

**Proteínas de membrana externa de
Moraxella bovis y *Moraxella bovoculi*
como componentes de vacunas contra la
queratoconjuntivitis bovina**

Sofía Acquistapace

**Tesis de grado
Licenciatura en Bioquímica**

**Tutor: Dr. Pablo Zunino
Departamento de Microbiología
Instituto de Investigaciones
Biológicas Clemente Estable**

**2014
Montevideo-Uruguay**



ÍNDICE

	Página
ÍNDICE.....	1
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB).....	4
Signos clínicos asociados a la QIB.....	4
Transmisión.....	5
Factores asociados a la patogénesis.....	5
Agentes etiológicos.....	6
<i>Moraxella bovis</i>	6
<i>Moraxella bovoculi</i>	7
Factores de virulencia.....	7
Fimbrias.....	8
Sistemas de adquisición de hierro.....	9
Proteínas de membrana externa (PME).....	9
Citotoxina.....	10
Tratamiento.....	11
Prevención.....	12
Vacunas.....	12
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	16
Extracción de PME.....	17
Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	18
Cuantificación de PME.....	18
Espectrometría de masas (MALDI TOF/TOF).....	19
Western blot.....	20
Extracción de ADN.....	21
Reacción de cadena de la polimerasa (PCR).....	21

Electroforesis en geles de agarosa.....	25
Secuenciación.....	25
RESULTADOS.....	26
Extracción de PME y análisis de diversidad de los perfiles entre las cepas de <i>Moraxella</i> spp.....	26
Identificación de proteínas por espectrometría de masas.....	28
Inmunogenicidad de PME.....	32
Amplificación por PCR del gen que codifica para la PME-CD.....	35
<i>Primers</i> OMP-F y OMP-R diseñados a partir de <i>M. catarrhalis</i>	35
<i>Primers</i> degenerados ompCD-F y ompCD-R diseñados a partir de <i>M. catarrhalis</i>	36
<i>Primers</i> Draft2-F y Draft2-R diseñados a partir de secuencia preliminar del genoma de la cepa de referencia Epp63 de <i>M. bovis</i>	37
<i>Primers</i> OMPCD_IntF y OMPCD_IntR diseñados a partir del alineamiento múltiple entre las secuencias obtenidas con los <i>primers</i> Draft2.....	38
Secuenciación de los fragmentos de ADN de interés.....	39
Comparación de las secuencias.....	40
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIÓN.....	48
PERSPECTIVAS.....	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXO.....	58
Anexo 1.....	58
Anexo 2.....	64

RESUMEN

La Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB) es una frecuente enfermedad ocular que afecta al ganado, y se manifiesta a través de ulceraciones corneales, edemas, fotofobia y lagrimeo intenso, pudiendo ocasionar la ruptura de la cornea y ceguera permanente. Varios agentes etiológicos están asociados a la QIB, como *M. bovis*, *M. bovoculi* y *M. ovis*. La QIB se encuentra distribuida mundialmente y se ha convertido en un grave problema económico y sanitario, lo que ha llevado a procurar desarrollar vacunas efectivas para su prevención. Actualmente, las vacunas comerciales están elaboradas en base a fimbrias o a bacterinas, y en general proveen una protección. En vista de la importancia que tienen las proteínas de membrana externa (PME) para la supervivencia bacteriana, se podría pensar en considerarlas como posibles componentes de vacunas. Los objetivos de este trabajo consistieron en evaluar la diversidad de las PME de una colección de cepas de *M. bovis* y *M. bovoculi* aisladas de casos clínicos en Uruguay, su posible papel en la patogenicidad y su potencial como componentes de vacunas.

En primer lugar, se extrajeron las PME de cepas de *M. bovis* y *M. bovoculi*, se evaluó la diversidad de sus perfiles y se seleccionó una cepa de cada especie para estudios de espectrometría de masas. Posteriormente se evaluó la reactividad de las PME frente a sueros y lágrimas de bovinos no infectados e infectados con *Moraxella* spp. Además, se amplificó la secuencia del gen que codifica una PME común en *M. bovis* y *M. bovoculi*.

Los perfiles de PME de las cepas analizadas de *M. bovis* y *M. bovoculi* presentaron una alta diversidad intraespecífica. De acuerdo a los resultados de inmunogenicidad de las PME y la presencia de una proteína inmunogénica de similar peso molecular, se deduce la posibilidad de que esta proteína (posible PME-CD) sea una proteína de interés como componente vacunal. El gen que codifica para esta PME fue amplificado en la mayoría de las cepas estudiadas, y se encontraron regiones altamente conservadas las cuales serían potenciales epítopes.

Todos estos resultados podrían indicar que la PME-CD podría tener un papel en la patogenicidad y ser un potencial componente de vacunas contra QIB.

INTRODUCCIÓN

Queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB)

La QIB constituye la enfermedad ocular más frecuente en bovinos (Baptista, 1979; McConnel *et al.*, 2007). Es una enfermedad altamente contagiosa que si bien afecta animales jóvenes puede manifestarse en todas las categorías de bovinos (Punch, 1985). La QIB es una enfermedad raramente fatal, pero las pérdidas económicas asociadas son ampliamente conocidas. Entre ellas encontramos la disminución en la producción, el retraso en el crecimiento, la reducción en la producción de leche, los costos en tratamientos y la demanda de mano de obra (Pugh *et al.*, 1970; Thrift *et al.*, 1974).

Esta enfermedad está ampliamente presente en Uruguay y aunque no existen registros precisos, las pérdidas económicas son significativas. Como ejemplo, en Australia se estima que se pierden más de 22 millones de dólares anuales debido a la reducción de la producción asociada a QIB, con 1,5 millones de dólares que se gastan para el tratamiento (Brown *et al.*, 1998). En EEUU, mas de 10 millones de bovinos son afectados por QIB anualmente, con un pérdida económica estimada de más de \$US 150 millones (Ali *et al.*, 2012).

Signos clínicos asociados a la QIB

La QIB puede presentar un curso agudo, subagudo ó crónico, pudiendo afectar uno o ambos ojos (Punch, 1985). Con frecuencia, al principio un solo ojo se encuentra afectado, pudiendo ocurrir una infección cruzada, infectando también el otro ojo (Punch *et al.*, 1984). Los primeros síntomas en el bovino son lagrimeo intenso, fotofobia y blefaroespasmo, seguido uno o dos días de opacidad en el centro de la córnea, lo que puede evolucionar hasta la ulceración, ocasionando ceguera temporaria o permanente en uno o ambos ojos, descematocele y ruptura de la córnea (Brown *et al.*, 1998; Angelos, 2010a). Este proceso puede demorar una semana en progresar y en el transcurso de un mes se pueden constatar síntomas en prácticamente la totalidad del lote (Baptista, 1979).

Ciertos casos de QIB se resuelven espontáneamente (Alexander, 2010) y algunos animales logran recuperarse sin ningún daño permanente en el ojo (Hilton, 2002).

Transmisión

La conjuntiva del ojo bovino representa la puerta de entrada a las bacterias que son transportadas a través del polvo contaminado, de hierbas altas, de las descargas nasales y oculares o a través de la mosca de la cara (*Musca autumnalis*). Esta última es el vector más importante y se ha determinado que puede ser portadora de *Moraxella bovis* durante 3 días, pudiendo captarla y transmitirla a un animal vecino, y durante dos días puede permanecer en el tracto alimentario de la mosca de la cara (Glass *et al.*, 1982). Las moscas pueden también causar irritación superficial del ojo provocando lesiones y en consecuencia un aumento de la secreción de lágrimas (Brown *et al.*, 1998; Alexander, 2010; Hilton, 2002).

Factores asociados a la patogénesis

Asociados a los agentes etiológicos que tienen un papel determinante en la ocurrencia de QIB existen varios factores que están involucrados en la patogenicidad de esta enfermedad. Los más importantes incluyen ciertas características del bovino (edad, raza, sistema inmune, grado de pigmentación en los ojos, estado de stress), factores ambientales (viento, polvo, radiación solar, época del año) y biológicos (patógenos concurrentes, agentes etiológicos, y el ciclo de vida de la mosca de la cara) (Snowder *et al.*, 2005; Baptista, 1979).

La prevalencia de *M. bovis* aumenta gradualmente durante los meses de primavera (21,4 %) y verano (29,3 %). Esta prevalencia de QIB está precedida por los más altos valores de radiación ultravioleta (UV). De todas maneras, QIB puede ocurrir durante cualquier época del año, pero los brotes son más comunes durante los meses de verano (Smith *et al.*, 1990; Hughes *et al.*, 1970).

Existen variaciones entre la prevalencia de la enfermedad y raza afectada. En América del Sur, Aberdeen Angus y Charolais tienen una mayor prevalencia de QIB que las mismas razas en América del Norte y Australia. En EEUU, Hereford parece ser mas predisponente a QIB, mientras Brahma y Zebu o sus cruas, pertenecientes a la especie *Bos indicus*, son menos frecuentemente afectadas (Webber *et al.*, 1981b). En América del Sur, se sospecha que la falta de pigmentación periocular es un factor de riesgo importante para la QIB. La tasa de recuperación de *M. bovis* de las secreciones oculares de las vacas más jóvenes y de las adultas es similar, sin embargo, los animales más viejos tienen una menor prevalencia de la enfermedad clínica (Brown *et al.*, 1998).

Agentes etiológicos

M. bovis

M. bovis (Allen, 1919) es un cocobacilo Gram negativo, que pertenece a la familia *Moraxellaceae*, en la clase Proteobacteria (Pettersson *et al.*, 1998; Rosseau *et al.*, 1991; Alexander, 2010; Baptista, 1979). Es un patógeno oportunista encontrado en la conjuntiva y en las secreciones nasales de bovinos que carecen de síntomas o historia clínica de infección ocular (Pugh *et al.*, 1986). Durante décadas se consideró a *M. bovis* como el principal agente etiológico de QIB (Henson *et al.*, 1960; Hughes *et al.*, 1965). Más recientemente, en 2007 se identificó una nueva especie del género *Moraxella*, *Moraxella bovoculi*, muy cercana filogenéticamente a *M. bovis* y aislada de animales afectados con QIB en EEUU (Angelos *et al.*, 2007a), un tiempo después fue también identificada en Brasil por Libardoni *et al.* (2012) y en Uruguay por Sosa *et al.* (2012). Sin embargo, se ha establecido la existencia de otras especies pertenecientes al género *Moraxella*, *Moraxella ovis* (anteriormente denominada *Branhamella ovis*) y *M. bovoculi*, asociadas a casos de QIB, sugiriendo que tienen un rol en la patogenidad (Angelos, *et al.*, 2007c; Cerny *et al.*, 2006; Nagy *et al.*, 1989).

M. bovoculi

Durante el verano del 2002, en el norte de California, se tomaron muestras de 138 ojos de bovinos de entre 3 y 9 meses de edad con sintomatología clínica de QIB. Los exámenes microbiológicos permitieron aislar 29 cepas de *M. bovis* y 18 cepas β -hemolíticas con forma de cocos Gram negativos. Estas bacterias no identificadas se estudiaron genotípica y fenotípicamente, lo que permitió incluirlas en una nueva especie la que se denominó *M. bovoculi*. Las secuencias del ADNr 16S de estas 18 cepas presentaron un 99,9% de homología entre ellas. Se observó que la actividad fenilalanina desaminasa distinguía a *M. bovoculi* de *M. bovis* (fenilalanina desaminasa negativa) (Angelos *et al.*, 2007a). Tiempo después, estos mismos autores identificaron cepas de *M. bovoculi* con actividad fenilalanina desaminasa negativa, por lo cual consideran que para identificar especies de *Moraxella* se deben analizar las secuencias de los genes ribosomales (Angelos *et al.*, 2007c). En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se estudió la relación filogenética de una colección de aislamientos clínicos de *M. bovis* y *M. bovoculi* obtenidas en Uruguay en base a las secuencias codificantes de la subunidad 16S del RNA (ADNr 16S). Los resultados obtenidos permitieron establecer agrupamientos filogenéticos compuestos por las cepas de las diferentes especies de *Moraxella* spp. e identificar por primera vez en nuestro país la presencia de cepas de *M. bovoculi* asociados a casos de QIB. Esto indicaría que esta nueva especie ha estado circulando en nuestro país por lo menos desde 1983 y no estaba siendo correctamente identificada. Esto es también propuesto por Angelos (2010a) con respecto a EEUU. Estos resultados demuestran que *M. bovoculi* podría tener un rol importante en la patogenicidad de QIB (Sosa *et al.*, 2012).

Factores de virulencia

Diversos factores de virulencia se han asociado tradicionalmente a la patogenicidad de *M. bovis*, entre los que se encuentran la expresión de fimbrias, lipopolisacáridos (LPS), fosfolipasas, proteínas de membrana externa (PME), sistemas de

adquisición de hierro, enzimas proteolíticas e hidrolíticas así como una hemolisina (Postma *et al.*, 2008). Con respecto a *M. bovoculi* existen pocos estudios que vinculen factores de virulencia y patogenicidad. Hasta el momento sólo el operón RTX ha sido descrito en *M. bovoculi*, responsable de la actividad hemolítica en cepas de *M. bovis*, y se ha sugerido que el mismo podría estar implicado en la patogenicidad de esta especie bacteriana (Angelos *et al.*, 2007b).

Fimbrias

Las fimbrias son los factores de virulencia más estudiados. Son largos y finos apéndices presentes en las superficies de varias especies de bacterias Gram negativas y algunas bacterias Gram positivas (Simpson *et al.*, 1976). Están compuestas por subunidades polipeptídicas repetidas homólogas, que le permiten adherirse a la superficie corneal, mejorando así su capacidad de vencer los mecanismos de defensa del huésped (Lepper *et al.*, 1992; Ruehl *et al.*, 1993). Las fimbrias de *M. bovis* son clasificadas como fimbrias tipo IV (Dalrymple *et al.*, 1987) y se ha propuesto que las bacterias no fimbriales de *M. bovis* no serían patógenas (Jayappa *et al.*, 1986).

Análisis moleculares han demostrado que existen dos tipos funcionalmente distintos de fimbrias, denominados I (20KDa) y Q (17KDa) como resultado de la inversión de un segmento de ADN de 2,1 kb por mecanismos de recombinación específica de sitio (Marrs *et al.*, 1988). La fimbria Q favorecería la adhesión inicial del agente al tejido corneal bovino mientras que la tipo I promovería la persistencia local y el mantenimiento de la infección (Postma *et al.*, 2008). Se ha observado que cepas de *M. bovis* que expresan fimbrias de tipo Q serían más eficientes en establecer la infección y por lo tanto serían más patógenas que las cepas que expresan fimbrias de tipo I (Ruehl *et al.*, 1988, 1993).

La capacidad de *Moraxella* spp. de producir más de un tipo de fimbrias podría incrementar su habilidad para evadir las defensas del huésped ya que el cambio de un tipo a otro le conferiría una heterogeneidad antigénica frente al sistema inmune (Postma *et al.*, 2008; Angelos 2010b). Diversos autores han observado además la existencia de

numerosos serotipos de *Moraxella* determinados en base a antígenos fimbriales lo que genera una marcada diversidad antigénica entre cepas de estos patógenos e incorpora dificultades a la formulación de vacunas en base a antígenos fimbriales (Moore *et al.*, 1991).

Sistemas de adquisición de hierro

Se ha propuesto que *M. bovis* posee una alta afinidad por los sistemas de hierro, pudiendo captar el elemento de la lactoferrina bovina y transferrina por medio de PME que actúan como receptores específicos de superficie (Tsutomu *et al.*, 2003). Se ha observado que la expresión de estos receptores se ve incrementada cuando el crecimiento se produce en condiciones de disponibilidad de hierro limitada. Un mecanismo común para la adquisición de hierro consiste en la síntesis y secreción de sideróforos, pequeñas moléculas quelantes del hierro que compiten con las proteínas de unión a hierro del huésped. En *M. bovis* se ha estudiado que hay ligandos de alta afinidad al hierro pudiendo ser sideróforos (Fenwick *et al.*, 2002). Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la producción de sideróforos por parte de especies del género *Moraxella* (Postma *et al.*, 2008),

Proteínas de membrana externa (PME)

La membrana externa de las bacterias Gram-negativa consiste principalmente en fosfolípidos, lipopolisacáridos, y un grupo de PME, que forman aproximadamente el 50% de la masa de la membrana externa (Koebnik *et al.*, 2000). Las PME son expuestas en las superficies de las bacterias y funcionan principalmente como una interfaz dinámica entre la célula y su entorno, estando implicadas en el mantenimiento de la estructura celular, el transporte pasivo y activo, la adhesión a otras células, la unión de una variedad de sustancias, y resistencia a los antimicrobianos (Sun *et al.*, 2013). Además presentan también un rol esencial en la adaptación de las bacterias a los nichos del huésped, que

suelen ser hostiles a los patógenos invasores (Lin *et al.*, 2002). Las PME bacterianas más abundantes son las porinas que son esencialmente β -barriles triméricos formando canales con diversos grados de selectividad (Galdiero *et al.*, 2012). Su estructura, ubicación y el gran número en la superficie bacteriana le permite tener múltiples funciones (Achouak *et al.*, 2001). Las porinas de varias bacterias Gram negativas tienen un papel fundamental en la interacción huésped-patógeno, provocando diversas actividades proinflamatorias biológicas y respuesta inmune. De hecho, las porinas presentan una actividad biológica intrínseca cuando interacciona con las células eucariotas, pero también se comportan como antígenos estimulando la respuesta inmune (Galdiero *et al.*, 2012).

En la patogénesis bacteriana, tanto el contacto con la célula huésped, la adherencia, como la colonización son fundamentales para desarrollar una infección. Las PME que actúan como adhesinas se sabe que juegan un papel clave en la adhesión durante el proceso de infección. Además, estas moléculas podrían servir como candidatas a vacunas porque a menudo son esenciales para la infección y están localizadas en la superficie (Maiti *et al.*, 2012).

Por todo ello, las PME son consideradas antígenos útiles para el reconocimiento del patógeno por el sistema inmune del huésped, así como para la identificación clínica de la bacteria (Prieto *et al.* 1999).

Citotoxina

Diversos autores han propuesto que en la patogénesis de *M. bovis* también participa una exotoxina con propiedades de hemólisis calcio dependiente, corneotóxicas y leucotóxicas. Se trata de una citotoxina (100 KDa) que se encuentra altamente conservada en distintos aislamientos. Se ha determinado que es una β -hemolisina (MbxA) perteneciente a la familia RTX de exo-proteínas bacterianas y que se caracteriza por provocar la lisis celular al producir poros en la membrana citoplasmática promoviendo el

desarrollo de úlceras corneales (Angelos *et al.*, 2001; George *et al.*, 2007; Angelos *et al.*, 2014). Angelos y colaboradores (2003) identificaron y secuenciaron los genes que codifican las proteínas de *M. bovis* RTX C, B y D, que juntos forman un clásico operón RTX, designado mbx. Operones RTX completos han sido identificados en *M. bovoculi* y *M. ovis*; en *M. bovoculi* el operón fue denominado mbv, mientras que en *M. ovis* el operón fue denominado mov (Angelos *et al.*, 2007b).

Existe una correlación entre la capacidad de *M. bovis* de producir β -hemolisinas en Agar Sangre y la capacidad de este patógeno de producir la enfermedad clínica. Las cepas no hemolíticas de *M. bovis* no son patógenas para el bovino (Postma *et al.*, 2008). La citotoxina de *M. bovis* esta conservada geográficamente entre los aislamientos de *M. bovis*. Por lo tanto vacunas contra QIB que tienen MbxA como antígeno podrían ofrecer protección geográfica contra diversas cepas de *M. bovis* (Angelos, 2007e).

Tratamiento

Se han sugerido diversos tratamientos para la QIB, entre los que se destaca la terapia antimicrobiana, aunque esta no es efectiva al 100 % (Brown *et al.*, 1998). La terapia antimicrobiana consiste en administrar antibióticos por vía subconjuntiva o por vía tópica lo más temprano posible, una vez diagnosticada la enfermedad para evitar lesiones graves en la córnea del animal (Kibar *et al.*, 2005).

El tratamiento tópico mediante aerosoles, pomadas o ungüentos puede detener rápidamente los estadios temprano de la enfermedad (Alexander, 2010) pero no es ampliamente utilizado debido a que el manejo de un gran número de animales resulta poco práctico. Además causa irritación dolorosa provocando la secreción de lágrimas y reduciendo su efectividad (Brown *et al.*, 1998). Por ello, generalmente es necesario aplicar el tratamiento 2 o 3 veces al día (Kibar *et al.*, 2005).

Las vías parenteral sistémica o subconjuntiva son las más indicadas para tratar QIB (Shryock *et al.*, 1998), las inyecciones subconjuntivas son una manera económica de administrar antibióticos, como la penicilina G que es un antibiótico universal. La

oxitetraciclina es a menudo el segundo tratamiento de elección después de la penicilina, debido a que tiene como consecuencia la irritación a los tejidos del párpado superior y el aumento de la hinchazón en la zona afectada (Alexander, 2010). La tetraciclina es efectiva pero puede causar necrosis en el sitio de inyectado. Por otro lado, la oxitetraciclina intramuscular es más eficaz que la furazolidona aplicada tópicamente (Brown *et al*, 1998). El tratamiento sistémico incluye antibióticos y antiinflamatorios no esteroideos. Este tratamiento es más caro debido a la cantidad de medicamentos que se usan. A su vez, la velocidad y la seguridad de la administración, sin embargo, son superiores a la terapia tópica y subconjuntival. Varios agentes antimicrobianos son utilizados además de los ya mencionados, como por ejemplo florfenicol, tilmicosina, nitrofurazona, gentamicina y ceftiofur (Alexander, 2010; Shryock *et al.*, 1998).

Prevención

Las moscas de la cara son atraídas por las lágrimas secretadas en los casos de QIB. Un modo de prevenir esta enfermedad es reducir la exposición a las moscas, mediante el uso de pesticidas, alejar el ganado de las zonas arboladas o con agua estancada, pero esto es poco práctico. A su vez los árboles proporcionan sombra, lo cual puede ayudar a reducir el nocivo efecto de la luz UV (Alexander, 2010; Snowden *et al.*, 2005; Baptista 1979; Angelos, 2010b).

Hilton y colaboradores (2002) recomiendan llevar a cabo las siguientes prácticas de manejo para reducir la incidencia y gravedad de la QIB: cortar pastos altos para reducir la irritación de los ojos y también para evitar el contacto con el material vegetal contaminado con las lágrimas de los bovinos afectados, controlar las moscas con plaguicidas, proveer algún tipo de sombra para proteger a los bovinos de la exposición directa a la luz solar y la vacunación de bovinos.

Vacunas

La magnitud del problema sanitario originado por la QIB ha llevado a sectores académicos y técnicos a procurar desarrollar vacunas efectivas para prevenir la enfermedad. En la actualidad, las vacunas comerciales están elaboradas en base a fimbrias o a bacterinas (bacterias enteras inactivadas) cultivadas en condiciones que optimizan la expresión de fimbrias (Brown *et al*, 1998). Sin embargo, la protección asociada a las vacunas es variable. Esto se podría explicar por la elevada variabilidad de los antígenos fimbriales entre las cepas de *Moraxella* spp. causantes de QIB (Horsnell *et al*, 1987). Además, la presencia de múltiples serogrupos de fimbrias aumenta la variabilidad antigénica y puede dar lugar a un “switching” antigénico permitiéndole a *M. bovis* evadir la respuesta inmune del huésped en animales vacunados con fimbrias (Lepper *et al*, 1995). La vacunación con cepas homólogas reduce la prevalencia y severidad de la enfermedad, aunque es poco probable la prevención de la enfermedad en la totalidad de los animales. En cambio, cepas heterólogas contra QIB son menos efectivas (Brown *et al*, 1998).

Por lo tanto, debido a que las vacunas comerciales tienen una protección variable (Smith *et al*, 1990; Webber *et al*, 1981a) y sumado a que los tratamientos con antibióticos no son siempre exitosos erradicando la enfermedad (McConnel *et al*, 2007; Sargison *et al*, 1996), es importante buscar una estrategia alternativa para poder prevenir efectivamente la enfermedad, y es por esto que se han realizado estudios procurando desarrollar nuevas vacunas que sean efectivas.

Existen diferentes estudios sobre el desarrollo de vacunas constituidas por subunidades proteicas: de fimbrias purificadas mediante administración intranasal (Zbrun *et al*, 2012) y en base a citotoxina nativa (George *et al*, 2005), y de administración subcutánea de citotoxina recombinante de *M. bovis* (Angelos *et al*, 2004). Posteriores estudios se centraron aun más en la formulación de una vacuna con la citotoxina recombinante, en la cual se incluyeron fragmentos conservados de fimbrias de *M. bovis* (Angelos *et al*, 2007d) y una citotoxina recombinante de *M. bovoculi* (Angelos *et al*, 2012). Angelos y colaboradores (2010c) inmunizaron de forma subcutánea bovinos con una vacuna recombinante formada por subunidades del extremo carboxi-terminal de la

citotoxina de *M. bovoculi* (MbvA) junto al adyuvante ISCOM y evaluaron su capacidad de prevenir naturalmente la QIB. En los animales vacunados con MbvA se observó un aumento significativo de anticuerpos en suero, respecto a los animales que recibieron sólo adyuvante (control), aunque no se observaron diferencias significativas en la proporción de animales que desarrollaron úlceras de córnea. Recientemente se estudió una vacuna de administración por vía intranasal de una citotoxina recombinante de *M. bovis* combinada con un polímero muco-adhesivo (ácido poliacrílico) (Angelos *et al.*, 2014).

HIPÓTESIS

Las PME de *M. bovis* y *M. bovoculi* pueden ser consideradas como candidatas para vacunas contra la QIB en virtud de su papel en la biología y la patogenicidad bacteriana así como su posible limitada variabilidad antigénica entre cepas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la diversidad de las PME de una colección de cepas de *M. bovis* y *M. bovoculi* aisladas de casos clínicos en Uruguay, su posible inmunogenicidad y su potencial como componentes de vacunas.

Objetivos específicos

1. Extraer las PME de las cepas de *M. bovis* y *M. bovoculi*
2. Evaluar la diversidad en los perfiles de PME por medio de electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida.
3. Determinar la identidad de diferentes bandas de cepas representativas de los grupos mediante espectrometría de masa.
4. Evaluar la reactividad de las PME frente a sueros y lágrimas de bovinos no infectados e infectados con *Moraxella* spp.
5. Amplificar y secuenciar el gen de una PME común en *M. bovoculi* y *M. bovis* en distintas cepas de origen clínico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Se utilizó una colección de aislamientos bacterianos de origen clínico de 14 cepas de *M. bovis* y *M. bovoculi* obtenidas entre los años 2005 y 2009 de diferentes departamentos de Uruguay (Canelones, Cerro Largo, Flores, Maldonado, Paysandú, Rocha, Tacuarembó y Treinta y Tres), ampliamente caracterizadas en nuestro laboratorio (Sosa *et al.*, 2012). Se incluyeron 4 aislamientos obtenidos de un brote de QIB en el estado de Kansas, Estados Unidos, gentilmente cedidas por el Dr. Brad Fenwick (Kansas State University) (Tabla 1). En el estudio se incluyeron las cepas de referencia ATCC de *M. bovis* (EPP63) y *M. bovoculi* (BAA1259).

Las bacterias se cultivaron en forma rutinaria en infusión cerebro corazón (BHI) agar suplementado con 5 % de sangre ovina estéril (Agar Sangre) durante 24 hs a 37 °C. Los aislamientos se conservaron a -20 °C y a -80 °C en caldo BHI suplementado con glicerol al 15 %. Para la extracción de PME, las bacterias se cultivaron en el medio BHI durante 72 hs a 37 °C, con agitación.

Tabla 1. Aislamientos utilizados de *M. bovis* y *M. bovoculi* obtenidos de diferentes Departamentos de Uruguay (2005-2009) y EEUU (Kansas).

Aislamientos	Origen	Descripción (cepa)
CANIIB	Uy, Canelones (2009)	<i>M. bovis</i>
EV345	Uy, Maldonado (2006)	<i>M. bovis</i>
Fs327	EEUU, Kansas	<i>M. bovis</i>
Fs328	EEUU, Kansas	<i>M. bovis</i>
Fs330	EEUU, Kansas	<i>M. bovis</i>
LC190	Uy, Flores (2006)	<i>M. bovis</i>
5120	Uy, Paysandú (2009)	<i>M. bovis</i>
BM3B	Uy, Cerro Largo (2005)	<i>M. bovoculi</i>
Fs343	EEUU, Kansas	<i>M. bovoculi</i>
M1	Uy, Rocha (2009)	<i>M. bovoculi</i>
NIN1	Uy, Tacuarembó (2007)	<i>M. bovoculi</i>
PRO	Uy, Canelones (2007)	<i>M. bovoculi</i>
3A8	Uy, Treinta y Tres (2007)	<i>M. bovoculi</i>
EV458	Uy, Maldonado (2006)	<i>M. bovoculi</i>

Extracción de PME

Se estudiaron dos protocolos para la extracción de PME. Primeramente, se evaluó el protocolo descrito por Piccini *et al.* (1998), para la extracción de PME de *Proteus mirabilis* por tratamiento mecánico y centrifugación diferencial al que se le realizaron modificaciones para *M. bovis* y *M. bovoculi*. También se puso a punto el método descrito por Prieto *et al.* (1999) para la extracción de PME de *M. bovis*, al que se le realizaron modificaciones. Este último permitió obtener las PME por tratamiento con lisozima-shock térmico y posterior sonicado, con solubilización diferencial de envolturas celulares con Tritón X-100 (Schnaitman, 1971). Los distintos aislamientos se cultivaron en 100 mL de BHI a 37 °C durante 72 hs con agitación continua (New Brunswick Scientific. Excella E24 Incubator Shaker Series). A continuación las células del cultivo se lavaron con PBS, se concentraron por centrifugación (8000 x g, 15 minutos, 4 °C) en Centrifuga Thermo Scientific Sorvall RT1 Centrifuge, y luego se resuspendieron en buffer Tris 10 mM/EDTA 20 mM al que se le adicionó 100 µl de lisozima (9 mg/ml). La suspensión se homogeneizó y se incubó 1 h a temperatura ambiente (25 °C-30 °C). Luego se congeló a -80 °C, por 1 h (shock térmico) para romper las células. Luego de descongelar cada muestra se sonicó en hielo durante 4 minutos cada muestra con intervalos de 1 minuto, en modo pulsado a la máxima potencia permitida por el equipo (Ultrasonic Homogenizer, Cole-Parmer Instrument Co). Posteriormente se adicionaron 800 µl de MgCl₂ 80 mM, se centrifugaron a 10000 rpm, 10 minutos, 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y las membranas sedimentaron por centrifugación (20000 x g, 1 h, 4 °C). El pellet se resuspendió en 1 ml de buffer HEPES 10 mM/Tritón X-100 2 % y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. El material insoluble que quedó (PME) se sedimentó por centrifugación (20000 x g durante 1 h a 4 °C). El pellet final se resuspendió en 100 µl de H₂O bidestilada.

Finalmente, las PME se conservaron a -20 °C hasta su uso o se trataron con buffer de muestra de doble concentración si a continuación se realizaba un SDS-PAGE. Las PME

que se analizaron por espectrometría de masas fueron resuspendidas en Tris-HCl 10 mM, MgCl₂, Triton 2 % para su cuantificación, debido a que se requiere que las PME estén en un buffer con detergentes desde el momento en que se preparan.

Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para evaluar la diversidad de los perfiles de PME se utilizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Esta técnica fue realizada de acuerdo al protocolo de Sambrook y colaboradores (1989). Para la preparación se usó una relación de acrilamida/bisacrilamida de 29:1. El gel concentrador fue utilizado en todos los casos a una concentración final de acrilamida de 5 %. El gel separador se preparó a una concentración final de acrilamida de 12 %. La solución tampón utilizada para electroforesis fue Tris-glicina (Tris 0,3 %, glicina 1,9 %, SDS 1 %). La corrida electroforética se realizó en una cuba Mini Protean II de Bio-Rad a 100 V hasta que el frente de corrida llegó al gel separador y luego se continuó a 140 V.

Las proteínas se suspendieron en buffer de muestra al doble de su concentración (2x) para electroforesis en geles de acrilamida (Tris-HCl 125 mM, pH: 6,75, glicerol 20 %, SDS 4 %, β-mercaptoetanol 10 % y azul de bromofenol 0,01 %) y se solubilizaron por calentamiento a 100 °C durante 10 minutos. Las bandas proteicas se visualizaron por tinción de los geles con azul brillante de Coomassie (0,25 g de azul brillante de Coomassie en 90 ml de etanol absoluto al 50 % en agua destilada y 10 ml de ácido glacial) y posterior decoloración de los mismos con solución decolorante (etanol 25 %, ácido acético 8 %). Para la estimación del peso molecular de la proteína se empleó el marcador de peso molecular estándar de amplio rango de Bio-Rad.

Cuantificación de PME

La cuantificación de PME se realizó primeramente mediante el ensayo de Bradford basado en la unión del colorante Coomassie Blue a las proteínas, provocando un cambio

en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm (Bradford, 1976). Es un método sensible, rápido, económico y con pocas interferencias (sensible a detergentes y lípidos). Para la cuantificación de las PME se construyó una curva de calibración empleando como estándar albúmina sérica bovina (BSA) a diferentes concentraciones. El reactivo de Bradford se añadió, tanto a las muestras de la curva de calibración así como a las muestras de PME, los mismos se agitaron y se midió la absorbancia a 595 nm.

Debido a que las PME que fueron analizadas por espectrometría de masas requerían estar resuspendidas en un buffer con detergente, se las cuantificó empleando el ensayo de BCA (Ácido Bincocínico) (Smith *et al.*, 1985), basado en la reducción de iones de Cu^{2+} mediante la interacción con las proteínas bajo condiciones alcalinas. El BCA se une a los iones de Cu^{1+} y forman un producto coloreado (púrpura) que se puede medir espectrofotométricamente a 562 nm. Además de las ventajas ya señaladas, esta técnica muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos (tolera hasta en un 5 % al Tritón). Dicha cuantificación se realizó en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur de Montevideo previo a realizar la espectrometría de masas.

Espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF)

Una vez analizadas las preparaciones de PME por SDS-PAGE y en base a los patrones de bandas obtenidos, se seleccionó una cepa representativa de cada especie. Con el fin de determinar la identidad de las proteínas, las preparaciones de PME se analizaron en SDS-PAGE en dos dimensiones (2D) en el Servicio de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur de Montevideo.

Se identificaron las proteínas de interés y se extrajeron del gel donde fueron separadas. El siguiente paso consistió en la digestión de las proteínas mediante una proteasa específica (tripsina) que genera un conjunto de péptidos que se analizó por espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF). La identidad de los spots analizados se obtuvo analizando los resultados con el programa MASCOT (Matrix Science, London, UK) usando bases de datos públicas (NCBI).

Western blot

Con el fin de determinar qué PME se expresaban in vivo así como la inmunoreactividad de las distintas bandas, se realizaron ensayos de Western *blot* empleando sueros y lágrimas de terneros sanos y enfermos de QIB, de acuerdo al procedimiento clásico descrito por Towbin *et al.* (1979). Dichos sueros fueron cedidos gentilmente por el Dr. Carlos López Mazz obtenidos en el marco de las actividades de rutina que se llevan a cabo en la Estación Experimental Prof. Bernardo Rosengurtt (Cerro Largo, Fac. de Agronomía) y se encontraban conservados a -20 °C en nuestro Laboratorio.

Las lágrimas fueron colectadas por la Dra. Fabia Fernández con pipeta Pasteur estéril del lacrimal de cada animal, en el marco de un proyecto de investigación con Laboratorios Santa Elena SA. Las muestras se colectaron de animales con y sin síntomas de QIB. Las muestras se almacenaron a -20 °C en nuestro Laboratorio.

Las muestras de PME purificadas se separaron en geles de poliacrilamida al 12 %. Luego de realizadas las corridas electroforéticas, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 mm (Bio-Rad) utilizando una cuba de transferencia Mini Trans-blot (BioRad), a 100 V, 1 h. Luego de la transferencia se realizó el bloqueo con TBS-Tween (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, Tween 20 al 0,5 %)-Leche descremada (Conaprole) al 3% (p/v) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces en TBS-Tween y luego se las incubó con el suero (o lágrima según sea el caso) de un animal sano y otro correspondiente a un animal enfermo de QIB a una dilución 1/100 (1/200 para lágrimas) en TBS-T-1 % Leche descremada durante una hora a 37 °C con agitación. Las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween. El conjugado, anti-IgG de bovino acoplado a fofatasa alcalina se empleó en el caso de las muestras de suero (SIGMA, dilución 1/30.000 en TBS-Tween-1 % leche descremada) y anti-IgA de bovino acoplado a fofatasa alcalina para las muestras de lágrimas (SIGMA, dilución 1/10000), se incubó 45 minutos a 37 °C. Nuevamente se lavaron las membranas tres veces con TBS-Tween y se les agregó solución tampón (Tris 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM,

MgCl₂ 50 mM), 5-bromo-4-cloro-3-indoil fosfato (BCIP, 15 mg/ml) y nitro blue tetrazolium (NBT 30 mg/ml) como sustrato cromogénico de la fosfatasa alcalina. Las membranas se incubaron a temperatura ambiente hasta que las bandas fueran visibles, deteniéndose la reacción con una solución de EDTA al 0,05 % en agua destilada.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los pasos anteriores, se continuó el estudio en base a la PME-CD (50 KDa) que presentó una elevada homología con *M. catarrhalis* identificada por espectrometría de masas tanto en *M. bovoculi* como en *M. bovis*.

Extracción de ADN

El ADN de cada aislamiento se obtuvo resuspendiendo colonias aisladas, cultivadas durante toda la noche en medio BHI agar, en 1 mL de agua destilada estéril y llevando a ebullición la muestra durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 10000 x g durante 10 minutos para eliminar restos celulares y se utilizó el sobrenadante como ADN molde para PCR. La pureza del ADN se determinó empleando un espectrofotómetro para micro-volúmenes (Nanodrop).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Luego de identificar una PME (PME-CD) presente en los geles de SDS-PAGE 2D y su posterior análisis por MALDI-TOF/TOF en *M. bovis* y en *M. bovoculi*, se amplificó el gen de dicha PME mediante PCR convencional, para esto se utilizaron 4 pares de *primers*. La síntesis de los mismos se realizó en MacroGen Inc. (Corea del Sur, <http://www.macrogen.com/eng>).

Inicialmente se diseñaron *primers* (Tabla 2) en las regiones adyacentes al gen, 1588 pares de bases (pb), a partir de la secuencia conocida del genoma de *M. catarrhalis* (Número de acceso *Genbank*: L10755.1).

Tabla 2. Secuencias de los *primers* forward (OMP-F) y reverse (OMP-R) usados para la amplificación de la PME-CD.

<i>Primer</i>	Secuencia
OMP-F	5'-GCAGGTCAACGGATCGCTATGCTA-3'
OMP-R	5'-TGATTATTCAAAAGCTAAGAAAACCGC-3'

La amplificación de las muestras se realizó en un volumen total de 25 µl, conteniendo 1x PCR buffer, 1 U de *Taq* polimerasa (INVITROGEN), 0,2 mM de cada uno de los cuatro dNTPs, 3,5 mM MgCl₂, 0,5 µM de cada *primer*, y 1 µl de ADN. Como control negativo se utilizó agua bidestilada en lugar de ADN molde, realizados en paralelo a cada corrida. El termociclador utilizado fue el *Labnet International, Inc. MultiGene optimax* con las condiciones mostradas en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones utilizadas para realizar los análisis por PCR.

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	94	5
Desnaturalización	94	2
Hibridación	46	1
Extensión	72	1
Extensión final	72	10

30 ciclos

Debido a que los resultados no fueron los esperados, y además los *primers* estaban diseñados a partir de una especie diferente a *M. bovis* y *M. bovoculi*, se diseñaron *primers* degenerados sobre la base de datos de secuencias de genes homólogos relacionados y ya secuenciados como es el caso de *M. catarrhalis* (Lang *et al.*, 2011) en las regiones adyacentes al gen. Estos se degeneraron en la tercera base de cada codón con una “N” como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Secuencias de los *primers* degenerados forward (OmpCD-F) y reverse (OmpCD-R) usados para la amplificación de la PME-CD.

<i>Primer</i>	Secuencia
OmpCD-F	5'-CCTTGGAGGAATTTATGAANTTNAANAANATNG-3'
OmpCD-R	5'-CTCATGTGCAATTATTNAANAANCANATNTTNG G-3'

Las condiciones de la PCR se mantuvieron iguales que la anterior, a excepción de la temperatura de *annealing*, la cual se bajó a 40 °C, y la cantidad de *primers* se aumentó a 1 uL. Sin embargo, no se amplificó el tamaño esperado (1387 pb) en ningún caso, lo que llevó a diseñar nuevos *primers*.

En el transcurso del estudio se pudo acceder a la secuencia preliminar del genoma de la cepa de referencia Epp63 de *M. bovis* (<https://www.hgsc.bcm.edu/microbiome/moraxella-bovis-epp63>). Se realizó un análisis mediante BLAST de la secuencia preliminar de Epp63 con el gen de PME-CD de *M. catarrhalis*, resultando en diferentes *contigs*, el de menor *E value* fue seleccionado, mostrando los marcos abiertos de lectura. La identidad de dicha secuencia se confirmó por retroBLAST utilizando la base de datos de la NCBI. De ésta manera se obtuvo la secuencia nucleotídica del gen de PME-CD de *M. bovis*. A partir de dicha secuencia se diseñó un par de *primers* en regiones adyacentes al gen, denominado Draft2 (Tabla 5).

Tabla 5. Secuencias de los *primers* forward (Draft2-F) y reverse (Draft2-R) usados para la amplificación de la PME-CD.

<i>Primer</i>	Secuencia
Draft2-F	5'-CGAAACCATCCTTTGGAGG -3'
Draft2-R	5'-GAACTTACACAAAAGCTGTCTA-3'

Las condiciones de PCR se mantuvieron iguales a las utilizadas con los primeros *primers* utilizados (OMP-F y OMP-R), a excepción de la temperatura de *annealing*. Para los *primers* Draft2 la temperatura de *annealing* varió entre cepas, como se muestra en la tabla 6. Para el caso de los ADN de Epp63, Lc190 y EV345, todas *M. bovis*, se utilizó una temperatura de *annealing* de 56 °C. En cambio para los ADN de BAA1259, 3A8, Fs343 y PRO

(*M. bovoculi*) y CANIIIB (*M. bovis*) se utilizó una temperatura de *annealing* de 44 °C. El producto de amplificación esperado era de 1392 pb.

Tabla 6. Diferentes temperaturas de *annealing* utilizadas con los *primers* Draft2 según el ADN de la cepa analizada

	Draft2- T_{annealing}
<i>M. bovis</i>	
Epp63	56°C
Lc190	56°C
EV345	56°C
CANIIIB	44°C
<i>M. bovoculi</i>	
BAA1259	44°C
3A 8	44°C
Fs343	44 °C
PRO	44 °C

Finalmente, debido a que no todas las secuencias de ADN presentaron homología con la PME-CD de *M. catarrhalis*, se diseñó un nuevo par de *primers* denominados OMPCD_IntF y OMPCD_IntR (Tabla 7). Estos están ubicados en las regiones conservadas que se pudieron visualizar a partir de un alineamiento múltiple realizado con la herramienta informática BioEdit, una vez obtenidas las secuencias esperadas con los *primers* Draft2. Para el alineamiento de las secuencias se incluyó la secuencia preliminar del genoma de Epp63 original (Anexo 1).

Tabla 7. Secuencias de los *primers* forward (OMPCD_IntF) y reverse (OMPCD_IntR) situados en regiones conservadas en las secuencias con homología a la PME-CD de *M. catarrhalis*.

Primer	Secuencia
OMPCD_IntF	5'-AAGCTCACGACAAACACGTG-3'
OMPCD_IntR	5'-TACGGTAGGTGCCAAACGAC-3'

Las condiciones de PCR se mantuvieron iguales a las utilizadas con los *primers* usados anteriormente a excepción de la temperatura de *annealing* que en este caso fue de 59 °C, y el producto esperado de amplificación fue de 586 pb.

Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de PCR se analizaron mediante la electroforesis con geles de agarosa al 0,8 % en TBE (108 g Tris, 55 g ácido bórico, 40 ml EDTA 0,5 M pH 8,0). Los geles se prepararon utilizando 0,8 g de agarosa en 100 ml de buffer TBE 0,5X. Las bandas se visualizaron mediante tinción con Gelred 3X durante media hora, y se analizaron en un transiluminador de luz UV (Biometra T13) de donde se tomó registro fotográfico digital. Para estimar el tamaño y cantidad de ADN presente en las bandas se utilizó el marcador 1Kb plus (Fermentas).

Secuenciación

Para la determinación de la secuencia nucleotídica de los productos de PCR, se seleccionó la banda de acuerdo al tamaño esperado del fragmento según el par de *primers* utilizado. Estos productos se purificaron utilizando el *QIAquick Gel Extraction KiT* de QIAGEN de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El producto purificado se envió a MacroGen Inc. (Corea del Sur) para su secuenciación y algunos también fueron enviados al Instituto Pasteur de Montevideo (IPMont).

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y editadas empleando la herramienta informática BioEdit. Posteriormente, se las analizó en la herramienta informática BLAST buscando su homología en la base de datos del NCBI. Una vez hallada la homología con la PME-CD de *M. catarrhalis*, se realizó un alineamiento múltiple en BioEdit para analizar que regiones estaban conservadas entre las secuencias estudiadas.

Resultados

Extracción de PME y análisis de diversidad de los perfiles entre las cepas de *Moraxella* spp.

El protocolo de extracción de PME puesto a punto para *Proteus* spp. no permitió la correcta purificación de PME de las diferentes cepas de *Moraxella* spp. obteniéndose bandas poco definidas y con bajo rendimiento (Fig. 1). De esta forma, se puso a punto el método utilizado por Prieto *et al.* 1999 (Fig. 2) al que se le realizaron modificaciones. Se logró realizar la extracción de PME de 7 cepas de *M. bovis* (EV345, Lc190, CANIIB, Fs327, Fs330, Fs328, 5120) y de 7 cepas de *M. bovoculi* (PRO, Fs343, 3A8, M1, NIN1, BM3B, EV458) además de las cepas de referencia ATCC (Epp63 y BAA1259).

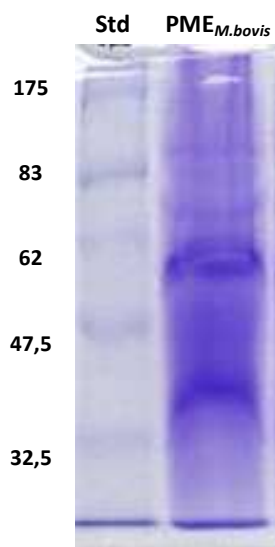


Figura 1. SDS-PAGE 12 % de las PME de *M. bovis*. Extracción de PME realizada con el protocolo para *Proteus* spp. Primer carril: marcador de peso molecular de amplio rango de Bio-Rad (kDa). Segundo carril: PME de *M. bovis*. No se obtiene una correcta purificación de PME.

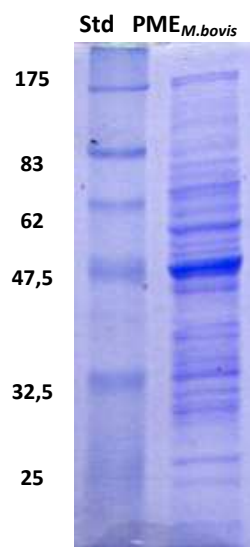


Figura 2. SDS-PAGE 12 % de las PME de *M. bovis*. Mejora en la extracción de PME realizado con el protocolo de Prieto *et al.*, 1999. Primer carril: marcador de peso molecular de amplio rango de Bio-Rad (kDa). Segundo carril: PME de *M. bovis*.

Se analizaron los perfiles de PME de *M. bovis* y *M. bovoculi* mediante electroforesis en SDS-PAGE 12 % y se compararon los distintos perfiles como se muestra en las figuras 3 y 4.

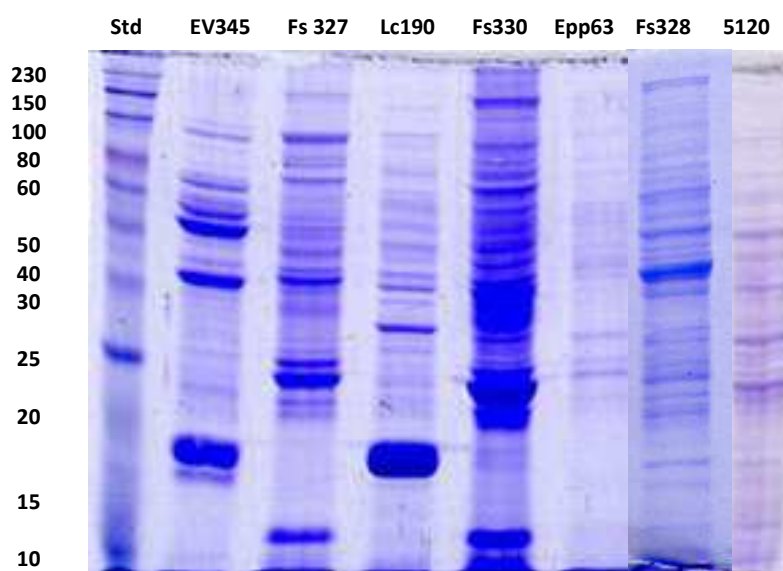


Figura 3. SDS-PAGE 12 % de PME de 7 cepas de *M. bovis*. Las PME purificadas se analizaron a través de un SDS-PAGE 12 % presentando una alta heterogeneidad entre ellas.

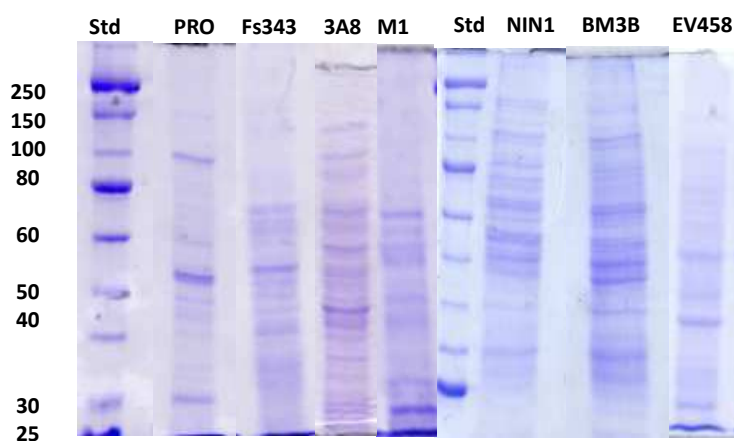


Figura 4. SDS-PAGE 12 % de PME de 7 cepas de *M. bovoculi*. Las PME obtenidas se analizaron a través de un SDS-PAGE 12 % presentando heterogeneidad entre ellas.

Dado que los patrones de bandas entre las diferentes cepas de una misma especie presentaron una elevada heterogeneidad, se seleccionaron dos cepas, una de cada especie, en base al alto rendimiento y definición que presentaron en los geles de poliacrilamida. A continuación se analizaron los perfiles de PME por medio de geles 2D y posterior espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF). Las extracciones de PME seleccionadas fueron de las cepas de CANIIB (*M. bovis*) y de BAA1259 (*M. bovoculi*) (Fig.5). Estos ensayos se realizaron en el Servicio de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur de Montevideo.

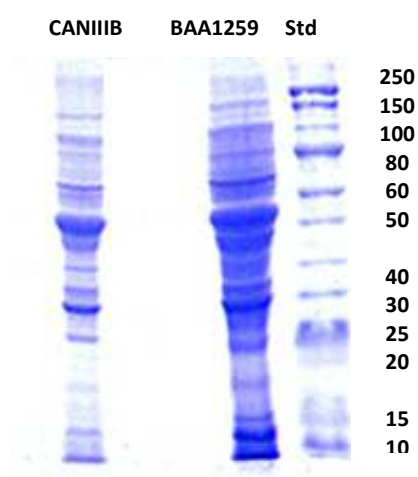


Figura 5. SDS-PAGE 12 % de PME de las dos cepas seleccionadas, CANIIB (*M.bovis*) y BAA1259 (*M.bovoculi*), para su posterior análisis por MALDI-TOF/TOF.

Identificación de proteínas por espectrometría de masas

La concentración proteica de ambas preparaciones de PME se cuantificó por el método de BCA en el Servicio de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur de Montevideo resultando las PME de CANIIB (*M. bovis*) de 0.3 µg/µl y de BAA1259 (*M. bovoculi*) de 0.2 µg/µl.

A continuación, se visualizaron las proteínas en un gel 2D, de las cuales se seleccionaron 7 *spots* en el gel de CANIIB (*M. bovis*) y 9 *spots* en el de BAA1259 (*M. bovoculi*), incluyendo aquellas que contenían ambas cepas y otras que se encontraban en una y no en la otra (Fig. 6). Estas proteínas se digirieron con tripsina y el extracto proteico resultante se identificó por MALDI-TOF/TOF (Tabla 7).

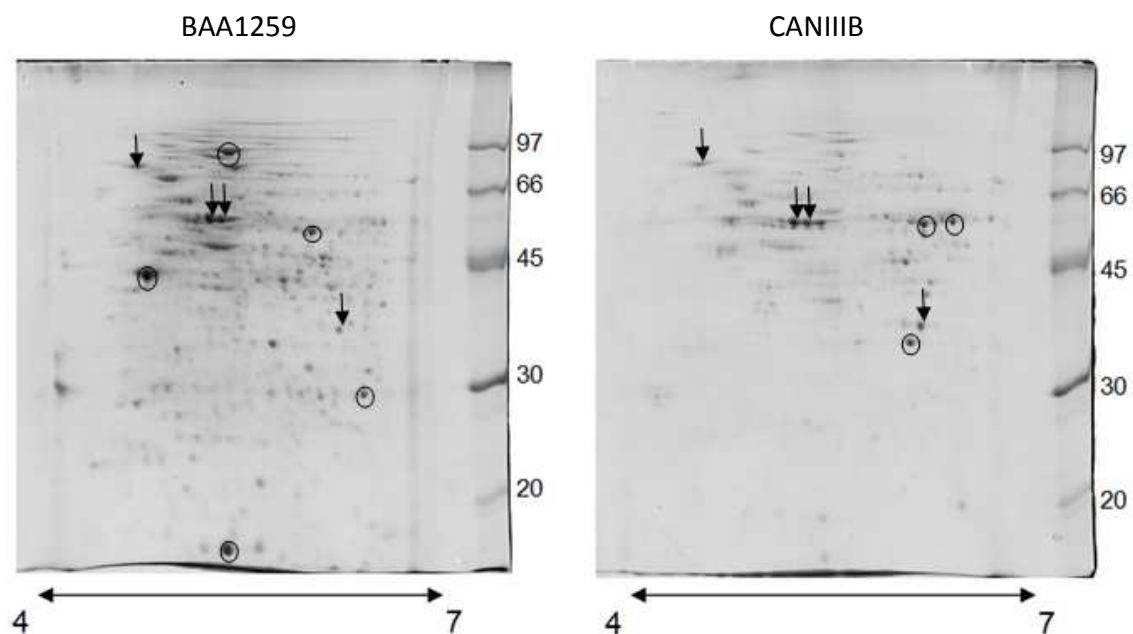


Figura 6. Perfiles 2D de BAA1259 y CANIIB. Con flechas se indica la selección de *spots* en común entre ambas cepas, y mediante círculos se señalan los *spots* diferenciales entre las dos especies. La óptima resolución electroforética fue en el rango de pH 4-7 en la primera dimensión como se indica debajo de cada gel.

Tabla 7. Identificación de proteínas de *M. bovis* y *M. bovoculi* por MALDI-TOF/TOF. En rojo se muestran las proteínas comunes a ambas extracciones.

Rótulo de la muestra	Masa molecular en el gel (kDa)	Proteína identificada por MALDI-TOF/TOF	Masa molecular teórica (kDa)
BAA1259-1	81	Chaperona DnaK (<i>Acinetobacter</i>)	69
BAA1259-2	57	Proteína de membrana externa CD (<i>Moraxella catarrhalis</i>)	47.9
BAA1259-3	57	Proteína de membrana externa CD (<i>Moraxella catarrhalis</i>)	45.8
BAA1259-4	36	Aminotransferasa de cadena ramificada (<i>Moraxella catarrhalis</i>)	34.6
BAA1259-5	43	Proteína de membrana externa omp38 (<i>Acinetobacter</i> spp.)	38
BAA1259-6	92	Chaperona Club ATP-dependiente (<i>Acinetobacter</i> spp.)	94
BAA1259-7	53	Dihidrolipoil deshidrogenasa (<i>Acinetobacter</i> spp)	51
BAA1259-8	30	Proteína hipotética F923_00870 (<i>Acinetobacter</i> spp.)	27
BAA1259-9	17	Proteína pequeña de shock térmico (<i>Acinetobacter</i> spp.)	17
CANIIIB -1	85	Chaperona DnaK (<i>Moraxella</i> spp.)	67
CANIIIB -2	57	Proteína de membrana externa CD (<i>Moraxella catarrhalis</i>)	45.8
CANIIIB -3	57	Proteína de membrana externa CD (<i>Moraxella catarrhalis</i> .)	45.8
CANIIIB-4	37	Aminotransferasa de cadena ramificada (<i>Moraxella catarrhalis</i> .)	34.6
CANIIIB-5	35	Proteína de membrana externa M35 (<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>)	38
CANIIIB-6	56	Componente de la piruvato deshidrogenasa E3 (dihidrolipoamida deshidrogenasa) (<i>Moraxella catarrhalis</i>)	51
CANIIIB-7	57	Hydrolasa Acetyl-CoA (<i>Moraxella catarrhalis</i>)	55

Tal como se indica en la Tabla 7, se identificaron porinas, otras PME, chaperonas y distintas enzimas que participan en el metabolismo (Tabla 4). Todas las proteínas seleccionadas presentaron homología con proteínas aisladas de *M. catarrhalis*, *Enhydrobacter aerosacus* o *Acinetobacter* spp.

Ambos extractos de PME de *M. bovis* y *M. bovoculi* presentaron cuatro proteínas en común. Una proteína presentó homología con la PME-CD de *M. catarrhalis* (45,8 KDa, con 427 aminoácidos (aa)), una exhibió homología con la aminotransferasa de cadena ramificada de *M. catarrhalis* (34,6 KDa con 310 aa), otra con la chaperona DnaK de *Moraxella* spp. (67KDa con 635 aa) y de *Acinetobacter* spp. (69KDa con 646 aa), y otra con homología a la dihidrolipoil deshidrogenasa de *Acinetobacter* spp. (51 KDa con 477 aa) y a la componente de la piruvato deshidrogenasa E3 (dihidrolipoamida deshidrogenasa) de *M. catarrhalis* (51 KDa con 482 aa).

El alineamiento realizado con la herramienta BLASTp, entre las secuencias aminoacídicas publicadas de las chaperonas DnaK de *Acinetobacter* spp. (Número de acceso *Genbank*: gi|262377673) y *Moraxella* spp. (Número de acceso *Genbank* gi|296112251) resultó en un 78% de identidad lo que indica que se trata de la misma proteína. De la misma manera, se realizó el alineamiento entre la dihidrolipoil deshidrogenasa de *Acinetobacter* spp (Número de acceso *Genbank*: gi|480165187) y la componente de la piruvato deshidrogenasa E3 (dihidrolipoamida deshidrogenasa) de *M. catarrhalis* (Número de acceso *Genbank*: gi|296112302) resultando en un 71 % de identidad, mostrando que se trata de la misma proteína.

Solamente dos proteínas estaban presentes en la preparación de PME de *M. bovis* y no fueron identificadas en *M. bovoculi* (una proteína con homología a la PME M35 de *Enhydrobacter aerosacus* y otra con homología a una hidrolasa Acetyl-CoA de *M. catarrhalis*).

Además, solamente cuatro proteínas estuvieron presentes en la preparación de *M. bovoculi* y no fueron detectadas en *M. bovis* (una proteína que presentaba homología con la PME omp38 de *Acinetobacter* spp., otra con una proteína pequeña de shock térmico de

Acinetobacter spp., una con la proteína hipotética F923_00870 de *Acinetobacter* spp., y finalmente una con la chaperona Club ATP-dependiente de *Acinetobacter* spp.

Inmunogenicidad de PME

Mediante la técnica Western *blot* se evaluó de forma indirecta la expresión *in vivo*, e inmunogenicidad de las PME de cuatro cepas de *M. bovis* (Epp63, Lc190, EV345, CANIIIB) y de cuatro cepas de *M. bovoculi* (BAA1259, 3A8, Fs343, PRO) seleccionadas al azar. Se utilizaron sueros de animales sanos (St0) y enfermos de QIB (Et0), evaluados anteriormente en el marco de un proyecto de investigación desarrollado en nuestro laboratorio, como se muestra en las figuras 7, 8 y 9. Estos animales de igual raza (Hereford), se encontraban en un mismo campo experimental y no habían sido previamente inmunizados contra ninguna enfermedad bacterial ni viral.

Por otro lado, la reactividad de las PME también fue evaluada por Western *blot* con muestras de lágrimas de un animal sano y otro enfermo (Fig. 10, 11 y 12). En todos los casos se observó una banda que, de acuerdo a su peso molecular (aproximadamente de 50 KDa) podría tratarse de la proteína que presenta homología con la PME-CD de *M. catarrhalis*, identificada por espectrometría de masas (figura 7, 8, 9, 10, 11 y 12).

Esta PME-CD es una de las principales PME de *M. catarrhalis* a la que se le han atribuido propiedades como para ser un buen antígeno (Hsiao *et al.*, 1995). En general, la reacción fue notoriamente más intensa en los enfermos que en los sanos. Particularmente, las PME de BAA1259 (*M. bovoculi*) evaluadas frente a muestras de lágrimas de un animal sano, no presentaron ninguna banda.

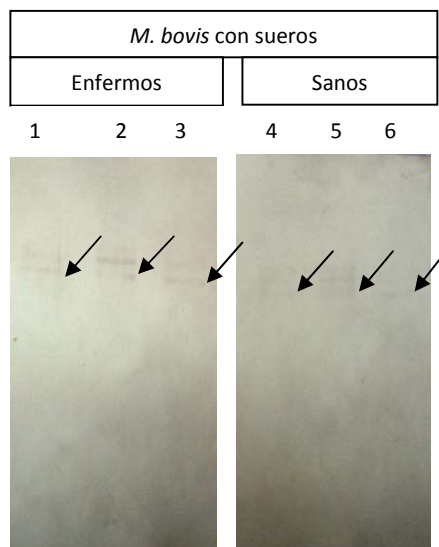


Figura 7. Western blot de tres cepas de *M. bovis* evaluadas con sueros. Carril 1: EV 345-Et0, carril 2: Epp63-Et0 , carril 3: LC190-Et0, carril 4: EV345-St0, carril 5: Epp63-St0, carril 6: LC190-St0. Las flechas indican la presencia de una banda de aproximadamente 50 KDa según el marcador de peso molecular de amplio rango Bio-Rad (no mostrado).

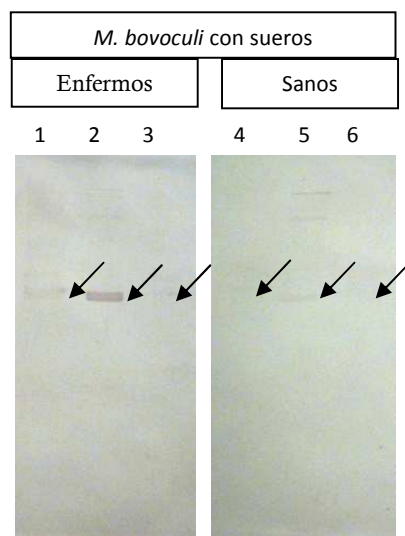


Figura 8. Western blot de tres cepas de *M. bovoculi* evaluadas con sueros. Carril 1: 3A8-Et0, carril 2: PRO-Et0 presenta una banda mas intensa que las demás, carril 3: Fs343-Et0, carril 4: 3A8-St0, carril 5: PRO-St0, carril 6: Fs343-St0. Las flechas indican la presencia de una banda de aproximadamente 50 KDa según el marcador de peso molecular de amplio rango Bio-Rad (no mostrado).

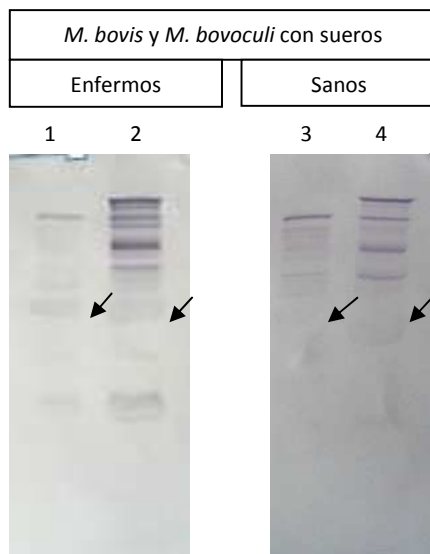


Figura 9. Western blot de una cepa de *M. bovis* y una *M. bovoculi* evaluadas con sueros. Carril 1: BAA1259-Et0, carril 2: CANIIB-Et0, carril 3: BAA1259-St0, carril 4: CANIIB-St0. Las flechas indican la presencia de una banda de aproximadamente 50 KDa según el marcador de peso molecular de amplio rango Bio-Rad (no mostrado).

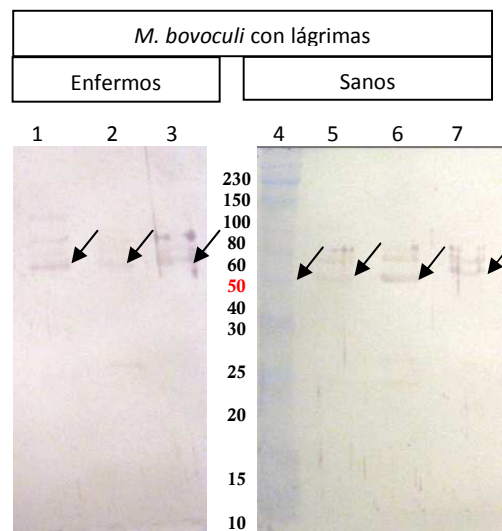


Figura 10. Western blot de tres cepas de *M. bovoculi* evaluadas con lágrimas. Carril 1: 3A8-Et0, carril 2: PRO-Et0, carril 3: Fs343-Et0, carril 4: marcador de peso molecular de amplio rango Bio-Rad (KDa), carril 5: 3A8-St0, carril 6: PRO-St0, carril 7: Fs343-St0. Las flechas indican la presencia de una banda de aproximadamente 50 KDa según el marcador de peso molecular Bio-Rad.

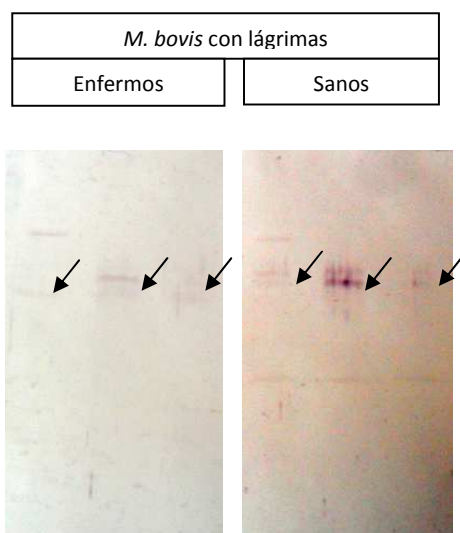


Figura 11. Western blot de tres cepas de *M. bovis* evaluadas con lágrimas. Carril 1: EV345-Et0, carril 2: Epp63-Et0, carril 3: LC190-Et0, carril 4: EV345-St0, carril 5: Epp63-St0, carril 6: LC190-St0. Las flechas indican la presencia de una banda de aproximadamente 50 KDa según el marcador de peso molecular de amplio rango Bio-Rad (no mostrado).

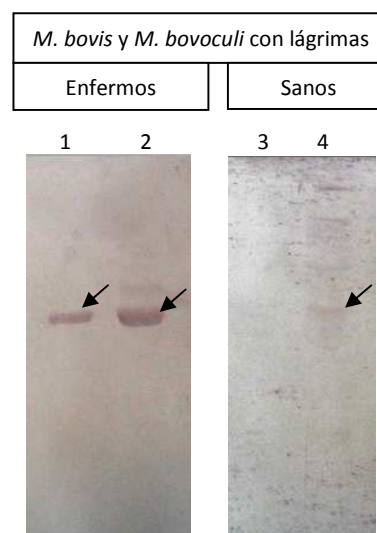


Figura 12. Western blot de una cepa de *M. bovis* y una de *M. bovoculi* evaluadas con lágrimas. Carril 1: BAA1259-Et, carril 2: CANIIB-Et0, carril 3: BAA1259-St0 no se observan bandas, carril 4: CANIIB-St0. Las bandas presentes en los animales enfermos son más intensas que en los animales sanos. Las flechas indican la presencia de una banda de aproximadamente 50 KDa según el marcador de peso molecular de amplio rango Bio-Rad (no mostrado).

Amplificación por PCR del gen que codifica para la PME-CD

Para probar que la PME-CD estaba presente en otras cepas de *M. bovis* y *M. bovoculi* se amplificó el gen que codifica para la PME-CD mediante PCR convencional, para lo que se diseñaron cuatro pares de *primers*.

Primers OMP-F y OMP-R diseñados a partir de *M. catarrhalis*

Inicialmente, los *primers* se diseñaron a partir del genoma de *M. catarrhalis* teniendo en cuenta que el genoma de *M. bovoculi* aun no estaba disponible en las bases de datos públicas y hasta el momento tampoco lo estaba el de *M. bovis*. A dichos *primers* se los denominó OMP-F y OMP-R. Los productos de amplificación obtenidos tuvieron un tamaño variable, siendo el esperado de 1588 pb (Fig. 13).

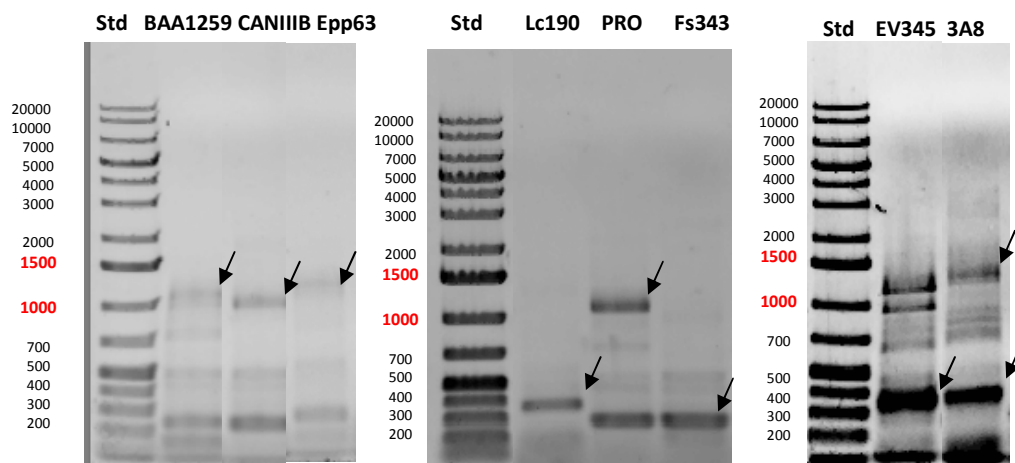


Figura 13. Visualización de los productos de PCR amplificados con los *primers* OMP-F y OMP-R en geles de agarosa al 0,8 % de cuatro cepas de *M. bovis* (CANIIB, Epp63, Lc190, EV345) y de cuatro cepas de *M. bovoculi* (BAA1259, PRO, Fs343, 3A8). En el primer carril de cada gel se observa el marcador de tamaño molecular, 1Kb plus (Std). No se observan productos del tamaño esperado (1588 pb). Sin embargo se observan bandas de menor tamaño. Las flechas indican los productos de amplificación que fueron enviados a secuenciar al servicio de Macrogen.

Posteriormente, los productos de amplificación de entre 1000-1500 pb de las cepas BAA1259, Epp63, CANIIB, 3A8 y PRO se extrajeron de un gel de agarosa 0,8 % utilizando el *QIAquick Gel Extraction Kit* de QIAGEN y se enviaron a secuenciar al Servicio de Secuenciación de Macrogen Inc. (Corea del Sur).

De la misma manera se purificaron y se enviaron a secuenciar los productos de amplificación de 400-300 pb de Lc190, Fs343, EV345 y 3A8. Los productos de PCR analizados presentaron cromatogramas con picos solapados, haciendo difícil la obtención de las secuencias. Dichas secuencias no resultaron tener homología con el gen de PME-CD de *M. catarrhalis*, lo que llevó al diseño de un nuevo par de *primers*.

Primers degenerados ompCD-F y ompCD-R diseñados a partir de *M. catarrhalis*

Seguidamente, se empleó un par de *primers* degenerados ompCD-F y ompCD-R, diseñados a partir de la secuencia de la PME-CD de *M. catarrhalis*. Se logró amplificar bandas de 500 pb (Fig. 14), pero no del tamaño esperado (1387 pb), lo que llevó a pensar en el diseño de nuevos *primers*.

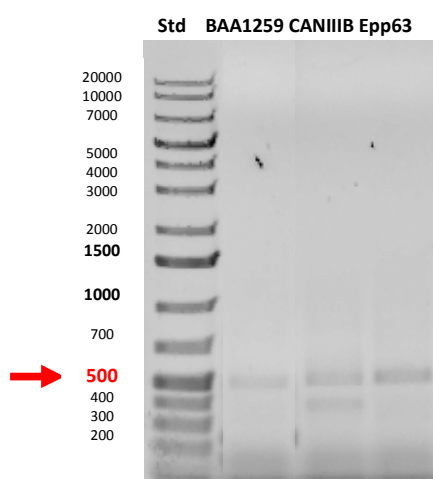


Figura 14. Visualización de los productos de PCR amplificados con los *primers* OmpCD-F y OmpCD-R en geles de agarosa al 0,8 %. Se observan productos de 500 pb (indicado con una flecha). Carril 1: marcador 1Kb plus (Std), 2: BAA1259 (*M. bovoculi*), 3: CANIIB (*M. bovis*) además de amplificar un fragmento de 500 pb, también amplifica de 400 pb, 4: Epp63 (*M. bovis*).

Primers Draft2-F y Draft2-R diseñados a partir de secuencia preliminar del genoma de la cepa de referencia Epp63 de *M. bovis*

Posteriormente, se diseñaron *primers* que se encontraban adyacentes al gen que codifica la PME-CD a partir de la secuencia preliminar del genoma de la cepa de referencia Epp63 de *M. bovis*, a la que en esta etapa del trabajo se pudo tener acceso.

Se pudo amplificar en ambas especies el producto esperado (1392 pb). Luego se purificaron las bandas de interés con kit (QIAGEN) en geles de agarosa 0,8 %, y posteriormente se enviaron a secuenciar al Servicio de Secuenciación de Macrogen Inc. (Corea del Sur).

Finalmente, tres cepas de *M. bovis* (Epp63, EV345, Lc190) y dos de *M. bovoculi* (BAA1259, 3A8) presentaron homología con la PME-CD de *M. catarrhalis*. Sin embargo, Fs343 y PRO (*M. bovoculi*) no pudieron ser editadas, debido a que los cromatogramas presentaban picos solapados.

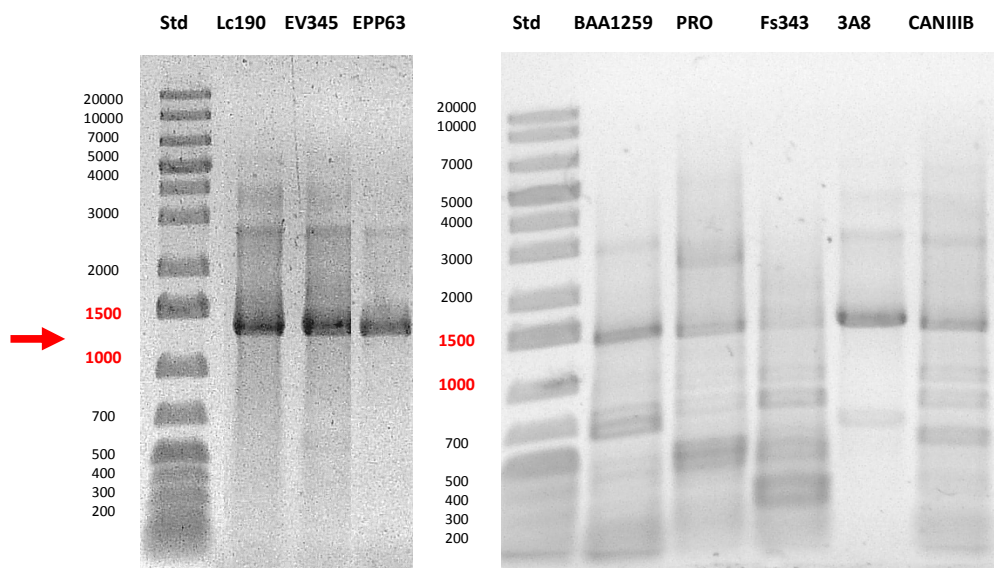


Figura 15. Visualización de los productos de PCR, con *primers* Draft2-F y Draft2-R de las 4 cepas analizadas de *M. bovis* (Epp63, Lc190, CANIIB, EV345) y 4 cepas de *M. bovoculi* (BAA1259, PRO, Fs343, 3A8) en geles de agarosa 0,8 %. Además, se observa el marcador 1Kb plus (Std). En todos los casos se observan bandas entre 1000-1500 pb como se esperaba (indicado con una flecha).

Primers OMPCD IntF y OMPCD IntR, diseñados a partir del alineamiento múltiple entre las secuencias obtenidas con los primers Draft2

Finalmente, se diseñó un par de *primers* en base a regiones conservadas internas del gen que codifica la PME-CD. El producto de amplificación por PCR esperado era de 586 pb. Los cuatro ADN de *M. bovis* presentaron dicha banda, y además CANIIB y Epp63 amplificaron otros fragmentos de entre 1000-1500 pb (Fig. 16). Se seleccionaron los productos de amplificación de alrededor de 580 pb correspondientes a las cepas CANIIB, Epp63 y LC190, así como los fragmentos de entre 1000-1500 pb de las cepas CANIIB y Epp63, y se purificaron con un kit comercial (QIAGEN) en geles de agarosa 0,8 %. Posteriormente se enviaron a secuenciar al Servicio de Secuenciación de Macrogen Inc. (Corea del Sur) y al servicio del Instituto Pasteur de Montevideo (IPMont).

Para el caso de los aislamientos de *M. bovoculi* solamente el ADN de la cepa 3A8 amplificó el tamaño esperado mientras que el resto amplificó una banda intensa de entre 1000-1500 pb. Particularmente, los productos de PCR de las cepas BAA1259, Fs343 y 3A8 fueron purificadas en geles de agarosa 0,8 %, y posteriormente se enviaron a secuenciar al Servicio de Secuenciación de Macrogen Inc. (Corea del Sur) y al servicio del IPMont.

Finalmente, de los ADN analizados solamente resultaron tener homología con la PME-CD de *M. catarrhalis* los fragmentos de ADN de aproximadamente 580 pb de Epp63, CANIIB, Lc190 y 3A8. Sin embargo, los dos fragmentos de ADN secuenciados de *M. bovoculi*, de las cepas BAA1259 y Fs343, no pudieron ser editados debido a que las muestras indicaban más de un producto de PCR presentando picos solapados en el cromatograma de secuenciación.

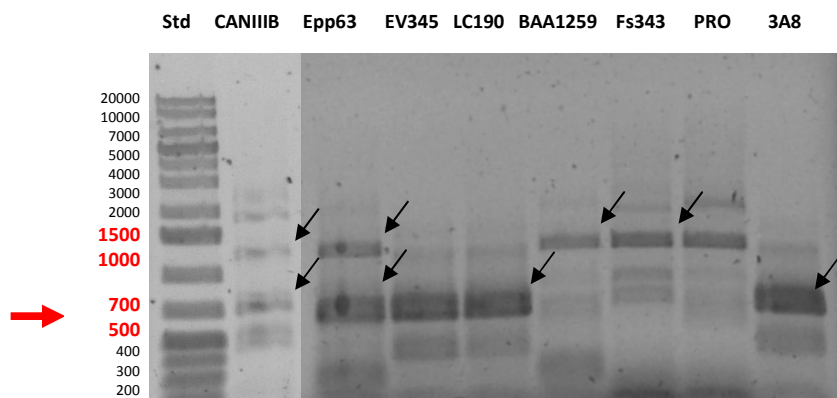


Figura 16. Visualización de los productos de PCR, con *primers* OMPCD_IntF y OMPCD_IntR de las cepas analizadas de *M. bovis* (CANIIB, Epp63, EV345, Lc190) y de *M. bovoculi* (BAA1259, Fs343, PRO, 3A8) en geles de agarosa 0,8 %. Las flechas negras indican las bandas que se purificaron con kit (QIAGEN) y se enviaron a secuenciar al servicio de Macrogen Inc. (Corea del Sur) y de IPMont.

Secuenciación de los fragmentos de ADN de interés

Las secuencias obtenidas de los ADN analizados fueron editadas en el programa informático BioEdit y posteriormente mediante la herramienta informática BLAST se evaluó su homología con la base de datos públicas del NCBI (Anexo 2). En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos de la secuenciación realizada en el servicio de Macrogen Inc. y en el servicio de IPMont, de los productos de amplificación analizados con los dos últimos pares de *primers* utilizados.

Tabla 8. Resultado del análisis de las secuencias obtenidas de la secuenciación, amplificadas con los *primers* Draft2 y OMPCD_Int

Cepas	Homología por BLAST con <i>primers</i> Draft2	Homología por BLAST con <i>primers</i> OMPCD_Int
<i>M. bovis</i> Epp63	PME-CD	PME-CD (586 pb)
<i>M. bovis</i> EV345	PME-CD	
<i>M. bovis</i> LC190	PME-CD	PME-CD (586 pb)
<i>M. bovis</i> CANIIB	-	PME-CD (586 pb)
<i>M. bovoculi</i> BAA1259	PME-CD	-
<i>M. bovoculi</i> 3A8	PME-CD	PME-CD (586 pb)
<i>M. bovoculi</i> Fs343	-	-
<i>M. bovoculi</i> PRO	-	

Comparación de las secuencias

Luego de determinar la homología que presentaba cada secuencia, se procedió a compararlas entre ellas, incluyendo la secuencia preliminar del genoma de Epp63 (*M. bovis*) original. La alineación de las mismas mostró gran similitud entre todas las secuencias, mostrando varias regiones conservadas internas, a partir de las cuales se diseñaron los primers OMPCD_Int (Anexo 1).

DISCUSIÓN

La ganadería en el Uruguay cumple un papel clave para el desarrollo nacional (DIGESA, 2012). La explotación del ganado se ve alterada de forma negativa por diversas enfermedades lo cual trae enormes pérdidas económicas a nivel nacional. Entre estas enfermedades se encuentra la Queratoconjuntivitis infecciosa bovina. Esta se encuentra distribuida mundialmente y se ha convertido en un grave problema económico y sanitario que afecta al sector productivo y ganadero. Varios agentes etiológicos están asociados a esta enfermedad, incluyendo *M. bovis*, *M. bovoculi* y *M. ovis* (Henson *et al.*, 1960; Angelos *et al.*, 2007a; Nagy *et al.*, 1989; Sosa *et al.*, 2012).

En Uruguay, existen pocos datos disponibles acerca de la diversidad de las cepas circulantes de *Moraxella* spp. Recientemente en nuestro laboratorio se analizó la diversidad de estas cepas asociadas a brotes de QIB. El conocimiento de dichas cepas circulantes es un requisito para un exitoso programa inmunoprolifático debido a que las cepas circulantes varían durante los brotes de la enfermedad exigiendo una caracterización continua (Sosa *et al.*, 2013). El problema sanitario originado por la QIB ha llevado a procurar desarrollar vacunas efectivas para prevenir la enfermedad. En la actualidad, las vacunas comerciales están elaboradas en base a fimbrias o a bacterinas (bacterias enteras inactivadas) (Brown *et al.*, 1998). Sin embargo, la protección asociada a las vacunas es variable. Esto se podría explicar por la elevada heterogeneidad antigénica fimbrial entre las cepas de *Moraxella* spp. causantes de QIB (Horsnell *et al.*, 1987).

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la diversidad de las PME de una colección de cepas clínicas de *M. bovis* y *M. bovoculi* aisladas de casos clínicos en Uruguay, su posible papel en la patogenidad y su potencial como componentes de vacunas. Para cumplir con los objetivos propuestos se emplearon 16 cepas de *M. bovis* y *M. bovoculi* obtenidas entre los años 2005 y 2009 de diferentes departamentos de Uruguay (Sosa *et al.*, 2012) y 4 aislamientos obtenidos de un brote de QIB en el estado de Kansas, Estados Unidos. Además se incluyeron las cepas de referencia ATCC de *M. bovis* (Epp63) y *M. bovoculi* (BAA1259).

Todas estas actividades se desarrollaron en el marco de una de las principales líneas de investigación del Departamento de Microbiología del IIBCE, relacionada con la patogenicidad de *Moraxella* spp. Dando continuidad a esta línea de investigación y a raíz de la importancia que tiene prevenir la enfermedad se busca desarrollar nuevas vacunas que sean efectivas. Esta situación justifica la investigación dirigida a identificar y caracterizar antígenos conservados entre cepas capaces de inducir una respuesta inmune potente y efectiva. En vista de la importancia que tienen las proteínas de membrana externa (PME) para la supervivencia bacteriana, se podría pensar en considerarlas como posibles componentes de vacunas.

Con el fin de extraer las PME presentes en ambas especies se utilizaron dos protocolos. Inicialmente se utilizó el de Piccini *et al.* 1998 utilizado para *Proteus mirabilis*, un uropatógeno Gram-negativo, el cual no resultó en una correcta purificación de las PME. Posteriormente, se utilizó el protocolo de Prieto *et al.*, 1999 al que se le realizaron modificaciones y que resultó el adecuado para la purificación de PME. Estas fueron obtenidas por tratamiento con lisozima-shock térmico, sonicación y solubilización diferencial de envolturas celulares con Tritón X-100. Esto demuestra que son importantes los pasos de ruptura celular y en especial para *Moraxella* ya que demostró que no fue fácil romper su pared celular, requiriendo de diversos tratamientos. A su vez, con el protocolo de Prieto se pudieron extraer las PME que luego fueron identificadas como tales a través de MALDI-TOF/TOF.

Una vez obtenidas las PME, se visualizaron los perfiles de bandas de las PME entre las cepas de *Moraxella* spp. a través de una electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida: SDS-PAGE. Esta técnica ya ha sido utilizada por diversos autores para evaluar la diversidad de perfiles de PME de *Moraxella* (Prieto *et al.*, 1999; Horsnell *et al.*, 1987). En el presente trabajo debido a la alta heterogeneidad observada, tanto en *M. bovis* como en *M. bovoculi* no se pudieron establecer grupos de cepas en base a los perfiles de bandas obtenidos de los extractos proteicos. En otros trabajos, se han observado variaciones con respecto a los resultados de diversidad de PME de *Moraxella* que pueden deberse a diferencias locales o temporales de las cepas.

En lo que respecta a diversidad de otros antígenos de *M. bovis*, Prieto y colaboradores (1999) analizaron una colección de 57 aislamientos clínicos de *M. bovis* obtenidos de brotes de QIB en Argentina y tres cepas de referencia e identificaron tres perfiles de LPS y tres perfiles de PME, reflejando una baja heterogeneidad de los antígenos de superficie evaluados. Este resultado es contradictorio al que habían obtenido previamente Horsnell y colaboradores (1987), quienes analizaron los patrones de PME de diez aislamientos británicos de *M. bovis*. En ese caso los patrones proteicos de los diferentes aislamientos fueron similares pero no idénticos y sólo se encontraron tres proteínas en común (128 KDa, 55KDa y 37KDa) para todos los aislamientos. Así, para identificar las PME presentes en una alta proporción entre las distintas cepas se necesita de otras metodologías por lo que se decidió utilizar geles en 2D.

La técnica de MALDI-TOF/TOF ha probado ser una herramienta interesante para el hallazgo e identificación de nuevas proteínas y para descubrir probables nuevas funciones de proteínas ya conocidas. Además de las ventajas de MALDI-TOF como una técnica sensible para el análisis de compuestos de alto peso molecular, la disposición en tándem permite la identificación de las proteínas a través de sus patrones de fragmentación de los experimentos de espectrometría de masas/espectrometría de masas (MS/MS) (Mateos-Martín *et al.*, 2012; Severin *et al.*, 2007; Webster *et al.*, 2012). Esta técnica ya ha sido empleada con éxito por nuestro grupo para determinar las identidades de las PME de *Proteus mirabilis* (D'Alessandro *et al.*, 2011).

Con la finalidad de analizar la variabilidad en las PME presentes en *M. bovis* y *M. bovoculi*, se seleccionó una cepa de *M. bovis* y una de *M. bovoculi* en base a la alta definición y rendimiento que presentaron en los geles de poliacrilamida. El análisis de las PME en geles 2D a menudo es dificultoso debido a la alta hidrofobicidad intrínseca de las proteínas de membrana, que usualmente se refleja con una baja resolución de los patrones (Molloy, 2000). Sin embargo, se obtuvo una buena resolución en los patrones. La óptima resolución electroforética fue en el rango de pH 4 -7 en la primera dimensión. Se obtuvieron proteínas que se separaron por geles 2D y a partir de esta separación se seleccionaron 16 *spots* para su análisis por MALDI-TOF/TOF, en el Servicio de la Unidad de

Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur de Montevideo. Los resultados obtenidos se compararon con la información incluida en bases de datos públicas. Los resultados de MALDI-TOF/TOF permitieron identificar porinas, otras PME, chaperonas y distintas enzimas que participan en el metabolismo. La presencia de estas últimas podría deberse a contaminación con proteínas del citosol durante la extracción de las PME.

Conjuntamente, el estudio por MALDI-TOF/TOF indicó que las cepas de *M. bovis* y de *M. bovoculi* tenían cuatro proteínas en común. Una de ellas presentó homología con una PME-CD de *M. catarrhalis* (45,8 KDa con 427 aa), otra con una aminotransferasa de cadena ramificada de *M. catarrhalis* (34,6 KDa con 310 aa), una chaperona DnaK de *Moraxella* (67 KDa con 635 aa) y de *Acinetobacter* (69 KDa con 646 aa) y cuarta una con homología a la Dihidrolipoil deshidrogenasa de *Acinetobacter* spp. (51 KDa con 477 aa) y a la componente de la piruvato deshidrogenasa E3 (dihidrolipoamida deshidrogenasa) de *M. catarrhalis* (51 KDa con 482 aa).

La proteína con homología a la PME M35 de *Enhydrobacter aerosacus* solamente se identificó en *M. bovis*. Esta PME presenta homología con la PME M35 de *M. catarrhalis*, que está altamente conservada, se expresa en la superficie siendo importante para cumplir su rol de porina y se ha propuesto que es una interesante candidata a vacunas (Easton *et al.*, 2005). Dicha PME ya ha sido identificada en la cepa de referencia de *M. bovis* (Epp63), en estudios anteriores en nuestro laboratorio dentro el marco de la tesis de doctorado de la Dra. Vanessa Sosa. Además, se identificó una proteína con homología a una hidrolasa Acetyl-CoA de *M. catarrhalis*.

A su vez, cuatro proteínas se identificaron únicamente en *M. bovoculi*: una proteína con homología a la PME omp38 de *Acinetobacter* la cual se conoce que podría actuar como un potente factor de virulencia para inducir la apoptosis en células epiteliales en estadios temprano de la infección de *A. baumannii* (Choi *et al.*, 2005), una proteína con homología a una proteína pequeña de shock térmico de *Acinetobacter*, una con homología a una proteína hipotética F923_00870 de *Acinetobacter* y finalmente una con homología a una chaperona Club ATP-dependiente de *Acinetobacter*.

Hasta el momento, la PME-CD con una masa molecular teórica de 45,8 kDa se conoce en *M. catarrhalis* y no existen reportes previos sobre esta proteína en *M. bovis* ni en *M. bovoculi*. Debido a que esta PME-CD se encuentra presente en *M. bovis* y en *M. bovoculi* y además posee posibles atributos como buen antígeno en *M. catarrhalis* (Hsiao *et al.*, 1995) se continuaron los estudios para su caracterización como posible componente de vacunas contra la QIB.

M. catarrhalis es un patógeno Gram-negativo del tracto respiratorio humano que causa aproximadamente el 20 % de todos los episodios de otitis media en niños y arriba del 10 % de infecciones del tracto respiratorio (Giebink *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2005). Además otras enfermedades como sinusitis (Brook *et al.*, 2005), y conjuntivitis (Bingen *et al.*, 2005) pueden agregarse a la lista de enfermedades asociadas a *M. catarrhalis*. Asimismo, expresa varias proteínas afimbriales, una de ellas es la PME-CD (Akimana *et al.*, 2007; Holm *et al.*, 2004), proteína modificable térmicamente. Tiene una masa molecular de 55 kDa a temperatura ambiente y una masa de 60 kDa cuando se calienta bajo condiciones reductoras. Esta proteína está expuesta superficialmente y conservada entre una variedad de cepas de *M. catarrhalis* conteniendo al menos dos epítopes que están presentes en todas las cepas estudiadas de *M. catarrhalis* (Sarwar *et al.*, 1992; Sarwar *et al.*, 1993; Hsiao *et al.*, 1995; Murphy *et al.*, 1999). Un evento clave que se produce temprano en la patogénesis por el organismo es la adhesión a la superficie de la mucosa de la nasofaringe, conduciendo a la colonización. Las proteínas afimbriales de adherencia (adhesinas), son cruciales para este proceso ya que median la unión de las bacterias a las células huésped (Beachey, 1981; St Geme, 1997; Gerlach *et al.*, 2007).

Además de sus funciones relacionadas con el crecimiento bacteriano y la adherencia a las células epiteliales humanas, la PME-CD juega un papel muy importante en la fisiología bacteriana y la patogénesis, incluyendo aspectos tales como la estabilización de la morfología celular bacteriana y la prevención de autoagregación mediante la reducción de hidrofobicidad de la superficie. Asimismo juega un rol importante en el pasaje de nutrientes a través de la membrana externa de *M. catarrhalis* (Saito *et al.*, 2013). Se ha propuesto que la PME-CD es una adhesina para las células

humanas de pulmón A549. Holm y colaboradores (2004) sugieren que una vacuna conteniendo esta proteína o partes de la misma podría interferir con la adherencia, un paso importante en la patogénesis bacteriana. La adhesina PME-CD contiene dos dominios distintos de unión a la célula, uno localizado en la región β -barril y otro en la región *linker* entre los residuos 236 y 300 conteniendo un motivo parecido a una repetición de tipo III de la trombospondina (TT3R) (Akimana *et al.*, 2007). Otras adhesinas han sido provistas como efectivos antígenos para vacunas, por ejemplo vacunas contra *Bordetella pertussis* que contienen la adhesina FHA (<http://www.cdc.gov/nip/publications/pink/pert.pdf>). Además se han inmunizado ratones con la recombinante de PME-CD dando inmunidad protectora (Murphy *et al.*, 1998) y se ha observado que es un importante blanco en la respuesta inmune, de pacientes con enfermedades pulmonares provocadas por *M. catarrhalis* (Murphy *et al.*, 2003).

Por todo lo expuesto, existen evidencias que sugieren que la inmunización con PME-CD induciría anticuerpos protectores. Primero, la inmunización de animales de experimentación con PME-CD induce anticuerpos bactericidas (Yang *et al.*, 1997). Segundo, la inmunización sistémica y mucosal con la recombinante de PME-CD favorece la eliminación pulmonar de *M. catarrhalis* en un modelo de ratón (Murphy *et al.*, 1998). Finalmente, el nivel de anticuerpos en suero contra PME-CD en niños es inversamente correlativo con la severidad de la otitis media, sugiriendo que los anticuerpos contra PME-CD tienen un papel protector (Harabuchi *et al.*, 1998).

Con el fin de analizar de forma indirecta la expresión *in vivo* y la inmunogenicidad de las PME de *M. bovis* y *M. bovoculi* se empleó la técnica Western blot. Ésta es usada para identificar la presencia de proteínas gracias a la especificidad de la interacción anticuerpo-antígeno; dicha técnica ha sido empleada con éxito en nuestro laboratorio para el análisis de PME de *P. mirabilis* (Piccini *et al.*, 1998).

En la mayoría de las cepas estudiadas en *M. bovis* y en *M. bovoculi*, evaluadas con sueros y lágrimas se observaron que las PME mostraron una respuesta a los anticuerpos. En todos los casos se utilizó la misma cantidad de PME. Sin embargo en algunos se observaron bandas notoriamente más intensas en los animales enfermos que en los

sanos, como se visualiza en la cepa PRO (*M. bovoculi*) evaluada con los sueros de los animales. La presencia de cierta reacción en animales sanos, puede deberse a que el animal estuvo expuesto a bacterias Gram negativas previamente, y en particular a *Moraxella* spp., debido a que se ha descrito que forma parte de la biota ocular normal (Pugh *et al.* 1986, O'Connor *et al.* 2012).

De acuerdo al peso molecular se presume que se trataría de la PME-CD identificada por MALDI-TOF/TOF. Para probar que esta PME-CD está presente en otras cepas de *M. bovis* y *M. bovoculi* se amplificó el gen que codifica para la PME-CD mediante PCR convencional.

A partir de la técnica de PCR se amplificó el gen que codifica para la PME-CD identificada por MALDI-TOF/TOF en *M. bovis* y en *M. bovoculi*. De los cuatro pares de *primers* utilizados, solamente con el par Draft2 (diseñado a partir de la secuencia preliminar del genoma de la cepa de referencia Epp63 de *M. bovis*) y el par OMPCD_Int (diseñado a partir del alineamiento múltiple entre las secuencias obtenidas con los *primers* Draft2) se logró obtener secuencias que presentaban homología con el gen de la PME-CD de *M. catarrhalis*.

Con los *primers* Draft2 se logró amplificar fragmentos del tamaño esperado (1391 pb) en todas las cepas, cuyas secuencias en la mayoría de los casos presentaron homología con el gen que codifica la PME-CD de *M. catarrhalis*.

Además, con el par de *primers* OMPCD_Int se logró amplificar el tamaño esperado (586 pb) en los cuatro ADN de *M. bovis* y en uno de *M. bovoculi* (3A8). Cuando se emplearon los ADN de *M. bovis* Epp63 y CANIIIB, y de *M. bovoculi* BAA1259, Fs343 y PRO, se amplificó una banda de un tamaño mayor al esperado en los productos de PCR (entre 1000-1500 pb). De todos estos fragmentos, aquellos de aproximadamente 580 pb de Epp63, CANIIIB, Lc190 y 3A8 resultaron tener homología con el gen de la PME-CD.

En resumen, en las cuatro cepas de *M. bovis* estudiadas y en dos de las cuatro *M. bovoculi* analizadas, se logró identificar secuencias homólogas al gen de la PME-CD de *M.*

catarrhalis. Esto demuestra que la PME-CD estaría conservada en la mayoría de las cepas estudiadas, pudiendo constituir un posible candidato a vacunas contra la QIB.

CONCLUSIÓN

Los perfiles de PME de las cepas analizadas de *M. bovis* y *M. bovoculi* presentaron una alta diversidad cuando se visualizaron a través de SDS-PAGE. Este resultado se inscribe junto a otros obtenidos por nuestro grupo con anterioridad, que indican la existencia de una alta diversidad intraespecífica (Sosa *et al.*, 2013).

Dados los antecedentes de inmunogenicidad de la PME-CD de *M. catarrhalis* y la presencia de una banda de una proteína inmunogénica de similar peso molecular, se deduce la posibilidad de que esta PME sea una proteína inmunogénica.

Se amplificó el gen de la PME-CD en la mayoría de las cepas estudiadas. En particular se encontraron regiones altamente conservadas las cuales serían posibles potenciales epítopes. Todos estos resultados podrían indicar que la PME-CD podría tener un papel en la patogenicidad y ser un potencial componente de vacunas contra QIB.

PERSPECTIVAS

Para continuar con la validación de la PME-CD como un potencial blanco para la generación de vacunas se plantean los siguientes experimentos:

Inicialmente evaluar la presencia del gen de interés en la colección de cepas mediante PCR, utilizando el par de *primers* OMPCD_Int diseñados en base a las regiones conservadas que se observaron en el alineamiento múltiple. A continuación, generar un plásmido recombinante para la expresión de dicha PME (se evaluará la posibilidad de expresar la proteína entera, o dominios de ésta) en un sistema de expresión adecuado. La expresión y purificación de la proteína recombinante permitirá realizar ensayos que permitan evaluar la protección otorgada por la vacunación con dicho antígeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achouak W**, Heulin T, Pagès JM (2001) Multiple facets of bacterial porins. FEMS Microbiol. Lett. 199:1–7.
- Akimana C**, Lafontaine ER (2007) The *Moraxella catarrhalis* outer membrane protein CD contains two distinct domains specifying adherence to human lung cells. FEMS Microbiol Lett. 271:12-19.
- Alexander D** (2010) Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review of cases in clinical practice. Vet Clin Food Anim. 26:487–503.
- Ali AA**, O'Neill CJ, Thomson PC, Kadarmideen HN (2012) Genetic parameters of infectious bovine keratoconjunctivitis and its relationship with weight and parasite infestations in Australian tropical *Bos taurus* cattle. Genet Sel Evol. 44:22.
- Allen JA** (1919) A preliminary note on infectious keratitis. JAVMA. 54:306-313.
- Angelos JA** (2010a) *Moraxella bovoculi* and infectious bovine keratoconjunctivitis: cause or coincidence?. Vet Clin Food Anim. 26:73-78.
- Angelos JA** (2010b) *Moraxella*. En: Pathogenesis of bacterial (Eds). Willey-Blackwell. Cap. 24.
- Angelos JA**, Ball LM (2007c) Differentiation of *Moraxella bovoculi* sp. nov. from other coccoid *moraxellae* by the use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis of amplified DNA. J Vet Diagn Invest. 19:532-534.
- Angelos JA**, Ball LM (2007e) Relatedness of cytotoxins from geographically diverse isolates of *Moraxella bovis*. Vet Microbiol. 124:382-386.
- Angelos JA**, Ball LM, Hess JF (2007b) Identification and characterization of complete RTX operons in *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*. Vet Microbiol. 125:73-79.
- Angelos JA**, Bonifacio RG, Ball LM, Hess JF (2007d) Prevention of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis with a recombinant *Moraxella bovis* pilin-*Moraxella bovis* cytotoxin-ISCOM matrix adjuvanted vaccine. Vet Microbiol 125:274-283.
- Angelos JA**, Edman JM, Chigerwe M (2014) Ocular immune responses in steers following intranasal vaccination with recombinant *Moraxella bovis* cytotoxin adjuvanted with polyacrylic acid. Clin Vaccine Immunol. 21:181-187.

- Angelos JA**, Gohary KG, Ball LM, Hess JF (2012) Randomized controlled field trial to assess efficacy of a *Moraxella bovis* pilin-cytotoxin-*Moraxella bovoculi* cytotoxin subunit vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. *Am J Vet Res.* 73:1670-1675.
- Angelos JA**, Hess JF, George LW (2001) Cloning and characterization of a *Moraxella bovis* cytotoxin gene. *Am J Vet Res.* 62:1222-1228.
- Angelos JA**, Hess JF, George LW (2003) An RTX operon in hemolytic *Moraxella bovis* is absent from nonhemolytic strains. *Vet Microbiol.* 92:363-377.
- Angelos JA**, Hess JF, George LW (2004) Prevention of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis with a recombinant *Moraxella bovis* cytotoxin-ISCOM matrix adjuvanted vaccine. *Vaccine* 23:537-545.
- Angelos JA**, Lane VM, Ball LM, Hess JF (2010c) Recombinant *Moraxella bovoculi* cytotoxin-ISCOM matrix adjuvanted vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. *Vet Res Commun.* 34:229-239.
- Angelos JA**, Spinks PQ, Ball LM, George LW (2007a) *Moraxella bovoculi* sp. nov., isolated from calves with infectious bovine keratoconjunctivitis. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57:789-795.
- Baptista PJP** (1979) Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. *Br Vet J.* 135:225-242.
- Beachey EH** (1981) Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. *J Infect Dis.* 143:325-345.
- Bingen E**, Cohen R, Jourenkova N, Gehanno P (2005) Epidemiologic study of conjunctivitis-otitis syndrome. *Pediatr. Infect Dis J.* 24:731-732.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248.
- Brook I**, Foote PA, Frazier EH (2005) Microbiology of acute exacerbation of chronic sinusitis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 114:573-576.
- Brown M**, Brightman A, Fenwick B, Rider M (1998) Infectious bovine keratoconjunctivitis: A review. *J Vet Intern Med.* 12:259-266.

- Cerny HE**, Rogers DG, Gray JT, Smith DR, Hinkley S (2006) Effects of *Moraxella* (*Branhamella*) *ovis* culture filtrates on bovine erythrocytes, peripheral mononuclear cells, and corneal epithelial cells. J Clin Microbiol. 44:772-776.
- Choi CH**, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, Kim SA, Lee SK, Lee JC (2005) Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. Cell Microbiol. 7:1127-1138.
- D'Alessandro B**, Lery LMS, Von Kruger WMA, Lima A, Piccini C, Zunino P (2011) Proteomic analysis of *Proteus mirabilis* outer membrane proteins reveals differential expression in vivo vs. in vitro conditions. FEMS Immunol Med Microbiol. 63:174-182.
- Dalrymple B**, Mattick JS (1987) An analysis of the organization and evolution of type 4 fimbrial (MePhe) subunit proteins. J Mol Evol. 25:261-269.
- DIGESA** (2012) Boletín Epidemiológico N°1. MGAP, DIGESA.
- Easton DM**, Smith A, Gallego SG, Foxwell AR, Cripps AW, Kyd JM (2005) Characterization of a novel porin protein from *Moraxella catarrhalis* and identification of an immunodominant surface loop. J Bacteriol. 187:6528-6535.
- Fenwick B**, Rider M, Liang J, Brightman A (2002) Iron repressible outer membrane proteins of *Moraxella bovis* and demonstration of siderophore-like activity. Vet Microbiol. 48:315-324.
- Galdiero S**, Falanga A, Cantisani M, Tarallo R, Della Pepa ME, D'Oriano V, Galdiero M. (2012) Microbe-host interactions: structure and role of gram-negative bacterial porins. Curr Protein Pept Sci. 13:843-854.
- George LW**, Angelos JA, Hess JF (2007) *Moraxella bovis* cytotoxin, cytotoxin gene, antibodies and vaccines for prevention and treatment of *Moraxella bovis* infections. Patent Application Publication. US 2007/0269424 A1
- George LW**, Borrowman AJ, Angelos JA (2005) Effectiveness of a cytolyisin-enriched vaccine for protection of cattle against infectious bovine keratoconjunctivitis. Am J Vet Res. 66:136-142.
- Gerlach RG**, Hensel M (2007) Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. Int J Med Microbiol. 297:401-415.

Giebink GS, Kurono Y, Bakaletz LO, Kyd JM, Barenkamp SJ, Murphy TF, Green B, Ogra PL, Gu XX, Patel JA, Heikkinen T, Pelton SI, Hotomi M, Karma P (2005) Recent advances in otitis media. 6 Vaccine Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl. 194:86-103.

Glass HW Jr, Gerhardt RR, Greene WH (1982) Survival of *Moraxella bovis* in the alimentary tract of the face fly. J Econ Entomol. 75:545-546.

Harabuchi Y, Murakata H, Goh M, Kodama H, Kataura A, Faden H, Murphy TF (1998) Serum antibodies specific to CD outer membrane protein of *Moraxella catarrhalis*, P6 outer membrane protein of nontypeable *Haemophilus influenzae* and capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* in children with otitis media with effusion. Acta Otolaryngol. 118:826-832.

Henson JB, Grumbles LC (1960) Infectious bovine keratoconjunctivitis. I. Etiology. Am J vet Res. 21:761-766.

Hilton M (2002) Pinkeye Keratoconjunctivitis of Cattle. Animal Health.3:1-2.

Holm MM, Vanlerberg SL, Foley IM, Sledjeski DD, Lafontaine ER (2004) *The Moraxella catarrhalis* porin-like outer membrane protein CD is an adhesin for human lung cells. Infect Immun. 72:1906-1913.

Horsnell JM, Teale CM (1987) Characterisation of the outer membrane protein antigens of British field isolates of *Moraxella bovis*. Vet Microbiol. 15:181-189.

Hsiao CB, Sethi S, Murphy TF (1995) The major heat modifiable outer membrane protein CD is highly conserved among strains of *Branhamella catarrhalis*. Mol Microbiol 10:87–97.

Hughes DE, Pugh GW (1970) A five-year study of infectious bovine keratoconjunctivitis in a beef herd. J Am Vet Med Assoc. 157(4):443-451.

Hughes DE, Pugh GW Jr, McDonald TJ (1965) Ultraviolet radiation and *Moraxella bovis* in the etiology of bovine infectious keratoconjunctivitis. Am J vet Res. 26:1331-1338.

Jayappa HG, Lehr C (1986) Pathogenicity and immunogenicity of piliated and nonpiliated phases of *Moraxella bovis* in calves. Am J Vet Res. 47:2217–2221.

Kibar M, Gümüşsoy KS, Öztürk A (2005) Evaluation of Various Antibiotic Treatments in Calves with Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. Turk J Vet Anim Sci.30:553-559.

- Koebnik R**, Locher KP, Van Gelder P (2000) Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol.* 37:239-253.
- Lang M**, Orgogozo V (2011) Identification of homologous gene sequences by PCR with degenerate primers. *Methods Mol Biol.* 772:245-256.
- Lepper AW**, Moore L (1992) The protective efficacy of pili from different strains of *Moraxella bovis* within the same serogroup against infectious bovine keratoconjunctivitis. *Vet Microbiol.* 32:177-187.
- Lepper AW**, Atwell JL, Lehrbach PR, Schwartzkoff CL, Egerton JR, Tennent JM (1995) The protective efficacy of cloned *Moraxella bovis* pili in monovalent and multivalent vaccine formulations against experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK). *Vet Microbiol.* 45:129-138.
- Libardoni F**, Scherer CFC, Farias L, Vielmo A, Balzan C, de Vargas AC (2012) *Moraxella bovoculi* em casos de ceratoconjuntivite infecciosa bovina no Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras.* 32:743-746.
- Lin J**, Huang S, Zhang Q (2002) Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes Infect.* 4:325-331.
- Maiti B**, Shetty M, Shekar M, Karunasagar I, Karunasagar I (2012) Evaluation of two outer membrane proteins, Aha1 and OmpW of *Aeromonas hydrophila* as vaccine candidate for common carp. *Vet Immunol Immunopathol.* 149:298-301.
- Marrs CF**, Ruehl WW, Falkow S, Schoolnik GK, Falkow S (1988) Pilin gene phase variation of *Moraxella bovis* is caused by an inversion of the pilin genes. *J Bacteriol.* 170:3032-3039.
- Mateos-Martín ML**, Fuguet E, Quero C, Pérez-Jiménez J, Torres JL (2012) New identification of proanthocyanidins in cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* L.) using MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 402:1327-1336.
- McConnel CS**, Shum L, House JK (2007) Infectious bovine keratoconjunctivitis antimicrobial therapy. *Aust Vet J.* 85:65-69.
- Molloy MP** (2000) Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Anal Biochem.* 280:1-10.

- Moore LJ**, Lepper AWD (1991) A unified serotyping scheme for *Moraxella bovis*. Vet Microbiol. 29:75-83.
- Murphy TF**, Brauer AL, Grant BJ, Sethi S (2005) *Moraxella catarrhalis* in chronic obstructive pulmonary disease: burden of disease and immune response. Am J Respir Crit Care Med. 172:195-199.
- Murphy TF**, Kirkham C, DeNardin E, Sethi S (1999) Analysis of antigenic structure and human immune response to outer membrane protein CD of *Moraxella catarrhalis*. Infect Immun. 67:4578-4585.
- Murphy TF**, Kirkham C, Liu DF, Sethi S (2003) Human immune response to outer membrane protein CD of *Moraxella catarrhalis* in adults with chronic obstructive pulmonary disease. Infect Immun. 71:1288-1294.
- Murphy TF**, Kyd JM, John A, Kirkham C, Cripps AW (1998) Enhancement of pulmonary clearance of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* following immunization with outer membrane protein CD in a mouse model. J Infect Dis. 178:1667–1675.
- Nagy A**, Vandersmissen E, Kapp P (1989) Further data to the aetiology, pathogenesis and therapy of infectious bovine keratoconjunctivitis. Comp Immun Microbiol Infect Dis. 12:115-127.
- O'Connor AM**, Shen HG, Wang C, Opriessnig T (2012) Descriptive epidemiology of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* in beef calves with naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis (Pinkeye). Vet Microbiol. 155:374-380.
- Piccini CD**, Barbé FM, Legnani-Fajardo CL (1998) Identification of iron-regulated outer membrane proteins in uropathogenic *Proteus mirabilis* and its relationship with heme uptake. FEMS Microbiol Lett. 166:243-248.
- Pettersson B**, Kodjo A, Ronaghi M, Uhlen M, Tonjum T (1998) Phylogeny of the family *Moraxellaceae* by 16s rDNA sequence analysis, with special emphasis on differentiation of *Moraxella* species. Int J Syst Bacteriol. 48:75–89.
- Postma GC**, Carfagnini JC, Minatel L (2008) *Moraxella bovis* pathogenicity: An update. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 31:449-458.

- Prieto CI**, Aguilar OM, Yantorno OM (1999) Analyses of lipopolysaccharides, outer membrane proteins and DNA fingerprints reveal intraspecies diversity in *Moraxella bovis* isolated in Argentina. *Vet Microbiol.* 70:213-223.
- Pugh GW**, Hughes DE (1970) Comparison of the virulence of various strains of *Moraxella bovis*. *Can J Comp Med.* 34:333-340.
- Pugh GW**, McDonald TJ (1986) Identification of bovine carriers of *Moraxella bovis* by comparative cultural examinations of ocular and nasal secretions. *Am J Vet Res.* 47:2343-2345.
- Punch N** (1985) Plasma and tear concentrations of antibiotics administered parenterally to cattle. *Res Vet Sci.* 39:179-187.
- Punch P**, Slatter D (1984) A review of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Vet Bull* 54:193-257.
- Rosseau RA**, Van Landschoot A, Gillis M, De Ley J (1991) Taxonomy of *Moraxellaceae* fam.nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and Related Organisms. *Int J Syst Evol Microbiol.* 41:310-319.
- Ruehl WW**, Marrs C, Beard MK, Shokooki V, Hinojoza JR, Banks S (1993) Q pili enhance the attachment of *Moraxella bovis* to bovine corneas in vitro. *Mol Microbiol.* 7:285-288.
- Ruehl WW**, Marrs C, Fernandez R, Falkow S, Schoolnik GK (1988) Purification, characterization, and pathogenicity of *Moraxella bovis* pili. *J Exp Med.* 168:983-1002.
- Saito R**, Matsuoka S, Fujinami Y, Nonaka S, Ichinose S, Kubota T, Okamura N (2013) Role of *Moraxella catarrhalis* outer membrane protein CD in bacterial cell morphology and autoaggregation. *Res Microbiol.* 164:236-243.
- Sambrook J**, Fritsh EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor. NY.
- Sargison ND**, Hutner JE, West DM, Gwozdz MJ (1996) Observations on the efficacy of mass treatment by subconjunctival penicillin injection for the control of an outbreak of infectious bovine keratoconjunctivitis. *N Z Vet J.* 44:142–144.

- Sarwar J**, Campagnari AA, Kirkham C, Murphy TF (1992) Characterization of an antigenically conserved heat-modifiable major outer membrane protein of *Branhamella catarrhalis*. Infect Immun. 60:804-809.
- Sarwar J**, Campagnari AA, Kirkham C, Murphy TF (1993) Outer membrane protein CD of *Branhamella catarrhalis*: Sequence conservation in strains recovered from the human respiratory tract. Microb Pathog. 19:215-225.
- Schnaitman CA** (1971) Effect of ethylenediaminetetraacetic acid, Triton X-100, and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolate cell walls of *Escherichia coli*. J Bacteriol. 108:553-563.
- Severin A**, Nickbarg E, Wooters J, Quazi SA, Matsuka YV, Murphy E, Moutsatsos IK, Zagursky RJ, Olmsted SB (2007) Proteomic analysis and identification of *Streptococcus pyogenes* surface-associated proteins. J Bacteriol. 189:1514-1522.
- Shryock TR**, White DW, Werner CS (1998) Antimicrobial susceptibility of *Moraxella bovis*. Vet Microbiol. 61:305-309.
- Simpson CF**, White FH, and Sandhu TS (1976) The Structure of Pili (Fimbriae) of *Moraxella bovis*. Can J comp Med. 40:1-4.
- Smith PC**, Blankenship T, Hoover TR, Powe T, Wright JC (1990) Effectiveness of two commercial infectious bovine keratoconjunctivitis vaccines. Am J Vet Res. 51:1147-1150.
- Smith PK**, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto, EK, Goeke NM, Olson BJ, and Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85.
- Snowder GD**, Van Vleck LD, Cundiff LV, Bennett GL (2005) Genetic and environmental factors associated with incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis in preweaned beef calves. J Anim. Sci. 83:507–518.
- Sosa V**, Zunino P (2012) Molecular and phenotypic analysis of *Moraxella* spp. associated to infectious bovine keratoconjunctivitis. Vet J. 193:595-597.
- Sosa V**, Zunino P (2013) Diversity of *Moraxella* spp. strains recovered from infectious bovine keratoconjunctivitis cases in Uruguay. J Infect Dev Ctries. 7:819-824.

- St Geme JW 3rd** (1997) Bacterial adhesins: determinants of microbial colonization and pathogenicity. *Adv Pediatr.* 44:43-72.
- Sun D**, Zhang H, Lv S, Wang H, Guo D (2013) Identification of a 43-kDa outer membrane protein of *Fusobacterium necrophorum* that exhibits similarity with pore-forming proteins of other *Fusobacterium* species. *Res Vet Sci.* 95:27-33.
- Thrift FA**, Overfield JR (1974) Impact of pinkeye (infectious bovine kerato-conjunctivitis) on weaning and postweaning performance of Hereford calves. *J Anim Sci.* 38(6):1179–1184.
- Towbin M**, Staehlin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350- 4354.
- Tsutomu K**, Oishi D, Tsubaki S, Takai S (2003) Molecular cloning and characterization of a 79-kDa iron-repressible outer-membrane protein of *Moraxella bovis*. *FEMS Microbiol Lett.* 225:279-284.
- Webber JJ**, Selby LA (1981a) Effects of *Moraxella bovis* vaccination schedules on experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis. *Am J Vet Res.* 42:1181-1183.
- Webber JJ**, Selby LA (1981b) Risk factors related to the prevalence of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Am J Vet Res.* 179:823-826.
- Webster J**, Oxley D (2012) Protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 800:227-240.
- Yang YP**, Myers LE, McGuinness U, Chong P, Kwok Y, Klein MH, Harkness RE (1997) The major outer membrane protein, CD, extracted from *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* is a potential vaccine antigen that induces bactericidal antibodies. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 17:187-199.
- Zbrun MV**, Zielinski GC, Piscitelli HC, Descarga C, Urbani LA, Defain Tesoriero MV, Hermida L (2012) Evaluation of anti-*Moraxella bovis* pili immunoglobulin-A in tears following intranasal vaccination of cattle. *Res Vet Sci.* 93:183-189.

ANEXO

Anexo 1:

Alineamiento Múltiple

Seguidamente de haber obtenido las secuencias de los fragmentos amplificados, con los *primers* Draft2, a través del servicio de secuenciación de MACROGEN Inc. y haberlas editado con la herramienta informática BioEdit, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias del gen que codifican la PME-CD de 3 cepas de *M. bovis*, de 2 cepas de *M. bovoculi*, además se incluyó la secuencia preliminar de la PME-CD de Epp63 de *M. bovis* (Epp63sec.p) y la secuencia que codifica la PME-CD de CANIIB, obtenida a partir de los fragmentos de amplificación con los *primers* OMPCD_Int. Se observan regiones conservadas entre ellas. En la siguiente figura se muestra en color verde la localización de los *primers* OMPCD_Int.

		
	10 20 30 40 50	
Epp63	-----G CTGCTACCGC	
CANIIB	-----	
EV345	-----TACCGC	
LC190	-----	
BAA1259	-----	
3A8	-----G CTGCTACCGC	
Epp63sec.p	ATGAACTTA ATAAAATCGC TTTGGCATTG GTTGCCACTG CTGCTACCGC	
		
	60 70 80 90 100	
Epp63	CGCATCTGCT GGCCTAACCG TAACCCCACT AGTTGGTTAT CAATATCAAG	
CANIIB	-----	
EV345	CGCATCTGCT GGCCTAACCG TAACCCCACT AGTTGGTTAT CAATATCAAG	
LC190	-----CCG TAACCCCACT AGTTGGTTAT CAATATCAAG	
BAA1259	-----	
3A8	CGCATCTGCT GGCCTAACCG TAACCCCACT AGTTGGTTAT CAATATCAAG	
Epp63sec.p	CGCATCTGCT GGCCTAACCG TAACCCCACT AGTTGGTTAT CAATATCAAG	
		
	110 120 130 140 150	
Epp63	ACAAAGCTCA CGACAAACAA CGTGAAATAT TCAAACTCG TCAGCAACTT	
CANIIB	-----	
EV345	ACAAAGCTCA CGACAAACAA CGTGAAATAT TCAAACTCG TCAGCAACTT	
LC190	ACAAAGCTCA CGACAAACAA CGTGAAATAT TCAAACTCG TCAGCAACTT	
BAA1259	-----GCTCA CGACAAACAA CGTGAAATAT TCAAACTCG TCAGCAACTT	
3A8	ACAAAGCTCA CGACAAACAA CGTGAAATAT TCAAACTCG TCAGCAACTT	
Epp63sec.p	ACAAAGCTCA CGACAAACAA CGTGAAATAT TCAAACTCG TCAGCAACTT	

	
	160 170 180 190 200
Epp63	AATGACGCTA ACGCCAAAGC ACCAAACAAT CCAGCAAATG GTGGCGTTGC
CANIIIB	-----TG GTGGCGTTGC
EV345	AATGACGCTA ACGCCAAAGC ACCAAACAAT CCAGCAAATG GTGGCGTTGC
LC190	AATGACGCTA ACGCCAAAGC ACCAAACAAT CCAGCAAATG GTGGCGTTGC
BAA1259	AATGACGCTA ACGCCAAAGC ACCAAACAAT CCAGCAAATG GTGGCGTTGC
3A8	AATGACGCTA ACGCCAAAGC ACCAAACAAT CCAGCAAATG GTGGCGTTGC
Epp63sec.p	AATGACGCTA ACGCCAAAGC ACCAAACAAT CCAGCAAATG GTGGCGTTGC

	
	210 220 230 240 250
Epp63	CCTAGAAAAGT GACTTATACA CGGGTCTTGC GCTAGGTGTG GAACTTACCC
CANIIIB	CCTAGAAAAGT GACTTATACA CGGGTCTTGC GCTAGGTGTG GAACTTACCC
EV345	CCTAGAAAAGT GACTTATACA CGGGTCTTGC GCTAGGTGTG GAACTTACCC
LC190	CCTAGAAAAGT GACTTATACA CGGGTCTTGC GCTAGGTGTG GAACTTACCC
BAA1259	CCTAGAAAAGT GACTTATACA CGGGTCTTGC GCTAGGTGTG GAACTTACCC
3A8	CCTAGAAAAGT GACTTATACA CGGGTCTTGC GCTAGGTGTG GAACTTACCC
Epp63sec.p	CCTAGAAAAGT GACTTATACA CGGGTCTTGC GCTAGGTGTG GAACTTACCC

	
	260 270 280 290 300
Epp63	CATCTACTCA ATTCCAAGTA GAATATGGCG TAACTGATAC TGATGCGAGA
CANIIIB	CATCTACTCA ATTCCAAGTA GAATATGGCG TAACTGATAC TGATGCGAGA
EV345	CATCTACTCA ATTCCAAGTA GAATATGGCG TAACTGATAC TGATGCGAGA
LC190	CATCTACTCA ATTCCAAGTA GAATATGGCG TAACTGATAC TGATGCGAGA
BAA1259	CATCTACTCA ATTCCAAGTA GAATATGGCG TAACTGATAC TGATGCGAGA
3A8	CATCTACTCA ATTCCAAGTA GAATATGGCG TAACTGATAC TGATGCGAGA
Epp63sec.p	CATCTACTCA ATTCCAAGTA GAATATGGCG TAACTGATAC TGATGCGAGA

	
	310 320 330 340 350
Epp63	GCTTCAAAAA CTTCTGCCAA TGCTCATCCT AGAAACGTAT TTGATGCCAA
CANIIIB	GCTTCAAAAA CTTCTGCCAA TGCTTATCCT AGAAACGTAT TTGATGCCAA
EV345	GCTTCAAAAAG CTTCTGCCAA TGCTTATCCT AGAAACGTAT TTGATGCCAA
LC190	GCTTCAAAAAG CTTCTGCCAA TGCTTATCCT AGAAACGTAT TTGATGCCAA
BAA1259	GCTTCAAAAA CTTCTGCCAA TGCTCATCCT AGAAACGTAT TTGATGCCAA
3A8	GCTTCAAAAAG CTTCTGCCAA TGCTTATCCT AGAAACGTAT TTGATGCCAA
Epp63sec.p	GCTTCAAAAA CTTCTGCCAA TGCTCATCCT AGAAACGTAT TTGATGCCAA

	
	360 370 380 390 400
Epp63	AGAAGAAATC ATCTCTGGTA ACTTCCTAAT CGGCACTGAG CAATTCTCAG
CANIIIB	AGAAGAAATC ATCTCTGGTA ACTTCCTAAT CGGCACTGAG CAATTCTCAG
EV345	AGAAGAAATC ATCTCTGGTA ACTTCCTAAT CGGCACTGAG CAATTCTCAG
LC190	AGAAGAAATC ATCTCTGGTA ACTTCCTAAT CGGCACTGAG CAATTCTCAG
BAA1259	AGAAGAAATC ATCTCTGGTA ACTTCCTAAT CGGCACTGAG CAATTCTCAG
3A8	AGAAGAAATC ATCTCTGGTA ACTTCCTAAT CGGCACTGAG CAATTCTCAG
Epp63sec.p	AGAAGAAATC ATCTCTGGTA ACTTCCTAAT CGGCACTGAG CAATTCTCAG

	
	410 420 430 440 450
Epp63	GCTACACTAA CAATAAGTTC AAGCCTTATG TGCTTATCGG TGCAGGTCAA
CANIIIB	GCTACACTAA CAATAAGTTC AAGCCTTATG TGCTTATCGG TGCAGGTCAA
EV345	GCTACACTAA CAATAAGTTC AAGCCTTATG TGCTTATCGG TGCAGGTCAA
LC190	GCTACACTAA CAATAAGTTC AAGCCTTATG TGCTTATCGG TGCAGGTCAA
BAA1259	GCTACACTAA CAATAAGTTC AAGCCTTATG TGCTTATCGG TGCAGGTCAA
3A8	GCTACACTAA CAATAAGTTC AAGCCTTATG TGCTTATCGG TGCAGGTCAA
Epp63sec.p	GCTACACTAA CAATAAGTTC AAGCCTTATG TGCTTATCGG TGCAGGTCAA

	
	460 470 480 490 500
Epp63	GCCAAATATA AAGTAGAAAG --CCGTGAAC AACTTC-GTG ATGGTACTCC
CANIIIB	GCCAAATATA AAGTAGAAAG --CCGTGAAC AACTTC-GTG ATGGTACTCC
EV345	GCTAAATATA AAGTAGAAAG --CCGTGAAC AACTTC-GTG ATGGTACTCC
LC190	GCTAAATATA AAGTAGAAAG --CCGTGAAC AACTTC-GTG ATGGTACTCC
BAA1259	GCCAAATATA AAGTAGAAAA GCCTGTGAAC AACTTCTGTG ATGGTACTCC
3A8	GCTAAATATA AAGTAGAAAG --CCGTGAAC AACTTC-GTG ATGGTACTCC
Epp63sec.p	GCCAAATATA AAGTAGAAAG --CCGTGAAC AACTTC-GTG ATGGTACTCC

	
	510 520 530 540 550
Epp63	AG-CTGGCAT AG-AAGTATC TGA-GTCAAA AGACACCATC GG-TAACCTA
CANIIIB	AG-CTGGCAT AG-AAGTATC TGA-GTCAAA AGACACCATC GG-TAACCTA
EV345	AG-CTGGCAT AG-AAGTATC TGA-GTCAAA AGACACCATC GG-TAACCTA
LC190	AG-CTGGCAT AG-AAGTATC TGA-GTCAAA AGACACCATC GG-TAACCTA
BAA1259	AGGCTGGCAT AGGAAGTATC TGAAGTCAAA AGACACCATC GGGTAACCTA
3A8	AG-CTGGCAT AG-AAGTATC TGA-GTCAAA AGACACCATC GG-TAACCTA
Epp63sec.p	AG-CTGGCAT AG-AAGTATC TGA-GTCAAA AGACACCATC GG-TAACCTA

	
	560 570 580 590 600
Epp63	G-GTCTAGGT GCTCG-TTAC CTAATCAACG ACG-CTCTA- GCTCTACGTG
CANIIIB	G-GTCTAGGT GCTCG-TTAC CTAATCAACG ACG-CTCTA- GCTCTACGTG
EV345	G-GTCTAGGT GCTCG-TTAC CTAATCAACG ACG-CTCTA- GCTCTACGTG
LC190	G-GTCTAGGT GCTCG-TTAC CTAATCAACG ACG-CTCTAA GCTCTACGTG
BAA1259	GAGTCTAGGT GCTCGATTAC CTAATCAACG ACGGCTCTAG CGTCTACGTG
3A8	G-GTCTAGGT GCTCG-TTAC CTAATCAACG ACG-CTCTA- GCTCTACGTG
Epp63sec.p	G-GTCTAGGT GCTCG-TTAC CTAATCAACG ACG-CTCTA- GCTCTACGTG

	
	610 620 630 640 650
Epp63	G-CGAAGC-T CGTGCCG-TT CACAACCTTTG ACAACGCATG GTGGGAAGGT
CANIIIB	G-CGAAGC-T CGTGCCG-TT CACAACCTTTG ACAACGCATG GTGGGAAGGT
EV345	G-CGAAGC-T CGTGCCG-TT CACAACCTTTG ACAACGCATG GTGGGAAGGT
LC190	G-CGAAGC-T CGTTCCG-TT CACAACCTTTG ACAACGCATG GTGGGAAGGT
BAA1259	GTCGAAGCCT CGTGCCGGTT CACAACCTTTG ACAACGCATG GTGGGAAGGT
3A8	G-CGAAGC-T CGTGCCG-TT CACAACCTTTG ACAACGCATG GTGGGAAGGT
Epp63sec.p	G-CGAAGC-T CGTGCCG-TT CACAACCTTTG ACAACGCATG GTGGGAAGGT

	
	660 670 680 690 700
Epp63	CAAGCCCTAG CAGGTCTTGA AGTGACTCTA GGTG GTCTGTT TGGCACCTAC
CANIIIB	CAAGCCCTAG CAGGTCTTGA AGTGACTCTA GGTG GTCTGTT TGGCACCTA-
EV345	CAAGCCCTAG CAGGTCTTGA AGTGACTCTA GGTG GTCTGTT TGGCACCTAC
LC190	CAAGCCCTAG CAGGTCTTGA AGTGACTCTA GGTG GTCTGTT TGGCACCTAC
BAA1259	CAAGCCCTAG CAGGTCTTGA AGTGACTCTA GGTG GTCTGTT TGGCACCTAC
3A8	CAAGCCCTAG CAGGTCTTGA AGTGACTCTA GGTG GTCTGTT TGGCACCTAC
Epp63sec.p	CAAGCCCTAG CAGGTCTTGA AGTGACTCTA GGTG GTCTGTT TGGCACCTAC

	
	710 720 730 740 750
Epp63	CGTAC CTGTG GCACCTATTC ATGAGCC-AG TGGTTCAA-C CTGTACAAGT
CANIIIB	-----
EV345	CGTAC CTGTG GCACCTATTC ATGAGCC-AG TGGTTCAA-C CTGTACAAGT
LC190	CGTAC CTGTG GCACCTATTC ATGAGCC-AG TGGTTCAA-C CTGTACAAGT
BAA1259	CGTAC CTGTG GCACCTATTC ATGAGCCCAAG TGGTTCAATC CTGTACAAGT
3A8	CGTAC CTGTG GCACCTATTC ATGAGCC-AG TGGTTCAA-C CTGTACAAGT
Epp63sec.p	CGTAC CTGTG GCACCTATTC ATGAGCC-AG TGGTTCAA-C CTGTACAAGT

	
	760 770 780 790 800
Epp63	AC-AAGTTGT TGAAGAGC-A GTTCATC-GA CAGT-GATGG TGATGGTGT
CANIIIB	-----
EV345	AC-AAGTTGT TGAAGAGC-A GTTCATC-GA CAGT-GATGG TGATGGTGT
LC190	AC-AAGTTGT TGAAGAGC-A GTTCATC-GA CAGT-GATGG TGATGGTGT
BAA1259	ACTAAGTTGT TGAAGAGCCA GTTCATCTGA CAGTAGATGG TGAT-----
3A8	AC-AAGTTGT TGAAGAGC-A GTTCATC-GA CAGT-GATGG TGATGGTGT
Epp63sec.p	AC-AAGTTGT TGAAGAGC-A GTTCATC-GA CAGT-GATGG TGATGGTGT

	
	810 820 830 840 850
Epp63	GCTGACCATC TAGACCTATG CCCAAATACT CCA-CGCAAC GTTGTGGTTG
CANIIIB	-----
EV345	GCTGACCATC TAGACCTATG CCCAAATACT CCA-CGCAAC GTTGTGGTTG
LC190	GCTGACCATC TAGACCTATG CCCAAATACT CCAGCGCAAC GTTGTGGTTG
BAA1259	-----
3A8	GCTGACCATC TAGACCTATG CCCAAATACT CCA-CGCAAC GTTGTGGTTG
Epp63sec.p	GCTGACCATC TAGACCTATG CCCAAATACT CCA-CGCAAC GTTGTGGTTG

	
	860 870 880 890 900
Epp63	ATGCTAATGG TTGCCCAGTT GAGACTGCGG TACAAGAAGA CCTACGCATG
CANIIIB	-----
EV345	ATGCTAATGG TTGCCCAGTT GAGACTGCGG TACAAGAAGA CCTACGCATG
LC190	ATGCTAATGG TTGCCCAGTT GAGACTGCGG TACAAGAAGA CCTACGCATG
BAA1259	-----
3A8	ATGCTAATGG TTGCCCAGTT GAGACTGCGG TACAAGAAGA CCTACGCATG
Epp63sec.p	ATGCTAATGG TTGCCCAGTT GAGACTGCGG TACAAGAAGA CCTACGCATG

	
	910 920 930 940 950
Epp63	GAACTTCGTG TATTCTTTGA CCGTGACAAG TCAAACATCA AACCACAGTT
CANIIIB	-----
EV345	GAACTTCGTG TATTCTTTGA CCGTGACAAG TCAAACATCA AACCACAGTT
LC190	GAACTTCGTG TATTCTTTGA CCGTGACAAG TCAAAC-----
BAA1259	-----
3A8	GAACTTCGTG TATTCTTTGA CCGTGACAAG TCAAACATCA AACCACAGTT
Epp63sec.p	GAACTTCGTG TATTCTTTGA CCGTGACAAG TCAAACATCA AACCACAGTT

	
	960 970 980 990 1000
Epp63	CCGTGAAGAG GTTGCTAAAG TTGCTGACAA GATGCGTGAG TTCCCGAACG
CANIIIB	-----
EV345	CCGTGAAGAG GTTG-----
LC190	-----
BAA1259	-----
3A8	CCGTGAAGAG GTTGCTAAAG TTGCTGACAA GATGCGTGAG TTCCCGAACG
Epp63sec.p	CCGTGAAGAG GTTGCTAAAG TTGCTGACAA GATGCGTGAG TTCCCGAACG

	
	1010 1020 1030 1040 1050
Epp63	CAACTGCTGC CATCGAAGGT CACGCTTCTA AA-----
CANIIIB	-----
EV345	-----
LC190	-----
BAA1259	-----
3A8	CAACTGCTGC CATCGAAGGT CACGCTTCTA AAGACAGCAA GCGTTCAAGT
Epp63sec.p	CAACTGCTGC CATCGAAGGT CACGCTTCTA AAGACAGCAA GCGTTCAAGT

	
	1060 1070 1080 1090 1100
Epp63	-----
CANIIIB	-----
EV345	-----
LC190	-----
BAA1259	-----
3A8	GCTAAGTACA ACCAACGCCT ATCTGAAGCT CGTGCAAACG CTGTGAAGTC
Epp63sec.p	GCTAAGTACA ACCAACGCCT ATCTGAAGCT CGTGCAAACG CTGTGAAGTC

	
	1110 1120 1130 1140 1150
Epp63	-----
CANIIIB	-----
EV345	-----
LC190	-----
BAA1259	-----
3A8	TATGCTATCT AACGAGTTCTG GTATCGCTCC TAACCGTATC TCTGCGGTAG
Epp63sec.p	TATGCTATCT AACGAGTTCTG GTATCGCTCC TAACCGTATC TCTGCGGTAG

	
	1160 1170 1180 1190 1200

Epp63	-----	-----	-----	-----	-----
CANIIIB	-----	-----	-----	-----	-----
EV345	-----	-----	-----	-----	-----
LC190	-----	-----	-----	-----	-----
BAA1259	-----	-----	-----	-----	-----
3A8	GTTATGGCTT	TGACCGTCCT	GTAGCACCTA	ACGACACTGC	TGAAAACAAA
Epp63sec.p	GTTATGGCTT	TGACCGTCCT	GTAGCACCTA	ACGACACTGC	TGAAAACAAA

		
		1210 1220 1230 1240 1250
Epp63	-----	-----
CANIIIB	-----	-----
EV345	-----	-----
LC190	-----	-----
BAA1259	-----	-----
3A8	GCACTTAACC	GCCGTGTTTA
Epp63sec.p	GCACTTAACC	GCCGTGTTTA

		
		1260
Epp63	-----	-----
CANIIIB	-----	-----
EV345	-----	-----
LC190	-----	-----
BAA1259	-----	-----
3A8	C-----	-----
Epp63sec.p	CGTTGTAGAA	ACCAAATAA

Anexo 2:

Análisis de las secuencias obtenidas de los fragmentos de interés amplificados con los pares de *primers* Draft2 y OMPCD_Int. Se muestra la homología de cada secuencia editada en BioEdit con la PME-CD de *M. catarrhalis* a través de la herramienta BLASTn y BLASTx.

Primers Draft2

Epp63 (<i>M. bovis</i>)	Descripción	Cobertura	E value	Identidad	Número de Acceso
BLASTn	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc103	97%	1,00E-72	66%	AB725647.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc166	85%	6,00E-70	66%	AB725648.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc36	85%	6,00E-70	66%	AB725640.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc91	85%	3,00E-68	66%	AB725644.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc52	85%	9,00E-68	66%	AB725643.1
BLASTx	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	95%	3,00E-116	57%	BAM17488.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	95%	3,00E-116	57%	BAM17487.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	95%	1,00E-115	57%	BAM17491.1
	proteína de membrana externa CD (<i>M. catarrhalis</i>)	95%	5,00E-115	56%	ABK88265.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	95%	7,00E-115	55%	BAM17493.1

EV345 (<i>M. bovis</i>)	Descripción	Cobertura	E value	Identidad	Número de Acceso
BLASTn	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc103	90%	4,00E-59	67%	AB725647.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc116	77%	1,00E-59	69%	AB725646.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc138	90%	2,00E-57	67%	AB725649.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc166	77%	2,00E-57	69%	AB725648.1
	proteína de membrana externa CD, parcial CDS (<i>M. catarrhalis</i>), cepa Mc91	77%	2,00E-57	69%	AB725644.1
BLASTx	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	95%	3,00E-116	57%	BAM17488.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	95%	3,00E-116	57%	BAM17487.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	95%	1,00E-115	57%	BAM17491.1
	proteína de membrana externa CD (<i>M. catarrhalis</i>)	95%	5,00E-115	56%	ABK88265.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	95%	7,00E-115	55%	BAM17493.1

Lc190 (<i>M. bovis</i>)	Descripción	Cobertura	E value	Identidad	Número de Acceso
BLASTn	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc103	78%	6,00E-57	69%	AB725647.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc116	61%	6,00E-57	69%	AB725646.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc166	78%	7,00E-56	69%	AB725648.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc91	78%	7,00E-56	69%	AB725644.1
	proteína de membrana externa CD, parcial CDS (<i>M. catarrhalis</i>), cepa Mc36	78%	7,00E-56	69%	AB725640.1
BLASTx	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	98%	3,00E-67	54%	BAM17487.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	98%	5,00E-67	54%	BAM17491.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	98%	9,00E-67	54%	BAM17488.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	98%	6,00E-66	54%	BAM17492.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	98%	7,00E-66	54%	BAM17493.1

BAA1259 (<i>M. bovoculi</i>)	Descripción	Cobertura	E value	Identidad	Número de Acceso
BLASTn	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc46	90%	4,00E-59	67%	AB725647.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc103	77%	1,00E-59	69%	AB725646.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc116	90%	2,00E-57	67%	AB725649.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc166	77%	2,00E-57	69%	AB725648.1
	proteína de membrana externa CD, parcial CDS (<i>M. catarrhalis</i>), cepa Mc138	77%	2,00E-57	69%	AB725644.1
BLASTx	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	95%	3,00E-116	57%	BAM17488.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	95%	3,00E-116	57%	BAM17487.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	95%	1,00E-115	57%	BAM17491.1
	proteína de membrana externa CD (<i>M. catarrhalis</i>)	95%	5,00E-115	56%	ABK88265.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	95%	7,00E-115	55%	BAM17493.1

3A8 (<i>M. bovoculi</i>)	Descripción	Cobertura	E value	Identidad	Número de Acceso
BLASTn	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc103	97%	3,00E-113	67%	AB725647.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc52	87%	1,00E-110	68%	AB725643.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc166	87%	6,00E-109	67%	AB725648.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc36	87%	6,00E-109	67%	AB725640.1
	proteína de membrana externa CD, parcial CDS (<i>M. catarrhalis</i>), cepa Mc144	87%	8,00E-108	68%	AB725645.1
BLASTx	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	96%	4,00E-163	62%	BAM17488.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	96%	6,00E-163	62%	BAM17487.1
	proteína de membrana externa CD (<i>M. catarrhalis</i>)	96%	1,00E-162	62%	BAM17491.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	96%	6,00E-162	61%	ABK88265.1
	proteína de membrana externa CD (<i>M. catarrhalis</i>)	96%	1,00E-161	61%	WP 003665470.1

Primers OMP_Int

Epp63 (<i>M. bovis</i>)	Descripción	Cobertura	E value	Identidad	Número de Acceso
BLASTn	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc116	100%	2,00E-39	68%	AB725646.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc166	100%	1,00E-37	68%	AB725648.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc103	100%	1,00E-37	68%	AB725647.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc91	100%	1,00E-37	68%	AB725644.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc36	100%	1,00E-37	68%	AB725640.1
BLASTx	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	100%	4,00E-56	64%	BAM17488.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	100%	4,00E-56	64%	BAM17493.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	100%	5,00E-56	64%	BAM17492.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	100%	5,00E-56	64%	BAM17486.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	100%	6,00E-56	64%	BAM17490.1

Lc190 (<i>M. bovis</i>)	Descripción	Cobertura	E value	Identidad	Número de Acceso
BLASTn	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc103	90%	4,00E-59	67%	AB725647.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc116	77%	1,00E-59	69%	AB725646.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc138	90%	2,00E-57	67%	AB725649.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc166	77%	2,00E-57	69%	AB725648.1
	proteína de membrana externa CD, parcial CDS (<i>M. catarrhalis</i>), cepa Mc91	77%	2,00E-57	69%	AB725644.1
BLASTx	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	95%	3,00E-116	57%	BAM17488.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	95%	3,00E-116	57%	BAM17487.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	95%	1,00E-115	57%	BAM17491.1.3
	proteína de membrana externa CD (<i>M. catarrhalis</i>)	95%	5,00E-115	56%	ABK88265.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	95%	7,00E-115	55%	BAM17493.1

CANIIB (<i>M. bovis</i>)	Descripción	Cobertura	E value	Identidad	Número de Acceso
BLASTn	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc103	88%	4,00E-23	69%	AB725641.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc142	88%	2,00E-21	68%	AB725650.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc138	88%	2,00E-21	69%	AB725649.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc166	88%	2,00E-21	68%	AB725648.1
	proteína de membrana externa CD, parcial CDS (<i>M. catarrhalis</i>), cepa Mc103	88%	2,00E-21	68%	AB725647.1
BLASTx	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	99%	6,00E-33	54%	BAM17492.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	99%	8,00E-33	54%	BAM17486.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	99%	8,00E-33	54%	BAM17488.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	99%	8,00E-33	54%	BAM17193.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	99%	9,00E-33	54%	BAM17490.1

3A8 (<i>M. bovoculi</i>)	Descripción	Covertura	E value	Identidad	Número de Acceso
BLASTn	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc103	89%	6,00E-41	68%	AB725647.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc116	89%	6,00E-41	68%	AB725646.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc166	89%	3,00E-39	68%	AB725648.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc91	89%	3,00E-39	67%	AB725644.1
	<i>M. catarrhalis</i> , proteína de membrana externa CD, parcial CDS, cepa Mc46	89%	3,00E-39	69%	AB725641.1
BLASTx	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	86%	2,00E-50	62%	BAM17488.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	86%	2,00E-50	62%	BAM17492.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	86%	2,00E-50	62%	BAM17486.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	86%	2,00E-50	62%	BAM17493.1
	proteína de membrana externa CD, parcial (<i>M. catarrhalis</i>)	86%	2,00E-50	62%	BAM17490.1