismas condiciones y sin IPTG, no se observó ninguna banda proteica compatible con el tamaño de la leucotoxina (Figura 19, carril 4).

La expresión de la proteína recombinante β -galactosidasa (control positivo) de aproximadamente 133 KDa (Figura 19, cabeza de flecha), durante las mismas condiciones, confirmó un adecuado crecimiento e inducción de la expresión.

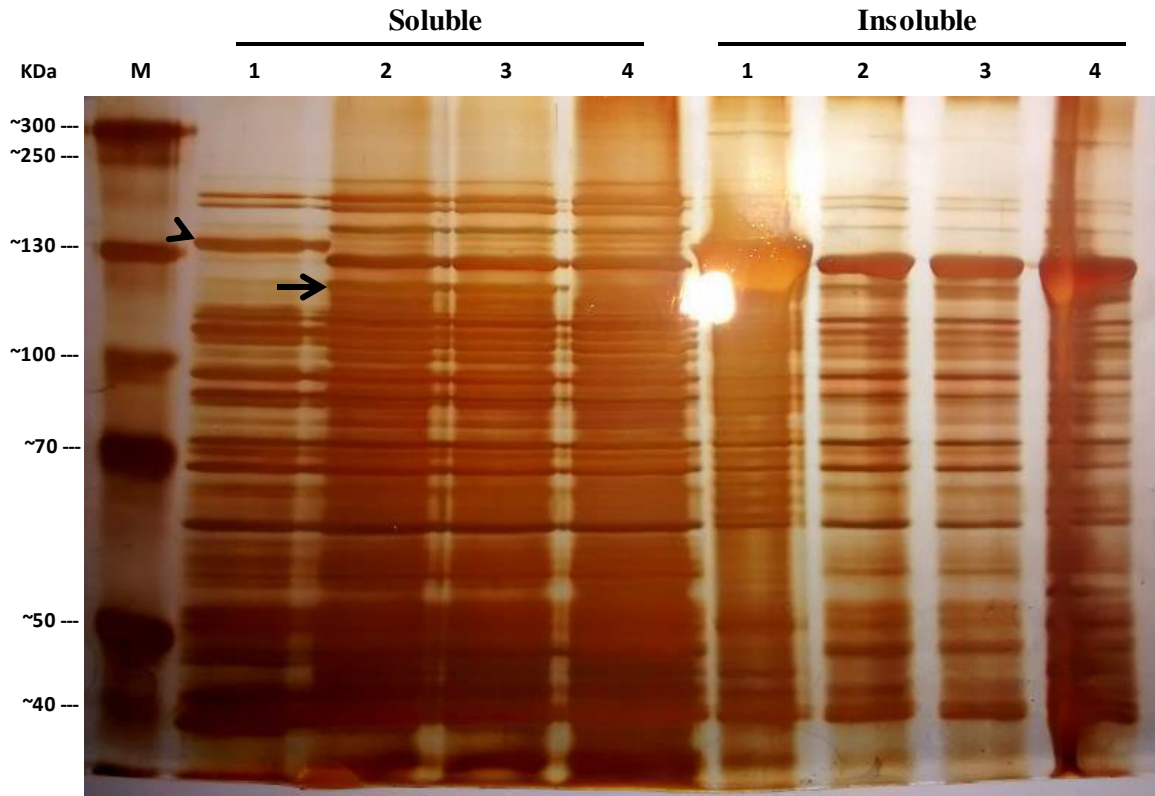


Figura 19. Análisis SDS-PAGE de la proteína recombinante leucotoxina de *M. haemolytica*, expresada en *E. coli*. M: *Spectra Multicolor High Range Protein Ladder* (Fermentas); carril 1: sobrenadante (soluble) y *pellet* (insoluble) de lisados *E. coli* BL21 Star™ (DE3) transformados con pET102/D/lacZ (control positivo β -galactosidasa: cabeza de flecha) e inducidos con IPTG (1mM) por 5 horas; carril 2 y 3: sobrenadante (soluble) y *pellet* (insoluble) de lisados *E. coli* BL21 Star™ (DE3) transformados con pET102-*lktA* e inducidos con IPTG (1mM) por 5 horas (Leucotoxina: flecha); carril 4: sobrenadante (soluble) y *pellet* (insoluble) de lisados *E. coli* BL21 Star™ (DE3) transformados con pET102-*lktA* y no inducidos con IPTG.

6. DISCUSIÓN

En la presente investigación se utilizó el enfoque Pan-Genómico de la vacunología reversa con la finalidad obtener en *E. coli* un candidato vacunal recombinante representativo del pangenoma de *Mannheimia haemolytica*, que sea prometedor para brindar una protección heteróloga contra la pasteurelosis neumónica.

En ese sentido, se realizó un análisis genómico comparativo de 19 cepas aisladas de animales con cuadro de neumonía mediante una estrategia pangenómica. El pangenoma se define como todas las secuencias codificantes de un conjunto de genomas incluyendo genes comunes a todas las cepas (genoma core), genes presentes en algunos pero no en todas las cepas (genoma accesorio) y genes específicos que son

únicos para cada aislado (*singletons*); (Medini *et al.*, 2005). En el análisis, un total de 4391 *clusters* de genes fueron identificados en el pangenoma de *M. haemolytica*, de las cuales 1609 (37%) pertenece al genoma core y 2782 (63%) están incluidas en el genoma accesorio (Tabla 5). Estos resultados nos sugieren que *M. haemolytica* presenta una alta variabilidad genómica y que su pangenoma es probablemente abierto. Un pangenoma abierto es observado frecuentemente en especies bacterianas que habitan nichos ecológicos diversos, tienen complejos estilos de vida y son propensos para la transferencia horizontal de genes (Tettelin *et al.*, 2005). Esto no es sorprendente, considerando que *M. haemolytica* habita un complejo nicho, puede exhibir fenotipo patogénico y comensal, y contiene muchos serotipos con cantidad variable de elementos genéticos móviles (Davies *et al.*, 2001). Además, la presencia de un alto número de genes específicos (*singletons*) identificados en el pangenoma (948) justifica que *M. haemolytica* debería tener un pangenoma abierto, lo que significa que cada cepa contribuye, en promedio, con 50 genes nuevos. De manera interesante, cuando se calculó la frecuencia de los genes del pangenoma presente en los 19 genomas analizados, se encontró una distribución similar a lo reportado por Lapierre y Gogarten (2009) cuando estimaron el pangenoma de 573 genomas bacterianos, demostrando que el pangenoma de *M. haemolytica* tiene una alta prevalencia de genes variables (Figura 9). En un reciente estudio donde caracterizaron el pangenoma de *M. haemolytica* usando un total de 21 cepas, derivadas de animales sanos, enfermos y muertos por neumonía, identificaron 9,507 grupos ortólogos, de las cuales 1,333 (14%) pertenecen al genoma core y 8,174 (86%) al genoma accesorio (Klima *et al.*, 2016). Este pangenoma estimado excede al calculado en nuestro estudio por más de 5,000 genes; no obstante, esto es totalmente esperado dado que, para pangenomas abiertos, a más genomas analizados, existe una mayor probabilidad de descubrir nuevos genes, siendo el genoma core afectado negativamente.

La representación circular del pangenoma de *M. haemolytica* reveló que los elementos accesorios están distribuidos ampliamente pero más concentrados en una región del cromosoma (0 kpb hasta 2500 kpb) y que las deleciones identificadas no son específicos para ninguna cepa/serotipo (Figura 10). Esto nos sugiere que *M. haemolytica* tiene una gran variabilidad intra e inter serotipos y no presentan comportamiento clonal. Lo anterior es respaldado en un estudio realizado por Timsit *et al.* (2013) donde aislados de *M. haemolytica*, recuperados de pulmones durante un brote de neumonía, fueron caracterizados por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) encontrando una alta diversidad genética de *M. haemolytica* y concluyendo que la enfermedad no sólo es desencadena por una simple cepa virulenta.

El análisis funcional del genoma core identificó un alto porcentaje de genes esenciales para supervivencia y funciones celulares (Figura 11). Estudios previos han mostrado resultados similares donde el genoma core es enriquecido en funciones metabólicas y celulares incluyendo replicación, transcripción y traducción (Valot *et al.*, 2015; Klima *et al.*, 2016). Por el contrario, en la caracterización funcional del genoma accesorio de *M. haemolytica*, más del 70% de proteínas no tuvieron ortología identificable y mayormente son *singletons*, muchas de las cuales son proteínas hipotéticas y asociados a fagos. En el componente restante, se encontraron genes de resistencia de antibióticos incluyendo genes de resistencia a aminoglicosidos (*aadA*, *aph3-I*, *strA* y *strB*), un gen de resistencia a beta lactamasa (*bla_{penP}*) y un gen de resistencia a tetraciclina (*tetA*). Nuestro análisis identificó a este conjunto de genes de resistencia antimicrobiana en las cepas M42548, MhSwine2000 y MhBrain2012, considerando a este grupo con fenotipo multiresistente (Eidam *et al.*, 2013). Estos genes han sido encontrados dentro del elemento conjugativo e integrativo ICEMh1 y está relacionado al elemento multiresistente ICEPmu1 de *Pasteurella multocida*, sugiriendo que resistencia antimicrobiana puede ser transferido entre especies *Pasteurellaceae* y contribuir a la patogenicidad de *M. haemolytica* (Eidam *et al.*, 2015).

Asimismo, se identificaron genes accesorios que codifican para proteínas de sistema de secreción tipo I-II y IV-V asociados con la exportación de proteasas, toxinas y a la transferencia de ADN transformante y conjugal, muchas de las cuales podrían funcionar como *targets* para una nueva clase de drogas antivirulencia (Baron, 2006). Además, se identificaron proteínas accesorias implicadas en el sistema de dos componentes relacionados a la regulación de la virulencia (Bertrand *et al.*, 2010); proteínas del sistema toxina/antitoxina tipo II (HipBA) y III (AbiQ) asociadas con la tolerancia a las drogas (Correia *et al.*, 2006) y a la resistencia de fagos (Samson *et al.*, 2013), respectivamente; proteínas implicadas en el sistema CRISPR tipo I y II para la defensa antiviral (Zhang *et al.*, 2012); y proteínas de unión a glicosaminoglicano como hemaglutininas filamentosas, siendo consideradas estas últimas como adhesinas altamente antigénicas y responsables de la colonización del tracto respiratorio inferior y modulación de la respuesta inflamatoria inicial (Inatsuka *et al.*, 2005); (Figura 11). Por lo tanto, el genoma accesorio le confiere a las cepas de *M. haemolytica*, una gran variedad de mecanismos de virulencia asociados a la infectividad, resistencia y letalidad.

M. haemolytica tiene múltiples factores de virulencia que han sido extensamente estudiados (Highlander, 2001). En este estudio, se identificaron antígenos candidatos

en el genoma core y accesorio con potencial para inducir protección heteróloga. En total 33 candidatos vacunales fueron seleccionados, 10 en el genoma core y 23 en el genoma accesorio, la mayoría de ellos asociados a la membrana externa, de las cuales algunos coinciden con candidatos vacunales seleccionados en el genoma de *M. haemolytica* A2 Ovino (Juscamayta, 2013). No obstante, en este análisis se evidencia, alta variación de secuencias intra e inter serotipos de algunos candidatos, principalmente en el genoma accesorio, incluyendo hasta cuatro variantes para una misma proteína (Tabla 6). Lo anterior, coincide con estudios previos, donde reportaron variación de secuencias para *tbpA* (Lee y Davies, 2011), *ompA* (Davies y Lee, 2004), y *lktA* (Davies *et al.*, 2001) entre diferentes aislados de *M. haemolytica*, originados principalmente por transferencia horizontal de ADN intra-inter especies y eventos de recombinación intragénica. Estos cambios posiblemente le confieran una ventaja adaptativa contra la respuesta de anticuerpos del hospedero, generando nueva variación antigénica en sitios que están expuestas a la superficie.

Las proteínas de unión a transferrina tipo A (TbpA), son clasificadas como proteínas de membrana externa reguladas por hierro (IROMPs) y han demostrado ser inmunogénicas en bovinos y, en combinación con sobrenadantes de cultivo, incluyendo leucotoxina, lipopolisacárido y polisacáridos capsulares, resultaron ser inmunoprotectores contra la infección experimental por *M. haemolytica* serotipo A1 (Sreevatsan *et al.*, 1996). En general estas proteínas son potenciales candidatos vacunales, ya que la adquisición de hierro es imprescindible para *M. haemolytica*, durante el estadio temprano de la infección; así como para la producción de leucotoxina y otros factores de virulencia y por ende modulan su patogénesis (Ogunnariwo *et al.*, 1997). La proteína de membrana externa P5-*like*, identificada en el genoma accesorio, forma parte de la familia OmpA, una proteína altamente conservada en bacterias Gram negativas y está involucrado en la adherencia a tejidos de hospederos en varios patógenos asociados a neumonía, incluyendo *H. influenzae* y *P. multocida* (Davies y Lee, 2004). Por lo tanto, Omp-P5-*like* puede jugar un rol en la adherencia y la colonización de *M. haemolytica* al tracto respiratorio de su hospedero.

El análisis filogenómico de SNPs ortólogos compartidos entre los 19 genomas de *M. haemolytica*, evidenció una correlación entre la filogenia y serotipo pero no con el hospedero, coincidiendo con análisis filogenéticos basados en la comparación de secuencias de ARNr 16S (Davies *et al.*, 1996). Sin embargo, cepas del serotipo A1 estuvieron dispersas en la filogenia. Un grupo cercanamente relacionado, de serotipo A1, incluyen aislados con genes multiresistentes a antibióticos (M42548, MhBrain2012,

MhSwine2000). Además, la cepa OVINE del serotipo A2 se encuentra genéticamente relacionada con aislados del mismo serotipo que presentan alto número de *singletons* asociados a virulencia (D35, USDA-ARS-USMARC-184 y MH10517-OVINE). El perfil del *heatmap* de este último grupo nos indica una alta diversidad de secuencias dentro del serotipo A2 (Figura 12), lo cual es compatible con resultados obtenidos por Klima *et al.* (2016). Por ende, este grupo debería ser considerado como un linaje altamente virulento. No obstante, aislados del serotipo A6 estuvieron más relacionados a cepas del serotipo A2 que el serotipo A1. Esto difiere con resultados obtenidos en estudios de diversidad intraespecífica basados en perfiles LPS y OMP; y en análisis filogenético basado en todos los genomas de 11 cepas de *M. haemolytica*. En ambos casos, aislados del serotipo A6 estuvieron más relacionados a cepas del serotipo A1 (Davies y Donachie, 1996; Klima *et al.*, 2016). Posiblemente estas diferencias se deben a la variabilidad de factores de virulencia incluidas en el análisis, demostrando que aislados del serotipo A6 están más relacionados patogénicamente a cepas del serotipo A1. No obstante, los SNPs poseen alta resolución filogenética y han demostrado ser más estables evolutivamente, por ende podrían ser incorporados dentro de métodos de genotipificación de especies patógenas (Foster *et al.*, 2009).

Debido a la diversidad genética de *M. haemolytica* y a su complejidad de serotipos, el desarrollo de una vacuna que provea una protección heteróloga contra la pasteurelisis neumónica ha sido un problema. De esta manera, en base al análisis pangénomico realizado, se decidió seleccionar a una variante de la leucotoxina (*lktA.84*) para su clonación y expresión heteróloga en *E. coli*. Este candidato vacunal tiene potencial para brindar protección heteróloga, debido a que está presente en el 84% de las cepas analizadas, con una identidad mayor al 80%, incluyendo *M. haemolytica* A2 Ovino, que posiblemente se haya adaptado en alpacas. Precisamente, aislados del serotipo A2 son genéticamente más diversos y virulentos; y han sido asociados principalmente en casos de neumonía en ovinos (Davies y Baillie, 2003). La leucotoxina es considerada un factor de virulencia importante en la patogenicidad de *M. haemolytica* (Highlander, 2001), causante de la lisis de macrófagos y neutrófilos en bovinos y ovinos (Clinkenbeard *et al.*, 1989); y, su estructura y función son altamente conservadas a pesar de su mosaicismo y variación de aminoácidos. Además, existen diferentes estudios que han demostrado su capacidad inmunoprotectora (Conlon *et al.*, 1991).

En ese sentido, en la presente investigación, el gen *lktA* fue clonado exitosamente y en la orientación correcta, como lo demuestra el crecimiento de los clones recombinantes pET102-*lktA* (Figura 15) y el análisis de sus plásmidos (Figura

16), así como los productos de PCR específicos obtenidos del PCR colonia (Figura 18). Resultados similares fueron reportados en diferentes estudios sobre clonación de antígenos candidatos de *M. tuberculosis* (Wang *et al.*, 2005; Mahmoudi *et al.*, 2013), respaldando la alta eficiencia de la estrategia de clonación utilizada (TOPO *cloning*) frente a otros métodos tradicionales (Shuman, 1994).

La sobreexpresión, en *E. coli*, de nuestro candidato vacunal seleccionado, resultó en una leucotoxina recombinante con un peso neto de 105 KDa (Figura 19). La secreción de estas especies de 105 KDa ha sido identificada en todos los serotipos patogénicos y está asociada a la forma activa de la leucotoxina (Chang *et al.*, 1987), lo cual nos sugiere que posiblemente nuestra proteína haya sido expresada de una forma biológicamente activa. Sin embargo, estudios iniciales indicaron que la expresión de LktC, una trans-acilasa codificada por el gen *lktC*, es indispensable para la activación por acilación de la LktA, la protoxina codificada por el gen *lktA*, por ende la expresión de ambos genes es requerida para la actividad funcional de la leucotoxina (Lo *et al.*, 1987; Jeyaseelan *et al.*, 2002). No obstante, en estudios recientes, *M. haemolytica* mutantes (LktC⁻) fueron parcialmente atenuados en su virulencia causando neumonía fatal en bovinos y ovinos, con leucocitos polimorfonucleares (PMNs) necróticos en los pulmones. LktA secretada de estos mutantes fueron enfrentados *in vitro* con PMNs, observándose la presencia de poros y la inducción de necrosis en estas células. Estos resultados nos sugieren que la activación, por acilación, no es necesario para la actividad citotóxica de la LktA pero sí para intensificar su toxicidad (Highlander *et al.*, 2000; Batra *et al.*, 2015).

El primer cuello de botella que se encuentra cuando se estudia el aspecto estructural, biofísico y bioquímico de una proteína específica, es la expresión de una cantidad adecuada de proteína soluble y biológicamente activa. En ese sentido, uno de los principales problemas es la pobre solubilidad de la proteína expresada, por ejemplo la formación de cuerpos de inclusión (Baneyx, 1999). Los cuerpos de inclusión son estructuras granulares densas de proteína en forma inactiva, precipitadas a lo largo del citoplasma cuando son expresadas a niveles celulares muy altos o inclusive por mutación de un solo residuo aminoacídico de la proteína expresada (Bollag *et al.*, 2016). En algunos casos, los cuerpos de inclusión son extraídos y solubilizados y la proteína recombinante puede ser plegada *in vitro* (*refolding*); no obstante, la eficiencia del *refolding* para generar una proteína activa varía significativamente en cada caso (Pavan *et al.*, 2016). Debido a ello, se prefiere evitar el proceso de re-plegamiento que demanda tiempo y orientarse a optimizar la expresión de la proteína en forma soluble. En este

estudio, la proteína recombinante fue sobreexpresado sólo en forma soluble y sin formar cuerpos de inclusión, lo que aumenta la posibilidad que se encuentre biológicamente activa o al menos que su actividad citotóxica este conservada. Lo último ha sido posible debido a que el gen de interés fue expresado junto con un *tag* de fusión tiorredoxina (Trx) incluido en el vector de expresión. Se ha demostrado que la proteína tiorredoxina (11.7 KDa) aumenta la eficiencia de la traducción y la solubilidad de proteínas heterólogas sintetizadas en el citoplasma de *E. coli* (LaVallie *et al.*, 1993).

El tiempo óptimo de expresión de la LktA fue determinado a las 5 horas de inducción con IPTG (1 mM). A este punto sólo se observaron especies de 105 KDa en forma soluble. Estudios previos demostraron la pérdida de la actividad de la leucotoxina debido a su degradación por proteasas extracelulares durante su crecimiento exponencial, liberándose cantidades variables de subunidades de bajo peso molecular (20KDa, 50 KDa y 95 KDa) antigénicamente similar a la especie de 105 KDa (Himmel *et al.*, 1982; Chang *et al.*, 1987). En nuestro caso, la pérdida de proteasas claves (lon y OmpT mutada) en la cepa *E. coli* BL21 Star™ (DE3) evitó la degradación de nuestra proteína heteróloga expresada, dejando posiblemente intacta su actividad citotóxica.

De esta manera, en el presente estudio, se logró clonar y expresar en forma soluble, a una variante de la leucotoxina de *M. haemolytica*, identificada mediante el enfoque Pan-Genómico de la vacunología reversa, siendo considerado un potencial candidato vacunal para inducir una protección heteróloga contra la pasteurelosis neumónica en bovinos, ovinos y alpacas. Análisis posteriores, incluyendo su purificación, así como ensayos *in vitro* e *in vivo* serán necesarios para confirmar su actividad biológica y protección cruzada.

7. CONCLUSIONES

1. El pangenoma de *M. haemolytica* es abierto y con una alta variabilidad genómica, estando compuesto de 4391 *clusters* de genes, de las cuales 1609 (37%) pertenece al genoma core y 2782 (63%) están incluidas en el genoma accesorio.
2. El genoma core de *M. haemolytica* incluye genes esenciales para supervivencia y funciones celulares, mientras el genoma accesorio le confiere una gran variedad de mecanismos de virulencia asociados a la infectividad, resistencia y letalidad.
3. El pangenoma de *M. haemolytica* presenta 33 potenciales candidatos vacunales, 10 en el genoma core y 23 en el genoma accesorio, incluyendo alta variación de secuencias.
4. La leucotoxina seleccionada en nuestro análisis forma parte del genoma accesorio y está presente en el 84% de las cepas virulentas de *M. haemolytica*, incluyendo la cepa A2 Ovino, compartiendo una identidad mayor al 80%.
5. El análisis filogenómico de SNPs ortólogos compartidos entre los 19 genomas de *M. haemolytica*, evidencia una correlación entre la filogenia y serotipos virulentos pero no con el hospedero.
6. Se logró la clonación y expresión heteróloga de un potencial candidato vacunal contra neumonía en alpacas.

8. RECOMENDACIONES

1. A pesar que el enfoque Pan-genómico de la vacunología reversa, es útil en la búsqueda rápida y eficaz de candidatos vacunales, es necesario combinar diversos enfoques genómicos: como el enfoque genómico funcional y el enfoque genómico estructural, todos ellos soportado por estudios epidemiológicos moleculares para la selección de cepas representativas de un patógeno dado.
2. Se sugiere confirmar la expresión de la leucotoxina recombinante mediante el análisis de *Western blot*, utilizando anticuerpos monoclonales anti-Lkt contra las regiones inmunodominantes MAb 601 y 605, presente en la proteína.
3. Se recomienda la purificación, evaluación *in vitro* e *in vivo* y la búsqueda de anticuerpos neutralizantes para la leucotoxina seleccionada como candidato vacunal con el fin de confirmar su actividad citotóxica y su capacidad inmunoprotectora cruzada.
4. Se sugiere realizar la evaluación combinada de los otros candidatos vacunales seleccionados, en el genoma core y accesorio, para desarrollar una vacuna multivalente con protección heteróloga.
5. Se recomienda identificar los serotipos de *M. haemolytica* predominantes en casos de neumonía de alpacas; y secuenciar sus genomas para determinar los genes asociados a virulencia, comunes y únicos, que son claves en la patogénesis de la enfermedad.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ames TR, Markham RJ, Opuda-Asibo J, Leininger JR, Maheswaran SK. 1985. «Pulmonary response to intratracheal challenge with *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*.» *Canadian Journal of Comparative Medicine* 49 (4): 395-400.
- Ariel N, Zvi A, Grosfeld H, Gat O, Inbar Y, Velan B, Cohen S, Shafferman A. 2002. «Search for Potential Vaccine Candidate Open Reading Frames in the *Bacillus anthracis* Virulence Plasmid pXO1: In Silico and In Vitro Screening». *Infect. Immun.* 70 (12): 6817-27. doi:10.1128/IAI.70.12.6817-6827.2002
- Ayalew S, Confer AW, Blackwood ER. 2004. «Characterization of immunodominant and potentially protective epitopes of *Mannheimia haemolytica* serotype 1 outer membrane lipoprotein PlpE». *Infection and immunity* 72 (12): 7265.
- Ayalew S, Confer AW, Payton ME, Garrels KD, Shrestha B, Ingram KR, Montelongo MA, Taylor JD. 2008. «*Mannheimia haemolytica* chimeric protein vaccine composed of the major surface-exposed epitope of outer membrane lipoprotein PlpE and the neutralizing epitope of leukotoxin». *Vaccine* 26 (38): 4955-61. doi:10.1016/j.vaccine.2008.07.023.
- Bambini S, Rappuoli R. 2009. «The use of genomics in microbial vaccine development». *Drug discovery today* 14 (5-6): 252-60. doi:10.1016/j.drudis.2008.12.007.
- Baneyx F. 1999. «Recombinant protein expression in *Escherichia coli*». *Current Opinion in Biotechnology* 10 (5): 411-21. doi:10.1016/S0958-1669(99)00003-8.
- Baron C. 2006. «VirB8: A Conserved Type IV Secretion System Assembly Factor and Drug Target». *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 84 (6): 890-99. doi:10.1139/o06-148.
- Batra SA, Shanthalingam S, Munske GR, Raghavan B, Kugadas A, Bavanthasivam J, Highlander SK, Srikumaran S. 2015. «Acylation Enhances, but Is Not Required For, the Cytotoxic Activity of *Mannheimia Haemolytica* Leukotoxin in Bighorn Sheep». *Infection and Immunity* 83 (10): 3982-88. doi:10.1128/IAI.00733-15.
- Berggren KA, Baluyut CS, Simonson RR, Bemrick WJ, Maheswaran SK. 1981. «Cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica* on bovine neutrophils». *American journal of veterinary research* 42 (8): 1383-88.
- Bertrand JJ, West JT, Engel JN. 2010. «Genetic Analysis of the Regulation of Type IV Pilus Function by the Chp Chemosensory System of *Pseudomonas Aeruginosa*». *Journal of Bacteriology* 192 (4): 994-1010. doi:10.1128/JB.01390-09.

- Betts JC. 2002. «Transcriptomics and proteomics: tools for the identification of novel drug targets and vaccine candidates for tuberculosis». *IUBMB life* 53 (4-5): 239-42. doi:10.1080/15216540212651.
- Blackwell JR, Horgan R. 1991. «A Novel Strategy for Production of a Highly Expressed Recombinant Protein in an Active Form». *FEBS Letters* 295 (1-3): 10-12.
- Chang YF, Young R, Post D, Struck DK. 1987. «Identification and characterization of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin.» *Infection and Immunity* 55 (10): 2348-54.
- Cheng C, Shuman S. 2000. «Recombinogenic Flap Ligation Pathway for Intrinsic Repair of Topoisomerase IB-Induced Double-Strand Breaks». *Molecular and Cellular Biology* 20 (21): 8059-68.
- Chevallet M, Luche S, Rabilloud T. 2006. «Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels». *Nature Protocols* 1 (4): 1852-58. doi:10.1038/nprot.2006.288.
- Clinkenbeard KD, Mosier DA, Confer AW. 1989. «Effects of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin on isolated bovine neutrophils». *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology* 27 (7): 797-804.
- Clinkenbeard KD, Upton ML. 1991. «Lysis of bovine platelets by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin». *American journal of veterinary research* 52 (3): 453-57.
- Confer AW, Ayalew S, Montelongo M, Step DL, Wray JH, Hansen RD, Panciera RJ. 2009. «Immunity of cattle following vaccination with a *Mannheimia haemolytica* chimeric PlpE-LKT (SAC89) protein». *Vaccine* 27 (11): 1771–1776.
- Confer AW, Ayalew S, Panciera RJ, Montelongo M, Whitworth LS, Hammer JD. 2003. «Immunogenicity of recombinant *Mannheimia haemolytica* serotype 1 outer membrane protein PlpE and augmentation of a commercial vaccine». *Vaccine* 21 (21-22): 2821-29.
- Conlon JA, Shewen PE, Lo RY. 1991. «Efficacy of recombinant leukotoxin in protection against pneumonic challenge with live *Pasteurella haemolytica* A1.» *Infection and immunity* 59 (2): 587.
- Cooney BJ, Lo RY. 1993. «Three contiguous lipoprotein genes in *Pasteurella haemolytica* A1 which are homologous to a lipoprotein gene in *Haemophilus influenzae* type b». *Infection and Immunity* 61 (11): 4682-88.
- Correia FF, D'Onofrio A, Rejtar T, Li L, Karger BL, Makarova K, Koonin EV, Lewis K. 2006. «Kinase Activity of Overexpressed HipA Is Required for Growth Arrest and Multidrug Tolerance in *Escherichia Coli*». *Journal of Bacteriology* 188 (24): 8360-67. doi:10.1128/JB.01237-06.
- Crosby JA, Kachlany SC. 2007. «TdeA, a TolC-like protein required for toxin and drug export in *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*». *Gene* 388 (1-2): 83-92. doi:10.1016/j.gene.2006.10.004.

- Cruz WT, Young R, Chang YF, Struck DK. 1990. «Deletion analysis resolves cell-binding and lytic domains of the *Pasteurella leukotoxin*». *Molecular microbiology* 4 (11): 1933-39.
- Cudd L, Clarke C, Clinkenbeard K, Shelton M, Clinkenbeard P, Murphy G. 1999. «Role of intracellular calcium in *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced bovine neutrophil leukotriene B4 production and plasma membrane damage». *FEMS microbiology letters* 172 (2): 123-29.
- Davies RL, Donachie W. 1996. «Intra-Specific Diversity and Host Specificity within *Pasteurella Haemolytica* Based on Variation of Capsular Polysaccharide, Lipopolysaccharide and Outer-Membrane Proteins». *Microbiology (Reading, England)* 142 (Pt 7) (julio): 1895-1907. doi:10.1099/13500872-142-7-1895.
- Davies RL, Paster BJ, Dewhirst FE. 1996. «Phylogenetic Relationships and Diversity within the *Pasteurella Haemolytica* Complex Based on 16S rRNA Sequence Comparison and Outer Membrane Protein and Lipopolysaccharide Analysis». *International Journal of Systematic Bacteriology* 46 (3): 736-44. doi:10.1099/00207713-46-3-736.
- Davies RL, Arkinsaw S, Selander RK. 1997. «Evolutionary Genetics of *Pasteurella Haemolytica* Isolates Recovered from Cattle and Sheep». *Infection and Immunity* 65 (9): 3585-93.
- Davies RL, Whittam TS, Selander RK. 2001. «Sequence Diversity and Molecular Evolution of the Leukotoxin (lktA) Gene in Bovine and Ovine Strains of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*». *Journal of Bacteriology* 183 (4): 1394-1404. doi:10.1128/JB.183.4.1394-1404.2001.
- Davies RL, Baillie S. 2003. «Cytotoxic Activity of *Mannheimia Haemolytica* Strains in Relation to Diversity of the Leukotoxin Structural Gene lktA». *Veterinary Microbiology* 92 (3): 263-79.
- Davies RL, Lee I. 2004. «Sequence diversity and molecular evolution of the heat-modifiable outer membrane protein gene (ompA) of *Mannheimia(Pasteurella) haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, and *Pasteurella trehalosi*». *Journal of bacteriology* 186 (17): 5741-52. doi:10.1128/JB.186.17.5741-5752.2004.
- Donachie, W. 1995. «Vaccine Development Against *Pasteurella Haemolytica* Infections in Sheep». En *Haemophilus, Actinobacillus, and Pasteurella*, editado por W. Donachie, F. A. Lanson, y J. C. Hodgson, 25-37. Springer US. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4899-0978-7_3.
- Dubendorff JW, Studier FW. 1991. «Controlling Basal Expression in an Inducible T7 Expression System by Blocking the Target T7 Promoter with Lac Repressor». *Journal of Molecular Biology* 219 (1): 45-59.

- Eidam C, Poehlein A, Brenner Michael G, Kadlec K, Liesegang H, Brzuszkiewicz E, Daniel R, Sweeney MT, Murray RW, Watts JL, Schwarz S. 2013. «Complete Genome Sequence of *Mannheimia haemolytica* Strain 42548 from a Case of Bovine Respiratory Disease». *Genome Announcements* 1 (3). doi:10.1128/genomeA.00318-13.
- Eidam C, Poehlein A, Leimbach A, Michael GB, Kadlec K, Liesegang H, Daniel R, Sweeney MT, Murray RW, Watts JL, Schwarz S. 2015. «Analysis and Comparative Genomics of ICEMh1, a Novel Integrative and Conjugative Element (ICE) of *Mannheimia Haemolytica*». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (1): 93-97. doi:10.1093/jac/dku361.
- Enright AJ, Van Dongen S, Ouzounis CA. 2002. «An Efficient Algorithm for Large-Scale Detection of Protein Families». *Nucleic Acids Research* 30 (7): 1575-84.
- Esposito D, Chatterjee DK. 2006. «Enhancement of Soluble Protein Expression through the Use of Fusion Tags». *Current Opinion in Biotechnology* 17 (4): 353-58. doi:10.1016/j.copbio.2006.06.003.
- Etz H, Minh DB, Henics T, Dryla A, Winkler B, Triska C, Boyd AP, Söllner J, Schmidt W, von Ahsen U, Buschle M, Gill SR, Kolonay J, Khalak H, Fraser CM, von Gabain A, Nagy E, Meinke A. 2002. «Identification of in vivo expressed vaccine candidate antigens from *Staphylococcus aureus*». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (10): 6573-78. doi:10.1073/pnas.092569199.
- Ewers C, Lübke-Becker A, Wieler LH. 2004 «*Mannheimia haemolytica* and the pathogenesis of enzootic bronchopneumonia». *Berl Munch Tierarztl Wochenschr. Review. German. PubMed PMID: 15046457.*
- Fedorova ND, Highlander SK. 1997. «Generation of targeted nonpolar gene insertions and operon fusions in *Pasteurella haemolytica* and creation of a strain that produces and secretes inactive leukotoxin». *Infection and immunity* 65 (7): 2593-98.
- Foster JT, Beckstrom-Sternberg SM, Pearson T, Beckstrom-Sternberg JS, Chain PS, Roberto FF, Hnath J, Brettin T, Keim P.. 2009. «Whole-Genome-Based Phylogeny and Divergence of the Genus *Brucella*». *Journal of Bacteriology* 191 (8): 2864-70. doi:10.1128/JB.01581-08.
- Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W. 2012. «CD-HIT: Accelerated for Clustering the next-Generation Sequencing Data». *Bioinformatics* 28 (23): 3150-52. doi:10.1093/bioinformatics/bts565.
- Gamberini M, Gómez RM, Atzingen MV, Martins EA, Vasconcellos SA, Romero EC, Leite LC, Ho PL, Nascimento AL. 2005. «Whole-genome analysis of *Leptospira*

- interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis». *FEMS microbiology letters* 244 (2): 305-13. doi:10.1016/j.femsle.2005.02.004.
- Gentry MJ, Confer AW, Panciera RJ. 1985. «Serum neutralization of cytotoxin from *Pasteurella haemolytica*, serotype 1 and resistance to experimental bovine pneumonic pasteurellosis». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 9 (3): 239-50.
- Gentry MJ, Confer AW, Weinberg ED, Homer JT. 1986. «Cytotoxin (leukotoxin) production by *Pasteurella haemolytica*: requirement for an iron-containing compound». *American journal of veterinary research* 47 (9): 1919-23.
- Gileadi O, Burgess-Brown NA, Colebrook SM, Berridge G, Savitsky P, Smee CE, Loppnau P, Johansson C, Salah E, Pantic NH. 2008. «High Throughput Production of Recombinant Human Proteins for Crystallography». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 426: 221-46. doi:10.1007/978-1-60327-058-8_14.
- Gioia J1, Qin X, Jiang H, Clinkenbeard K, Lo R, Liu Y, Fox GE, Yerrapragada S, McLeod MP, McNeill TZ, Hemphill L, Sodergren E, Wang Q, Muzny DM, Homsí FJ, Weinstock GM, Highlander SK. 2006. «The Genome Sequence of *Mannheimia haemolytica* A1: Insights into Virulence, Natural Competence, and Pasteurellaceae Phylogeny». *Journal of Bacteriology* 188 (20): 7257-66. doi:10.1128/JB.00675-06.
- Gragerov A, Nudler E, Komissarova N, Gaitanaris GA, Gottesman ME, Nikiforov V. 1992. «Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ Heat Shock Proteins in Preventing Protein Misfolding in *Escherichia Coli*». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (21): 10341-44.
- Grant JR, Arantes AS, Stothard P. 2012. «Comparing Thousands of Circular Genomes Using the CGView Comparison Tool». *BMC Genomics* 13: 202. doi:10.1186/1471-2164-13-202.
- Guzmán-Brambila C, Quintero-Fabián S, González-Castillo C, de Obeso-Fernández del Valle Á, Flores-Samaniego B, de la Mora G, Rojas-Mayorquín AE, Ortuño-Sahagún D. 2012. «LKTA and PlpE small fragments fusion protein protect against *Mannheimia haemolytica* challenge». *Research in veterinary science* 93 (3): 1293-1300. doi:10.1016/j.rvsc.2012.07.004.
- Hauglund MJ, Tatum FM, Bayles DO, Maheswaran SK, Briggs RE. 2013. «Genome Sequences of *Mannheimia haemolytica* Serotype A1 Strains D153 and D193 from Bovine Pneumonia». *Genome Announcements* 1 (5). doi:10.1128/genomeA.00848-13.

- Hauglund MJ, Tatum FM, Bayles DO, Maheswaran SK, Briggs RE. 2015. «Genome Sequences of Serotype A6 *Mannheimia haemolytica* Isolates D174 and D38 Recovered from Bovine Pneumonia». *Genome Announcements* 3 (2). doi:10.1128/genomeA.00086-15.
- Hawari AD, Hassawi DS, Sweiss M. 2008. «Isolation and Identification of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in Sheep and Goats using Biochemical Tests and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis». *Journal of Biological Sciences* 8 (7): 1251-54. doi:10.3923/jbs.2008.1251.1254.
- He Y, Xiang Z, Mobley HL. 2010. «Vaxign: The First Web-Based Vaccine Design Program for Reverse Vaccinology and Applications for Vaccine Development». *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010. doi:10.1155/2010/297505.
- Highlander SK, Chidambaram M, Engler MJ, Weinstock GM. 1989. «DNA sequence of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin gene cluster». *DNA (Mary Ann Liebert, Inc.)* 8 (1): 15-28.
- Highlander SK, Engler MJ, Weinstock GM. 1990. «Secretion and expression of the *Pasteurella haemolytica* Leukotoxin.» *Journal of Bacteriology* 172 (5): 2343-50.
- Highlander SK, Fedorova ND, Dusek DM, Panciera R, Alvarez LE, Rinehart C. 2000. «Inactivation of *Pasteurella* (*Mannheimia*) *Haemolytica* Leukotoxin Causes Partial Attenuation of Virulence in a Calf Challenge Model». *Infection and Immunity* 68 (7): 3916-22. doi:10.1128/IAI.68.7.3916-3922.2000.
- Highlander SK. 2001. «Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia* (*pasteurella*) *haemolytica*». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 6 (septiembre): D1128-1150.
- Himmel ME, Yates MD, Lauerman LH, Squire PG. 1982. «Purification and Partial Characterization of a Macrophage Cytotoxin from *Pasteurella Haemolytica*». *American Journal of Veterinary Research* 43 (5): 764-67.
- Hsuan SL, Kannan MS, Jeyaseelan S, Prakash YS, Sieck GC, Maheswaran SK. 1998. «*Pasteurella haemolytica* A1-derived leukotoxin and endotoxin induce intracellular calcium elevation in bovine alveolar macrophages by different signaling pathways». *Infection and immunity* 66 (6): 2836-44.
- Hsuan SL, Kannan MS, Jeyaseelan S, Prakash YS, Malazdrewich C, Abrahamsen MS, Sieck GC, Maheswaran SK. 1999a. «*Pasteurella haemolytica* leukotoxin and endotoxin induced cytokine gene expression in bovine alveolar macrophages requires NF-kappaB activation and calcium elevation». *Microbial pathogenesis* 26 (5): 263-73. doi:10.1006/mpat.1998.0271.
- Hsuan SL, Kannan MS, Jeyaseelan S, Prakash YS, Malazdrewich C, Abrahamsen MS, Sieck GC, Maheswaran SK. 1999b. «*Pasteurella haemolytica* leukotoxin and

- endotoxin induced cytokine gene expression in bovine alveolar macrophages requires NF- κ B activation and calcium elevation». *Microbial Pathogenesis* 26 (5): 263-73. doi:10.1006/mpat.1998.0271.
- Inatsuka CS, Steven MJ, Cotter PA. 2005. «Bordetella Filamentous Hemagglutinin Plays a Critical Role in Immunomodulation, Suggesting a Mechanism for Host Specificity». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (51): 18578-83. doi:10.1073/pnas.0507910102.
- Jeyaseelan S, Kannan MS, Briggs RE, Thumbikat P, Maheswaran SK. 2001. «*Mannheimia haemolytica* leukotoxin activates a nonreceptor tyrosine kinase signaling cascade in bovine leukocytes, which induces biological effects». *Infection and immunity* 69 (10): 6131-39. doi:10.1128/IAI.69.10.6131-6139.2001.
- Jeyaseelan S, Sreevatsan S, Maheswaran SK. 2002. «Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis». *Animal Health Research Reviews* 3 (2): 69–82.
- Juscamayta J. 2013. Análisis genómico de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 para la identificación de potenciales candidatos vacunales contra neumonía. Tesis de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos.
- Kanehisa M, Sato Y, Morishima K. 2016. «BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences». *Journal of Molecular Biology, Computation Resources for Molecular Biology*, 428 (4): 726-31. doi:10.1016/j.jmb.2015.11.006.
- Käsbohrer A, Gelderblom HR, Arasteh K, Heise W, Grosse G, L'age M, Schönberg A, Koch MA, Pauli G. 1990. «Intestinal spirochetosis in HIV infection: prevalence, isolation and morphology of spirochetes». *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 115 (40): 1499-1506. doi:10.1055/s-2008-1065183.
- Klima CL, Cook SR, Zaheer R, Laing C, Gannon VP, Xu Y, Rasmussen J, Potter A, Hendrick S, Alexander TW, McAllister TA. 2016. «Comparative Genomic Analysis of *Mannheimia haemolytica* from Bovine Sources». *PLoS ONE* 11 (2). doi:10.1371/journal.pone.0149520.
- Knapp S, Oppermann U, Arrowsmith C, Hui R, Ming J, Dhe-Paganon S, Park HW, *et al.* 2008. «Protein Production and Purification». *Nature Methods* 5 (2): 135-46. doi: 10.1038/nmeth.f.202 doi: 10.1038/nmeth.f.202.
- Koronakis V, Cross M, Hughes C. 1989. «Transcription antitermination in an *Escherichia coli* haemolysin operon is directed progressively by cis-acting DNA sequences upstream of the promoter region». *Molecular microbiology* 3 (10): 1397-1404.

- Lacasta D, Ferrer LM, Ramos JJ, González JM, Ortín A, Fthenakis GC. 2015. «Vaccination Schedules in Small Ruminant Farms». *Veterinary Microbiology* 181 (1-2): 34-46. doi:10.1016/j.vetmic.2015.07.018.
- Laemmli UK. 1970. «Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4». *Nature* 227 (5259): 680-85.
- Lapierre P, Gogarten JP. 2009. «Estimating the Size of the Bacterial Pan-Genome». *Trends in Genetics: TIG* 25 (3): 107-10. doi:10.1016/j.tig.2008.12.004.
- LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF, McCoy JM. 1993. «A Thioredoxin Gene Fusion Expression System That Circumvents Inclusion Body Formation in the *E. Coli* Cytoplasm». *Bio/Technology (Nature Publishing Company)* 11 (2): 187-93.
- Lawrence PK, Kittichotirat W, Bumgarner RE, McDermott JE, Herndon DR, Knowles DP, Srikumaran S. 2009. «Genome Sequences of *Mannheimia haemolytica* Serotype A2: Ovine and Bovine Isolates». *Journal of Bacteriology* 192 (diciembre): 1167-68. doi:10.1128/JB.01527-09.
- Lee CW, Shewen PE, Cladman WM, Conlon JA, Mellors A, Lo RY. 1994. «Sialoglycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1: detection of antisialoglycoprotease antibodies in sera of calves». *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Vétérinaire* 58 (2): 93-98.
- Lee I, Davies RL. 2011. «Evidence for a Common Gene Pool and Frequent Recombinational Exchange of the *tbpBA* Operon in *Mannheimia Haemolytica*, *Mannheimia Glucosida* and *Bibersteinia Trehalosi*». *Microbiology (Reading, England)* 157 (Pt 1): 123-35. doi:10.1099/mic.0.041236-0.
- Lo RY, Strathdee CA, Shewen PE. 1987. «Nucleotide sequence of the leukotoxin genes of *Pasteurella haemolytica* A1.» *Infection and Immunity* 55 (9): 1987-96.
- Lo RY, Strathdee CA, Shewen PE, y Cooney BJ. 1991. «Molecular studies of Ssa1, a serotype-specific antigen of *Pasteurella haemolytica* A1». *Infection and Immunity* 59 (10): 3398-3406.
- Löytynoja A. 2014. «Phylogeny-Aware Alignment with PRANK». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1079: 155-70. doi:10.1007/978-1-62703-646-7_10.
- Lubbers BV, Gregg AH. 2013. «Antimicrobial Multidrug Resistance and Coresistance Patterns of *Mannheimia Haemolytica* Isolated from Bovine Respiratory Disease Cases-a Three-Year (2009–2011) Retrospective Analysis». *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25 (3): 413-17. doi:10.1177/1040638713485227.
- Madampage CA, Rawlyk N, Crockford G, Wang Y, White AP, Brownlie R, Van Donkersgoed J, Dorin C, Potter A. 2015. «Reverse Vaccinology as an Approach

- for Developing *Histophilus Somni* Vaccine Candidates». *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization* 43 (6): 444-51. doi:10.1016/j.biologicals.2015.09.001.
- Maheswaran SK, Berggren KA, Simonson RR, Ward GE, Muscoplat CC. 1980. «Kinetics of interaction and fate of *Pasteurella hemolytica* in bovine alveolar macrophages». *Infection and immunity* 30 (1): 254-62.
- Maheswaran SK, Kannan MS, Weiss DJ, Reddy KR, Townsend EL, Yoo HS, Lee BW, Whiteley LO. 1993. «Enhancement of neutrophil-mediated injury to bovine pulmonary endothelial cells by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin». *Infection and immunity* 61 (6): 2618-25.
- Maheswaran SK, Weiss DJ, Kannan MS, Townsend EL, Reddy KR, Whiteley LO, Srikumaran S. 1992. «Effects of *Pasteurella haemolytica* A1 leukotoxin on bovine neutrophils: degranulation and generation of oxygen-derived free radicals». *Veterinary immunology and immunopathology* 33 (1-2): 51-68.
- Mahmoudi S, Mamishi S, Ghazi M, Hosseinpour Sadeghi R, Pourakbari B. 2013. «Cloning, expression and purification of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 and CFP-10 antigens». *Iranian Journal of Microbiology* 5 (4): 374-78.
- Maione D, Margarit I, Rinaudo CD, Massignani V, Mora M, Scarselli M, Tettelin H, Brettoni C, Iacobini ET, Rosini R, et al. 2005. «Identification of a Universal Group B Streptococcus Vaccine by Multiple Genome Screen». *Science (New York, N.Y.)* 309 (5731): 148-50. doi:10.1126/science.1109869.
- Makovets S. 2013. *DNA Electrophoresis*. Vol. 1054. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. <http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-565-1>.
- Malhotra A. 2011. «Reprint of: Tagging for Protein Expression». *Protein Expression and Purification*, septiembre. doi:10.1016/j.pep.2011.08.023.
- Marciel AM, Highlander SK. 2001. «Use of operon fusions in *Mannheimia haemolytica* to identify environmental and cis-acting regulators of leukotoxin transcription». *Infection and immunity* 69 (10): 6231-39. doi:10.1128/IAI.69.10.6231-6239.2001.
- Medini D, Donati C, Tettelin H, Massignani V, Rappuoli R. 2005. «The microbial pan-genome». *Current opinion in genetics & development* 15 (6): 589-94. doi:10.1016/j.gde.2005.09.006.
- Mohamed RA, Abdelsalam EB. 2008. «A review on pneumonic pasteurellosis (respiratory manheimiosis) with emphasis on pathogenesis, virulence mechanisms and predisposing factors». *Bulg J Vet Med* 11: 139–160.
- Montigiani S, Falugi F, Scarselli M, Finco O, Petracca R, Galli G, Mariani M, Manetti R, Agnusdei M, Cevenini R, Donati M, Nogarotto R, Norais N, Garaguso I, Nuti S,

- Saletti G, Rosa D, Ratti G, Grandi G. 2002. «Genomic approach for analysis of surface proteins in *Chlamydia pneumoniae*». *Infection and immunity* 70 (1): 368-79.
- Mora M, Veggi D, Santini L, Pizza M, Rappuoli R. 2003. «Reverse vaccinology». *Drug discovery today* 8 (10): 459-64.
- Morton RJ, Simons KR, Confer AW. 1996. «Major Outer Membrane Proteins of *Pasteurella Haemolytica* Serovars 1-15: Comparison of Separation Techniques and Surface-Exposed Proteins on Selected Serovars». *Veterinary Microbiology* 51 (3-4): 319-30.
- Mosquera-Rendón J, Rada-Bravo AM, Cárdenas-Brito S, Corredor M, Restrepo-Pineda E, Benítez-Páez A. 2016. «Pangenome-wide and molecular evolution analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* species». *BMC Genomics* 17 (enero). doi:10.1186/s12864-016-2364-4.
- Movahedi AR, Hampson DJ. 2008. «New ways to identify novel bacterial antigens for vaccine development». *Veterinary microbiology* 131 (1): 1–13.
- Narayanan SK, Nagaraja TG, Chengappa MM, Stewart GC. 2002. «Leukotoxins of gram-negative bacteria». *Veterinary microbiology* 84 (4): 337–356.
- Nardini PM, Mellors A, Lo RY. 1998. «Characterization of a fourth lipoprotein from *Pasteurella haemolytica* A1 and its homology to the OmpA family of outer membrane proteins». *FEMS Microbiology Letters* 165 (1): 71-77.
- Ogunnariwo JA, Woo TK, Lo RY, Gonzalez GC, Schryvers AB. 1997. «Characterization of the *Pasteurella haemolytica* transferrin receptor genes and the recombinant receptor proteins». *Microbial pathogenesis* 23 (5): 273-84. doi:10.1006/mpat.1997.0156.
- Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MT, Fookes M, Falush D, Keane JA, Parkhill J. 2015. «Roary: Rapid Large-Scale Prokaryote Pan Genome Analysis». *Bioinformatics* 31 (22): 3691-93. doi:10.1093/bioinformatics/btv421.
- Page AJ, Taylor B, Delaney AJ, Soares J, Seemann T, Keane JA, Harris SR. 2016. «SNP-Sites: Rapid Efficient Extraction of SNPs from Multi-FASTA Alignments». *bioRxiv*, enero, 38190. doi:10.1101/038190.
- Pavan ME, Pavan EE, Cairó FM, Pettinari MJ. 2016. «Expression and Refolding of the Protective Antigen of *Bacillus Anthracis*: A Model for High-Throughput Screening of Antigenic Recombinant Protein Refolding». *Revista Argentina De Microbiologia*, enero. doi:10.1016/j.ram.2015.10.004.
- Pizza M, Scarlato V, Massignani V, Giuliani MM, Aricò B, Comanducci M, Jennings GT, Baldi L, Bartolini E, Capecchi B, Galeotti CL, Luzzi E, Manetti R, Marchetti E, Mora M, Nuti S, Ratti G, Santini L, Savino S, Scarselli M, Storni E, Zuo P, Broecker

- M, Hundt E, Knapp B, Blair E, Mason T, Tettelin H, Hood DW, Jeffries AC, Saunders NJ, Granoff DM, Venter JC, Moxon ER, Grandi G, Rappuoli R. 2000. «Identification of Vaccine Candidates Against Serogroup B Meningococcus by Whole-Genome Sequencing». *Science* 287 (5459): 1816-20. doi:10.1126/science.287.5459.1816.
- Potter AA, Schryvers AB, Ogunnariwo JA, Hutchins WA, Lo RY, Watts T. 1999. «Protective capacity of the *Pasteurella haemolytica* transferrin-binding proteins TbpA and TbpB in cattle». *Microbial Pathogenesis* 27 (4): 197-206. doi:10.1006/mpat.1999.0297.
- Price MN, Dehal PS, Arkin AP. 2010. «FastTree 2--Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments». *PloS One* 5 (3): e9490. doi:10.1371/journal.pone.0009490.
- Purdy CW, Cooley JD, Straus DC. 1998. «Cross-Protection Studies with Three Serotypes of *Pasteurella Haemolytica* in the Goat Model». *Current Microbiology* 36 (4): 207-11.
- Rappuoli R. 2000. «Reverse vaccinology». *Current opinion in microbiology* 3 (5): 445-50.
- Rice JA, Carrasco-Medina L, Hodgins DC, Shewen PE. 2008. «*Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease». *Animal Health Research Reviews* 8 (2): 117–128.
- Romier C, Ben Jelloul M, Albeck S, Buchwald G, Busso D, Celie PH, Christodoulou E, De Marco V, van Gerwen S, Knipscheer P, Lebbink JH, Notenboom V, Poterszman A, Rochel N, Cohen SX, Unger T, Sussman JL, Moras D, Sixma TK, Perrakis A. 2006. «Co-Expression of Protein Complexes in Prokaryotic and Eukaryotic Hosts: Experimental Procedures, Database Tracking and Case Studies». *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 62 (Pt 10): 1232-42. doi:10.1107/S09074444906031003.
- Rosadio R, Cirilo E, Manchego A, Rivera H. 2011. «Respiratory syncytial and parainfluenza type 3 viruses coexisting with *Pasteurella multocida* and *Mannheimia hemolytica* in acute pneumonias of neonatal alpacas». *Small Ruminant Research*.
- Rosenberg AH, Lade BN, Chui DS, Lin SW, Dunn JJ, Studier FW. 1987. «Vectors for Selective Expression of Cloned DNAs by T7 RNA Polymerase». *Gene* 56 (1): 125-35.
- Saadati M, Gibbs HA, Parton R, Coote JG. 1997. «Characterisation of the leukotoxin produced by different strains of *Pasteurella haemolytica*». *Journal of medical microbiology* 46 (4): 276.

- Sambrook J, Fritschi EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samson JE, Spinelli S, Cambillau C, Moineau S. 2013. «Structure and Activity of AbiQ, a Lactococcal Endoribonuclease Belonging to the Type III Toxin-Antitoxin System». *Molecular Microbiology* 87 (4): 756-68. doi:10.1111/mmi.12129.
- Scarselli M, Giuliani MM, Adu-Bobie J, Pizza M, Rappuoli R. 2005. «The impact of genomics on vaccine design». *Trends in biotechnology* 23 (2): 84-91. doi:10.1016/j.tibtech.2004.12.008.
- Seemann T. 2014. «Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation». *Bioinformatics (Oxford, England)* 30 (14): 2068-69. doi:10.1093/bioinformatics/btu153.
- Serruto D, Rappuoli R. 2006. «Post-genomic vaccine development». *FEBS letters* 580 (12): 2985-92. doi:10.1016/j.febslet.2006.04.084.
- Shewen PE, Wilkie BN. 1985. «Evidence for the *Pasteurella haemolytica* cytotoxin as a product of actively growing bacteria». *American Journal of Veterinary Research* 46 (5): 1212-14.
- Shuman S. 1994. «Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (51): 32678-84.
- Singh K, Ritchey JW, Confer AW. 2011. «*Mannheimia haemolytica*: bacterial-host interactions in bovine pneumonia». *Veterinary Pathology* 48 (2): 338-48. doi:10.1177/0300985810377182.
- Sreevatsan S, Ames TR, Werdin RE, Yoo HS, Maheswaran SK. 1996. «Evaluation of three experimental subunit vaccines against pneumonic pasteurellosis in cattle». *Vaccine* 14 (2): 147–154.
- Srinand S, Hsuan SL, Yoo HS, Maheswaran SK, Ames TR, Werdin RE. 1996. «Comparative evaluation of antibodies induced by commercial *Pasteurella haemolytica* vaccines using solid phase immunoassays». *Veterinary microbiology* 49 (3-4): 181-95.
- Srinivasa Rao PS, Lim TM, Leung KY. 2003. «Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis». *Infection and immunity* 71 (3): 1343-51.
- Stevens PK, Czuprynski CJ. 1996. «*Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces bovine leukocytes to undergo morphologic changes consistent with apoptosis in vitro». *Infection and immunity* 64 (7): 2687-94.
- Strathdee CA, Lo RY. 1989a. «Cloning, nucleotide sequence, and characterization of genes encoding the secretion function of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant.» *Journal of Bacteriology* 171 (2): 916-28.

- Strathdee CA, Lo RY. 1989b. «Regulation of expression of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant». *Journal of bacteriology* 171 (11): 5955-62.
- Straus DC, Purdy CW, Loan RW, Briggs RF, Frank GH. 1998. «In vivo production of neuraminidase by *Pasteurella haemolytica* in market stressed cattle after natural infection». *Current Microbiology* 37 (4): 240-44.
- Studier FW, Moffatt BA. 1986. «Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes». *Journal of Molecular Biology* 189 (1): 113-30.
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. 1990. «Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes». *Methods in Enzymology* 185: 60-89.
- Sutherland AD. 1985. «Effects of *Pasteurella haemolytica* cytotoxin on ovine peripheral blood leucocytes and lymphocytes obtained from gastric lymph». *Veterinary microbiology* 10 (5): 431-38.
- Sutherland AD, Donachie W, Jones GE, Quirie M. 1989. «A Crude Cytotoxin Vaccine Protects Sheep against Experimental *Pasteurella Haemolytica* Serotype A2 Infection». *Veterinary Microbiology* 19 (2): 175-81.
- Tettelin H, Saunders NJ, Heidelberg J, Jeffries AC, Nelson KE, Eisen JA, Ketchum KA, Hood DW, Peden JF, Dodson RJ, et al. 2000. «Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B strain MC58». *Science (New York, N. Y.)* 287 (5459): 1809-15.
- Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, Eisen JA, Peterson S, Wessels MR, Paulsen IT, Nelson KE, Margarit I, Read TD, et al. 2002. «Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*» *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (19): 12391-96. doi:10.1073/pnas.182380799.
- Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, Angiuoli SV, Crabtree J, Jones AL, Durkin AS, et al. 2005. «Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial "pan-genome"». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (39): 13950-55. doi:10.1073/pnas.0506758102.
- Thomas JG, Baneyx f. 1996. «Protein Folding in the Cytoplasm of *Escherichia Coli*: Requirements for the DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES Molecular Chaperone Machines». *Molecular Microbiology* 21 (6): 1185-96.
- Timsit E, Christensen H, Bareille N, Seegers H, Bisgaard M, Assié S. 2013. «Transmission dynamics of *Mannheimia haemolytica* in newly-received beef

- bulls at fattening operations». *Veterinary Microbiology* 161 (3–4): 295-304. doi:10.1016/j.vetmic.2012.07.044.
- Unger T, Jacobovitch Y, Dantes A, Bernheim R, Peleg Y.. 2010. «Applications of the Restriction Free (RF) Cloning Procedure for Molecular Manipulations and Protein Expression». *Journal of Structural Biology* 172 (1): 34-44. doi:10.1016/j.jsb.2010.06.016.
- Valot B, Guyeux C, Rolland JY, Mazouzi K, Bertrand X, Hocquet D. 2015. «What It Takes to Be a *Pseudomonas Aeruginosa*? The Core Genome of the Opportunistic Pathogen Updated». *PloS One* 10 (5): e0126468. doi:10.1371/journal.pone.0126468.
- van den Ent F, Löwe J.. 2006. «RF Cloning: A Restriction-Free Method for Inserting Target Genes into Plasmids». *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 67 (1): 67-74. doi:10.1016/j.jbbm.2005.12.008.
- Vincentelli R, Bignon C, Gruez A, Canaan S, Sulzenbacher G, Tegoni M, Campanacci V, Cambillau C. 2003. «Medium-Scale Structural Genomics: Strategies for Protein Expression and Crystallization». *Accounts of Chemical Research* 36 (3): 165-72. doi:10.1021/ar010130s.
- Vytvytska O, Nagy E, Blüggel M, Meyer HE, Kurzbauer R, Huber LA, Klade CS. 2002. «Identification of vaccine candidate antigens of *Staphylococcus aureus* by serological proteome analysis». *Proteomics* 2 (5): 580-90. doi:10.1002/1615-9861(200205)2:5<580::AID-PROT580>3.0.CO;2-G.
- Wang BL, Xu Y, Wu CQ, Xu YM, Wang HH.. 2005. «Cloning, Expression, and Refolding of a Secretory Protein ESAT-6 of *Mycobacterium Tuberculosis*». *Protein Expression and Purification* 39 (2): 184-88. doi:10.1016/j.pep.2004.09.020.
- Wang Z, Clarke C, Clinkenbeard K. 1998. «*Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced increase in phospholipase A2 activity in bovine neutrophils». *Infection and immunity* 66 (5): 1885-90.
- Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. 2016. «Protein Methods, 2nd Edition». Wiley Accedido enero 27. <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0471118370.html>.
- Wizemann TM, Heinrichs JH, Adamou JE, Erwin AL, Kunsch C, Choi GH, Barash SC, Rosen CA, Masure HR, Tuomanen E, et al. 2001. «Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection». *Infection and immunity* 69 (3): 1593-98. doi:10.1128/IAI.69.3.1593-1598.2001.
- Yates WD. 1982. «A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle».

- Canadian journal of comparative medicine. Revue canadienne de médecine comparée* 46 (3): 225-63.
- Yin Y, Zhang F, Ling V, Arrowsmith CH. 1995. «Structural analysis and comparison of the C-terminal transport signal domains of hemolysin A and leukotoxin A». *FEBS letters* 366 (1): 1-5.
- Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. 2007. «Select What You Need: A Comparative Evaluation of the Advantages and Limitations of Frequently Used Expression Systems for Foreign Genes». *Journal of Biotechnology* 127 (3): 335-47. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.07.012.
- Yoo HS, Rutherford MS, Maheswaran SK, Srinand S, Ames TR. 1996. «Induction of nitric oxide production by bovine alveolar macrophages in response to *Pasteurella haemolytica* A1». *Microbial Pathogenesis* 20 (6): 361-75. doi:10.1006/mpat.1996.0034.
- Yoo HS, Maheswaran SK, Lin G, Townsend EL, Ames TR. 1995. «Induction of inflammatory cytokines in bovine alveolar macrophages following stimulation with *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide». *Infection and immunity* 63 (2): 381-88.
- Yumerefendi H, Tarendeau F, Mas PJ, Hart DJ. 2010. «ESPRIT: An Automated, Library-Based Method for Mapping and Soluble Expression of Protein Domains from Challenging Targets». *Journal of Structural Biology* 172 (1): 66-74. doi:10.1016/j.jsb.2010.02.021.
- Zhang J, Kaschiukovic T, White MF. 2012. «The CRISPR Associated Protein Cas4 Is a 5' to 3' DNA Exonuclease with an Iron-Sulfur Cluster». *PloS One* 7 (10): e47232. doi:10.1371/journal.pone.0047232.
- Zhang Z, Gildersleeve J, Yang YY, Xu R, Loo JA, Uryu S, Wong CH, Schultz PG. 2004. «A New Strategy for the Synthesis of Glycoproteins». *Science (New York, N.Y.)* 303 (5656): 371-73. doi:10.1126/science.1089509.

10. ANEXOS

Buffer lisis, pH 7.8

- 50 mM KH_2PO_4 y K_2HPO_4
- 400 mM NaCl
- 100 mM KCl
- 10% glycerol
- 0.5% Triton X-100
- 10 mM imidazol
- 1mg/ml lisozima

1. Ajustar el pH para 7.8, con HCl.
2. Almacenar a 4°C.

Buffer de muestra SDS-PAGE 2X

- 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 2.5 ml
- Glicerol (100%) 2.0 ml
- β -mercaptoetanol 0.4 ml
- Azul de bromofenol 0.02 g
- SDS 0.4 g

1. Completar hasta 10 ml con agua destilada estéril.
2. Almacenar a -20°C.

Buffer de muestra SDS-PAGE 1X

- 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 1.25 ml
- Glicerol (100%) 1.0 ml
- β -mercaptoetanol 0.2 ml
- Azul de bromofenol 0.01 g
- SDS 0.2 g

1. Completar hasta 10 ml con agua destilada estéril.
2. Almacenar a -20°C.

Buffer de corrida Tris-Glicina-SDS 10X (pH 8.3)

- Tris-base 30.3 g
- Glicina 144.0 g
- SDS 10.0 g

1. Completar hasta 1 L con agua destilada estéril.
2. Diluir hasta 1X con agua destilada estéril, según necesidades.
3. Almacenar a 4°C.

Solución de fijación

Ácido acético glacial	10 ml
Etanol	30 ml

1. Completar con agua destilada estéril (H₂O_d) hasta 100ml.

Solución de Tiosulfato 0.02%

Tiosulfato de Na pentaH	0.02 g
H ₂ O _d	100 ml

Solución de tinción (Nitrato de Plata 0.2%)

Nitrato de plata	0.2 g
H ₂ O _d	100 ml

1. Una vez preparado cubrirlo de la luz, utilizarlo en la oscuridad.

Solución reveladora

Carbonato de Sodio	3 g
Formaldehido 37%	250 µl
Tiosulfato 0.02%	125 µl
H ₂ O _d	hasta 100 ml

Solución de parada

Tris	4 g
Ácido acético glacial	2 ml
H ₂ O _d	hasta 100 ml



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA



Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú - RIVEP

CONSTANCIA

La Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú (RIVEP) hace constar por intermedio de la presente que el artículo científico que lleva por título:

ANÁLISIS GENÓMICO DE MANNHEIMIA HAEMOLYTICA SEROTIPO A2 PARA LA IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES CANDIDATOS VACUNALES CONTRA LA NEUMONÍA EN ALPACAS

cuyos autores son: Eduardo Juscamayta L., Lenin Maturrano H., Raúl Rosadio A.

ha sido aceptado y ser@publicado en el Volumen 28, Número 2, correspondiente a la edición Abril-Junio de 2017 de la RIVEP.

Se hace entrega de la presente constancia a solicitud de los interesados y para los fines que consideren convenientes.

Lima, 7 de diciembre de 2016

Dr. Mario García Podestá
Editor Adjunto