

Universidad de la República

Posgrado en Biotecnología

Maestría en Biotecnología



iibce
INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS
CLEMENTE
ESTABLE

**Fimbrias y PME-CD de *Moraxella bovis* como posibles
antígenos protectores contra la Queratoconjuntivitis
Infecciosa Bovina**

Lic. Sofía Acquistapace

Tutor:

Dr. Pablo Zunino

Cotutor:

José Sotelo

Tribunal:

Dr. Rodrigo Puentes

Dr. Pablo Smircich

Dra. Susana Castro

Departamento de Microbiología

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

ÍNDICE

RESUMEN	5
ANTECEDENTES	6
La ganadería en el Uruguay.....	6
Queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB).....	6
Síntomas asociados a la QIB.....	7
Transmisión y factores predisponentes.....	7
Agentes etiológicos.....	9
<i>Moraxella bovis</i>	9
<i>Moraxella bovoculi</i>	9
Factores de virulencia.....	10
Citotoxina.....	10
Fimbrias tipo IV.....	11
<i>Type four pili Q</i> (TfpQ) y <i>Type four pili I</i> (Tfpl) de <i>M. bovis</i>	12
Proteínas de membrana externa (PME).....	14
PME-CD.....	15
Tratamiento.....	16
Prevención.....	17
Vacunas.....	18
Vacunas basadas en bacterias.....	18
Vacunas basadas en subunidades proteicas.....	19
Antígenos nativos.....	19
Antígenos recombinantes.....	20
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
1. SELECCIÓN DE CEPAS Y ANÁLISIS DE LAS FIMBRIAS	23
1.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	23
1.2. Movilidad “ <i>twitching</i> ” y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	24
1.3. Obtención de fimbrias.....	24
1.4. Extracción de ADN.....	25
1.5. Amplificación y secuenciación del primer gen fimbrial de <i>M. bovis</i>	26
2. SECUENCIACIÓN GENÓMICA DE <i>M. bovis</i> Y <i>M. bovoculi</i>	27
2.1. Confirmación de la identidad fenotípica y morfológica de EV345 y PRO.....	27
2.2. Confirmación de la identidad molecular de EV345 y PRO.....	28
2.3. Secuenciación genómica de <i>M. bovis</i> y <i>M. bovoculi</i>	28
2.4. Análisis genético de las fimbrias de <i>M. bovis</i>	29
2.4.1. Genes fimbriales <i>tfpQ</i> y <i>tfpl</i>	29
2.4.2. Amplificación de <i>locus</i> fimbrial.....	31
2.4.3. Búsquedas de secuencias invertidas en el <i>locus</i> fimbrial.....	32
2.4.4. Predicción de la estructura secundaria de las fimbrias.....	32
3. PRODUCCIÓN DE PME-CD RECOMBINANTE	33
3.1. Plásmido de expresión y cepas bacterianas.....	33

3.2. Amplificación del gen <i>pme-cd</i> por PCR.....	33
3.3. Purificación del ADN plasmídico.....	35
3.4. Digestión enzimática del producto de PCR y del plásmido de expresión.....	35
3.5. Ligación.....	35
3.6. Generación de células competentes.....	36
3.7. Transformación.....	36
3.8. Inducción de la expresión de PME-CD recombinante en <i>E. coli</i>	37
3.9. Solubilidad de la PME-CD recombinante.....	37
3.10. Purificación de PME-CD recombinante.....	38
3.11. Visualización de las PME-CD recombinante (SDS-PAGE).....	38
3.12. Confirmación de la identidad de PME-CD recombinante.....	38
3.13. Cuantificación de PME-CD.....	39
3.14. <i>Western blot</i>	40
3.15. Inmunización de ratones con PME-CD recombinante (EV345).....	41
3.15.1. Animales.....	41
3.15.2. Inmunización a través de la vía sistémica.....	41
3.15.3. Inmunización a través de la vía intranasal.....	41
3.15.4. Determinación de anticuerpos en suero y lavados bronqueoalveolares (BAL) por ELISA.....	42
3.15.5. Determinación de la producción de citoquinas por ELISA.....	43
3.15.6. Análisis estadísticos.....	43
RESULTADOS	45
Capítulo 1. Análisis de genes fimbriales de <i>M. bovis</i>	45
4. SELECCIÓN DE CEPAS	45
4.1. Presencia del primer gen fimbrial.....	45
4.2. Producción de fimbrias: Movilidad <i>twitching</i>	46
4.3. Visualización de las fimbrias mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	47
5. EXTRACCIÓN DE FIMBRIAS	49
6. SECUENCIACIÓN GENÓMICA	51
6.1. Confirmación de la identidad molecular de <i>M. bovis</i> EV345 y <i>M. bovoculi</i> PRO.....	51
6.2. Secuenciación genómica.....	51
6.3. Análisis genético de los dos tipos de fimbrias tipo IV (<i>tfpQ</i> , <i>tfpl</i>)	54
6.3.1. Predicción de la estructura secundaria de las fimbrias <i>TfpQ</i> y <i>Tfpl</i>	59
6.3.2. Comparación entre las secuencias de <i>fim09</i> , <i>tfpQ</i> y <i>tfpl</i>	60
6.3.3. Análisis del <i>locus</i> fimbrial de <i>M. bovis</i> a partir de PCR.....	62
6.3.4. Análisis del <i>locus</i> fimbrial de <i>M. bovis</i> a partir de la secuenciación genómica de EV345.....	63
6.3.5. Comparación de todas las secuencias fimbriales de EV345.....	65
6.3.6. Análisis de secuencias invertidas en el genoma.....	65
6.3.7. Análisis del gen fimbrial de <i>M. bovoculi</i>	66
6.3.8. Análisis de otros genes de interés en <i>M. bovis</i> y <i>M. bovoculi</i>	67
Capítulo 2. Inmunogenicidad de la PME-CD recombinante de <i>Moraxella bovis</i>	70
7. EXPRESIÓN IN VITRO DE PME-CD RECOMBINANTE	70
7.1. Amplificación, digestión, ligación y transformación del gen <i>pme-cd</i>	70
7.2. Inducción de la expresión de la proteína recombinante PME-CD en <i>E. coli</i>	71
7.3. Determinación de la solubilidad de la proteína recombinante.....	71

7.4. Purificación de la proteína PME-CD.....	71
7.5. Cuantificación de PME-CD purificada.....	72
7.6. Identidad de la PME-CD recombinante.....	73
7.7. Reactividad de la PME-CD recombinante con los anticuerpos.....	73
7.8. Respuesta de anticuerpos en animales inmunizados por vía sistémica.....	74
7.8.1. Respuesta de anticuerpos en sueros de animales.....	74
7.9. Respuesta de animales inmunizados por vía intranasal.....	75
7.9.1. Respuesta de anticuerpos en sueros de animales inmunizados.....	75
7.9.2. Respuesta de anticuerpos en BAL de animales inmunizados.....	75
7.9.2.1. Análisis de los niveles de IgG.....	75
7.9.2.2. Análisis de los niveles de IgA.....	76
7.9.3. Determinación de los niveles de citoquinas en BAL.....	77
DISCUSIÓN.....	79
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	89
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXO I.....	103
ANEXO II	105

RESUMEN

La Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB) es una enfermedad ocular grave que afecta frecuentemente al ganado y que tiene un impacto económico significativo mundialmente. Los agentes etiológicos asociados a la QIB son principalmente *Moraxella bovis* y *Moraxella bovoculi*. El problema sanitario originado por la QIB ha llevado a procurar desarrollar vacunas efectivas para prevenir la enfermedad. Las fimbrias son los factores de virulencia más estudiados de *Moraxella* spp. Existen dos tipos funcionalmente distintos de fimbrias en *M. bovis*, denominados I y Q como resultado de la inversión de un segmento de ADN por mecanismos de recombinación específica de sitio, lo que genera una gran heterogeneidad antigénica. Sin embargo, esto no se ha observado en *M. bovoculi*, ya que carece de mecanismos de cambio de fase. A su vez, 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. PME-CD ha exhibido potencial como antígeno protector en especies relacionadas como *Moraxella catharralis*, y recientemente se observó su presencia, expresión y reactividad con anticuerpos en *M. bovis* y *M. bovoculi*.

Los objetivos de este trabajo consistieron, en primer lugar, en analizar la base genética de la síntesis de fimbrias en base a PCR, secuenciación y posterior análisis bioinformático de una colección de aislamientos clínicos de *M. bovis*. Además se incluyó la secuenciación genómica de una cepa de *M. bovis* y una de *M. bovoculi* centrándonos en el análisis de los genes fimbriales. También se evaluó la inmunogenicidad de PME-CD recombinante de *M. bovis*. Para ello se inmunizaron animales de laboratorio y se analizó la respuesta de anticuerpos en los sueros y lavados bronqueoalveolares (BAL) obtenidos. Se determinaron también los niveles de citoquinas en los BAL.

Los resultados mostraron una alta diversidad intraespecífica entre las secuencias obtenidas de fimbrias. Se observó, además, que en un mismo cultivo pueden estar presentes simultáneamente poblaciones con ambas conformaciones de expresión de fimbrias. Esto pondría en revisión el uso de estos antígenos en vacunas contra la QIB. Por otro lado, los ensayos en modelos experimentales permitieron demostrar que PME-CD administrada por la vía intranasal indujo niveles significativamente altos de IgA e IL-4 en los BAL. Estos resultados alientan a continuar el estudio de esta PME como posible candidata para la formulación de vacunas contra la QIB.

ANTECEDENTES

LA GANADERÍA EN URUGUAY

La ganadería constituye una de las actividades económicas más importantes en Uruguay. Durante el año 2017 se faenaron 1.211.644 vacunos en establecimientos habilitados a nivel nacional, correspondiendo un 50 % a vacas y un 48 % a novillos. En ese mismo año, las exportaciones de carnes, menudencias, productos cárnicos y subproductos, sumaron 1864 millones de dólares. Los ingresos obtenidos por carne vacuna representaron un 84 % del total embarcado en el sector cárnico (INAC, 2017). Estas características muestran a la ganadería como una actividad clave para el desarrollo nacional, tanto por su aporte a la economía, como por el aprovechamiento del territorio.

Las enfermedades del ganado constituyen uno de los principales obstáculos para su explotación eficiente. Entre las enfermedades que afectan al ganado bovino y limitan sus rendimientos se encuentra la queratoconjuntivitis infecciosa bovina (Lorenz *et al.*, 2011; Kolenda *et al.*, 2015; Angelos 2015; Murray *et al.*, 2016).

QUERATOCONJUNTIVITIS INFECCIOSA BOVINA (QIB)

La Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB) es una enfermedad ocular grave que afecta frecuentemente al ganado y que tiene un impacto económico significativo mundialmente (Baptista *et al.*, 1979). El principal agente etiológico de la QIB es *Moraxella bovis* (Henson *et al.*, 1960). Esta enfermedad es altamente contagiosa y si bien afecta animales jóvenes puede manifestarse en todas las categorías de bovinos (Punch *et al.*, 1985). Aunque la QIB es rara vez mortal, genera pérdidas económicas asociadas a la disminución de la visión, pérdida de peso, disminución de la producción de leche, retrasos en el crecimiento, aumento de los costos de tratamiento, demanda de mano de obra y descuentos en el mercado debido a las lesiones del ojo y la ceguera (Thrift *et al.*, 1974; Slatter *et al.*, 1982; Pugh *et al.*, 1970).

Esta enfermedad está ampliamente presente en Uruguay, aunque no existen registros precisos de las pérdidas económicas que causa. 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 en el tratamiento (Brown *et al.*, 1998). En EEUU, más de 10 millones de bovinos son afectados por QIB anualmente, con una pérdida económica estimada de más de \$US 150 millones (Hansen, 2001).

Síntomas asociados a la QIB

Los indicios tempranos de la QIB están dados por la presencia de lagrimeo, una ligera fotofobia y blefaroespasmo. A medida que la QIB progresa, pudiendo ser a las 24-48 hs, se desarrollan otros signos clínicos, que incluyen mayor opacidad corneal y empeoramiento del blefaroespasmo, fotofobia y lagrimeo excesivo. En los casos más graves, incluso puede producirse una ruptura de la córnea, lo que puede conducir a ceguera permanente (Angelos, 2015). La QIB puede estar presente en uno o ambos ojos, si ambos están involucrados, el animal puede dudar en moverse (Punch *et al.*, 1985; Postma *et al.*, 2008). Algunos animales se recuperan espontáneamente, la úlcera se epiteliza, y se reduce por regeneración estromal, dejando una cicatriz; mientras que en otros el proceso se vuelve crónico, y la opacidad tarda de 1 a 2 meses en resolverse (Postma *et al.*, 2008). En otros casos los animales logran recuperarse sin ningún daño permanente en el ojo (Hilton, 2002).

Transmisión y factores predisponentes

QIB es una enfermedad altamente multifactorial, la virulencia de *M. bovis* está influenciada por los factores ambientales y el huésped. *M. bovis* puede ser transmitida tanto por las personas que manejan los animales o por contacto directo de animal a animal a través de descargas nasales y oculares de animales infectados, así como contacto con fomites, y más comúnmente por vectores como es la mosca de la cara (*Musca autumnalis*).

Los factores más importantes que están involucrados en la patogenicidad de la enfermedad incluyen características del bovino como la raza y edad, sistema inmune, grado de pigmentación en los ojos, estado de estrés. Además, también influyen los factores ambientales como es la exposición a la luz ultravioleta, las condiciones climáticas, época del año, viento, polvo y las condiciones de las pasturas. Los factores biológicos también cumplen un papel determinante en la patogenicidad, así como son patógenos concurrentes, agentes etiológicos y el ciclo de vida de la mosca (Snowder *et al.*, 2005; Baptista, 1979). Además, influyen los factores de manejo como pastorear cerca de los márgenes del campo, las espinas, el alambre de púas y los tallos secos de hierba que también pueden ejercer traumas físicos que ayudan a los patógenos a penetrar la córnea (Alexander, 2010; Glass & Gerhardt, 1982). Si bien, la QIB

puede ocurrir durante cualquier época del año, su prevalencia aumenta en los meses de primavera y verano cuando los valores de radiación ultravioleta (UV) son altos (Smith *et al.*, 1990; Hughes & Pugh, 1970). Se han observado brotes grandes en invierno cuando el ganado se encuentra confinado en establos cerrados o en engorde intensivo.

En Uruguay la producción pecuaria tradicionalmente ha sido de tipo extensiva, sin embargo recientemente se ha llevado a que se tienda a la intensificación de los sistemas de engorde a corral (*feedlot*) en diferentes zonas y épocas del año. Si bien los sistemas intensivos pueden mejorar la eficiencia productiva complementando las situaciones deficitarias, el estrés y la elevada concentración de animales pueden favorecer la difusión de enfermedades infectocontagiosas más rápidamente que en sistemas extensivos tradicionales.

La mosca de la cara es el vector más importante y se ha determinado que puede portar en sus patas *M. bovis* durante 3 días (Steve & Lilly, 1965) y durante 2 días puede permanecer en su tracto alimentario (Glass & Gerhardt, 1982). La mosca puede captar a *M. bovis* y transmitirla a un animal vecino. Las moscas causan irritación y lesiones en el ojo bovino, y como consecuencia producen un aumento del lagrimeo provocando la permanencia de la enfermedad (Brown *et al.*, 1998; Alexander, 2010; Hilton, 2002).

Existen variaciones entre la prevalencia de la enfermedad y raza afectada. La QIB puede afectar todas las razas, aunque se ha reportado una mayor incidencia de la enfermedad en razas que presentan la piel periorcular de color claro, como es Hereford o cruza de Hereford (Angelos, 2015), posicionando a esta raza como la más susceptible a QIB (Webber & Selby, 1981b). A su vez, los terneros nacidos de razas adaptadas tropicalmente tienen una menor incidencia de QIB comparados con algunos tipos de pura sangre y mestizos (Snowder *et al.*, 2005).

Las categorías de ganado mayores parecen menos susceptibles a la infección ocular por *Moraxella* (4.5-19,4 %) en comparación con la susceptibilidad de bovinos menores de 2 años (10-62,5 %). Con respecto al género, no se ha determinado definitivamente la preferencia, aunque se ha informado una mayor prevalencia en los machos (Slatter *et al.*, 1982).

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 microorganismo no móvil, no fermenta carbohidratos ni reduce nitratos, es oxidasa y catalasa positiva. 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 & McDonald., 1986). Durante décadas se consideró a *M. bovis* como el principal agente etiológico de QIB (Henson *et al.*, 1960; Hughes & Pugh., 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). Poco tiempo después fue también identificada en Brasil por Libardoni *et al.* (2012) y en Uruguay por Sosa & Zunino (2012). Además de *M. bovis* y *M. bovoculi*, se ha establecido la existencia de otra especie perteneciente al género *Moraxella* spp. como *Moraxella ovis* (anteriormente denominada *Branhamella ovis*), también asociada a casos de QIB, sugiriendo que tienen un rol en la patogenicidad (Angelos, *et al.*, 2007c; Cerny *et al.*, 2006; Nagy *et al.*, 1989).

M. bovoculi

M. bovoculi es un coco Gram negativo recientemente descrito que se aisló por primera vez de los ojos de terneros con QIB durante el verano del 2002 en el norte de Carolina en EEUU. 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 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* spp. 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 (Sosa & Zunino, 2012). Esto es también propuesto por Angelos (2010a) con respecto a EEUU. Sin embargo, hay autores que cuestionan la patogenicidad de *M. bovoculi* considerando que es poco probable que *M. bovoculi* sea el causante de QIB ya que solo no podría desencadenar las lesiones corneales observadas durante la QIB. *M. bovoculi* puede ser un patógeno invasor secundario en lesiones de QIB que crecen fácilmente en ojos dañados. Esto tiene implicaciones en el diseño de programas de control de QIB, que frecuentemente incorporan vacunas autógenas contra *M. bovoculi*. Dado que la combinación de las vacunas no son eficaces y que *M. bovoculi* no sería el agente causal, sugieren que su uso puede no estar garantizado (Gould *et al.*, 2013; O'Connor *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 (o también llamadas pili), lipopolisacáridos (LPS), fosfolipasa B, proteínas de membrana externa (PME), sistemas de adquisición de hierro, enzimas proteolíticas así como una hemolisina (Farn *et al.*, 2001; Yu & Schryvers 2002; Postma *et al.*, 2008). Con respecto a *M. bovoculi* no existen muchos estudios que vinculen factores de virulencia y patogenicidad. Hasta el momento se han realizado relativamente pocos estudios acerca de factores de virulencia de *Moraxella* spp. y el desarrollo de QIB

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 RTX C, B y D de *M. bovis*, que juntos forman un clásico operón RTX, designado *mbx*. Además de los genes RTX identificados

en *M. bovis*, se encontró aguas arriba del operon *rtx*, el gen *tolC*, codificante de la proteína TolC que es necesaria para la secreción de la toxina RTX. Los operones RTX completos se identificaron en *M. bovoculi* y en *M. ovis*; en *M. bovoculi* el operón se denominó *mbv*, mientras que en *M. ovis* el operón se denominó *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, 2008). La citotoxina de *M. bovis* está conservada geográficamente entre los aislamientos de *M. bovis*. Por lo tanto, las vacunas contra QIB que tienen MbxA como antígeno podrían ofrecer protección geográfica contra diversas cepas de *M. bovis* (Angelos, 2007e). Sin embargo, se han realizado diferentes estudios utilizando la citotoxina en forma recombinante pero aun son necesarios estudios adicionales para determinar si estas vacunas pueden prevenir la enfermedad.

Fimbrias tipo IV

La adhesión bacteriana a la superficie epitelial es considerada uno de los mecanismos de patogenicidad más importantes y estaría frecuentemente asociada con la presencia de fimbrias en la superficie celular (Reid & Sobel., 1987). Las fimbrias, son apéndices bacterianos que cubren el exterior tanto de bacterias Gram negativas como Gram positivas, son de pequeño tamaño (7 a 20 KDa), tienen diversas longitudes, diámetros (2 a 8 nm) y consisten de subunidades repetidas de polipéptidos con una adhesina en el extremo (Giltner *et al.*, 2012; Proft & Baker, 2009). Los genes fimbriales que codifican para las subunidades proteicas que conforman la fimbria se agrupan en operones que varían en extensión y complejidad y pueden tener una localización cromosómica o plasmídica (Low *et al.*, 1996).

Las fimbrias de *M. bovis* son los factores de virulencia más estudiados, ya que mediarían la adhesión a la superficie corneal bovina, 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* se clasifican como fimbrias tipo IV y se caracterizan por tener como primer aminoácido un N-metilfenilalanina y una región conservada en su extremo N-terminal (Dalrymple & Mattick., 1987; Elleman, 1988; Hermodson *et al.*, 1978). Otras bacterias también poseen este tipo de fimbrias como *Moraxella nonliquefaciens*, *Moraxella lacunata*, *Bacteroides nodosus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, y *Neisseria meningitidis* (Dalrymple & Mattick., 1987; Fulk *et al.*, 1990; Marrs *et al.*, 1990). Las fimbrias tipo IV poseen

multifuncionalidad, entre las cuales se destaca la mediación de la adherencia a las células eucariotas y la colonización al huésped. Además, están asociadas a la agregación bacteriana, la formación de biofilm, la evasión del sistema inmune, la conexión y la asimilación de ADN y al movimiento bacteriano llamados *twitching* (Pelicic, 2008). Se ha sugerido que las fimbrias tipo IV de *M. bovis*, como ocurre con otras fimbrias tipo IV de muchas bacterias Gram negativas, pueden ser modificadas después de la traducción a través de la glicosilación, pudiendo enmascarar epítopes y evitar su reconocimiento por el sistema inmune del huésped durante la infección (Craig & Li, 2008; Bosch *et al.*, 2010).

Type four pili Q (TfpQ) y Type four pili I (Tfpl) de *M. bovis*

A partir de análisis moleculares se ha demostrado que *M. bovis* tiene la capacidad de expresar dos tipos de fimbrias, funcionalmente diferentes, denominados *type four pili I* (Tfpl) de 20KDa y *type four pili Q* (TfpQ) de 17KDa como resultado de la inversión de un segmento de ADN de 2,1 kb por mecanismos de recombinación específica de sitio, dando lugar a un mecanismo de variación de fase. Por lo tanto ambos genes fimbriales están contenidos en una región de ADN pero en sentido contrario uno en relación al otro, de manera que uno de ellos se exprese y el otro no (Fig. 1). Existe un mecanismo oscilante de reordenamiento cromosómico que limita la expresión de un tipo de fimbria en beneficio del otro tipo, pues sólo un promotor está presente. Este reordenamiento ocurre por medio de un evento de inversión de la región de ADN, determinando cual será la proteína fimbrial expresada, TfpQ ó Tfpl, siendo este proceso reversible (Marrs *et al.*, 1988). Dentro de esa región de 2,1 Kb de ADN se encuentran 2 genes más, inicialmente llamados ORF-1 (*open reading frame*) y ORF-2. Posteriormente se los denominó *tfpB* (ORF-1), cuya función permanece desconocida y está localizado dentro de la región que recombina, y por otro lado, *piv* (ORF-2) que codifica la recombinasa o invertasa y es responsable de la inversión de esta región de ADN (Fig. 1) (Fulks *et al.*, 1990).

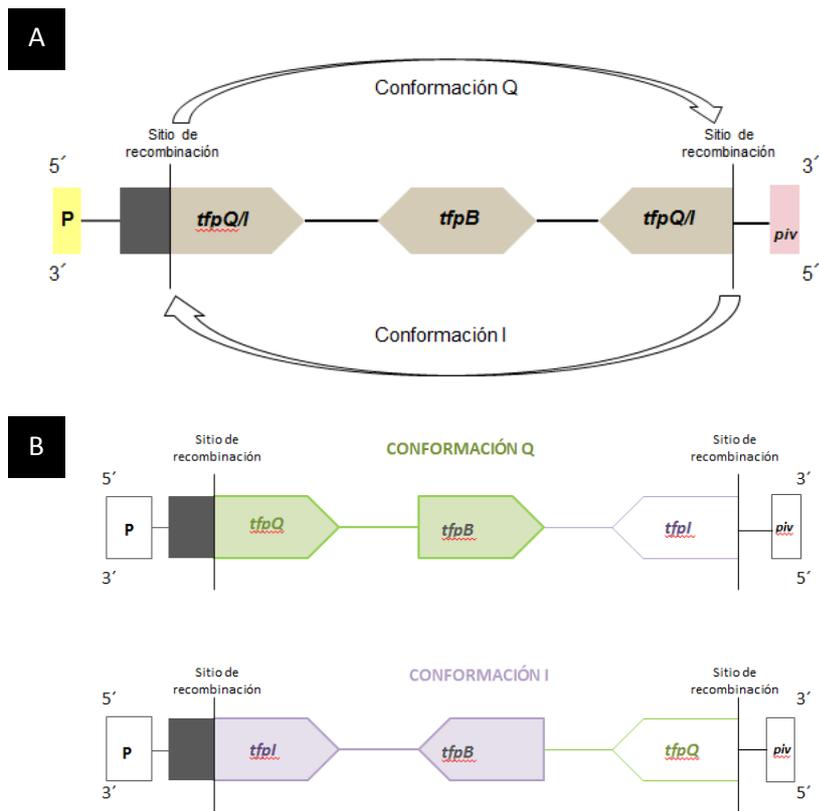


Figura 1. Representación esquemática del locus fimbrial de *M. bovis*. A: Representación de la inversión de ADN resultando en dos posibles conformaciones fimbriales de expresión Q ó I, se muestra el promotor P en el extremo 5', gen *tfpB* en el medio de los dos genes fimbriales, el gen *piv* que codifica la recombinasa y los dos sitios de recombinación. B: Representación de las dos conformaciones posibles a causa de la recombinación. En la imagen de arriba se encuentra en conformación de expresión de *tfpQ*, siendo el pseudogen *tfpl*, y en la imagen de abajo se encuentra en conformación de expresión de *tfpl*, siendo el pseudogen *tfpQ*.

Los genes *tfpQ*, *tfpl* y *piv* de *M. bovis* no están coordinadamente regulados, pues mientras los genes *tfpQ* y *tfpl* dependen del factor σ_{54} para la transcripción, el gen *piv* está regulado por el factor σ_{70} . Por lo tanto, la expresión de las fimbrias de *M. bovis* es controlada tanto por un sistema específico de inversión del ADN local, que determina qué gen será transcrito (*tfpQ* ó *tfpl*), como también por un sistema regulador que controla el inicio de la transcripción (Heinrich & Glasgow, 1997). La fimbria TfpQ favorecería la adhesión inicial del agente al tejido corneal bovino mientras que la tipo TfpI promovería la persistencia local y el mantenimiento de la infección (Postma *et al.*, 2008). Se ha propuesto que cepas de *M. bovis* que expresan fimbrias de tipo TfpQ serían más eficientes en establecer la infección y por lo tanto serían más patógenas que las cepas que expresan fimbrias de tipo TfpI (Ruehl *et al.*, 1988, Ruehl *et al.*, 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* spp. 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 ellos (Moore & Lepper, 1991; Atwell *et al.*, 1994). Por otro lado, se ha encontrado que las fimbrias de *M. bovis* son buenos inmunógenos aunque producen protección sólo contra el desafío con una cepa homóloga (Lehr *et al.*, 1985; Lepper *et al.*, 1987).

Proteínas de membrana externa (PME)

La pared de las bacterias Gram negativas es muy compleja y consiste en una membrana doble separada por un espacio periplásmico que actúa como una barrera de permeabilidad y protege contra el estrés ambiental, por ejemplo, la presencia de antibióticos. La parte externa de estas dos membranas, denominada membrana externa, entra en contacto directo con el exterior y es esencial para la viabilidad de las células bacterianas. Las proteínas en esta membrana son vitales en el mantenimiento de la homeostasis celular, lo que permite la excreción de sustancias tóxicas, como los antibióticos, y la absorción de nutrientes. Las PME también desempeñan papeles clave en la patogénesis microbiana, la virulencia y la resistencia a múltiples fármacos, así como en la mediación de muchos de los procesos letales responsables de la infección y la progresión de la enfermedad (Jevees *et al.*, 2015; 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. 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 interactúan con las células eucariotas, pero también se comportan como antígenos estimulando la respuesta inmune (Galdiero *et al.*, 2012). Un evento clave que se produce temprano en la patogénesis de *Moraxella* spp. es la adhesión a la superficie, 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 (St Geme, 1997; Gerlach & Hensel, 2007). 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).

PME-CD

La PME-CD ha sido estudiada fundamentalmente en *Moraxella catarrhalis* y posee posibles atributos como buen antígeno (Hsiao *et al.*, 1995). Esta proteína no había sido estudiada en *M. bovis* ni en *M. bovoculi* hasta el 2014 cuando nuestro grupo de investigación observó que se encontraba presente en cepas clínicas de *M. bovis* y *M. bovoculi* obtenidas en Uruguay. A través de la amplificación del gen por PCR y posterior secuenciación se encontraron regiones altamente conservadas las cuales serían potenciales epítopes. Por otro lado, se observó que esta proteína se expresaba *in vitro* y presentaba una respuesta de anticuerpos contra sueros y lágrimas de animales enfermos (Acquistapace, 2014).

M. catarrhalis es un patógeno Gram negativo que causa infecciones en el tracto respiratorio en humanos; aproximadamente el 20 % de todos los episodios de otitis media en niños y más del 10 % de las infecciones del tracto respiratorio (Giebink *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2005a). Además, la sinusitis (Brook *et al.*, 2005) y la conjuntivitis (Bingen *et al.*, 2005) pueden agregarse a la lista de enfermedades asociadas a este microorganismo. La PME-CD es una proteína modificable térmicamente, con una masa molecular de 55 kDa a temperatura ambiente y una masa de 60 kDa cuando se calienta bajo condiciones reductoras (Murphy *et al.*, 2009). Es una de las principales PME que se encuentra conservada en la mayoría de las *M. catarrhalis* con propiedades de potencial antígeno para vacunas (Saito *et al.*, 2013). Esta proteína está expuesta superficialmente y contiene 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). También se ha informado que exhibe características de una PME tipo porina, específicamente porque tiene una estructura similar y función biológica, incluida la adquisición de nutrientes (Holm *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 2013). La importancia de las respuestas de anticuerpos dirigidas contra la PME-CD se ve respaldada por la evidencia clínica. De hecho, los pacientes que se recuperan de una infección por *M. catarrhalis* con altos niveles de anticuerpos contra PME-CD son menos susceptibles a la reinfección que pacientes con bajos niveles de anticuerpos o sin anticuerpos contra esta proteína (Murphy *et al.*, 2003, Murphy *et al.*, 2005b).

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. Recientemente se estudió el papel de la PME-CD en la resistencia a los antibióticos en *M. catarrhalis* jugando un papel importante en la resistencia a la penicilina (Saito *et al.*, 2015).

Se ha propuesto que la PME-CD es una adhesina para las células humanas de pulmón A549 (Akimana *et al.*, 2007; Holm *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 1997) y que juega un papel esencial en la adherencia a las células HEp-2, contribuyendo a la colonización e infección de las células de la laringe (Saito *et al.*, 2013). 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. Otras adhesinas han sido provistas como efectivos antígenos para vacunas, por ejemplo vacunas contra *Bordetella pertussis* que contienen la adhesina FHA (Scheller & Cotter, 2015).

Existen evidencias que sugieren que la inmunización con PME-CD induciría anticuerpos protectores. Primero, la inmunización de animales de experimentación con PME-CD induciría anticuerpos bactericidas (Yang *et al.*, 1997). Segundo, la inmunización sistémica y mucosal con la recombinante de PME-CD favorecería la eliminación pulmonar de *M. catarrhalis* en un modelo de ratón (Murphy *et al.*, 1998). Posteriormente se evaluó la inmunización en ratones por vía intranasal de la recombinante de PME-CD con un adyuvante mucosal observándose la estimulación de una respuesta inmune capaz de promover el aclaramiento bacteriano eficiente después del desafío pulmonar con una cepa virulenta de *M. catarrhalis*, así como fuertes respuestas sistémicas humorales y celulares (Becker *et al.*, 2007). Otro trabajo evaluó el nivel de anticuerpos en suero contra PME-CD en niños observando que esta inversamente relacionado con la severidad de la otitis media, sugiriendo que los anticuerpos contra PME-CD tienen un papel protector (Harabuchi *et al.*, 1998).

Tratamiento

La investigación de QIB reportada en los últimos 60 años ha llevado a concluir que una variedad de antibióticos administrados por vía intramuscular, subcutánea, subconjuntival o en forma tópica podrían utilizarse como tratamientos, aunque esto no es efectivo en todos los casos (Brown *et al.*, 1998). *M. bovis* y *M. bovoculi* generalmente se consideran susceptibles a

una variedad de diferentes antibióticos. En el caso de *M. bovis*, se sabe que el organismo sobrevive en las superficies oculares. Para alcanzar estas superficies de manera adecuada y ayudar a eliminar una infección, un antibiótico debería administrarse localmente en el ojo o mediante métodos que aseguran la administración de antibióticos a través de secreciones de fluidos oculares (Angelos *et al.*, 2015). El tratamiento tópico mediante aerosoles, pomadas o ungüentos puede detener rápidamente los estadios temprano de la enfermedad pero se recomienda su utilización temprana una vez diagnosticada la enfermedad para evitar lesiones graves en la córnea del animal (Kibar., *et al*, 2005; Alexander, 2010). Sin embargo, este método no es ampliamente utilizado debido a que resulta poco práctico para el manejo de un gran número de animales. 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 ó 3 veces al día (Kibar *et al*, 2005). Generalmente se recomienda la antibiototerapia para casos agudos de QIB, aunque no existen pautas totalmente aceptadas acerca del tratamiento en relación al tamaño de la úlcera corneal. Según Angelos (2015), las úlceras que son de hasta 5 mm de diámetro a menudo sanarán espontáneamente; aunque, este no es siempre el caso y en animales valiosos o cuando existen preocupaciones por un brote, generalmente se recomiendan antibióticos (Angelos, 2015). En general, las vías parenteral, sistémica o subconjuntiva son las más indicadas para tratar la QIB (Shryock *et al.*, 1998).

Prevención

Es importante considerar el papel que los factores extrínsecos de riesgo pueden jugar en el desarrollo de la QIB. Dichos factores incluyen la exposición a la radiación ultravioleta, las moscas de la cara, la infección por *Mycoplasma* spp, la infección por el virus IBR, etc. (Alexander, 2010; Snowden *et al.*, 2005; Baptista 1979; Angelos, 2010b). Hilton (2002) recomienda 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 (Hilton , 2002).

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 & Teale, 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, las cepas heterólogas contra QIB son menos efectivas (Brown *et al.*, 1998).

Vacunas basadas en bacterias

Existen diferentes estudios sobre el desarrollo de vacunas basadas en bacterias inactivadas. Pugh y Hughes (1977) evaluaron el efecto de la inmunización de bovinos con células totales, células lisadas y fracciones fimbriales de tres cepas de *M. bovis* y posterior desafío de los animales con cultivos de *M. bovis*. El suero de los animales no susceptibles a QIB tuvo mayor título de anticuerpos contra las fimbrias homólogas que el suero de animales susceptibles a QIB. A su vez, los animales vacunados con lisado celular no fueron resistentes a la QIB y en el suero de esos animales no se detectaron anticuerpos contra fimbrias. La protección con una bacterina monovalente tiene por lo general una respuesta antigénica muy buena, pero sólo si el serogrupo homólogo de la fimbria que conforma la cepa infectante está contenido en la vacuna (Pugh & Hughes, 1977).

Además, se han evaluado los efectos de administrar por 2 vías (subcutánea y subconjuntival) una bacterina autógena. Sin embargo, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en el desarrollo de QIB entre los terneros vacunados y los no vacunados. Solamente se han observado diferencias estadísticamente significativas entre los sexos ya que las vaquillonas tuvieron una mayor tasa de QIB. Otra posible razón del fracaso de la vacuna pudo haber sido por la influencia de factores ambientales, incluido el nivel de luz

ultravioleta, las condiciones del viento y el estado concomitante de la enfermedad (Davidson *et al.*, 2003). Se han informado resultados mixtos sobre investigaciones de rutas de vacunación no parenterales contra QIB. Se informó que una bacterina de *M. bovis* en aerosol es efectiva para prevenir QIB de origen natural (Misiura, 1994a; Misiura, 1994b). En otro estudio reciente, los terneros fueron desafiados 45 días después de la vacunación ocular tópica con bacterina de *M. bovis* sola o con IL-2 humana recombinante e INF- α como adyuvantes. En ese estudio, las respuestas de anticuerpos oculares no se informaron; sin embargo, los terneros que recibieron la bacterina *M. bovis* más citoquinas tuvieron la proporción más baja de QIB y las puntuaciones más bajas de QIB después del desafío (di Girolamo *et al.*, 2012).

Con respecto a *M. bovoculi*, Funk y colaboradores (2009) inocularon animales con *M. bovis* y observaron que éstos desarrollaron úlceras debidas a QIB, mientras que los animales inoculados con *M. bovoculi* no desarrollaron la enfermedad usando este modelo, sugiriendo que este último podría no ser el organismo causal de la QIB (Funk *et al.*, 2009). Hace pocos años, Gould y colaboradores (2013) evaluaron si *M. bovoculi* se asociaba con la QIB utilizando un modelo de escarificación corneal en terneros. Se diseñó el estudio con tres grupos de animales los que sometieron a escarificación corneal solamente, escarificación corneal e inoculación con *M. bovoculi* y escarificación corneal e inoculación con *M. bovis*. La ausencia de ulceraciones corneales en terneros inoculados con *M. bovoculi* hace sugerir a los autores que no sería un microorganismo causal de la QIB en este modelo, no pudiéndose establecer la patogenicidad de esta especie. El desarrollo consistente de ulceración corneal en el grupo inoculado con *M. bovis* demuestra la capacidad del modelo para inducir úlceras de QIB (Gould *et al.*, 2013).

Vacunas basadas en subunidades proteicas

Además de las vacunas basadas en bacterias, otra opción son las vacunas constituidas por subunidades proteicas:

Antígenos nativos

Zbrun y colaboradores (2012) evaluaron fimbrias purificadas mediante administración intranasal con diferentes adyuvantes (QuilA, Marcol Arlcel, Marcol Span, pili microencapsulado con polímeros de PLGA). Evaluaron la respuesta de IgA local luego de la administración intranasal comparándola con la respuesta IgA producida luego de la inoculación con adyuvante placebo y con una infección natural de QIB. Se observó un aumento significativo en la respuesta IgA anti-fimbrias cuando los animales se inmunizaron

intranasalmente con fimbrias-QuilA y con fimbrias-Marcol Span, aunque esta respuesta no se asoció con protección contra la QIB ocasionada por *M. bovis* (Zbrun *et al.*, 2012). Además de las fimbrias, diversos autores han propuesto a la citotoxina como potencial antígeno protector en vacunas (George *et al.*, 2005).

Antígenos recombinantes

Vacunas recombinantes basadas en las fimbrias de tipo IV de *M. bovis* también han sido propuestas y, en este sentido las fimbrias de *M. bovis* producidas de forma recombinante en *Pseudomonas aeruginosa* han protegido exitosamente a los bovinos de un desafío homólogo (Elleman *et al.*, 1990; Lepper *et al.*, 1993).

Angelos y colaboradores (2004) realizaron un estudio donde inmunizaron bovinos por vía subcutánea con una citotoxina recombinante de *M. bovis*. Estos autores observaron respuestas de IgG significativamente alta en sueros y lágrimas, aunque también observaron úlceras corneales más grandes en terneros vacunados, sugiriendo que quizás los niveles altos de IgG podrían deberse a la aparición de la enfermedad (Angelos *et al.*, 2004). Posteriormente, Angelos y colaboradores (2010) 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 con 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 (Angelos *et al.*, 2010c).

En trabajos posteriores, estos autores evaluaron la protección ofrecida por la citotoxina recombinante de *M. bovis* junto con una fimbria recombinante de *M. bovis* (Angelos *et al.*, 2007d), luego evaluaron una fimbria recombinante de *M. bovis* con la citotoxina recombinante de *M. bovoculi* pero observaron que no fue efectiva la prevención contra la QIB natural (Angelos *et al.*, 2012). Años más tarde, analizaron otra vía de inoculación, la inmunización intranasal, con una citotoxina recombinante de *M. bovis* (Angelos *et al.*, 2014) y recientemente en 2016 inmunizaron bovinos por vía intranasal con citotoxina recombinante precipitada y en paralelo con una citotoxina parcialmente solubilizada de *M. bovis*. Las respuestas inmunitarias oculares y sistémicas inducidas por la administración intranasal de la vacuna con citotoxina precipitada fueron superiores a las inducidas por la vacuna con citotoxina solubilizada. Se necesita investigación adicional para determinar si la vacuna con citotoxina precipitada puede prevenir la QIB natural (Angelos *et al.*, 2016).

La efectividad de las vacunas comerciales actuales formuladas en base a células enteras o fimbrias purificadas de *M. bovis* es limitada (McConnel *et al.*, 2005; Burns & O'Connor, 2008) y estaría asociada con la alta diversidad antigénica entre las fimbrias de *M. bovis* (Moore & Rutter, 1987; Moore & Lepper, 1991; Conceição *et al.*, 2004). La gran diversidad genética entre las especies de *Moraxella* spp. involucradas en la QIB surge como importante dificultad a sortear por las vacunas comerciales (Calcutt *et al.*, 2014; Dickey *et al.*, 2016). Sin embargo, la identificación de secuencias nucleotídicas altamente conservadas de genes codificantes de proteínas con potencial inmunogénico e implicados en la patogénesis de la enfermedad en cepas de estas especies sustenta la hipótesis de una reactividad cruzada satisfactoria entre distintas cepas de *M. bovis*, *M. bovoculi* y *M. ovis*. Sin embargo, hasta la fecha, no hay estudios que demuestren la relación antigénica entre las tres especies de *Moraxella* spp. (Farias *et al.*, 2015; Kowalski *et al.*, 2017).

Otro aspecto a tener en cuenta para la eficacia de una vacuna es la vía de administración. Rutinariamente las vacunas se administran mediante inyecciones subcutáneas o intramusculares. Sin embargo, en algunas patologías, la inmunidad sistémica no cumple un papel preponderante en la prevención de la infección y sería más adecuado generar respuestas locales en el lugar en que pueda producirse la invasión del patógeno. Las vacunas a nivel de mucosas tienen la ventaja de inducir las respuestas inmunitarias tanto a nivel general como respuestas locales a nivel de mucosas (O'Sullivan *et al.*, 2015). Por lo tanto, dada la localización mucosal de la QIB, es racional considerar la administración de una vacuna de *M. bovis* por dicha vía (Angelos, 2014).

Debido a que las vacunas comerciales tienen una protección variable (Smith *et al.*, 1990; Webber & Selby, 1981a; Burns & O'Connor, 2008) 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 ésto que se han realizado estudios procurando desarrollar nuevas vacunas con una elevada efectividad.

HIPÓTESIS

Las fimbrias y la PME-CD de cepas nativas de *Moraxella bovis* son candidatas como componentes de vacunas contra la QIB en Uruguay, en virtud de su papel en la biología y la patogenicidad bacteriana.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la base genética de la síntesis de las fimbrias así como la inmunogenicidad de la PME-CD recombinante de *M. bovis* de cepas aisladas de casos clínicos en Uruguay, con el fin de evaluar su potencial como componentes de vacunas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar cepas en base a la presencia de genes de interés, movilidad *twitching*, producción de fimbrias y visualización de las fimbrias por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).
2. Obtener fimbrias nativas de *M. bovis*.
3. Analizar la base genética de los dos tipos de fimbrias tipo IV que presenta *M. bovis*.
4. Analizar la presencia de otros factores de virulencia de interés.
5. Obtener y expresar la PME-CD de *M. bovis* en forma recombinante.
6. Estudiar la respuesta humoral de la PME-CD recombinante a partir de la inmunización (vía subcutánea y mucosal) en modelos de animales de experimentación.
7. Determinar los niveles de citoquinas presentes en los lavados bronqueoalveolares de los animales de experimentación.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE CEPAS y ANÁLISIS DE LAS FIMBRIAS

1.1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

En el presente estudio se utilizó una colección de aislamientos bacterianos de origen clínico de 16 cepas de *M. bovis* y una de *M. bovoculi* obtenidas entre los años 2006 y 2009 de diferentes departamentos de Uruguay (Canelones, Maldonado, Cerro Largo, Flores, San José, Florida y Paysandú), ampliamente caracterizadas en nuestro laboratorio (Sosa & Zunino, 2012) (Tabla 1). En el estudio se incluyeron las cepas de referencia ATCC de *M. bovis* (EPP63) y *M. bovoculi* (BAA1259).

Tabla 1. Colección de aislamientos utilizados en el presente trabajo

Aislamientos	Origen geográfico y año	Especie
EPP63	ATCC (Marrs <i>et al.</i> , 1985)	<i>M. bovis</i>
BAA1259	ATCC (Angelos <i>et al.</i> , 2007a)	<i>M. bovoculi</i>
CANIIIA	Uy, Canelones (2009)	<i>M. bovis</i>
CANIIIB	Uy, Canelones (2009)	<i>M. bovis</i>
EV250	Uy, Maldonado (2006)	<i>M. bovis</i>
EV450B	Uy, Maldonado (2006)	<i>M. bovis</i>
64	Uy (2009)	<i>M. bovis</i>
BM3A	Uy, Cerro Largo (2005)	<i>M. bovis</i>
EV121	Uy, Maldonado (2006)	<i>M. bovis</i>
EV345	Uy, Maldonado (2006)	<i>M. bovis</i>
EV450A	Uy, Maldonado (2006)	<i>M. bovis</i>
LC190	Uy, Flores (2006)	<i>M. bovis</i>
SJ01	Uy, San José (2007)	<i>M. bovis</i>
SJ02	Uy, San José (2007)	<i>M. bovis</i>
SJ03B	Uy, San José (2007)	<i>M. bovis</i>
SJ07	Uy, San José (2007)	<i>M. bovis</i>
771A	Uy, Florida (2009)	<i>M. bovis</i>
5120	Uy, Paysandú (2009)	<i>M. bovis</i>
PRO	Uy, Canelones (2007)	<i>M. bovoculi</i>

Las bacterias se cultivaron en forma rutinaria en agar infusión cerebro corazón (BHI Agar, Oxoid) suplementado con 5 % de sangre ovina comercial estéril durante 24 hs a 37 °C. Los aislamientos se conservaron a -20 °C y a -80 °C en caldo infusión cerebro corazón (BHI, Oxoid) suplementado con glicerol al 15 %.

La selección de cepas se realizó en base a la presencia de una porción del primer gen fimbrial que posee *M. bovis* (al cual llamaremos en el presente trabajo *fim09*), a la capacidad de

realizar el movimiento *twitching*, a la producción de fimbrias y a la visualización de éstas por TEM. Además, se tomó en cuenta la presencia de diferentes genes de virulencia que fueron analizados anteriormente por PCR en nuestro laboratorio: *tolC*, *omp79*, *fur*, *mbxA* y *plB* (Sosa *et al.*, 2015). En base a esta selección se secuenció el genoma de una cepa de *M. bovis* y una de *M. bovoculi* de la colección. A su vez, para la expresión y purificación de la proteína recombinante PME-CD se tomó en cuenta la presencia del gen que codifica para la PME-CD caracterizado previamente en nuestro Laboratorio (Acquistapace, 2014).

1.2. Movilidad “twitching” y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Con el fin de observar la producción de fimbrias en medio sólido, las bacterias se cultivaron en caldo Triptosa de Soya (TSB, Oxoid) por 24 hs a 37 °C. Posteriormente se inocularon 20 uL de cultivo crecido en el centro de una placa de Triptosa de Soya Agar (TSA, Oxoid) + 2 % de sangre ovina estéril (Biokey), incubándolas por 96 hs en cámara húmeda. Luego, para visualizar las fimbrias por TEM, se tocó la región más externa del halo de crecimiento (*twitching*) con un ansa y se resuspendió suavemente en 1 mL de solución fisiológica. Posteriormente, las bacterias se fijaron con Glutaraldehído 2,5 % a temperatura ambiente y luego se incubaron a 37 °C por 30 minutos. Finalmente se trasladaron las muestras en frío a Facultad de Ciencias (Servicio de Microscopía Electrónica). Allí se realizó la tinción con Acetato de Uranilo 2 %. Se visualizaron las fimbrias de las cepas de referencia EPP63 (*M. bovis*) y BAA1259 (*M. bovoculi*) por TEM (servicio de Microscopía de la Facultad de Ciencias).

1.3. Obtención de fimbrias

Para la obtención de las fimbrias nativas de *M. bovis* se evaluaron diferentes protocolos (Tabla 2). Para esto, se probaron diferentes cultivos en medio sólido: Agar sangre (TSA + 5 % sangre ovina) y TSA, y en medio líquido: TSB y BHI. Se evaluó comenzar la extracción variando las cantidades iniciales de las placas de cultivo y sus tiempos de incubación. También se emplearon diversos métodos para la separación de las fimbrias: homogeneización con Ultraturrax (modelo: Ultraturrax T-50 Basic, código: 2004IK2953100), licuadora (Warning, comercial blender), sonicación (Ultrasonic Homogenizer, Cole-Parmer Instrument Co), tratamiento térmico (en baño de agua) y ultracentrifugación (Beckman, rotor tipo 90Ti). En algunos casos se requirió realizar una precipitación con 0,1 M Acetato de sodio o 10 % de saturación de Sulfato de amonio, según protocolo utilizado.

Tabla 2. Protocolos utilizados para la obtención de fimbrias de *M. bovis*

Protocolos	1	1'	2	3	4	5
Medio de cultivo	Agar sangre	Agar sangre	Agar sangre	Agar sangre	TSA	Agar sangre
Incubación	1 día, 37 °C	3 días, 37 °C	1 día, 37 °C	1 día, 37 °C	1 día, 37°C	1 día, 37 °C
Cantidad de placas	48	48	50	35	10	30
Buffer de extracción	Etanolamina	Etanolamina	Etanolamina	PBS	PBS	PBS
Método de desprendimiento fimbrial	Homogeneiza dor (Ultraturrax)	Homogeneiza dor (Ultraturrax)	Homogeneiza dor (Ultraturrax)-sonicación	Licuada-sonicador	Tratamiento térmico Filtración (Amicon 10K)	Licuada-Ultracentrifugación
Condiciones	15 minutos, en hielo	15 minutos, en hielo.	En hielo por 4 minutos con intervalos de 1 minutos. Sonicación: 10 minutos con intervalos de 2 minutos en hielo.	Licuada: 15 minutos con intervalos de 5 minutos en hielo. Sonicación: 10 minutos con intervalos de 2 minutos en hielo.	(60 °C, 20 minutos)	15 minutos con intervalos de 5 minutos en hielo y posterior Ultracentrifugación 10 minutos, 4 ° C, 100000 x g
Precipitación	Sulfato de Amonio (10 % saturación)	Sulfato de Amonio (10% saturación)	Sulfato de Amonio (10 % saturación)	Sulfato de Amonio (10 % saturación)	Acetato de sodio 0,1 M	No
Referencia	Rhuel <i>et al.</i> , 1988	Rhuel <i>et al.</i> , 1988	Zbrun <i>et al.</i> , 2012	Lepper <i>et al.</i> , 1986	Cagatay & Hickford, 2008 modificado	Prieto <i>et al.</i> , 2003

1.4. Extracción de ADN

Para los ensayos de PCR se cultivaron todas las cepas en las mismas condiciones. A partir de los cultivos en Agar sangre incubados durante 24 hs a 37 °C se repicó una colonia en agar BHI para la extracción de su ADN por el método de lisis térmica. Para esto se calentaron las muestras en baño de agua a 100 °C por 10 minutos y posteriormente se centrifugaron a 1000

rpm, 10 minutos. El pellet obtenido se descartó y el sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su uso. En paralelo, para la secuenciación genómica se las cultivó en Agar Sangre durante 24 hs a 37 °C únicamente a las dos cepas seleccionadas y se repicó una colonia de cada una de ellas en BHI para extraer sus ADN con kits comerciales (Qiagen Genomic-Tip 100/G y Sigma). Se evaluó la pureza (260/280) y concentración (ng/uL) por lectura en Nanodrop (Thermo Scientific). Las preparaciones de ADN se visualizaron en geles de agarosa 0,8 % en *buffer* TBE. Los geles se prepararon utilizando 0,8 g de agarosa en 100 mL de *buffer* TBE 0,5 X. Las bandas se visualizaron mediante tinción con GelRed (Biotum) 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 de tamaño molecular 1Kb plus (Thermo Scientific).

1.5. Amplificación y secuenciación del primer gen fimbrial de *M. bovis*

Cuando comenzó este trabajo solo se disponía en las bases de datos públicas con la secuencia de uno de los genes que codifica para una de las fimbrias de *M. bovis* (*GenBank*: M92155.1), sin especificar de cual tipo de fimbria se trataba (*tfpQ* ó *tfpI*). A partir de esta secuencia disponible se diseñaron cebadores para amplificar una parte de la región codificante de la fimbria incluyendo la región aguas arriba a dicho gen. A este producto de PCR se lo llamó *fm09* (Fig. 2). El programa de ciclado de PCR se describe en la Tabla 3. Los productos amplificados por PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % como se describió en el punto 1.4. 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 servicio de secuenciación brindado por la Unidad de Biología Molecular en el Instituto Pasteur de Montevideo (pasteur.uy/es/inicio). El tamaño esperado del amplicón fue de 603 pb en *M. bovis*.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y editadas empleando la herramienta bioinformática BioEdit. Posteriormente, se las analizó con la herramienta informática BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) buscando su homología en la base de datos del NCBI. Una vez hallada la homología con la fimbria de *M. bovis*, se realizó un alineamiento múltiple en el *software* MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Para la construcción de la filogenia se utilizó el modelo de Máxima Verosimilitud con un *bootstrap* de 1000.

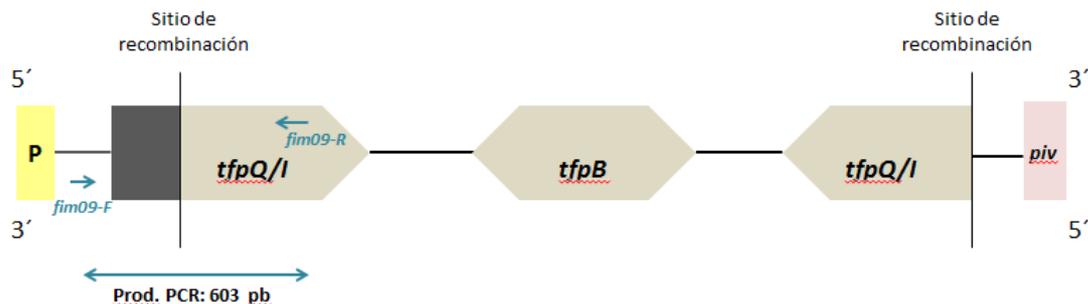


Figura 2. Estructura del locus fimbrial de *M. bovis*. De izquierda a derecha se visualiza: el promotor (P), una región conservada de color negro de 50pb, el gen *tfpQ* o *tfpl*, el gen *tfpB*, el pseudogen *tfpQ* o *tfpl* y el gen *piv*. Con flechas azules se indica la localización de los cebadores para amplificar parte del primer gen fimbrial, el cebador de avance se encuentra aguas arriba del extremo 5' de la secuencia fimbrial, y el cebador reverso se encuentra aguas arriba del extremo 3' de dicha

Tabla 3. Cebadores para amplificar parte del primer gen fimbrial de *M. bovis*

Cebadores			
Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Producto (pb)
fim09_F	5'-TTCCAAAAACAGCCCAAATC-3'	55,6	603
fim09_R	5'-GCAACCAGTTGGGATGAACT-3'	51,7	

Tabla 4. Ciclado de PCR para amplificar parte del primer gen fimbrial de *M. bovis*

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	
Desnaturalización inicial	94	1	} 35 ciclos
Desnaturalización	94	1	
Hibridación	63	30 seg	
Extensión	72	2	
Extensión final	72	7	

2. SECUENCIACIÓN GENÓMICA DE *M. bovis* Y *M. bovoculi*

2.1. Confirmación de la identidad fenotípica y morfológica de EV345 y PRO

Para confirmar la identidad fenotípica de las dos cepas seleccionadas, se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: producción de catalasa, se tomó una colonia con una pipeta pasteur y se la depositó sobre una gota de agua oxigenada comercial 10 vol. (Droguería Paysandú) en un porta de vidrio, se incubó a temperatura ambiente 20 segundos para observar la formación de burbujas. Para el ensayo de oxidasa se utilizaron discos comerciales (BIO-RAD, 53834) y luego se valuó el crecimiento en cultivo en medio Agar McConkey (Oxoid,

CM0007). Todas las pruebas bioquímicas se realizaron a partir de colonias aisladas de cultivos de 18-24 hs en agar BHI a 37 °C. También se evaluó la actividad β -hemolítica en base a la aparición de un halo transparente alrededor de las colonias aisladas cuando se las cultivó en Agar Sangre. Para evaluar la morfología bacteriana se realizó la tinción de Gram.

2.2. Confirmación de la identidad molecular de EV345 y PRO

La confirmación de la identidad de los aislamientos se realizó mediante amplificación de un fragmento del gen que codifica al ARNr 16S por PCR, utilizando los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') diseñados por Weisburg y colaboradores (1991). Se utilizó el Termociclador LabNet y se preparó una mezcla de reacción de 0,2 mM de dNTPs, 3,0 mM de MgCl₂, 20 mM de cada cebador, 40 ng/ μ L de ADN y 1 U de la enzima Taq polimerasa (Invitrogen), en un volumen final de 25 μ L. El protocolo del ciclado consistió en 3 minutos a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 50 °C y 1,5 minutos a 72 °C, para finalizar con 10 minutos a 72 °C y posterior mantenimiento a 4 °C.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 0,8 % como se describió en el punto 1.4 y se verificó que hubiera solamente una única banda. Para confirmar la identidad de los aislamientos se purificaron los productos de PCR y se secuenciaron en el servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo con posterior análisis bioinformático.

2.3. Secuenciación genómica de *M. bovis* y *M. bovoculi*

Los ADN genómicos obtenidos de ambas cepas (*M. bovis* EV345 y *M. bovoculi* PRO) se secuenciaron en una primera instancia en la plataforma de Secuenciación Masiva del IIBCE con un secuenciador Ion Torrent y posteriormente se complementó el resultado utilizando el servicio de MicrobesNG (<https://microbesng.uk/>, Reino Unido) con tecnología Illumina.

A las secuencias obtenidas a partir del secuenciador Ion Torrent se les analizó la calidad de las secuencias (FastQC), con posterior filtrado (Trimmomatic) (Bolger *et al.*, 2014). Luego se realizó el ensamblado de *novo* ya que no se contaba con un genoma de *M. bovis* publicado. Para esto, primero se utilizó el programa MIRA, luego con los *contigs* obtenidos se continuó ensamblando con el programa Spades (Bankevich *et al.*, 2012), se probaron diferentes parámetros con el fin de obtener el mejor ensamblado. Posteriormente se analizó la calidad del ensamblado (Quast). El genoma se anotó con el *software* libre y online RAST (<http://rast.nmpdr.org>; Aziz *et al.*, 2008) y el *software* Artemis (Rutherford *et al.*, 2000) permitió visualizar el genoma. Luego se realizó la predicción génica y anotación (Prokka)

(Seemann, 2014). A partir de las secuencias obtenidas de los 2 genes fimbriales: gen *tfpQ* y gen *tfpI* se diseñaron 2 pares de cebadores para amplificar dichos genes en las demás cepas de la colección de *M. bovis* (Fig. 3).

Posteriormente, el servicio de MicrobesNG incluía el análisis del *trimming* de los *reads* obtenidos a partir del secuenciador de Illumina en el *software* Trimmomatic y a la calidad la evaluaron utilizando la combinación de los *softwares*: Samtools (Li *et al.*, 2009a), BedTools (Quinlan & Hall, 2010) y bwa-mem. El ensamblaje del genoma se realizó con el *software* QUAST (Quality Assessment Tool) (Gurevich *et al.*, 2013). El genoma ensamblado se anotó en el *software* RAST donde además se evaluó la presencia de potenciales genes de virulencia: *pme-cd*, *tfpQ* (*type IV pili Q*), *tfpI* (*type IV pili I*), *pme-J*, *pme-E*, *pme-M35*, *pme-A*, *pme-79*, *fur* (*ferric uptake regulator*), *plb* (fosfolipasa), *tolC* y el operón RTX conteniendo el gen *mbxA* (citotoxina). El genoma se visualizó a través de Artemis. Además se predijo la localización subcelular de cada una de estas proteínas codificadas por los genes evaluados mediante el *software* libre PSORTb (<http://psort1.hgc.jp/form.html>).

2.4. Análisis genético de las fimbrias de *M. bovis*

2.4.1. Genes fimbriales *tfpQ* y *tfpI*

Una vez que se anotaron las secuencias de los genes de EV345, nos enfocamos en el análisis del *locus* fimbrial de *M. bovis* que contiene: *tfpQ* (codifica para la fimbria TfpQ), *tfpI* (codifica para la fimbria TfpI), *tfpB* (codifica para la proteína TfpB), *piv* (codifica para la Recombinasa o también llamada Invertasa). Con el fin de poder amplificar los dos tipos de fimbrias por PCR y tomando en cuenta que los genes de éstas presentan regiones muy variables, se diseñaron los cebadores en regiones conservadas. El cebador de avance (*tfpQI_F*) es el mismo para los dos tipos de fimbrias y se diseñó aguas arriba con respecto al sitio de recombinación. Los cebadores reversos son diferentes entre sí para un tipo u otro de fimbria, se encuentran localizados en la misma posición, pero son reversos complementarios entre sí, de manera que cada uno hibride con el gen *tfpB* en conformación Q (Q_R) o I (I_R), según sea el caso, esto se debe a que la proteína TfpB también participa en la recombinación del *locus*. A continuación se muestra un esquema en el cual se indican los sitios de hibridación de los cebadores (Fig. 3).

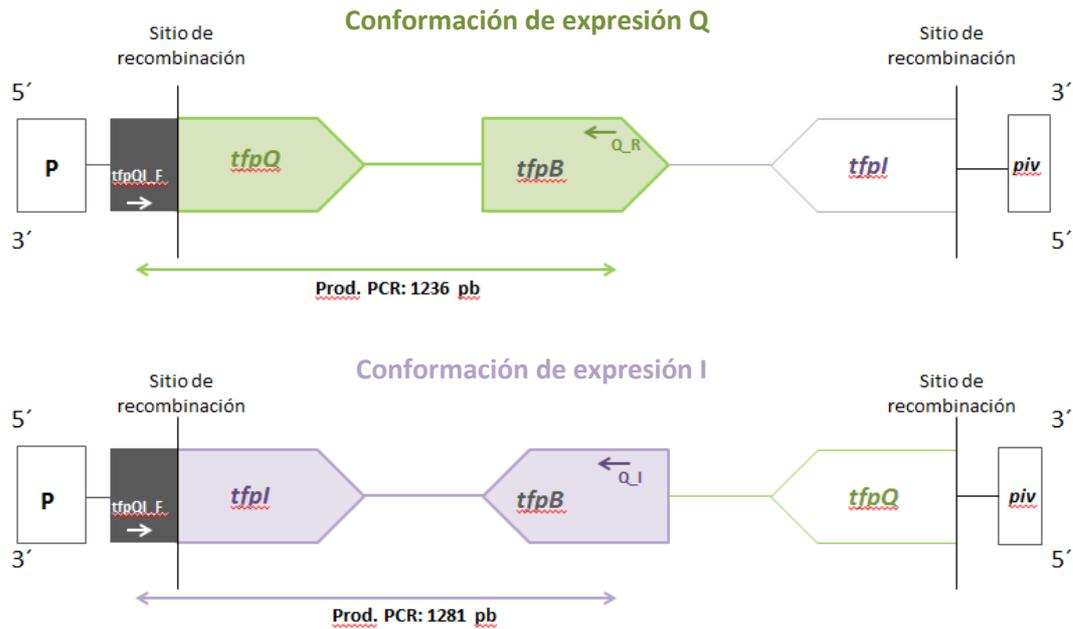


Figura 3. Esquema fimbrial en las dos conformaciones posibles. En la parte de arriba se muestra el sistema fimbrial en conformación de expresión Q con la posición de los cebadores en la parte de abajo, en conformación de expresión I con sus respectivos cebadores. El cebador de avance utilizado es el mismo para ambas conformaciones y está en la misma posición, sin embargo los cebadores reversos si bien están en la misma posición son reversos complementarios entre sí, de manera que el cebador Q_R es reverso complementario al Q_I.

Tabla 5. Cebadores para los genes fimbriales de *M. bovis* (*tfpQ*, *tfpI*)

Cebadores: <i>tfpQ</i>			
Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Producto (pb)
tfpQI_F	5'-ACGCTCAAAAAGGTTTCACC-3'	56,4	1236
Q_R	GGGCGATTCTCTACTTC-3'	52,4	
Cebadores: <i>tfpI</i>			
Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Producto (pb)
tfpQI_F	5'-ACGCTCAAAAAGGTTTCACC-3'	56,4	1282
Q_I	5'-GAAGTAGAGAATCGCCC-3'	53,2	

Tabla 6. Ciclado para amplificar los genes *tfpQ* y *tfpl* de *M. bovis*.

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	
Desnaturalización inicial	94	1	
Desnaturalización	94	1	} 35 ciclos
Hibridación	59 (Q)/55(I)	30seg	
Extensión	72	2	
Extensión final	72	7	

2.4.2. Amplificación de *locus* fimbrial

Por otra parte, se utilizó un par de cebadores propuesto por Farias (2015) para poder amplificar todo el locus formado por los genes fimbriales. El cebador de avance (L1) se localiza aguas arriba con respecto al sitio de recombinación, y el cebador reverso (L2) hibrida en el extremo 5' del gen que codifica la recombinasa (aguas abajo con respecto al sitio de recombinación) (Fig. 4). El producto de PCR se envió al servicio de MacroGen para su purificación y posterior secuenciación. Debido al tamaño del *locus*, para su secuenciación además del par de cebadores L1/L2, se incluyeron dos cebadores reversos internos (Q_R y Q_I) que habían sido utilizados anteriormente en la sección 2.4.1 y mostrados en la Tabla 5.

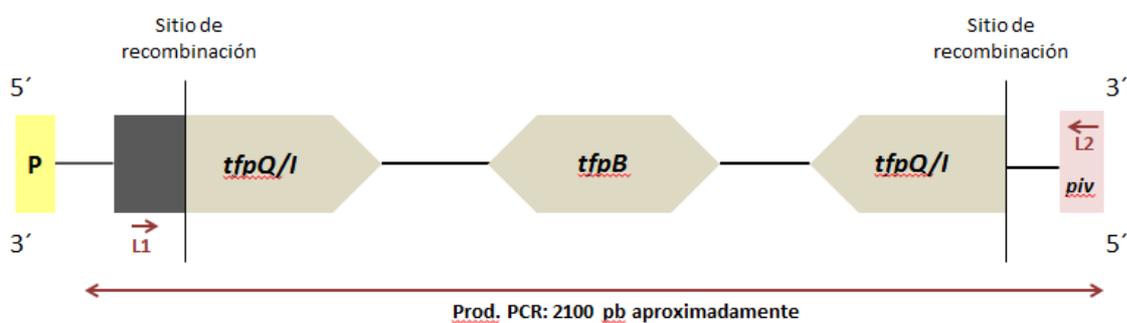


Figura 4. Estructura del *locus* fimbrial de *M. bovis*. De izquierda a derecha se representa el promotor (P), una región conservada de color negro de 50 pb, donde se ubica el cebador de avance (L1) mediante una flecha color bordó (L1), el gen *tfpQ* o *tfpl*, el gen *tfpB*, el pseudogen *tfpQ* o *tfpl* y el gen *piv* donde se localiza el cebador reverso (L2) mediante una flecha color bordó (L2) para amplificar el *locus* fimbrial. L2 se ubica en el extremo 5' del gen *piv*

Tabla 6. Cebadores para amplificar el *locus* fimbrial de *M. bovis*.

Cebadores del <i>locus</i> fimbrial			
Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Producto (pb)
L1	5'-AACGCTCAAAAAGGTTTCACCC-3'	60,3	2100
L2	5'-CGCCCTTTTGACAAACGCAT-3'	58,4	

Tabla 7. Ciclado para amplificar el *locus* fimbrial de *M. bovis*.

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	
Desnaturalización inicial	94	5	
Desnaturalización	94	50 seg	} 35 ciclos
Hibridación	67	30seg	
Extensión	72	2	
Extensión final	72	7	

2.4.3. Búsquedas de secuencias invertidas en el *locus* fimbrial

Con el fin de corroborar el resultado obtenido a partir de la amplificación por PCR de los dos tipos de fimbrias, se buscó dentro del *contig* que contiene el *locus* fimbrial obtenido a partir de Illumina, pares de *reads* que se alinearan en el mismo sentido y a su vez aumentarían su distancia intra par. Por otro lado se buscaron también *reads* que estuvieran cortados debido a que forman parte de dos zonas diferentes del genoma, causada por una inversión. Para esto se siguieron los procedimientos utilizados por Sekulovic y colaboradores (2018). El programa de alineamiento *Burrows-Wheeler Alignment Tool* (BWA) (Li & Durbin, 2006) permitió alinear y extraer secuencias que estuvieran en la misma orientación y que se le haya extraído su extremo 5'. BWA generó un archivo en formato SAM (Li *et al.*, 2009b) conteniendo los *reads* buscados, los cuales se alinearon en el *software* CLC Genomics Workbench 11 (<https://www.qiagenbioinformatics.com>) con el *contig* que contiene las fimbrias y las secuencias de *tfpQ* y *tfpI* obtenidas a partir del PCR.

Por otro lado, en el alineamiento generado anteriormente se buscó la secuencia donde actúa la recombinasa Piv, quien genera la recombinación específica de sitio generando la inversión de un fragmento de ADN de aproximadamente 2 Kb provocando el cambio de un tipo a otro de fimbria.

2.4.4. Predicción de la estructura secundaria de las fimbrias

La comprensión de la estructura de la fimbria tipo IV puede proporcionar importantes conocimientos sobre sus funciones biológicas asociadas a la patogénesis como es la adhesión, evasión del sistema inmune, entre otras. Con este fin, en base a las secuencias nucleotídicas obtenidas de *tfpQ* y *tfpI* de EV345 se tradujeron las mismas con la herramienta *online ExPASy Translate* (<https://web.expasy.org/translate>) y a partir de las secuencias aminoácidas obtenidas se predijo su estructura con el *software* libre Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015) el cual

permitió conocer a qué corresponde cada región conservada y variable observada anteriormente en el análisis de las secuencias. El servidor está disponible en: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>.

3. PRODUCCIÓN DE PME-CD RECOMBINANTE

3.1. Plásmido de expresión y cepas bacterianas

Para la generación de la proteína PME-CD recombinante se utilizaron dos cepas de *M. bovis*, la cepa de referencia EPP63 y el aislamiento clínico de Uruguay EV345. Dicho aislamiento se obtuvo de un animal con signos clínicos de QIB en el departamento de Maldonado en 2006. Además, ambas cepas presentaban el gen que codifica para la PME-CD (Acquistapace, 2014).

El sistema pET fue desarrollado para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. Los genes diana se clonan en los plásmidos pET bajo control de la transcripción del bacteriófago T7. En este trabajo se utilizó el plásmido pET-21a(+) para la expresión de la proteína, el cual codifica para la resistencia a Ampicilina y presenta el promotor T7 (Studier & Moffatt, 1986). Se utilizó la cepa de *E. coli* XL1-blue (Bullock *et al.*, 1987), la cual fue utilizada para la transformación y estabilización de la construcción de expresión luego de la ligación mientras que para la expresión de PME-CD se utilizó la cepa de *E. coli* BL21(λDE3) (Studier & Moffatt, 1986). Esta cepa es lisogénica para el fago λDE3, el cual presenta el gen que codifica para la ARN polimerasa T7 bajo el promotor Lac UV5 (inducible por IPTG en el cultivo bacteriano).

El cultivo de estas cepas se realizó en aerobiosis en caldo Luria-Bertani (LB) a 37 °C durante 24 hs a 200 rpm. En los casos en que se requirió seleccionar colonias de *E. coli* que portaran el plásmido pET, se adicionó Ampicilina al medio a una concentración final de 100 µg/mL.

3.2. Amplificación del gen *pme-cd* por PCR

Para la amplificación del gen *pme-cd* se extrajo el ADN de las cepas *M. bovis* EPP63 y EV345 con el kit comercial *Gen Elute Genomic DNA* kit (Sigma) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se cuantificaron sus concentraciones con Nanodrop.

Los cebadores se diseñaron a partir de la secuencia obtenida del borrador del genoma de *M. bovis* EPP63, disponible en la plataforma del Proyecto del *Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center* (<https://www.hgsc.bcm.edu/microbiome/moraxella-bovis-epp63>). A estos cebadores se les incorporaron las secuencias de los sitios de restricción para el par de enzimas *NdeI* y *HindIII* (Invitrogen Anza) para EPP63, y *NdeI* y *SacI* (Invitrogen Anza)

para EV345 (Tabla 8). Al cebador de avance se le incorporó un sitio de corte de la enzima *NdeI*, de forma que la enzima cortara la secuencia dejando al principio los nucleótidos correspondientes al codón inicio del gen. Por otro lado, al cebador reverso se le incorporó una cola de 6 residuos de histidina luego del último codón codificante, seguida por el sitio de corte de la enzima *HindIII* (EPP63) ó *SacI* (EV345) y un codón *stop*.

Tabla 8. Cebadores para amplificar las PME-CD recombinantes de la cepa EV345 y EPP63. En subrayado se indica el sitio de restricción de cada enzima, y en color naranja la cola de 6 residuos de histidina en el *reverse*.

Cebadores de <i>pme-CD</i> recombinante (EV345)			
Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Producto (pb)
PMECD_NdeI_F	5'-CTTTGGAGGAACATATGAACTTAATAAAAATCGCTTTGG-3'	71,6	
PMECD_HindIII_R	5'-CGCCCTTAAGCTTAATG GGT GAT GGT GAT GGT GTTTGGTTTCTACAACGTTAGTTAC-3'	81,8	1262
Cebadores de <i>pme-CD</i> recombinante (EPP63)			
Nombre	Secuencia	Tm (°C)	Producto (pb)
PMECD_NdeI_F	5'-CTTTGGAGGAACATATGAACTTAATAAAAATCGCTTTGG-3'	71,6	
PMECD_SacI_R	5'-GCCCTTGAGCTCTTAATG GGT GAT GGT GAT GGT GTTTGGTTTCTACAACGTTAGTTAC-3'	82,5	1262

La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 25 µL, conteniendo 1x PCR buffer, 1 U de Taq platinum polimerasa (Invitrogen), 0,2 mM de cada uno de los cuatro dNTPs, 3,5 mM MgCl₂, 0,5 µM de cada cebador, y 1 µL de ADN (50 ng/mL). La calidad, pureza y concentración del ADN se controló como se mencionó en el punto 1.4. Como control negativo se utilizó en cada corrida un tubo con agua bidestilada en lugar de ADN molde. El termociclador utilizado fue el Applied Biosystems™ SimpliAmp™ Thermal Cycler con las condiciones mostradas en la Tabla 8.

Tabla 9. Condiciones utilizadas para realizar los análisis por PCR para amplificación

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	
Desnaturalización inicial	94	5	
Desnaturalización	94	2	} 30 ciclos
Hibridación	63	1	
Extensión	72	1	
Extensión final	72	7	

3.3. Purificación del ADN plasmídico

Para la purificación plasmídica se utilizó el kit comercial *AxyPrep Plasmid Miniprep Kit: Spin Protocol* (Axygen). Se inocularon 10 mL de LB/Amp [100 µg/mL] con una colonia aislada de la cepa *E. coli* XL-1 Blue-pET21a(+), *E. coli* BL21 pET21a(+) y *E. coli* pUC19 (la cual se utilizó como control en la transformación) y luego se realizó la purificación de los plásmidos, de acuerdo a lo indicado por el fabricante. La presencia de los plásmidos purificados se corroboró en un gel de agarosa 0,8 % teñido con GelRed (Biotum) y se observó bajo luz UV. El ADN plasmídico se almacenó a -20 °C hasta su uso.

3.4. Digestión enzimática del producto de PCR y del plásmido de expresión

La digestión enzimática del gen que codifica la proteína PME-CD de EPP63 y EV345 se realizó con las enzimas *NdeI-HindIII* y *NdeI-SacI* respectivamente utilizando el mismo buffer de compatibilidad (Anza). De la misma manera, el plásmido pET21a (+) se digirió con ambos pares de enzimas. El tiempo de reacción en ambos casos fue de 15 minutos a 37 °C. La mezcla de reacción para la digestión del gen y del plásmido consistió en 3 µL de ADN, 1 µL de *NdeI* y 1 µL de *HindIII* o *SacI* (según corresponda), 2 µL 10x del *buffer* (provisto con las enzimas) en un volumen final de 20 µL. Paralelamente a la digestión doble del plásmido se realizaron dos digestiones simples del mismo gen y del plásmido con cada enzima por separado. Transcurrido el tiempo de incubación se inactivaron las enzimas a 80 °C durante 20 minutos. La presencia de los productos digeridos se corroboró en un gel de agarosa 0,8 % teñido con GelRed (Biotum) y se observó bajo luz UV. Posteriormente, se purificaron dichos productos con el *QIAquick Gel Extraction Kit* de Qiagen de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

3.5. Ligación

La ligación del gen que codifica para la proteína PME-CD y el plásmido pET21a(+) se realizó con la enzima ADN ligasa T4 (Invitrogen) tanto para el inserto correspondiente a la cepa de EPP63 como de EV345. Los productos previamente doble digeridos con las enzimas de restricción y purificados, se incluyeron en una mezcla de reacción y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción consistió en 3 µL de plásmido doble digerido y purificado, 9 µL del gen doble digerido y purificado, 1 µL de la ADN ligasa T4 y 4 µL de *buffer* (provisto con la ADN ligasa). Además, se incorporó un control de re-ligación del plásmido. En ambos casos, el volumen final de la mezcla de reacción fue 20 µL. Transcurrido el tiempo de incubación se almacenaron a -20 °C.

3.6. Generación de células competentes

Con el fin de generar células competentes de *E. coli* XL-1 Blue y *E. coli* BL21 (λ DE3), se inocularon 2 caldos LB de 100 mL cada uno, con una colonia aislada de *E. coli* XL-1 Blue ó *E. coli* BL21 (λ DE3), a 37 °C con agitación de 200 rpm durante aproximadamente 3:30 hs. Cuando la DO_{600} alcanzó valores de 0,4 se centrifugaron los cultivos a 4.000 rpm, 4 °C, durante 10 minutos, y se descartaron los sobrenadantes. Ambos sedimentos se resuspendieron en 25 mL de $CaCl_2$ 50 mM, estéril y frío y se centrifugaron a 4.000 rpm durante 8 minutos a 4 °C. Posteriormente las células se resuspendieron suavemente en 20 mL de $CaCl_2$ frío y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, las suspensiones se centrifugaron en las condiciones anteriores y las células se resuspendieron suavemente en 2 mL de $CaCl_2$ estéril y frío. Finalmente se agregó glicerol estéril, 10 % (v/v) de concentración final, a las células competentes, las células se almacenaron en alícuotas de 220 μ L a -80 °C hasta su uso.

3.7. Transformación

La transformación de *E. coli* XL-1 Blue con la construcción pET21a(+)-*pmeCD* se realizó en paralelo para ambos insertos en estudio, *pmeCD* (EPP63) y *pmeCD* (EV345). Primero se plaquearon 20 μ L de células competentes *E. coli* XL1-Blue en Agar Luria Bertani (LA) y LA/Ampicilina como control de viabilidad de las células. A continuación se incubaron en hielo 200 μ L de células competentes de *E. coli* XL-1 Blue con 8 μ L de la construcción pET21a(+)-*pmeCD* durante 30 minutos, luego se realizó un *shock* térmico a 42 °C durante 80 segundos y se lo dejó en hielo durante 1 minuto. Inmediatamente después se agregó 1 mL de caldo LB y se incubó durante 1 h y 30 minutos a 37 °C con agitación lenta. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se sembraron en agar LB/Amp [100 μ g/mL] y en agar LB como control y posteriormente se incubaron a 37 °C durante 24 hs. Asimismo, se transformó con el plásmido religado y el plásmido pUC como control de transformación. Las colonias que crecieron en las placas de agar LB/Amp se almacenaron a -80 °C en caldo LB/Amp [100 μ g/mL] y glicerol 20 % (v/v) final.

Posteriormente se seleccionó uno de los clones de *E. coli* XL-1 Blue con el vector de expresión conteniendo el inserto, se extrajo el plásmido de acuerdo a lo descrito en la sección 3.4 y se transformó la cepa de expresión *E. coli* BL21 (λ DE3) siguiendo el protocolo detallado

más arriba. Nuevamente, las colonias que crecieron en las placas de agar LB/Amp se almacenaron a -80 °C en caldo LB/Amp [100 µg/mL] y glicerol 20 % (v/v) final.

3.8. Inducción de la expresión de PME-CD recombinante en *E. coli*

La inducción de la expresión de PME-CD recombinante se realizó en paralelo para ambas construcciones (EPP63 y EV345). Se inocularon 300 mL de caldo LB/Amp [100 µg/mL] con una colonia aislada de *E. coli* BL21(λDE3)(pET-*pmeCD*) y el medio se incubó a 37 °C con agitación vigorosa (200 rpm). El crecimiento bacteriano se controló midiendo la DO_{600nm}. Cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ entre 0,4 y 0,8 (aproximadamente a las 3 horas), se tomó una alícuota de 20 µL (t0) como control y luego se le agregó al cultivo IPTG a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de la proteína recombinante. El cultivo se incubó a 37 °C con agitación vigorosa durante 3 hs, luego se tomó una alícuota del mismo de 20 uL (tf) como control de inducción. Se centrifugó el cultivo a 10.000 rpm y 4 °C durante 15 minutos. La expresión de la proteína recombinante antes (t0) y después de la inducción (tf) se controló en geles de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturizantes según se describe en 3.11. Finalmente, el *pellet* obtenido se almacenó a -20 °C para la posterior purificación de la proteína PME-CD recombinante.

3.9. Solubilidad de la PME-CD recombinante

Se determinó si las proteínas recombinantes se producían de forma soluble o insoluble. Para ello, una alícuota del *pellet* celular obtenido en el paso anterior se resuspendió en 5 mL de *buffer* de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM, pH 8), se agregó Lisozima 1 mg/mL final y se incubó en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, la suspensión obtenida se sonicó de forma intermitente a 200-300 W durante 5 minutos (x6) en hielo y el lisado se centrifugó a 10.000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Se colectó el sobrenadante (Extracto A) correspondiente la fracción de proteínas solubles y el *pellet* se resuspendió en 5 mL de *buffer* de lisis (Extracto B), lo correspondiente a la fracción de proteínas insolubles. Una alícuota de cada extracto se analizó por SDS-PAGE al 12 % como se describe en el punto 3.11 (Manual Novagen 6ta edición).

3.10. Purificación de PME-CD recombinante

Para la purificación de ambas PME-CD se tomó como referencia el protocolo de Qiagen en condiciones desnaturizantes (Manual *The QIAexpressionist*, 2003). Las células previamente

inducidas se resuspendieron en 9 mL de *buffer* A (Urea 8 M, Tris 0,01 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, pH 8) y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Se centrifugó el lisado a 10000 x g, 4 °C, 15 minutos. Al sobrenadante obtenido se le agregaron 8 mL de resina Ni-NTA al 50 % equilibrada en *buffer* A (4 volúmenes, 1 volumen = 4 mL), se separó por decantación y se incubó por 45 minutos a temperatura ambiente la resina equilibrada con el lisado. Luego se cargó la columna con los 8 mL de resina 50 % Ni-NTA cuidadosamente evitando la entrada de aire (se guardó una alícuota (0)). Se lavó la columna con 13 volúmenes de *buffer* A. El flujo de salida fue de 10-15 mL/h, se guardó una alícuota. Luego se lavó con *buffer* C (Urea 8 M, Tris 0,01 M, NaH₂PO₄ 0,1 M, pH 6.3) + Imidazole 500 Mm (10 volúmenes). Finalmente se recogieron las fracciones de la columna de la siguiente manera: los primeros 10-15 mL en un tubo y 2 tubos más en los siguientes 5 mL.

Previo a la visualización de las proteínas por SDS-PAGE 12 % y posterior evaluación de la reactividad con los anticuerpos por *Western blot* frente a sueros y lágrimas de bovinos sanos y enfermos, se dializó la proteína con membranas de diálisis con un corte de 14 KDa dentro de un vaso de bohemio de 2 L en solución fisiológica a 4°C, con agitación. La solución fisiológica se fue renovando cada 8 hs por 96 hs.

3.11. Visualización de las PME-CD recombinante (SDS-PAGE)

Para la visualización de las PME-CD 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 %. El *buffer* utilizado para electroforesis fue Tris-glicina. La corrida electroforética se realizó en una cuba Mini Protean II de Bio-Rad a 120 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 y se solubilizaron y desnaturalizaron por calentamiento a 100 °C durante 10 minutos. Las bandas proteicas se visualizaron por tinción de los geles con colorante de azul brillante de Coomassie y posterior decoloración de los mismos con solución decolorante. Para la estimación del peso molecular de la proteína se empleó el marcador de peso molecular estándar *SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard* de ThermoFisher Scientific.

3.12. Confirmación de la identidad de PME-CD recombinante

- Identificación del inserto mediante secuenciación

La identificación del gen que codifica la proteína recombinante (inserto) se evaluó mediante secuenciación y se verificó su correcto marco de lectura. Primero se extrajo la construcción que contiene el gen de la proteína PME-CD. Se inocularon 100 mL de medio LB/Amp [100 µg/mL] con una colonia aislada de *E. coli* BL21(λDE3)(pET-*pme-CD*) y el medio se incubó a 37 °C durante 24 hs. Transcurrido el tiempo de incubación se purificó el plásmido pET-*pme-CD* con el kit comercial *ZR Plasmid Miniprep* (Zymo Research), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los plásmidos obtenidos (uno de cada proteína recombinante) se enviaron a Macrogen junto con el par de cebadores (Tabla 10) para la secuenciación del fragmento conteniendo el sitio de múltiple clonado del plásmido pET-*pme-CD* descritos en el manual del pET-21a(+) (Novagen).

Tabla 10. Cebadores pET21a

Cebadores	5´- Secuencia-3´	Posición	Tm (°C)	Tamaño (pb)
pET21a-F	TAATACGACTCACTATAG	311-329	47	1093
pET21a-R	GCTAGTTATTGCTCAGCG	69-87	53,9	

El alineamiento y los análisis de las secuencias obtenidas se realizaron con el programa bioinformático BioEdit y el programa en línea BLAST.

- Identificación de la proteína expresada mediante análisis proteómico: MALDI- TOF

Con el fin de determinar la identidad de las proteínas, las preparaciones de las proteínas purificadas se analizaron en SDS-PAGE al 12 % y luego de la corrida electroforética se escindió la banda del gel. Dicha banda fue remitida al Laboratorio de Bioquímica y Proteómica Analítica del Instituto Pasteur de Montevideo para su análisis. Se analizaron los resultados con el programa MASCOT (Matrix Science, London, UK) usando bases de datos públicas (NCBI).

3.13. Cuantificación de PME-CD

La cuantificación proteica se realizó 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). Para la cuantificación de las proteínas se construyó una curva de calibración empleando como estándar albúmina sérica

bovina (BSA) a diferentes concentraciones (0,15 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,35 mg/mL, 0,45 mg/mL). Cada dilución se sembró por triplicado. El reactivo de Bradford *Dye Reagent Concentrate* (BioRad, 79201A) se añadió (200 uL por pocillo), tanto a las muestras de la curva de calibración así como a las muestras de PME, los mismos se agitaron y se midió en espectrofotómetro la absorbancia a 595 nm. Con los valores de absorbancia de la proteína BSA se realizó una curva estándar, a partir de la cual se cuantificaron las proteínas PME-CD recombinantes purificadas.

3.14. Western blot

Con el fin de determinar si las PME-CD recombinantes se expresaban *in vivo*, 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 y colaboradores (1979). Dichos sueros fueron cedidos gentilmente por el Dr. Carlos López Mazz obtenidos en el marco de las actividades llevadas a cabo en la Estación Experimental Prof. Bernardo Rosengurtt (Cerro Largo, Fac. de Agronomía). Los sueros se conservaron 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 VIRBAC-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-CD purificadas se corrieron 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 (BioRad) utilizando una cuba de transferencia Mini Trans-blot (BioRad), a 100 V, 1 h. Luego de la transferencia se realizó el bloqueo con *buffer* de bloqueo: TBS-Tween-Leche descremada (Conaprole) al 3 % (p/v) durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces en *buffer* de lavado: TBS-Tween y luego se las incubó con el suero ó lágrima (según fuera el caso) de un animal sano y otro correspondiente a un animal que sufría QIB a una dilución 1/100 (1/200 para lágrimas) en *buffer* de dilución: TBS-Tween-1 % Leche descremada durante una hora a 37 °C con agitación. Las membranas se lavaron tres veces con *buffer* de lavado. El conjugado, anti-IgG de bovino acoplado a fosfatasa alcalina se empleó en el caso de las muestras de suero (Sigma, dilución 1/30.000 en *buffer* de dilución) y anti-IgA de bovino acoplado a fosfatasa 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 *buffer* de lavado y se les agregó la solución del sustrato, 5-bromo-4-cloro-3-indoilo fosfato (BCIP, 15 mg/mL) y tetrazolio azul nitro (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.

3.15. Inmunización de ratones con PME-CD recombinante (EV345)

En los ensayos con animales solamente se trabajó con la PME-CD recombinante de la cepa EV345.

3.15.1. Animales

Se utilizaron ratones CD-1 hembras de 20 a 25 gr de peso de unas ocho semanas de edad, los cuales se mantuvieron en condiciones de cautiverio en el bioterio del IIBCE. Los animales se alimentaron con ración comercial y agua *ad libitum*. El protocolo de experimentación utilizado fue aprobado por el Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del IIBCE, Ministerio de Educación y Cultura (número de protocolo: 002/08/2015).

3.15.2. Inmunización a través de la vía sistémica

Se utilizaron dos grupos de cinco animales cada uno para evaluar la respuesta inmunológica de la PME-CD recombinante realizando inmunizaciones por la vía subcutánea. Para esto se inmunizó un grupo de acuerdo al protocolo de Pellegrino y colaboradores (2003) con la PME-CD recombinante combinada con el adyuvante completo de Freund (Sigma) en la primera inmunización a una relación 1:1 con la proteína, mientras que las inmunizaciones restantes se administraron con el adyuvante incompleto de Freund (Sigma) también en una relación 1:1. El volumen inoculado en cada dosis fue de 300 μ L y la cantidad de la proteína fue de 50 μ g. Luego de transcurridos los 7 días de la última dosis (día 24), los animales se sacrificaron por dislocación cervical y posteriormente se extrajo la sangre por punción cardíaca. La sangre obtenida se incubó durante 1 h a 37 °C y luego se incubó hasta el día siguiente a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos y el suero se almacenó a -20 °C.

3.15.3. Inmunización a través de la vía intranasal

Se inmunizaron cuatro grupos de seis ratones cada uno de forma intranasal en base al protocolo empleado por Pellegrino y colaboradores (2003) los días 0 (primera dosis), 3, 10, 17 y 24. Se inoculó un volumen de 30 μ L a cada ratón (15 μ L en cada narina). En los grupos que se inmunizaron con la PME-CD recombinante se les inoculó 50 μ g. También se utilizó un

adyuvante comercial basado en un polímero (carbómero) marca Carbigen MVP Adjuvants (<http://mvpadjuvants.com/>), preparado a un 10 % (v/v). La preparación de la formulación se realizó según las recomendaciones del fabricante. En la Tabla 11 se muestran los grupos y los tratamientos empleados.

Tabla 11. Grupo de animales inmunizados con la PME-CD recombinante por la vía intranasal

Grupo	1	2	3	4
Nº de animales	6	6	6	6
Contenido de vacuna	SF	PME-CD recombinante + SF	PME-CD recombinante + Adyuvante	SF + Adyuvante
Volumen de inóculo total (µL)	30	30	30	30

A los cuatro grupos de animales se les extrajo sangre de la vena caudal antes de la primera inmunización (Tiempo 0). Luego de transcurridos los 7 días de la última dosis (día 24), a los animales se los anestesió con Ketamina (50 mg/kg) y Xilazina (10 mg/kg), anestésicos inyectables de uso veterinario, y posteriormente se los eutanació por dislocación cervical. Se extrajo la sangre por punción cardíaca y se les realizaron lavados bronqueoalveolares (BAL). Para esto, se expuso la tráquea de los ratones y se les realizó una pequeña incisión por la cual se introdujo 1 mL de PBS + EDTA 1mM con una pipeta Pasteur de punta fina y de menor calibre que la tráquea del ratón, con el que se hicieron tres lavados para obtener el producto final (Muñoz-Wolf *et al.*, 2014). La sangre obtenida se incubó durante 1 h a 37 °C y luego se incubó hasta el día siguiente a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos y el suero se almacenó a -20 °C. Los BAL se centrifugaron a 1000 rpm por 5 minutos y los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C.

3.15.4. Determinación de anticuerpos en suero y BAL por ELISA

Se realizaron ensayos de ELISA para determinar el título de anticuerpos en los sueros de los ratones inmunizados por la vía sistémica y en los sueros y BAL de los ratones inmunizados por la vía intranasal. Para este ensayo las placas de microtitulación (Greiner) se sensibilizaron con 50 µg/mL de proteína recombinante PME-CD resuspendida en *buffer* de sensibilización, y se incubaron hasta el día siguiente a 4 °C en cámara húmeda. Luego, se lavaron los pocillos con PBS-T. Una vez sensibilizadas, las placas se bloquearon con 200 µL de PBS-T-L y se incubaron 90 minutos a 37 °C. Las diluciones de los sueros 1/100 (y de los BAL 1/4) se realizaron en PBS-T-L. Luego de sembrar el suero (o BAL) de cada animal (100 µL por pocillo), las placas se incubaron 90 minutos a 37 °C en cámara húmeda. Después de lavar las placas con PBS-T se

agregaron 100 μ L del conjugado anti-IgG (o anti-IgA) de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (ABCAM, Sigma respectivamente) diluido en PBS-T-L a una dilución 1/15000 para IgG (o 1/40 para IgA). La incubación del conjugado fue de 90 minutos a 37 °C. El revelado de las placas se realizó agregando el sustrato de la enzima fosfatasa alcalina (p-nitrofenil fosfato disódico, número de catálogo: N2640, Sigma) en *buffer* de Glicina y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente hasta que se observó el desarrollo de color. Se midió la absorbancia a 405 nm en el espectofotometro Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific).

3.15.5. Determinación de la producción de citoquinas por ELISA

Los niveles de las citoquinas IL-4, IL-10, INF- γ se determinaron en los sobrenadantes de los BAL de los cuatro grupos de animales inmunizados intranasalmente (SF, PME-CD, PME-CD + Adyuvante, Adyuvante). Para ello se utilizó un kit de ELISA de captura comercial (BD OptEIA) según las instrucciones del fabricante. Brevemente las placas de microtitulación se sensibilizaron con anticuerpo de captura anti-IL4, anti-IL10 o anti-INF- γ , según corresponda, en *buffer* de sensibilización y se incubaron toda la noche a 4 °C. Posteriormente las placas se bloquearon con 100 μ L de PBS-3 % BSA por pocillo durante 2 hs a temperatura ambiente. Luego se sembró un volumen de 50 μ L/pocillo de una dilución 1:4 de los BAL y de la curva estándar de IL4, IL10 o INF- γ , según correspondiera, diluidos en PBS-3 % BSA los cuales se incubaron por 2 hs a temperatura ambiente. El anticuerpo de detección biotinilado (anti-IL4, anti-IL10 o anti-INF- γ , según corresponda) se incubó 2 hs a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó estreptavidina/HRP y las placas se incubaron por 45 minutos a temperatura ambiente. El revelado se realizó adicionando TMB/Peróxido de hidrógeno e incubando 15 minutos a 37 °C. Cuando se observó desarrollo de color la reacción se detuvo con el agregado de 50 μ L/pocillo de H₂SO₄ 3 M y se midió la absorbancia a 450 nm. Las concentraciones de IL-4, IL-10, INF- γ obtenidas en cada grupo se calcularon realizando una interpolación con la curva del estándar de IL-4, IL-10, INF- γ según correspondiera, realizada en la misma placa.

3.15.6. Análisis estadísticos

Se evaluaron los supuestos básicos de la estadística paramétrica y se analizaron las diferencias entre los grupos de animales. En aquellos casos en que las distribuciones cumplieron con dichos supuestos se empleó el test de Análisis de Varianza (ANOVA) para la comparación entre medias de los tratamientos. En los casos en que se encontraron diferencias, se evaluó posteriormente mediante el Test de Tukey entre qué grupos se dieron dichas

diferencias. En los casos en que fue necesario emplear estadística no paramétrica la comparación entre grupos se realizó mediante el Test de Kruskal-Wallis con posterior comparación entre grupos empleando el Test de Man Whitney. Los análisis estadísticos se realizaron empleando el software Past (Hammer *et al.*, 2001) estableciéndose un nivel de confianza del 95 %.

RESULTADOS

Capítulo 1. Análisis de genes fimbriales de *M. bovis*

4. SELECCIÓN DE CEPAS

4.1. Presencia del primer gen fimbrial

Para confirmar que los genes fimbriales estaban presentes en distintas cepas clínicas de *M. bovis* se amplificó mediante PCR convencional parte del primer gen fimbrial que está localizado hacia el extremo 5' del *locus* fimbrial de *M. bovis*, con el par de cebadores fim09_F/fim09_R (Fig. 2). Al producto de amplificación, de un tamaño esperado de 603 pb, se le llamó *fim09* (Fig. 5). Todas las cepas de *M. bovis* amplificaron dicho gen. Los productos de PCR se enviaron a secuenciar y las secuencias obtenidas fueron editadas en BioEdit. Se realizó un alineamiento múltiple en base a las secuencias obtenidas el cual permitió observar la alta variabilidad entre las secuencias aminoacídicas de las fimbrias (Fig. 6). Si bien presentaron una región conservada al inicio de cada secuencia (extremo 5'), hacia el extremo 3' presentaron una creciente variabilidad. Además, éstas secuencias editadas se evaluaron en BLAST para conocer su homología con la base de datos públicos, mostrando homología del 94 % con *Moraxella bovis pilin gene, complete cds, GenBank: M92155.1*, el cual se esperaba amplificar. Con estos resultados no se le pudo atribuir a *fim09* que tipo de fimbria en conformación de expresión correspondía. Estos resultados permitieron saber que todas las cepas de *M. bovis* presentan parte del primer gen fimbrial del *locus*, aunque no fue posible discernir en cuál conformación de fimbria se encontraban las secuencias obtenidas (*tfpQ* ó *tfpI*).

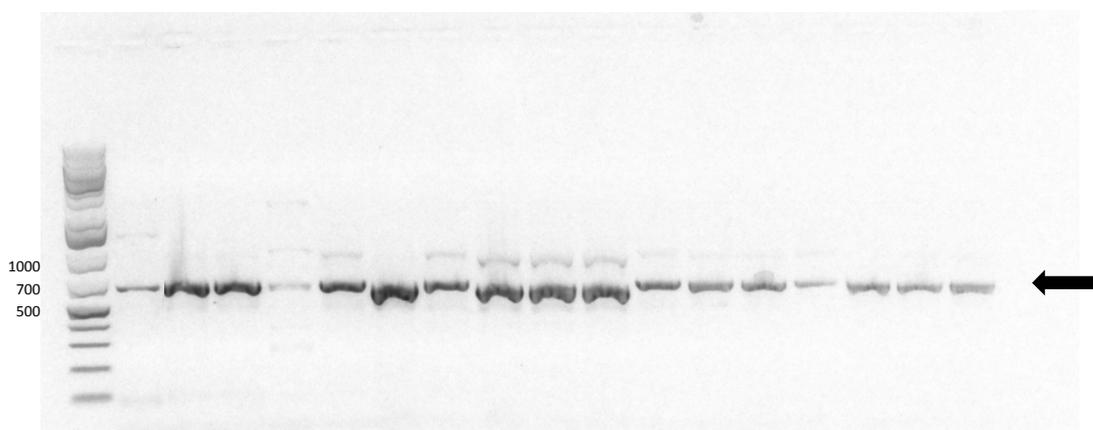


Figura 5. Productos de amplificación de *fim09* de *M. bovis*. 1-Marcador de tamaño molecular 1kb plus Thermo, 2-5120, 3-EV345, 4-64, 5-SJ01, 6-CANIIIB, 7-SJ03B, 8-LC190, 9-SJ02, 10-EV250, 11-EV450B, 12-CANIIIA, 13-SJ07, 14-EV450A, 15-EV121, 16-BM3A, 17-771A, 18-EPP63, 19-Control negativo. Tamaño del amplicón: 603 pb, indicado con una flecha negra.

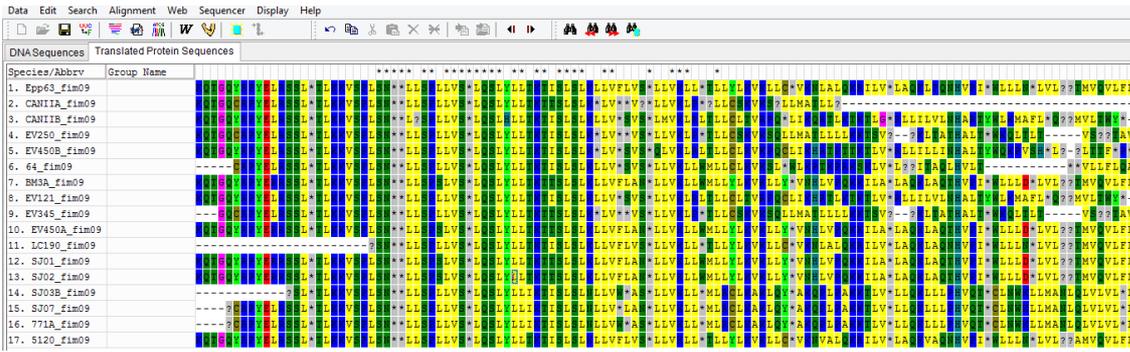


Figura 6. Alineamiento múltiple en MEGA de las secuencias de aminoácidos de *fim09*. Hacia el extremo 5' se visualizan secuencias más similares entre sí y conservadas, hacia el extremo 3' se observa mayor variabilidad de secuencias.

4.2. Producción de fimbrias: Movilidad *twitching*

Para tener una aproximación sobre la producción de fimbrias en la colección de *Moraxella* spp. se realizó un cultivo líquido y posteriormente se inocularon las bacterias en medio sólido, donde se pudo observar luego de 96 hs el movimiento *twitching* característico de las fimbrias tipo IV. Las cepas analizadas presentaron diferentes morfologías entre ellas (Fig. 7). En algunos casos el halo externo presentó una morfología rugosa e irregular (CANIIIB, 64, EV250, BM3A, EV121, PRO) y en otros presentó una morfología lisa (EPP63, EV345, BAA1259, CANIIIA, EV450B, LC190). Todas las cepas analizadas presentaron la capacidad de realizar el movimiento *twitching*.

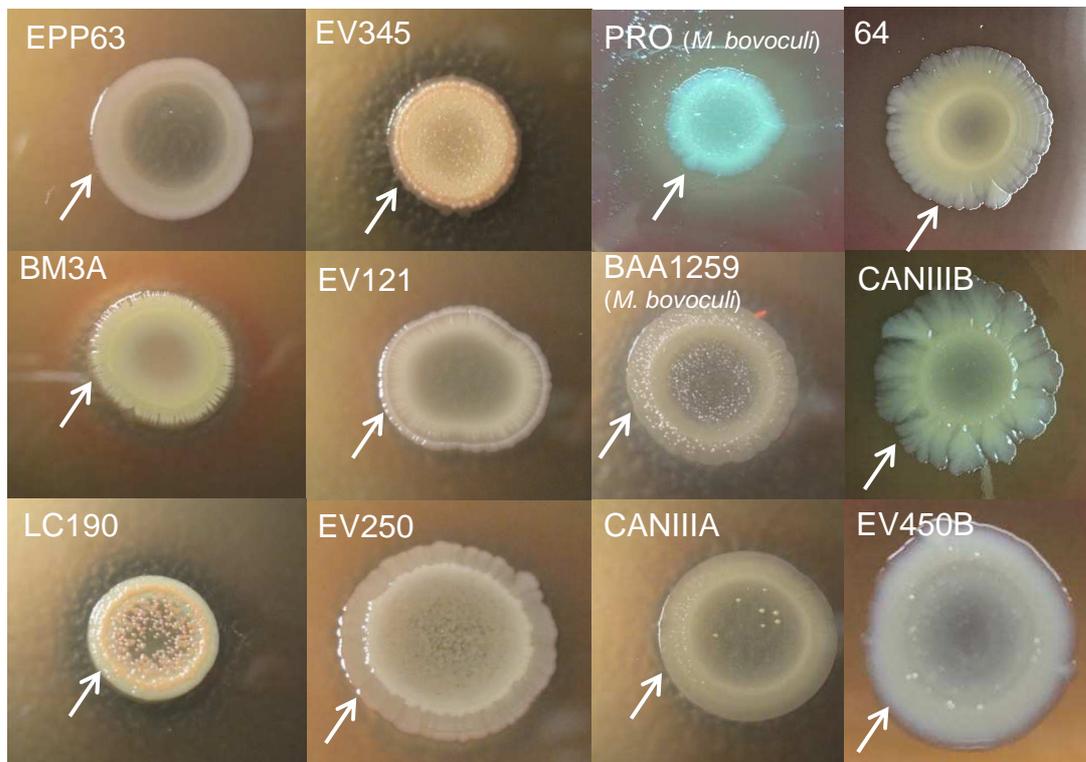


Figura 7. Movilidad *twitching*. Se visualiza el movimiento *twitching* de algunas cepas de *M. bovis* y *M. bovoculi* en placas de TSA + sangre ovina luego de 4 días de incubación a 37 °C con cámara húmeda. Se observan diferentes morfologías entre las cepas analizadas. Mediante flechas se señala el halo de crecimiento externo, el cual se evaluó por TEM.

4.3. Visualización de las fimbrias mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

A continuación se visualizaron las fimbrias por TEM, a partir de muestras tomadas en la región más externa del halo de crecimiento (*twitching*). Se observaron tanto fimbrias unidas a las bacterias (Fig. 8), como desprendidas de éstas (Fig. 9). En general, se visualizaron pocas bacterias con fimbrias en todo el campo de visualización.

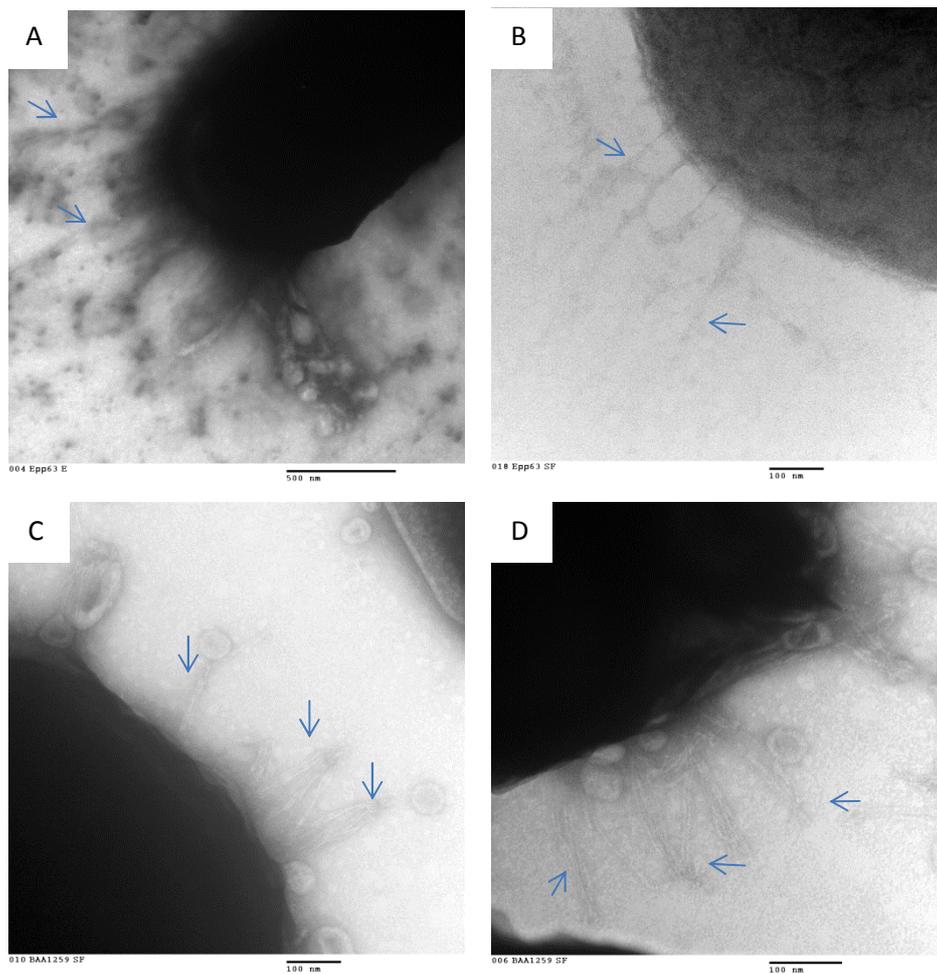


Figura 8. TEM del halo externo de crecimiento del *twitching* de *M. bovis* y *M. bovoculi*. A y B: Se muestran las fimbrias (flechas) de *M. bovis* (EPP63). C y D se muestran las fimbrias (flechas) de *M. bovoculi* (BAA1259).

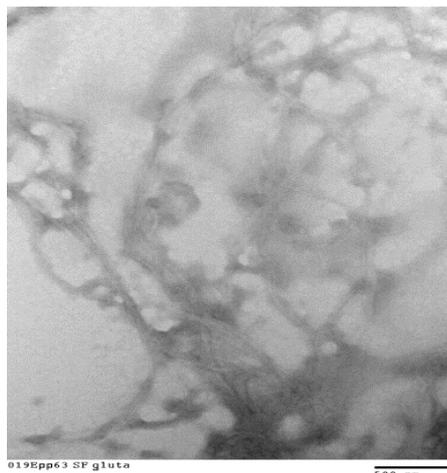


Figura 9. TEM del halo de crecimiento externo del twitching de *M. bovis*. Se muestran las fimbrias desprendidas de la bacteria.

En base a estos resultados (presencia de una porción del primer gen fimbrial, capacidad de exhibir la movilidad *twitching* y la visualización de fimbrias por TEM) y sumado a la presencia de otros genes de virulencia (*tolC*, *pmeCD*, *pme79*, *fur*, *mbxA* y *plB*) estudiados anteriormente por nuestro laboratorio (Sosa *et al.*, 2015; Acquistapace, 2014), se seleccionó una cepa de *M. bovis* y una de *M. bovoculi* para posteriores ensayos de obtención de fimbrias, secuenciación genómica y generación de proteína recombinante. Las cepas seleccionadas fueron: EV345 de *M. bovis* y PRO de *M. bovoculi*, como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Presencia de genes de virulencia y capacidad de movilidad *twlitching* en las cepas analizadas. En color rosado se resaltan las dos cepas seleccionadas para continuar el estudio.

Aislamiento	Especie	<i>pmeCD</i>	<i>fim09</i>	<i>Twitching</i>	<i>tolC*</i>	<i>pme79*</i>	<i>fur*</i>	<i>mbxA*</i>	<i>pIB*</i>
EPP63	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
BAA1259	<i>M. bovoculi</i>	+	-	+	-	-	-	+	-
CANIIIA	<i>M. bovis</i>	+	+	+	-	-	-	+	-
CANIIIB	<i>M. bovis</i>	+	+	+	-	-	-	+	-
EV250	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
EV450B	<i>M. bovis</i>	+	+	+	-	-	-	+	-
64	<i>M. bovis</i>	+	+	+	-	-	-	+	-
BM3A	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
EV121	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
EV345	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
EV450A	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	-	-	+	-
LC190	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
SJ01	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
SJ02	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+	-	+	+
SJ03B	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+	-	+	+
SJ07	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
771A	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+	-	+	+
5120	<i>M. bovis</i>	+	+	+	+	+	-	+	+
PRO	<i>M. bovoculi</i>	+	-	+	-	-	-	+	-

*Sosa *et al.*, 2015

5. EXTRACCIÓN DE FIMBRIAS

Se evaluaron diferentes medios de cultivos y métodos de separación de fimbrias en la cepa de *M. bovis* seleccionada anteriormente (EV345). Sin embargo, no se logró obtener fimbrias con ninguno de los protocolos evaluados. Las extracciones obtenidas con los diferentes protocolos se visualizaron en SDS-PAGE 15 % y las bandas de tamaño esperado: 20 KDa (de acuerdo a su peso molecular podía corresponder a la fimbria Tfpl) y 17 KDa (podía corresponder a la fimbria TfPQ) se escindieron del gel y se analizaron por MALDI-TOF (Servicio IPMont). Las identidades de dichas proteínas extraídas presentaron homología con diferentes proteínas de *M. bovoculi*, *M. catarrhalis* o *Moraxella caprae* pero ninguna con fimbrias (Fig. 10).

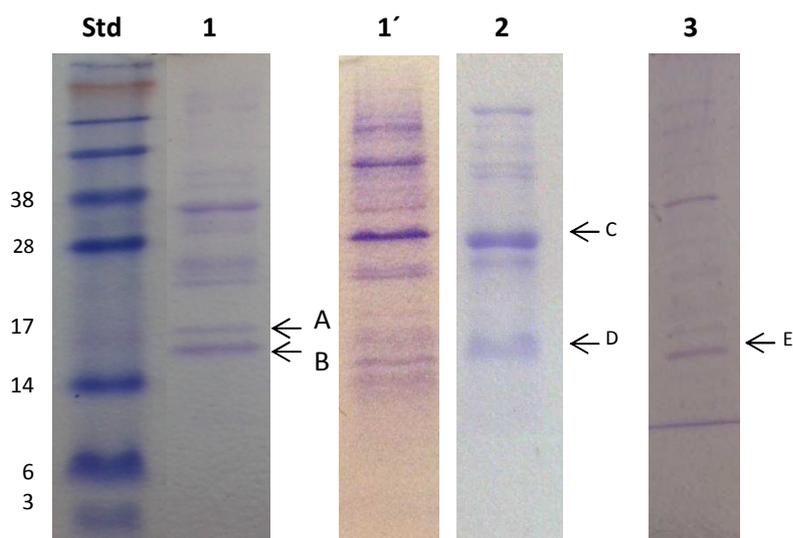


Figura 10. Extracción de fimbrias de *M. bovis*, SDS-PAGE 15 %. Std: Marcador de peso molecular (KDa), 1: protocolo de Rhuell *et al.*, 1988, 1': protocolo de Rhuell *et al.*, 1988 modificado, 2: protocolo de Zbrun *et al.*, 2012, 3: protocolo de Lepper *et al.*, 1986. Las flechas negras indican las bandas extraídas e identificadas por MALDI-TOF (IPMont).

De este modo, se identificó un conjunto de proteínas de membrana por MALDI-TOF (Tabla 13). La proteína hipotética que se muestra en la Tabla 13, en el punto D y E, presenta homología con la PME-J de *M. bovoculi* y con la *Porin family protein* de *M. bovoculi*. Esta proteína fue identificada cuando se utilizó el protocolo de Zbrun *et al.*, 2012 y el de Lepper *et al.*, 1986. Además, se identificó una proteína homóloga a la PME-A de *Moraxella caprae* (A), luego una homóloga a una proteína hipotética de *M. bovoculi* (B) y otra homóloga a la UspA1 de *M. catarrhalis* (C).

Tabla 13. Identificación de proteínas por MALDI-TOF

Protocolo	MALDI TOF	Genbank
1. Ruehl <i>et al.</i> , 1988	A- cell envelope biogenesis protein PME-A de <i>Moraxella caprae</i> (19 KDa)	gi656071393
	B- hypothetical protein AAX06_10525"de <i>Moraxella bovoculi</i> (21 KDa)	gi817923932
2. Zbrun <i>et al.</i> , 2012	C- surface protein A1 UspA1, partial [<i>Moraxella bovoculi</i> 237] (35 KDa)	gi639139271
	D- hypothetical protein de <i>M. catarrhalis</i> (18 KDa)	gi738474238
3. Lepper <i>et al.</i> , 1986	E- hypothetical protein de <i>M. catarrhalis</i> (18 KDa)	gi738474238

6. SECUENCIACIÓN GENÓMICA

En base a la poca información disponible sobre las secuencias fimbriales de *M. bovis* y de *M. bovoculi*, sumado a que no se conocía el genoma de *M. bovis* y a que hay muy pocos genomas disponibles en las bases de datos públicas de *M. bovoculi*, surgió la necesidad de secuenciar los genomas de ambas especies a partir de las dos cepas seleccionadas anteriormente (*M. bovis* EV345 y *M. bovoculi* PRO).

6.1. Confirmación de la identidad molecular de *M. bovis* EV345 y *M. bovoculi* PRO

Se realizaron cultivos frescos en agar sangre observándose la morfología colonial de ambas cepas: colonias circulares pequeñas y grisáceas con un halo β hemolítico. Posteriormente se las repicó a agar BHI a partir del cual se realizaron las pruebas bioquímicas las cuales exhibieron el siguiente perfil bioquímico: catalasa positiva, oxidasa positiva, sin crecimiento en McConkey. Además se evaluó la morfología microscópica siendo cocobacilos gram negativos, agrupados como diplococos. Ambas cepas analizadas presentaron características esperadas para *M. bovis* y *M. bovoculi*. La identidad molecular de EV345 y PRO se confirmó mediante la secuenciación del gen que codifica al ARNr 16S por PCR. Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa teñidos con GelRed y presentaron el tamaño esperado (1500 pb aproximadamente). Luego de ser secuenciados se analizaron con la herramienta bioinformática BLASTn. Finalmente, EV345 presentó un 99 % de homología con *M. bovis* (*GenBank*: JN001944.1) y PRO un 99 % con *M. bovoculi* (*GenBank*: JN001971.1) respecto a las secuencias publicadas.

6.2. Secuenciación genómica

Una vez obtenidos los dos ADN genómicos se enviaron a secuenciar al servicio del IIBCE con la plataforma de Ion Torrent. El genoma de PRO (*M. bovoculi*) no se logró secuenciar debido a que el ADN genómico se degradó durante la secuenciación, sin embargo, se obtuvieron mejores resultados para EV345 (*M. bovis*). Los datos de sus concentraciones y pureza se encuentran en la Tabla 14. El ensamblado presentó un valor bajo de N50: 4463, por lo que éste se encontraba muy fragmentado y no fue posible ensamblar todo el genoma de *M. bovis*.

Tabla 14. Concentración y pureza de los ADN genómicos que se secuenciaron en Ion Torrent

Aislamientos	Especie	[ADN]ng/μL	260/280	260/230
PRO	<i>M. bovoculi</i>	42,0	2,05	1,57
EV345	<i>M. bovis</i>	65,5	1,93	1,62

De todas maneras, estos resultados permitieron realizar el análisis de diferentes genes de virulencia. A partir de estos análisis se pudieron obtener las secuencias que conforman el *locus* fimbrial, pero debido a que las secuencias del gen *tfpQ* y *tfpI* se encontraban en diferentes *contigs* no fue posible determinar el orden en el cual estaban localizados. Dicho orden de genes permite conocer la orientación de los genes fimbriales dentro del *locus*, indicando cuál gen fimbrial se encuentra en la conformación de expresión. Según Fulks *et al.*, (1990) el gen fimbrial que se encuentra en el extremo 5' está en la conformación adecuada para su expresión aunque el otro gen que se encuentra hacia el extremo 3' del *locus* estaría en la conformación de no expresión (pseudogen).

A modo de análisis complementario, las dos cepas seleccionadas inicialmente (EV345 y PRO) se enviaron a secuenciar al servicio de MicrobesNG (Universidad de Birmingham, UK) con tecnología Illumina. De acuerdo a las especificaciones de este servicio, se utilizó otro kit comercial de extracción de ADNg (Qiagen), diferente al utilizado anteriormente para el Ion Torrent (Sigma).

En la Tabla 15 se muestran las concentraciones y pureza de ambos ADN. Las métricas de ensamblaje se calcularon usando QUASt y se pueden visualizar en la Tabla 16 y en las Figura 11 y 12 que se encuentran a continuación.

Tabla 15. Concentración y pureza de los ADN genómicos

Aislamientos	Especie	[ADN]ng/μL	260/280	260/230
PRO	<i>M. bovoculi</i>	37,7	1,82	2,46
EV345	<i>M. bovis</i>	119,2	1,86	2,29

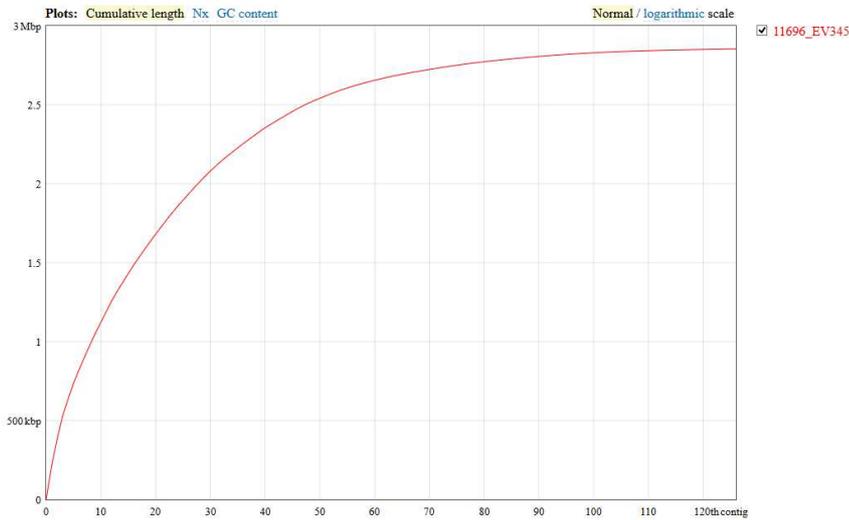


Figura 11. Reporte Quast de *M. bovis* EV345. Se observa el gráfico del número de *contigs* vs el largo acumulativo (pb).

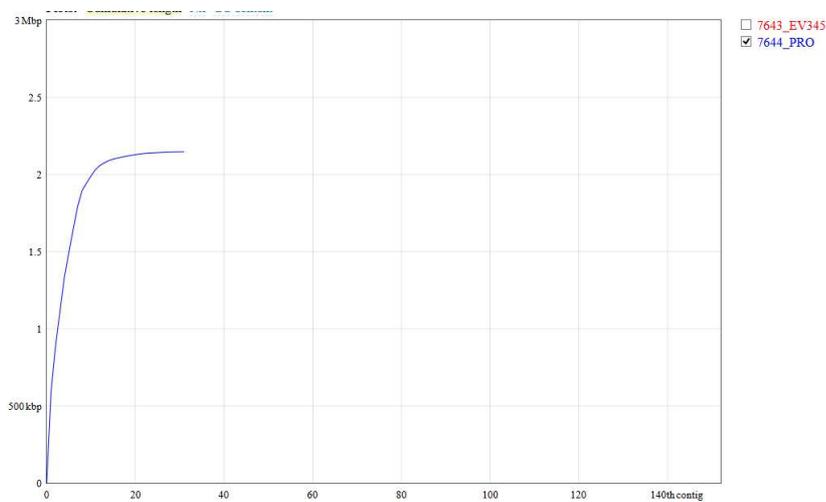


Figura 12. Reporte Quast de *M. bovoculi* PRO. Se observa el gráfico del número de *contigs* vs el largo acumulativo (pb).

Tabla 16. Resultado brindado por QUAST de los dos genomas obtenidos en MicrobesNG.

<i>M. bovis</i> EV345		<i>M. bovoculi</i> PRO	
# contigs	126	# contigs	31
# contigs (>= 0 bp)	165	# contigs (>= 0 bp)	58
# contigs (>= 1000 bp)	109	# contigs (>= 1000 bp)	28
Largest contig	213382	Largest contig	595495
Total length	2853777	Total length	2146333
Total length (>= 0 bp)	2865932	Total length (>= 0 bp)	2156921
Total length (>=1000 bp)	2841521	Total length (>= 1000 bp)	2144664
N50	55139	N50	224129
N75	30412	N75	152870
L50	15	L50	3
L75	32	L75	6
GC (%)	43.78	GC (%)	45.38

Es importante resaltar los siguientes valores que muestra la Tabla 16:

- # *Contigs* es el número total de *contigs* en el ensamblaje.
- *Largest contig* es la longitud del *contigs* más largo en el ensamblaje.
- GC (%) es el número total de nucleótidos G y C en el ensamblaje, dividido por la longitud total del ensamblaje.
- N50 es la longitud para la cual la colección de todos los *contigs* de esa longitud o más abarca por lo menos la mitad del ensamblado.

Los genomas ensamblados se analizaron en RAST, el cual permitió anotar ambos genomas y analizar la presencia tanto del gen ribosomal 16S correspondiente a *M. bovis* para el caso de EV345 y *M. bovoculi* para el caso de PRO, así como también la presencia de diferentes genes que codifican para proteínas de interés que son potenciales antígenos.

Además del análisis de las dos fimbrias tipo IV que presenta *M. bovis* se observó la presencia de un tercer gen fimbrial, pero éste es diferente al *tfpQ* y *tfpI*.

6.3. Análisis genético de los dos tipos de fimbrias tipo IV (*tfpQ*, *tfpI*)

En base a estas secuencias obtenidas y conociendo las dos conformaciones posibles que puede adoptar el *locus* de *M. bovis* EPP63 (publicado en la base de datos, *GenBank*: M32345.1 y *GenBank*: M59712.1), el cual se utilizó como guía de la disposición de los genes, se diseñaron cebadores para amplificar ambos tipos de fimbrias en todas las cepas de *M. bovis* a estudiar. El cebador de avance era el mismo para amplificar los dos tipos de genes fimbriales (*tfpQ* y *tfpI*) debido a que se localiza en una región conservada y aguas arriba respecto al sitio de recombinación. Los cebadores reversos se encuentran localizados en la misma posición pero son reversos complementarios entre sí (Fig. 3). Esta disposición de los cebadores permitió observar que el gen de la proteína TfpB, ubicado entre ambos genes fimbriales también participa en el *switch*. En consecuencia, el producto de PCR contiene la secuencia codificante del gen fimbrial, la región intergénica con el gen *tfpB*, y la mayor parte del gen *tfpB* (Fig. 2).

Los resultados permitieron observar que un mismo ADN presenta al mismo tiempo el gen *tfpQ* y *tfpI* en conformación de expresión, dado que resultó positiva la amplificación de ambos genes cuando se evaluó por PCR. Esto se observó en 12 de las 17 cepas evaluadas de *M. bovis* (Fig. 13 y 14). La amplificación del gen *tfpI* presentó más inespecificidad observándose bandas de diferentes tamaños e intensidad, señaladas con flechas color bordó en la figura 14. Dichas bandas fueron purificadas y secuenciadas por MacroGen resultando ser ADN polimerasa

III subunidad épsilon (700 pb aprox.) y proteína hipotética de *M. bovoculi* (1000 pb aprox.). A su vez, la cepa BM3A y 5120 amplificaron un tamaño mayor al esperado, y por secuenciación se determinó que correspondía a la secuencia del gen fimbrial *tfpI*.

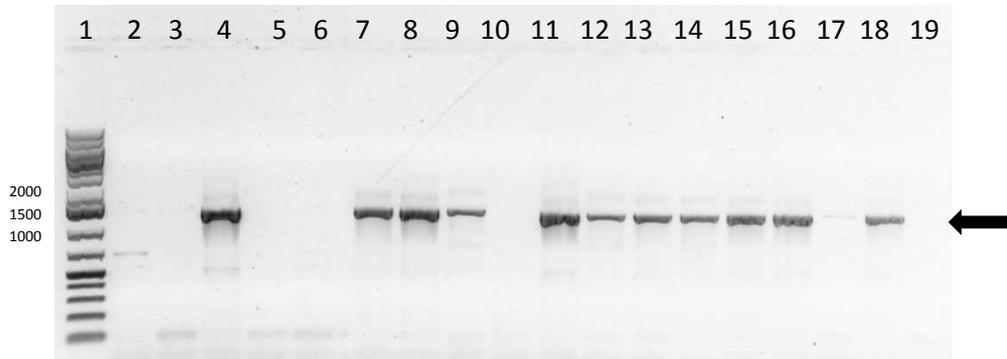


Figura 13. Productos de amplificación correspondientes al gen fimbrial en conformación Q. 1- Marcador de tamaño molecular 1kb plus Thermo, 2-CANIIIA, 3-CANIIIB, 4-EV250, 5-EV450B, 6-64, 7-BM3A, 8- EV121, 9-EV345, 10-EV450A, 11-LC190, 12-SJ01, 13-SJ02, 14-SJ03B, 15-SJ07, 16-771A, 17-5120, 18-EPP63, 19-Control negativo. Tamaño del amplicón: 1236 pb, indicado con una flecha negra.

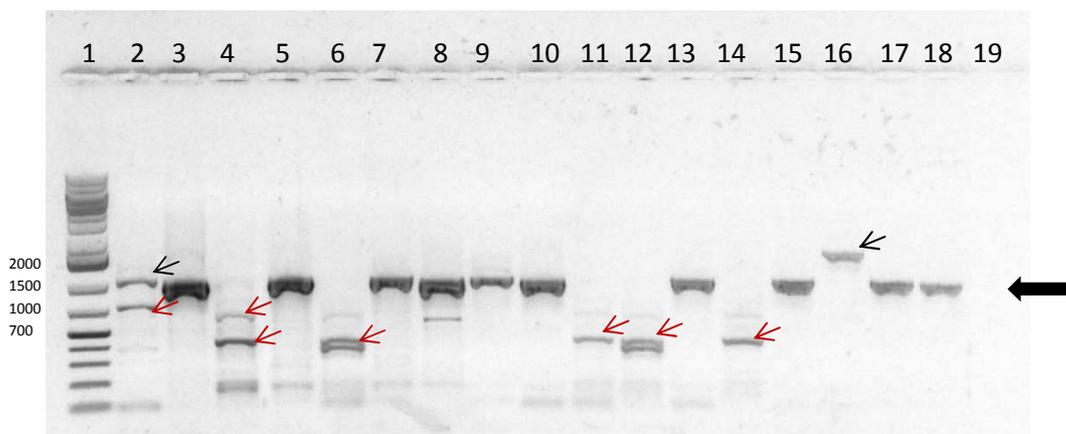


Figura 14. Productos de amplificación correspondientes al gen fimbrial en conformación I en cepa de *M. bovis*. 1-Marcador de tamaño molecular 1kb plus Thermo, 2-5120, 3- EV345, 4-64, 5-SJ01, 6-CANIIIB, 7- SJ03B, 8- LC190, 9- SJ02, 10-EV250, 11-EV450B, 12-CANIIIA, 13-SJ07, 14-EV450A, 15-EV121, 16-BM3A, 17-771A, 18- EPP63, 19-Control negativo. Tamaño del amplicón: 1282 pb, indicado con una flecha negra. Flechas color bordó indican las bandas inespecíficas purificadas y secuenciadas también por MacroGen.

Se editaron las secuencias de *tfpQ* y *tfpI* en BioEdit y se realizaron alineamientos múltiples en MEGA. Ambas conformaciones presentaron una región conservada hacia el extremo 5' (Fig. 15) y luego resultaron muy variables entre sí, tanto dentro del grupo de las *tfpQ* como de las *tfpI*, lo que hace muy difícil distinguir a qué gen fimbrial corresponde cada secuencia (Fig. 15 y 16). En las figuras de los alineamientos y en las filogenias no se incluyeron las secuencias de *tfpI* de EV250 y BM3A, debido a que son muy diferentes a las demás secuencias, y su inclusión generaba un tercer agrupamiento en las filogenias. Para el caso de

EV250 presenta inserciones a lo largo de la secuencia comparándolas con las demás cepas, y BM3A es diferente incluso en la región intergénica con el gen *tfpB*, donde todas las demás secuencias mantienen similitud entre las *tfpQ*, y las *tfpI*.



Figura 15. Alineamiento múltiple en MEGA a partir de las secuencias aminoacídicas. Las secuencias fimbriales sea *tfpQ* o *tfpI* son más conservadas hacia el extremo 5' y más variables hacia el extremos 3'.

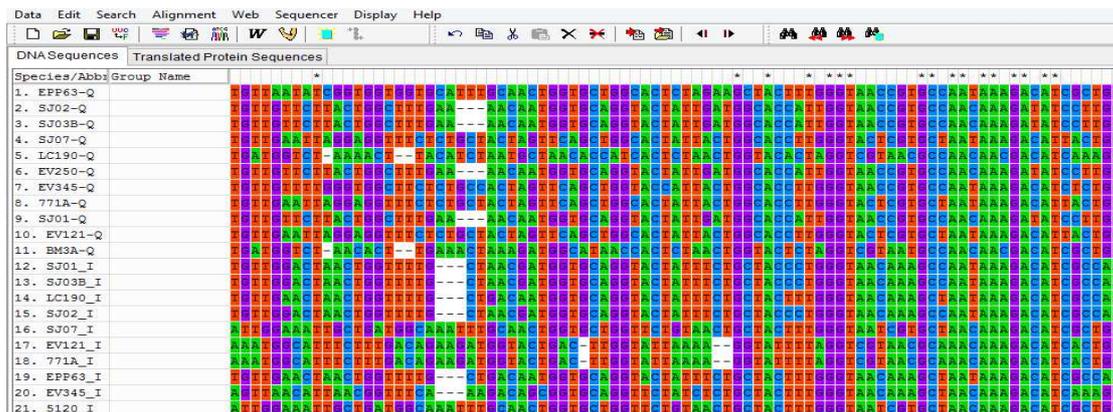


Figura 16. Alineamiento múltiple en MEGA dentro de la región codificante de las fimbrias. Se observa una variabilidad genética a nivel de nucleótidos hacia el extremo 3' entre las diferentes cepas de *M. bovis*.

Tabla 17. Resultado de la presencia de los tres productos de PCR fimbriales en las cepas de *M. bovis*

Aislamientos	Productos de PCR		
	<i>fim09</i>	<i>tfpQ</i>	<i>tfpl</i>
EPP63	+	+	+
CANIIIA	+		
CANIIIB	+		
EV250	+	+	+
EV450B	+		
64	+		
BM3A	+	+	+
EV121	+	+	+
EV345	+	+	+
EV450A	+		
LC190	+	+	+
SJ01	+	+	+
SJ02	+	+	+
SJ03B	+	+	+
SJ07	+	+	+
771A	+	+	+
5120	+		

Estos resultados permitieron determinar que las 17 cepas evaluadas de *M. bovis* presentan el primer gen fimbrial que se encuentra más en el extremo 5' del *locus* de *M. bovis*, de esas 17 cepas 12 presentan el gen *tfpQ* y las mismas 12 el gen *tfpl*.

La secuencia intergénica ubicada entre el primer gen fimbrial y el gen *tfpB* es similar entre secuencias de una misma conformación pero difiere entre las conformaciones Q e I (Fig. 17). En base a esta situación, esta región permitió distinguir cuándo el gen se encontraba en la conformación de expresión de *tfpQ* ó de *tfpl*. Se confirmó a través de BLAST que esta región conservada no codifica ninguna proteína ni presentaba marcos abiertos de lectura.. Luego de realizar el alineamiento múltiple entre estas secuencias se construyó un árbol filogenético (Fig. 18). Esta filogenia permitió observar una clara agrupación entre las secuencias de *tfpQ* y otra conformada por las secuencias de *tfpl*.



Figura 17. Alineamiento múltiple en MEGA de la region intergénica. Se visualiza la región intergénica que se encuentra entre el gen fimbrial (*tfpQ* ó *tfpI*) y el gen *tfpB*. Las primeras 11 secuencias comenzando de más arriba se encuentran en conformación Q y las secuencias son muy similares entre ellas. Las secuencias de más abajo en el alineamiento corresponden a las secuencias en conformación I, siendo similares entre sí. A su vez, las secuencias en conformación Q e I no son iguales entre sí.

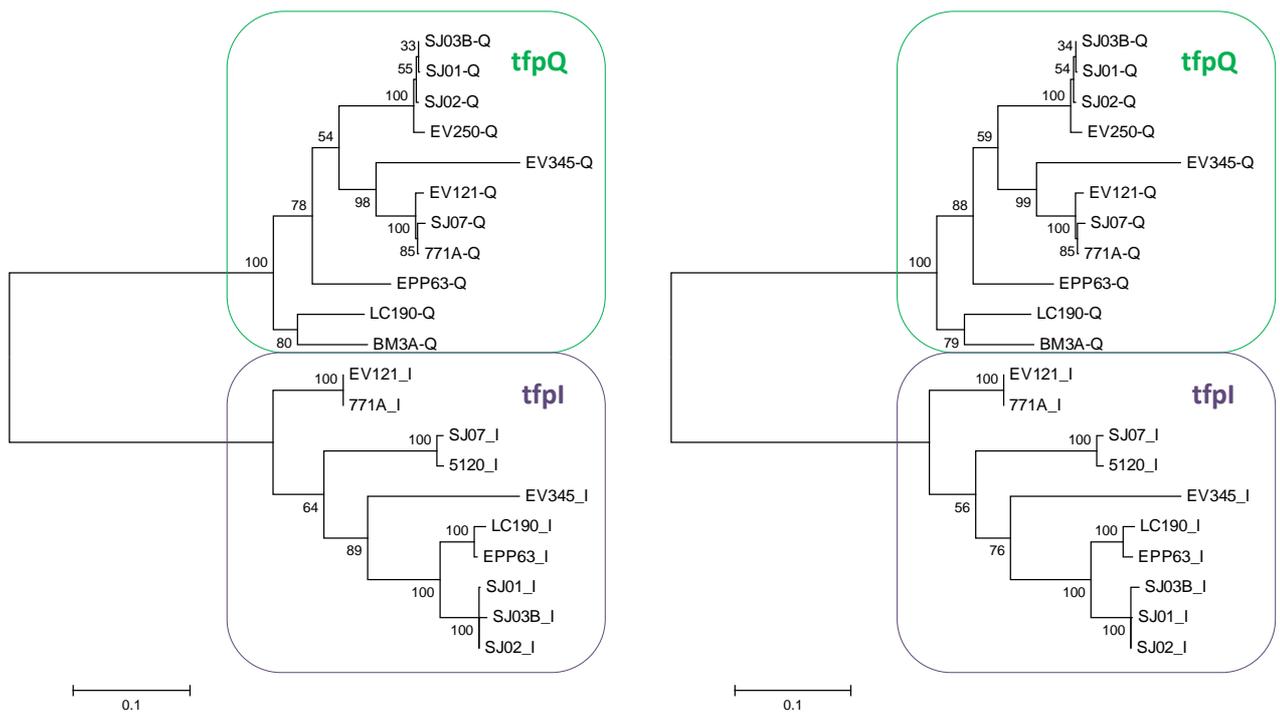


Figura 18. Árboles filogenéticos de *tfpQ* y *tfpI*. Método Máxima Verosimilitud. Los valores *bootstrap* son de 1000. El árbol de la izquierda se realizó a partir de las secuencias nucleotídicas, y el de la derecha con los aminoácidos. En ambas filogenias se observan dos agrupaciones diferenciales donde se ubican las secuencias *tfpQ* por un lado, y las *tfpI* por otro.

Si en el análisis de las secuencias no se incluye la región intergénica ni parte del gen *tfpB*, y solamente se incluye la región codificante de las fimbrias, el árbol filogenético pierde las dos agrupaciones de *tfpQ* y *tfpI* que se observó anteriormente, no permitiendo conocer cual conformación presenta cada secuencia. Esto se debe a la variabilidad que presentan las

secuencias tanto nivel de nucleótidos como de aminoácidos dentro de la región codificante de las fimbrias (Fig. 19).

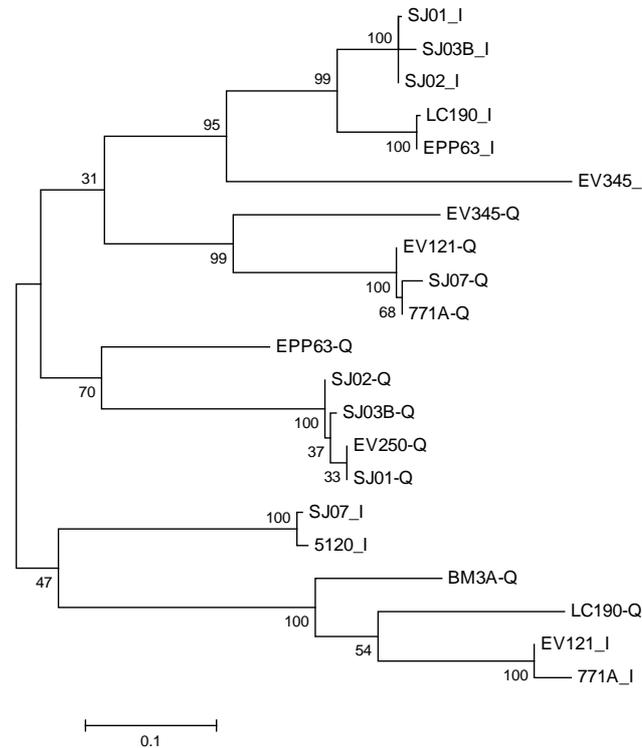


Figura 19. Árbol filogenético de la región codificante de *tfpQ* y *tfpI*. No se incluye la región intergénica ni el gen *tfpB*. Método Máxima Verosimilitud. Los valores *bootstrap* son de 1000. No se observan dos agrupaciones como se veía en la figura 16.

El cebador reverso Q_R hibrida en *tfpB* cuando el *locus* está en conformación de expresión Q y el cebador reverso Q_I hibrida en *tfpB* cuando el *locus* está en conformación de expresión I. Q_R y Q_I son reversos complementarios entre sí. Esto nos muestra que el gen *tfpB* también participa en el *switch* de cambio de fase de un tipo de fimbria a otra.

6.3.1. Predicción de la estructura secundaria de las fimbrias TfpQ y TfpI

Las secuencias nucleotídicas del gen *tfpQ* y *tfpI* de EV345 se tradujeron y en base a estas secuencias aminoacídicas se predijo la estructura secundaria de las fimbrias TfpQ y TfpI de EV345 en Phyre2 (Fig. 20). Esta estructura permitió observar a qué corresponde cada región de las secuencias analizadas anteriormente. El dominio N-terminal (región constante) comprende una α -hélice, el dominio C-terminal (región variable) comprende loop- $\alpha\beta$, hojas- β y la región D. El loop- $\alpha\beta$ y la región D son regiones importantes para las interacciones con otras fimbrias, receptores de células hospedadoras y componentes inmunes, participan en la adhesión a las superficies y está involucrada en la evasión al sistema inmune. Esta región D es

codificada por la secuencias comprendidas en la región variable del extremo C-terminal. Para ambos tipos de fimbrias se observa la misma estructura secundaria.

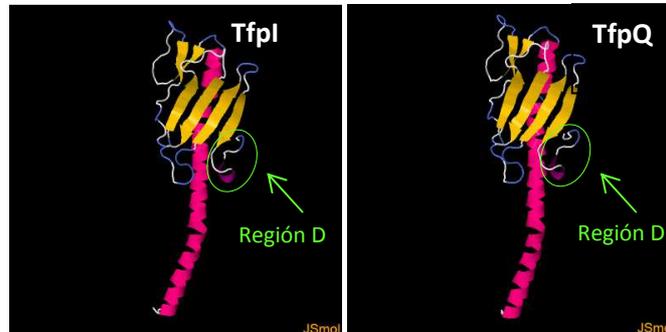


Figura 20. Predicción de la estructura secundaria de TfpQ y TfpI. A través de una flecha y un círculo se indica la región D de ambas fimbrias de *M. bovis*. Esta región es codificada por la región variable de las secuencias fimbriales.

6.3.2. Comparación entre las secuencias de *fim09*, *tfpQ* y *tfpI*

Se compararon todas las secuencias obtenidas de *fim09*, *tfpQ* y *tfpI* en MEGA. En los tres casos la región 5' está conservada entre todas las cepas (Fig. 21), ya sea un tipo u otro de fimbria, luego hacia el extremo 3' son variables. Como se puede observar en la Figura 22, las secuencias del primer gen fimbrial quedan agrupadas tanto con las secuencias de *tfpQ* como de *tfpI*.



Figura 21. Alineamiento múltiple de todas las secuencias aminoacídicas de las fimbrias (*fim09*, *tfpQ*, *tfpI*). El extremo 5' es conservado entre todas las secuencias fimbriales.

Observando la filogenia de la Figura 22 no es posible determinar a qué tipo de fimbria corresponde cada secuencia correspondiente al primer gen fimbrial (producto de PCR llamado *fim09*), dado que se agrupa tanto con los genes *tfpI* como con los *tfpQ*.

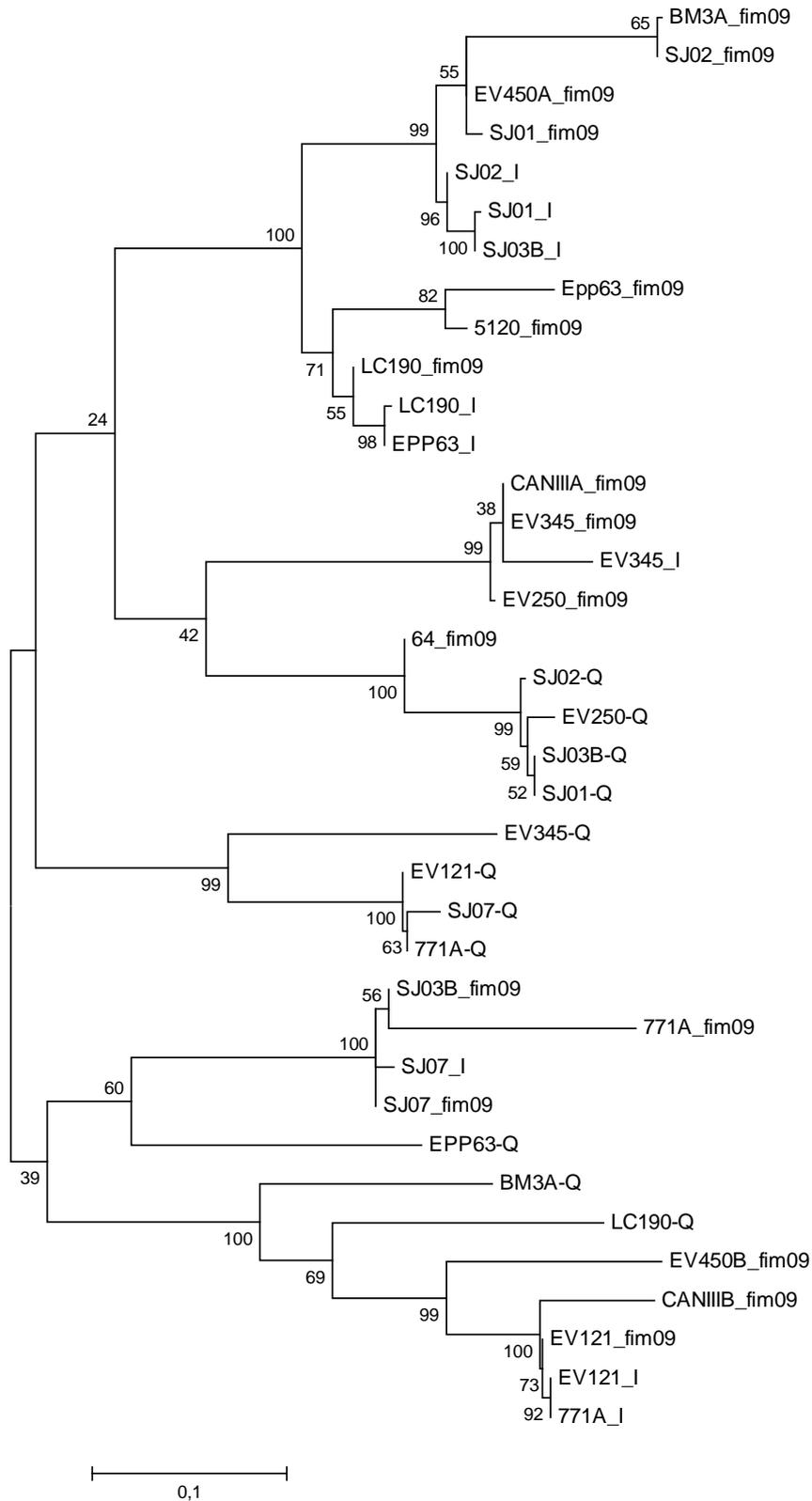


Figura 22. Árbol filogenético en MEGA de *fim09*, *tfpQ* (región codificante) y *tfpI* (región codificante). Las tres secuencias se agrupan sin mostrar un patrón determinado.

6.3.3. Análisis del locus fimbrial de *M. bovis* a partir de PCR

Dado que solamente se encuentran disponible en las bases de datos públicas las dos secuencias del locus fimbrial con la orientación Q e I para *M. bovis* EPP63 (publicadas 10 años atrás) se planteó la necesidad de conocer las secuencias del locus fimbrial completo de cuatro cepas de *M. bovis* (BM3A, EV345, EPP63, 771A) que habían resultado positivas tanto para *tfpQ* como para *tfpI*. Para ésto se amplificó por PCR el locus fimbrial (Fig. 23) con su posterior secuenciación. EV345, EPP63 y 771A presentaron bandas del tamaño esperado, sin embargo BM3A presentó una banda mayor. Los productos de PCR se enviaron a Macrogen, donde se realizó la extracción de bandas de interés (igual ó mayor a 2100 pb) y posterior secuenciación. Debido al tamaño del producto de PCR fue necesario enviar para su secuenciación, además del par de cebadores L1/L2, un cebador interno para cada conformación que puede adoptar el locus: Q_R y I_R. Cuando se editaron estas secuencias en BioEdit no se pudo completar la totalidad de la secuencia del locus. Debido a que los cebadores L1 y L2 hibridan con regiones fuera del segmento invertible, las secuencias obtenidas con el cebador L1 se consideraron en la dirección de “expresión”, mientras que las secuencias obtenidas con el cebador L2 se tomaron con la orientación opuesta. En base a este análisis, los cuatro ADN analizados con este par de cebadores estarían en la conformación de expresión de *Tfpl*.

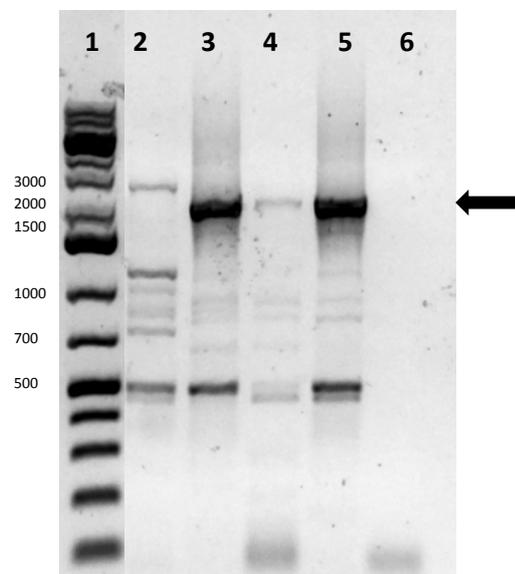


Figura 23. Productos de amplificación correspondientes al gen del locus fimbrial en cepas de *M. bovis*.
1.Marcador de tamaño molecular 1Kb plus Thermo, 2-BM3A, 3-EPP63, 4-EV345, 5-771A, 6- Control negativo. Tamaño esperado del amplicón:2100 pb, indicado con una flecha negra.

6.3.4. Análisis del locus fimbrial de *M. bovis* a partir de la secuenciación genómica de EV345

A partir del genoma de EV345 secuenciado por Illumina se analizó el locus fimbrial en RAST y se visualizó en Artemis, estando presente una sola vez en el genoma. Además, se conoció la secuencia entera del locus fimbrial de EV345, el cual se encontraba en la conformación de expresión de I, siendo en este caso la fimbria en conformación Q el pseudogen (Fig. 24).

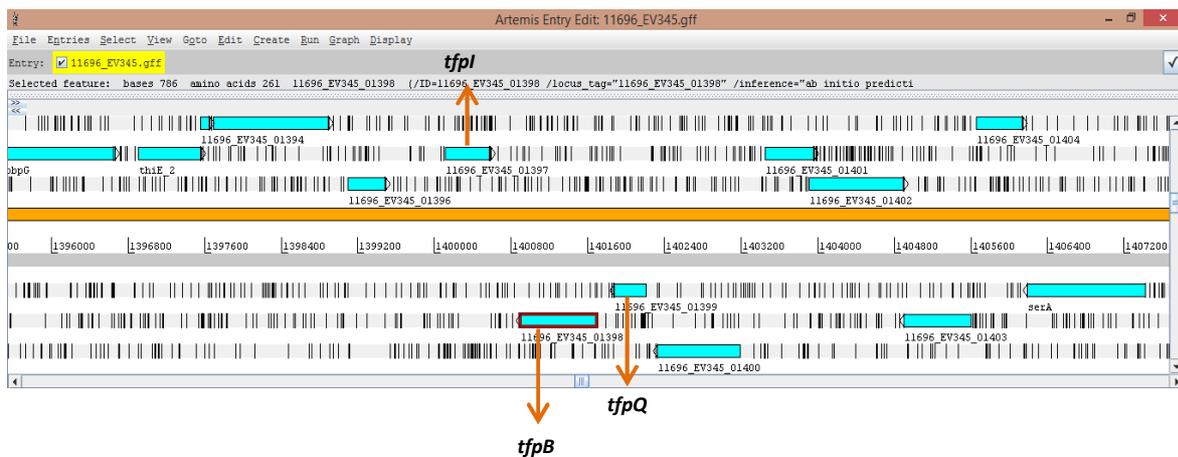


Figura 24. Visualización en Artemis de la región donde se encuentra el locus fimbrial en *M. bovis* EV345. Mediante flechas anaranjadas se indica la posición del gen *tfpI*, *tfpB* y *tfpQ*.

En la figura 25 se muestra el resultado del análisis filogenético obtenido de las secuencias obtenidas anteriormente en este trabajo:

- *tfpQ*, *tfpI* (obtenidas por PCR)
- locus EV345-I (obtenida por secuenciación genómica)
- locus EPP63 Q e I (publicadas en base de datos)
- *tfpQ* y *tfpI* (publicadas en la base de datos).

Se observan dos grandes agrupaciones (*tfpQ* y *tfpI*):

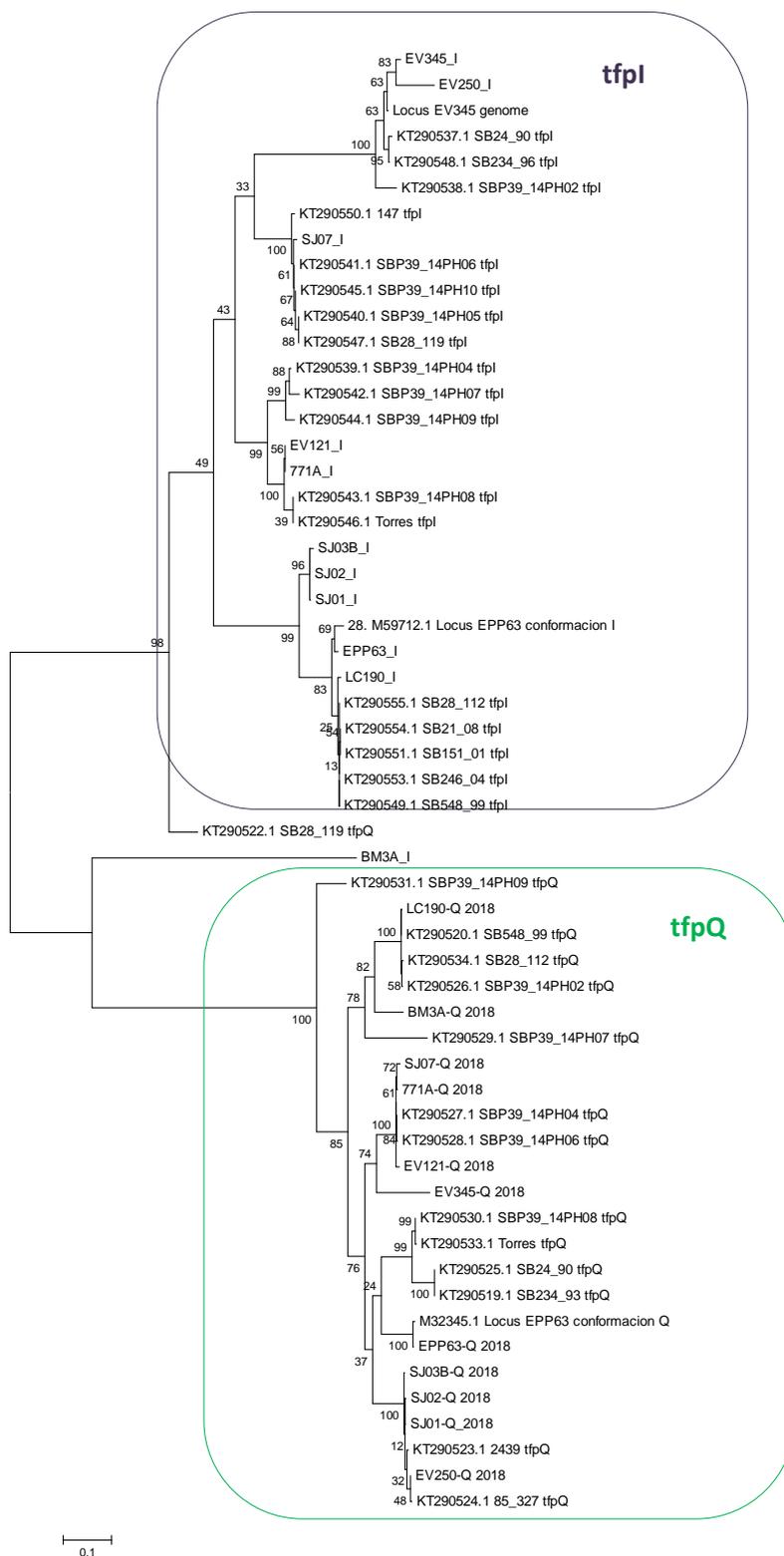


Figura 25. Árbol filogenético de las secuencias obtenidas en el presente trabajo de *tfpQ* y *tfpI*, incluyendo las secuencias obtenidas en el genoma de EV345, además de las secuencias publicadas en la base de datos públicas para *tfpQ* y *tfpI*. Método de Máxima Verosimilitud. Boostrap: 1000.

6.3.5. Comparación de todas las secuencias fimbriales de EV345

Se compararon las secuencias obtenidas por PCR con la secuencia del *locus* fimbrial obtenido a partir de la secuenciación genómica de EV345. El resultado mostró que las secuencias *tfpl* de EV345 obtenidas por PCR presentaban homología con el primer gen fimbrial en conformación de expresión del *locus*, y la secuencia *tfpQ* obtenidas por PCR presentaban homología con el segundo gen fimbrial del *locus* (conformación de no expresión). Esto muestra que la conformación del *locus* que presenta la cepa EV345 secuenciada por MicrobesNG es I. Este análisis se realizó en el *software* CLC Genomics Workbench 11 (Fig. 26).

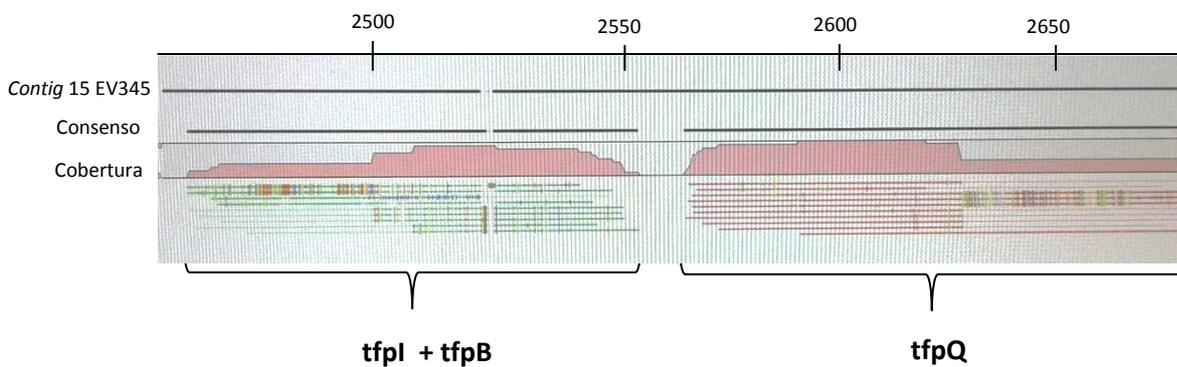


Figura 26. Comparación de todas las secuencias de EV345. Se muestra un alineamiento entre el *contig* de interés (conteniendo el *locus* fimbrial de EV345) y las secuencias obtenidas por PCR de *tfpl* (color verde) y *tfpQ* (color rojo). Las regiones en rojo indican la cobertura entre los alineamientos, cuánto más ancha mayor es ésta. La conformación de expresión del *locus* fimbrial en el genoma de EV345 es de I.

6.3.6. Análisis de secuencias invertidas en el genoma

Dado que el resultado anterior obtenido a partir de la secuenciación genómica no se correspondió con lo obtenido por PCR, se analizaron las secuencias invertidas dentro de la región del *locus* fimbrial. Para esto se analizaron lo *reads* pareados que están en la misma orientación y se alinean con el *contig* que contiene el *locus* fimbrial, estos son pares de secuencias que se alinean de acuerdo a una inversión (los pares los forman el 1 con el 2, el 3 con el 4 y así sucesivamente). Por otro lado, como se ve en la Figura 27, están los *reads* identificados con letras, estas son las secuencias que presentan un corte en uno de sus extremos debido a una inversión. Este último grupo de secuencias son la minoría, sin embargo se encuentran dentro de la zona de interés. Todas estas secuencias se visualizan en color verde junto con las secuencias de *tfpl*, y en color rojo las secuencias de *tfpQ* indicando que esta última se encuentra en la hebra contraria. Por lo tanto se observa mayor cantidad de *reads* invertidos en la conformación de *tfpl* que de *tfpQ*.

Por otro lado, en este alineamiento se localizó el sitio de recombinación (donde actúa la recombinasa Piv) y detectamos la secuencia en varios *reads* que abarcaban un tamaño de aproximadamente 2 Kb (tamaño aproximado del fragmento recombinado con las secuencias fimbriales).

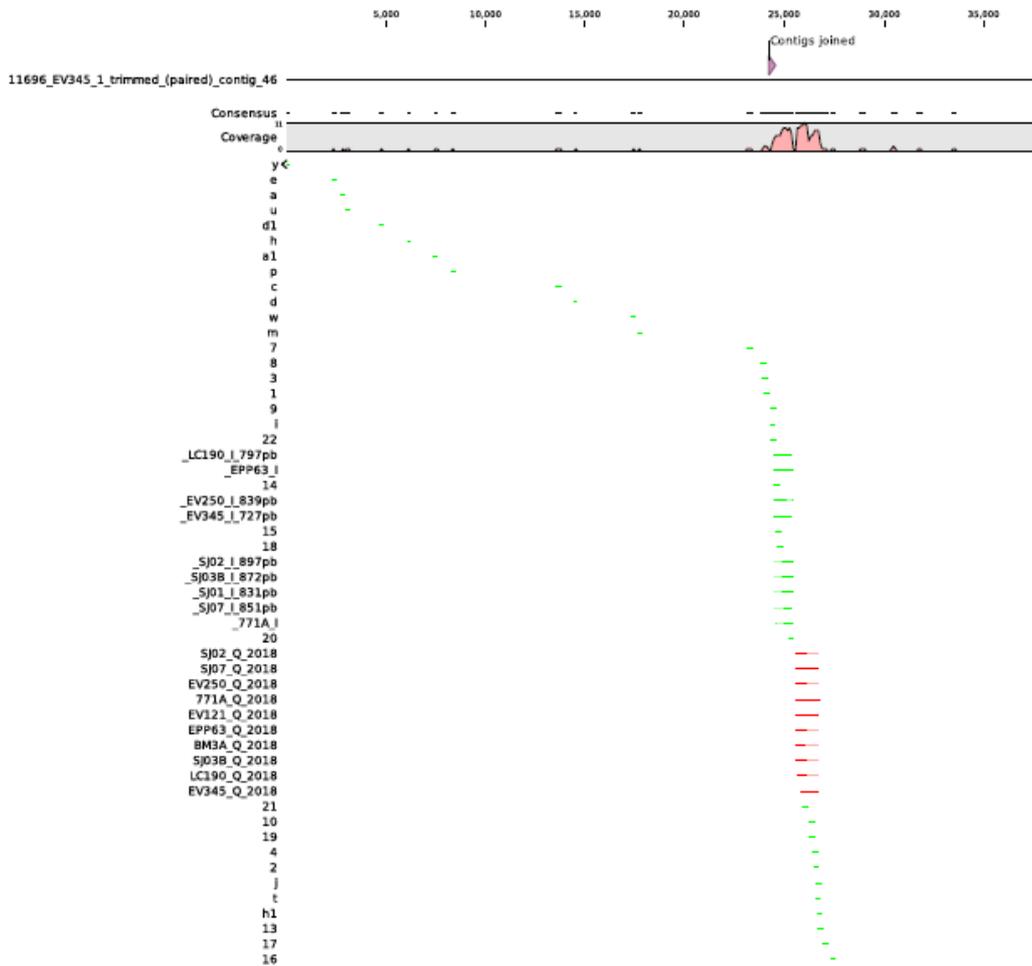


Figura 27. Alineamiento entre el locus fimbrial, *tfpI*, *tfpQ* y secuencias invertidas. Alineamiento en CLC entre el contig que contiene el locus fimbrial de EV345, las secuencias fimbriales obtenidas a partir de PCR, y las secuencias invertidas. A la izquierda de la figura se encuentra la identidad de cada secuencia. Los números son los pares de *reads* que se encuentran en la misma dirección y las letras las secuencias que presentan un corte en su extremo 5' formando parte de dos zonas diferentes del genoma, causada por una inversión.

6.3.7. Análisis del gen fimbrial de *M. bovoculi*

El análisis de genes en el genoma de *M. bovoculi* PRO reveló un único gen que presenta homología con *pilA* de *M. bovoculi*. *M. bovis* y *M. lacunata* presentan una variación de fase de los genes fimbriales, aunque este no se observó en *M. bovoculi*. La secuencia de la fimbria de *M. bovoculi* presenta sólo un 33 % de identidad con la fimbria I de *M. bovis* EV345 y 42 % con la fimbria Q. Se compararon las secuencias obtenidas de los genes fimbriales de *M.*

bovis (*tfpQ* y *tfpI*) con los de *M. bovoculi* (gen fimbrial de PRO y los publicados en la base de datos públicas) observándose que las fimbrias de *M. bovoculi* se agrupan aparte de los genes fimbriales de *M. bovis*. A su vez, el gen fimbrial de PRO se agrupa con los genes que provienen de aislamientos de *M. bovoculi* de animales enfermos con QIB (Dickey *et al.*, 2016) (Fig. 28).

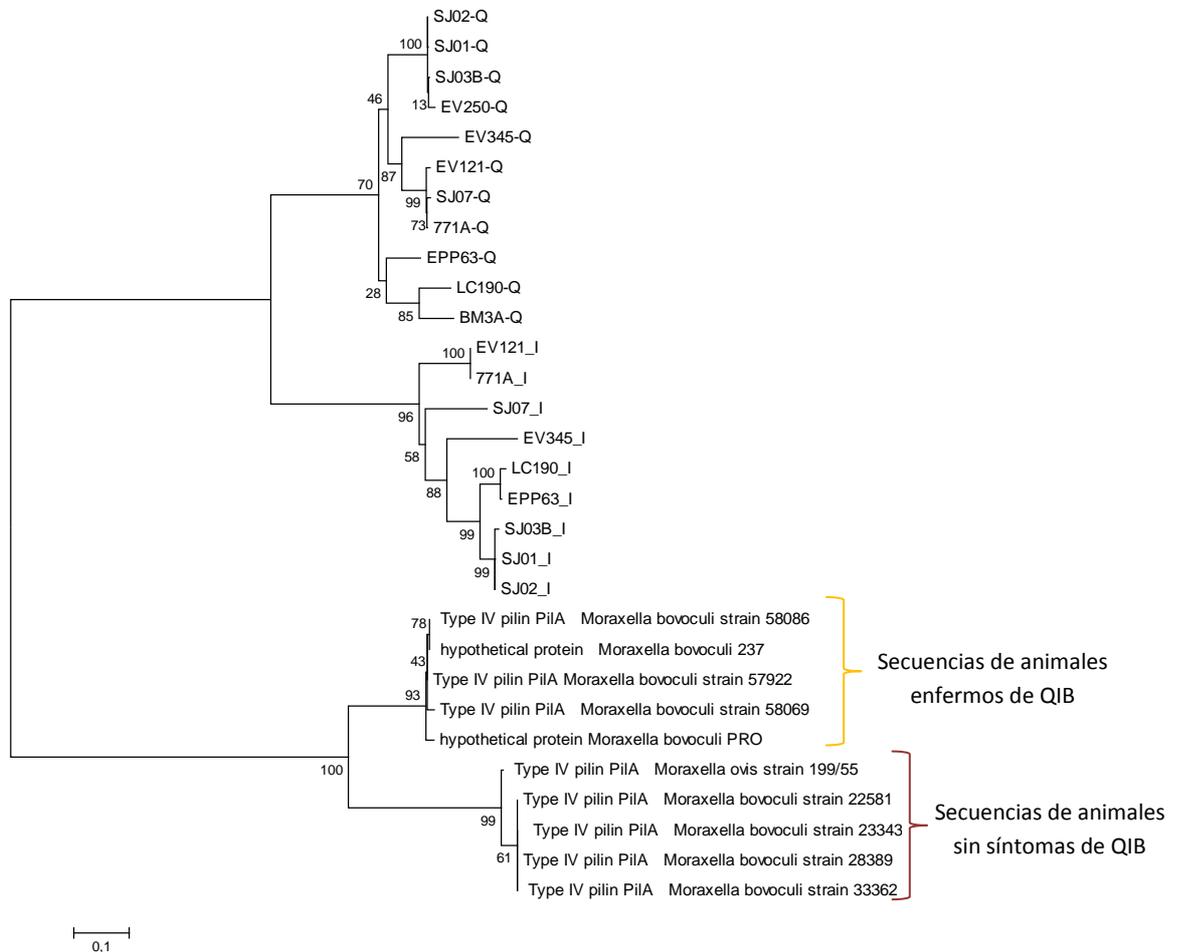


Figura 28. Filogenia de las secuencias fimbriales de *M. bovis* y *M. bovoculi*. Se visualizan dos grandes agrupaciones, las secuencias de *M. bovis* y las de *M. bovoculi*. Dentro de la agrupación de las secuencias de *M. bovoculi* hay dos agrupaciones, las secuencias provenientes de animales enfermos de QIB y las provenientes de animales sin sintomatología de QIB. Método de Máxima Verosimilitud. Bootstrap: 1000.

6.3.8. Análisis de otros genes de interés en *M. bovis* y *M. bovoculi*

En *M. bovoculi* PRO y en *M. bovis* EV345 también está presente un gen homólogo al de la adhesina McaP de *M. catarrhalis*, la fosfolipasa B, como uno de los autotransportadores identificados. Los sistemas de adquisición de hierro incluyen dos miembros de la familia de lipoproteínas de unión a transferrina/lactoferrina y tres transportadores putativos transportadores de hierro ABC. Además, está presente un único operón que codifica una toxina RTX (hemolisina).

Anteriormente en nuestro laboratorio fueron identificadas diferentes proteínas de interés por MALDI-TOF a partir de extractos proteicos de *M. bovis*, o sus genes fueron amplificados por PCR (Sosa & Zunino., 2013; Acquistapace, 2014): *pme-CD*, *pme-M35*, *mbxA*, *pme-E*, *pme-J*, *pme-A*, *tolC*, *plb*, *fur* y *pme-79*. Estas proteínas están también presentes en los genomas de *M. bovis* y *M. bovoculi*. Se determinó mediante el empleo de BioEdit el porcentaje de identidad de cada gen para ambas especies, incluyendo en la comparación un genoma publicado de *M. catarrhalis* (BBH18) seleccionado al azar, como se puede ver en la Tabla 18. Observando los porcentajes de identidad, las proteínas analizadas de *M. bovis* presentaron más similitud con las proteínas de *M. bovoculi* que con las de *M. catarrhalis*. Por otro lado, las proteínas de *M. catarrhalis* presentaron mayores porcentajes de identidad con proteínas de *M. bovoculi*.

Además del análisis de las dos fimbrias tipo IV que presenta *M. bovis* se observó la presencia de un tercer gen fimbrial, pero éste es diferente a los genes *tfpQ* y *tfpI*. Dicho gen presenta un 53 % de identidad con *tfpI* y un 50 % con *tfpQ*.

Tabla 18. Porcentaje de identidad entre secuencias de diferentes proteínas de *M. bovis*, *M. bovoculi* y *M. catarrhalis*.

% de identidad de las secuencias nucleotídicas de diferentes proteínas de interés				
Genes de proteínas de interés	Característica de la proteína	<i>M. bovis</i> EV345- <i>M. bovoculi</i> PRO	<i>M. bovis</i> EV345- <i>M. catarrhalis</i> BBH18	<i>M. bovoculi</i> PRO- <i>M. catarrhalis</i> BBH18
<i>mbxA</i>	Hemolisina	82%	no está presente en <i>M. catarrhalis</i>	no está presente en <i>M. catarrhalis</i>
<i>tolC</i>	PME involucrada en la secreción de proteínas	70%	no está presente en <i>M. catarrhalis</i>	no está presente en <i>M. catarrhalis</i>
<i>fur</i>	Regula la captación de hierro	74%	74%	75%
<i>pme79</i>	PME involucrada en la captación de hierro	60%	50% (TonB*)	52% (TonB)
<i>pme-CD</i>	PME, adhesina	71%	67%	72%
<i>pme-E</i>	PME	69%	68%	67%
<i>pme-M35</i>	PME	74%	62%	61%
<i>pme-J</i>	PME	69%	64%	67%
<i>tfp</i>	Fimbrias tipo IV	33% (<i>tfpI</i>) 42% (<i>tfpQ</i>)	53% (<i>tfpI</i>) 42% (<i>tfpQ</i>)	55%
<i>pIB</i>	Fosfolipasa	62%	58%(McaP**)	58%(McaP)

*TonB (*M. catarrhalis*) es homólogo de *pme79* (*M. bovis* y *M. bovoculi*)

**McaP (*M. catarrhalis*) es homólogo de *pIB* (*M. bovis* y *M. bovoculi*)

Capítulo 2. Inmunogenicidad de la PME-CD recombinante de *Moraxella bovis*

7. EXPRESIÓN *IN VITRO* DE PME-CD RECOMBINANTE

Se generaron dos proteínas recombinantes (PME-CD), a partir de dos cepas de *M. bovis*, la cepa clínica aislada en Uruguay EV345 y la cepa de referencia de *M. bovis* EPP63.

7.1. Amplificación, digestión, ligación y transformación del gen *pme-cd*

La amplificación del gen *pme-cd* se realizó a partir de ADN de las cepas EV345 y EPP63. Los productos de PCR y sus digestiones con enzimas de restricción se corrieron en un gel de agarosa donde se corroboró la amplificación y correcta digestión del gen (Fig. 29). En la Figura 30 se muestra la ligación del producto de PCR y del plásmido pET21a(+) (ambos previamente digeridos con las mismas enzimas).

Finalmente, la construcción pET21a(+)-*pmeCD* se incorporó a la cepa de expresión *E. coli* BL21(λDE3) mediante transformación. La cepa de expresión conteniendo dicha construcción se almacenó por duplicado a -20 °C y a -80 °C en TSB-Glicerol 15%, suplementado con Ampicilina 100 µg/mL.

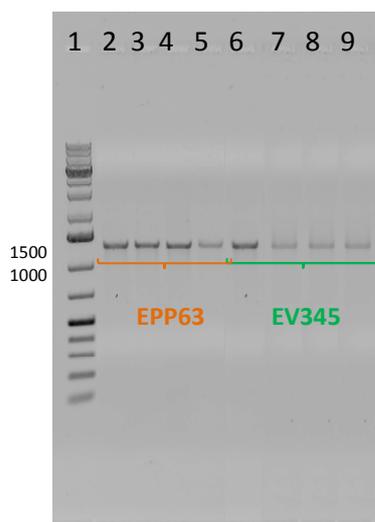


Figura 29. Digestión. 1-Ladder, 2-Producto de PCR EPP63, 3-Digestión inserto EPP63 HindIII, 4-Digestión inserto EPP63 NdeI, 5-Doble digestión inserto EPP63 HindIII/NdeI, 6-Producto de PCR EV345, 7-Digestión inserto EV345 SacI, 8-Digestión inserto EV345 NdeI, 9-Doble digestión inserto EV345 SacI/NdeI

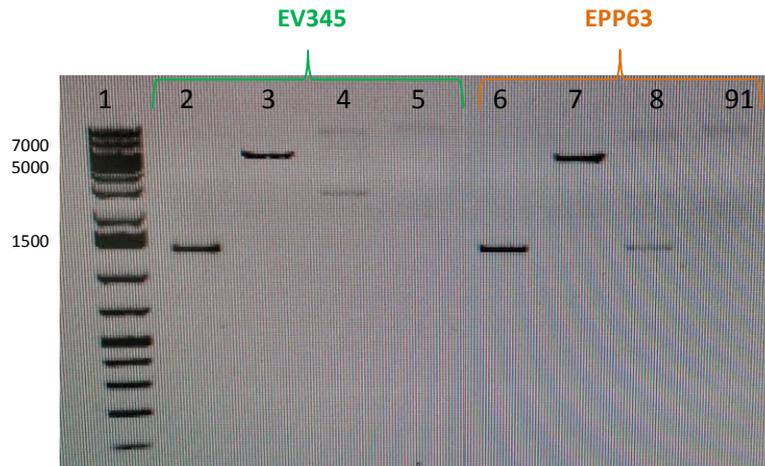


Figura 30. Ligación. 1-Ladder, 2-Producto de PCR purificado EV345, 3-pET purificado, 4-Ligación inserto EV345-pET, 5-Control de religación del pET, 6-Producto de PCR purificado EPP63, 7-pET purificado, 8-Ligación inserto EPP63-pET, 9-Control de religación pET.

7.2. Inducción de la expresión de la proteína recombinante PME-CD en *E. coli*

La inducción de la expresión de PME-CD se corroboró analizando los extractos de proteínas totales inmediatamente antes de la adición de IPTG (t₀) y luego de la inducción (t_f) por SDS-PAGE. Se observó una banda de aproximadamente 45 KDa notoriamente más intensa en el carril post inducción lo que corresponde con el peso molecular predicho de PME-CD (Fig. 31).

7.3. Determinación de la solubilidad de la proteína recombinante

Las fracciones celulares de la cepa de *E. coli* que expresa PME-CD recombinante se analizaron por medio de SDS-PAGE para evaluar su solubilidad. La banda correspondiente a PME-CD se observó predominantemente en el carril correspondiente al *pellet*, obtenido luego de centrifugar el cultivo de *E. coli* sometido a tratamiento con ultrasonido, correspondiente a la fracción insoluble. Estos resultados determinaron que la purificación de PME-CD se realizara bajo condiciones desnaturizantes (Fig. 31).

7.4. Purificación de la proteína PME-CD

La proteína PME-CD se purificó en columnas de afinidad de Agarosa-Níquel en condiciones desnaturalizantes con urea, las cuales retienen la proteína gracias a la presencia de una cola de histidina en su extremo N-terminal. La presencia de la proteína purificada se analizó por SDS-PAGE (Fig. 31).

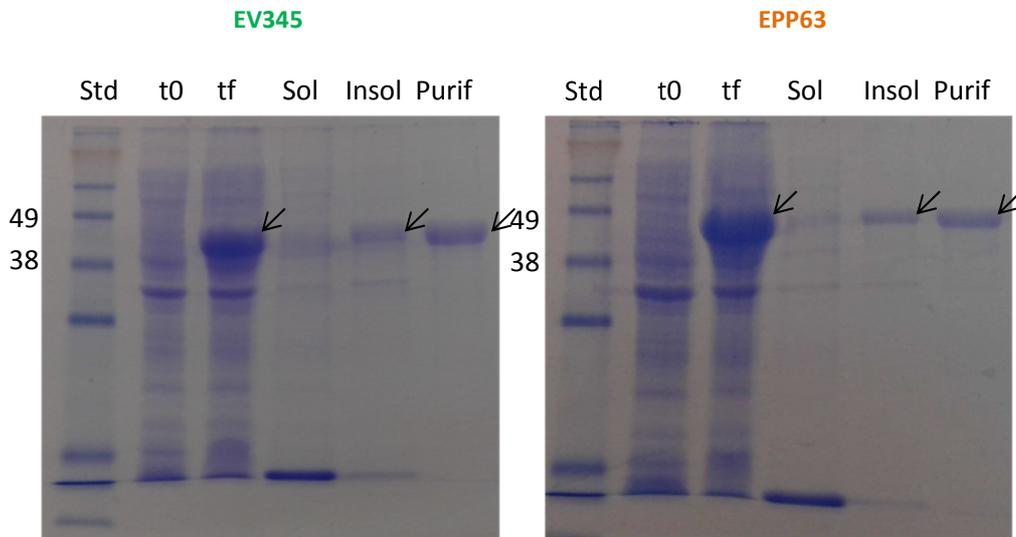


Figura 31. SDS-PAGE 12%. A la izquierda se muestra el gel correspondiente a EV345 y a la derecha EPP63. En ambos geles se muestra el Std: marcador de peso molecular (KDa), t0: fracción antes de inducir la expresión de la proteína, tf: fracción inducida con IPTG, Sol.: es la fracción soluble, Insol.: es la fracción insoluble donde se encuentran ambas proteínas. Purif.: proteínas purificadas por columnas de níquel-agarosa. Las flechas negras señalan la proteína de tamaño esperado.

7.5. Cuantificación de PME-CD purificada

La concentración de las proteínas recombinantes purificadas se realizó con el método de Bradford. La PME-CD de EV345 mostró una concentración de 3,33 mg/mL y la PME-CD de EPP63 1,34 mg/mL.

7.6. Identidad de la PME-CD recombinante

Para corroborar la identidad de los insertos, se extrajeron los ADN plasmídicos de la construcción pET21a(+)-*pmeCD* y se secuenciaron en MacroGen (Corea). Ambos insertos mostraron un porcentaje de identidad del 99 % con la PME-CD de *M. bovis* EPP63 y un correcto marco de lectura. Estas secuencias nucleotídicas obtenidas fueron traducidas en el *software online ExPASy Translate* para obtener la secuencia aminoacídica de cada proteína. Estas

secuencias fueron utilizadas posteriormente para generar una base de datos local en el IPMont para el análisis de MALDI-TOF.

Además, las identidades de las proteínas se confirmaron por MALDI-TOF (IPMont). Cada muestra se comparó frente a la base de datos públicas y frente a una base local del IPMont. Estos análisis revelaron que en ambas muestras analizadas (EV345 y EPP63) se identificaron de manera significativa una proteína hipotética de *M. bovis*. Esta proteína no identificada de *M. bovis* a su vez es similar a la proteína PME-CD de *M. catharralis*. *Link* del resultado de la PME-CD de EV345 al *protein summary report* obtenido con el MASCOT: http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=..%2Fdata%2F20170619%2FFTITiGcth.dat&group_family=0&REPTYPE=protein&sigthreshold=0.05&REPORT=20&minpeplen=7&_server_mudpit_switch=99999999&ignoreionscorebelow=-1&showsubsets=0&showpopups=TRUE&sortunassigned=scoredown&requireboldred=0&prefertaxonomy=0&sessionID=guest_guestsession. *Link* del resultado de la PME-CD de EPP63 al *protein summary report* obtenido con el MASCOT: http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=..%2Fdata%2F20170619%2FFTITiGaES.dat&group_family=0&REPTYPE=protein&sigthreshold=0.05&REPORT=20&minpeplen=7&_server_mudpit_switch=99999999&ignoreionscorebelow=-1&showsubsets=0&showpopups=TRUE&sortunassigned=scoredown&requireboldred=0&prefertaxonomy=0&sessionID=guest_guestsession. De esta manera, teniendo en cuenta la identidad de las secuencias y el análisis proteómico de las proteínas purificadas, se confirmó la identidad, en ambos casos, de nuestra proteína recombinante PME-CD.

7.7. Reactividad de la PME-CD recombinante con los anticuerpos

Se evaluó la reactividad con los anticuerpos de ambas proteínas enfrentándolas a sueros y lágrimas de bovinos sanos y enfermos con QIB empleando la técnica de *Western blot*. Se observó una respuesta de anticuerpos tanto en sueros como en lágrimas de bovinos sanos y enfermos, mostrando una mayor respuesta en los animales enfermos (Fig. 32). Estos resultados permitieron observar que la PME-CD recombinante de la cepa EV345 y EPP63 reaccionan con anticuerpos.

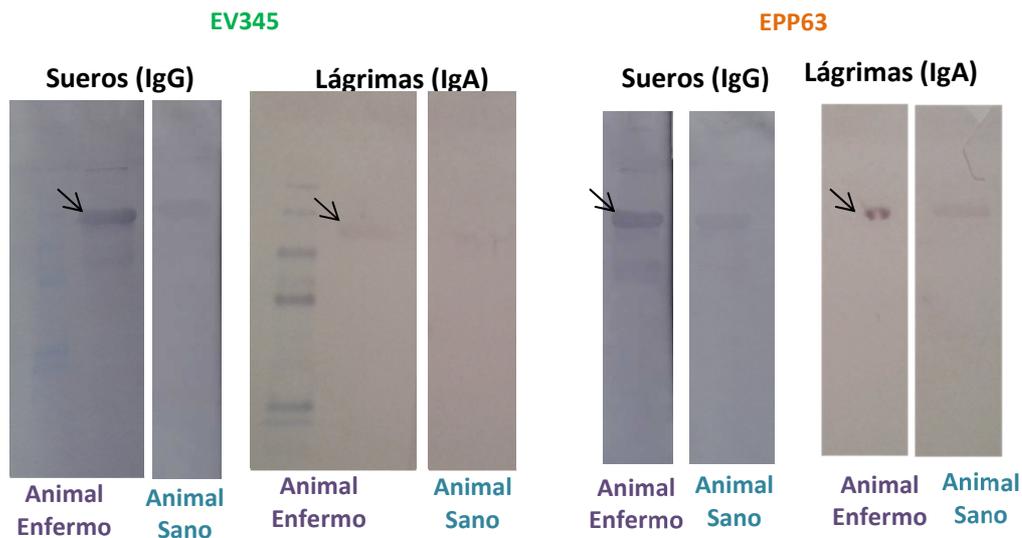


Figura 32. Western blot. A la izquierda se muestra la reacción de la proteína PME-CD de EV345 frente a sueros y lágrimas de animales sanos y enfermos. Mostrándose una mayor respuesta de anticuerpos en animales enfermos. A la derecha de la figura se muestra la reacción de la proteína PME-CD de EPP63 frente a sueros y lágrimas de animales sanos y enfermos. Mostrándose una mayor respuesta de anticuerpos en animales enfermos. Las flechas señalan la banda a la altura correspondiente a la banda de la PME-CD, donde se visualiza la reacción antígeno-anticuerpo.

7.8. Respuesta de anticuerpos en animales inmunizados por vía sistémica

7.8.1. Respuesta de anticuerpos en sueros de animales

Con el objetivo de evaluar la respuesta de anticuerpos en sueros de animales inmunizados por vía sistémica, se los inmunizó con la PME-CD recombinante de la cepa EV345. Se generaron dos grupos de ratones, cinco ratones fueron inmunizados por vía subcutánea con la PME-CD (controles positivos) y cinco ratones no se inmunizaron (controles negativos). El grupo inmunizado con la proteína mostró una inducción significativa de los niveles IgG, aunque no así de IgA (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) (Tabla 19, Fig. 33).

Tabla 19. Resultado del ELISA de IgG e IgA (DO_{405nm}) en animales inmunizados vía sistémica.

	DO_{405nm}-IgG		DO_{405nm}-IgA	
	Control Positivo	Control Negativo	Control Positivo	Control Negativo
Animal 1	0,452	0,006	0,005	0,001
Animal 2	0,444	0,000	0,002	0,003
Animal 3	0,439	-0,007	0,001	0,001
Animal 4	0,484	-0,0059	-0,001	-0,002
Animal 5	0,442	-0,006	-0,002	-0,003

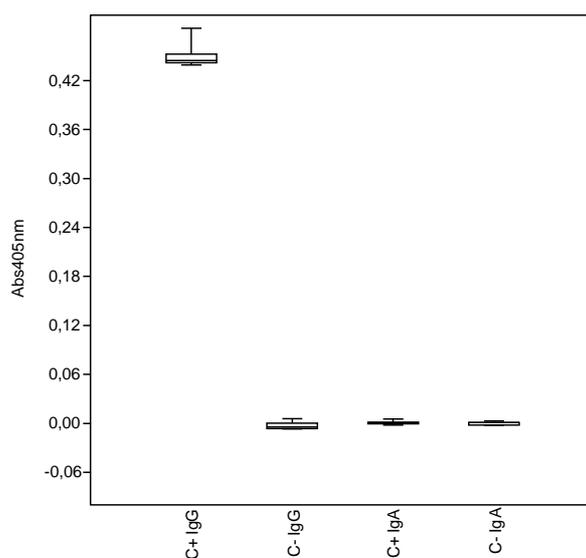


Figura 33. Niveles de IgG e IgA en sueros de animales inmunizados por la vía sistémica (Abs_{405nm}). Se visualiza la inducción de IgG en el grupo control positivo con respecto al control negativo. No se observa inducción de IgA.

7.9. Respuesta de animales inmunizados por vía intranasal

Con el objetivo de evaluar la respuesta de anticuerpos en sueros y en lavados bronqueoalveolares (BAL) de animales inmunizados por la vía intranasal (mucosal), utilizando la PME-CD recombinante de la cepa EV345, se formuló una vacuna monovalente experimental con adyuvante mucosal.

7.9.1. Respuesta de anticuerpos en sueros de animales inmunizados

Se analizó la inducción de IgG e IgA en sueros de los cuatro grupos de animales inmunizados por la vía intranasal mediante la técnica de ELISA. Se analizaron los sueros en tiempo inicial y en tiempo final presentando en ambos casos bajos valores de DO. Las diferencias no fueron significativas entre los tiempos iniciales y final dentro de cada grupo (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) ni entre los diferentes grupos (Mann-Whitney $p > 0,05$).

7.9.2. Respuesta de anticuerpos en BAL de animales inmunizados

7.9.2.1. Análisis de los niveles de IgG

Se evaluó la respuesta de anticuerpos analizando los niveles de IgG en los BAL de los cuatro grupos de animales inmunizados por la vía intranasal. Los valores de DO fueron similares y bajos en los cuatro grupos de animales (Mann-Whitney $p>0,05$).

7.9.2.2. Análisis de los niveles de IgA

Se observó una inducción significativa de IgA en el grupo inmunizado con PME-CD y el grupo inmunizado con la mezcla PME-CD y adyuvante mucosal con respecto al grupo tratado con SF y al grupo tratado solo con el adyuvante (Mann-Whitney, $p<0,05$). Por otro lado, no hubo diferencias significativas de niveles de IgA entre estos dos últimos grupos (tratados con SF y adyuvante mucosal) (Mann-Whitney, $p>0,05$).

A su vez, los niveles inducidos de IgA en el grupo PME-CD + adyuvante mucosal son significativamente mayores con respecto al grupo inmunizado con PME-CD (Mann-Whitney, $p>0,05$). Por lo tanto, la inducción de IgA más elevada se observa en el grupo inmunizado con la mezcla PME-CD + adyuvante mucosal, seguida del grupo inmunizado con la PME-CD y ninguna en el grupo tratado con SF y adyuvante mucosal (Tabla 20 y Fig. 34).

Tabla 20. Resultado del ELISA de IgA (DO_{405nm}) en animales inmunizados vía intranasal.

Vía Intranasal (BAL) (DO_{405nm})				
IgA				
	Grupo 1 (Suero Fisiológico)	Grupo 2 (PME-CD)	Grupo 3 (PME-CD + Adyuvante)	Grupo 4 (Adyuvante)
Animal 1	0,006	0,344	0,405	0,003
Animal 2	0,014	0,394	0,416	0,012
Animal 3	0,016	0,379	0,414	0,014
Animal 4	0,005	0,398	0,404	0,004
Animal 5	0,002	0,389	0,402	0,000
Animal 6	0,002	0,376	0,402	0,002

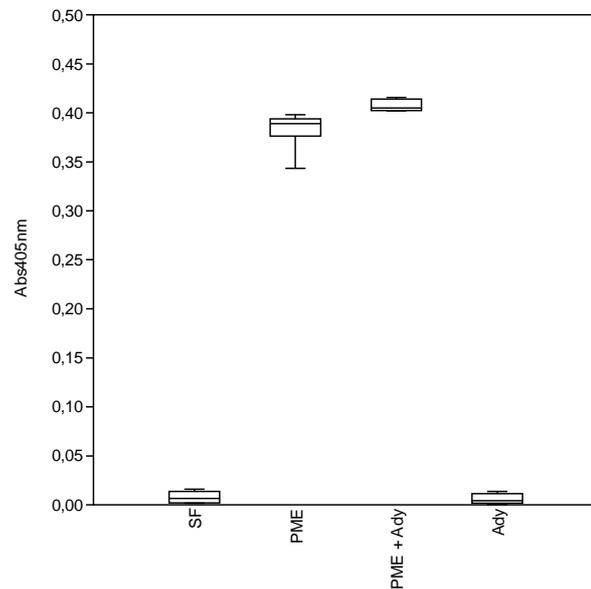


Figura 34. Niveles de IgA en BAL (Abs_{405nm}). Se visualizan los 4 grupos estudiados, observándose que el grupo 2 (PME-CD) y 3 (PME-CD + Ady) presentaron valores mayores al grupo 1 (SF) y 4 (Ady).

7.9.3. Determinación de los niveles de citoquinas en BAL

La producción de IL-4, IL-10 e IFN- γ se midió en todos los grupos de animales tratados con SF, PME-CD, mezcla de PME-CD con adyuvante mucosal y adyuvante mucosal en los BAL obtenido de los ratones inmunizados por vía intranasal, utilizando un kit comercial de ELISA de captura. Se observó una inducción significativa de los niveles de IL-4 solamente en el grupo de animales inmunizado con la PME-CD (Mann-Whitney, $p < 0,05$) (Fig. 35), y no en los animales inmunizados con la mezcla PME-CD y adyuvante mucosal, ni los tratados con SF, ni con adyuvante mucosal. Además, los valores similares de IL-10 e IFN- γ presentaron valores de DO bajos en los cuatro grupos estudiados (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

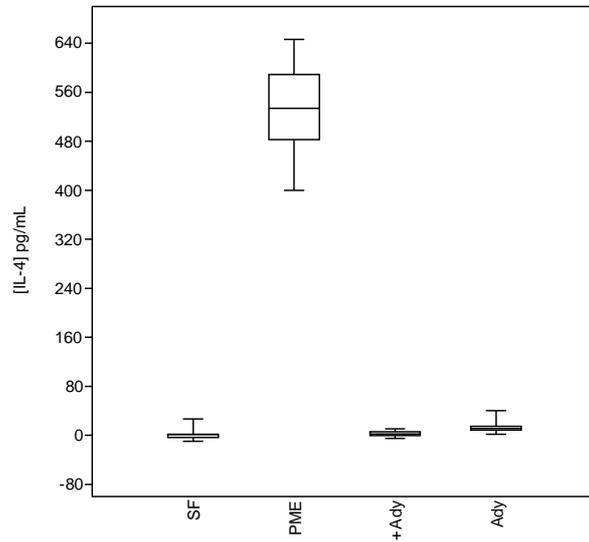


Figura 35. Niveles de IL-4 (pg/mL) en BAL. Se visualizan los 4 grupos estudiados, observándose que el grupo 2 (PME-CD) presentó valores de DO mayores al grupo 1 (SF), 3 (PME-CD + Ady) y 4 (Ady).

DISCUSIÓN

El problema sanitario originado por la QIB ha llevado a procurar desarrollar vacunas efectivas para prevenir la enfermedad. Las vacunas disponibles comercialmente están elaboradas en base a fimbrias o bacterinas cultivadas en condiciones que supuestamente favorecen la expresión fimbrial. Sin embargo, la protección que generan es variable.

Las fimbrias son los factores de virulencia más estudiados de *Moraxella* spp. Existen dos tipos funcionalmente distintos de fimbrias en *M. bovis*, denominados TfpQ y TfpI, lo que genera una gran heterogeneidad antigénica. Sin embargo, esto no se ha observado en *M. bovoculi*, ya que carece de mecanismos de cambio de fase.

Las fimbrias tipo IV son altamente inmunogénicas y pueden inducir respuestas serológicas protectoras, aunque normalmente sólo frente a antígenos homólogos o estrechamente relacionados (Moore & Lepper, 1991; Angelos *et al.*, 2007b). El cambio de un tipo a otro de fimbria constituye una forma de evadir el sistema inmune (Craig *et al.*, 2004).

De acuerdo a estas consideraciones, el análisis de las bases genéticas de la síntesis fimbrial de cepas aisladas de casos clínicos en nuestro país se torna relevante con la finalidad de contribuir con el desarrollo de estrategias de prevención efectivas. En el presente trabajo se analizó la base genética de la síntesis de las fimbrias de una colección de aislamientos de *M. bovis* vinculados a brotes de QIB que fueron recuperados de casos clínicos ocurridos en distintos años y provenientes de diversos orígenes.

Producción de fimbrias

M. bovis presenta fimbrias tipo IV, las cuales tienen la capacidad de realizar el movimiento *twitching* que consiste en la retracción de la fimbria, adhiriéndose inespecíficamente a las superficies de la mucosa y posterior retracción hacia la bacteria (Craig *et al.*, 2004; Mattick 2002; Whitchurch *et al.*, 1990). En este trabajo, inicialmente se evaluó si las cepas de *M. bovis* y *M. bovoculi* eran capaces de realizar este movimiento de manera de tener una primera aproximación sobre la producción de fimbrias en estas cepas. Se observó que todas las cepas eran capaces de realizar *twitching* y que presentaban diferentes morfologías. Por otro lado, presentaron diferencias en la rugosidad del halo externo. A partir de estos halos, se seleccionó una cepa de *M. bovis* y otra de *M. bovoculi* con el fin de realizar preparaciones para el análisis por TEM. De esta manera se logró observar y confirmar la presencia de fimbrias visualizándose pocas bacterias con fimbrias cortas, mostrando en general una baja producción fimbrial.

Extracción de fimbrias

Con el fin de extraer las fimbrias de *M. bovis* para ser evaluadas como posible antígeno de vacunas se llevaron a cabo diferentes protocolos estandarizados en base a trabajos publicados (Ruehl *et al.*, 1988; Zbrun *et al.*, 2012; Lepper *et al.*, 1986). Los resultados obtenidos se compararon con la información incluida en bases de datos públicas. Las proteínas extraídas e identificadas presentaron homología con proteínas no fimbriales de *Moraxella* spp. incluyendo PME (una porina, PME-J, PME-A y UspA1) y una proteína hipotética.

Una baja expresión de fimbrias podría ser uno de los motivos por los que no se logró la extracción. Este resultado concuerda con la poca cantidad de fimbrias visualizadas anteriormente por TEM a partir del halo externo del *twitching*. En el futuro, sería interesante evaluar la expresión de las fimbrias en diferentes condiciones de cultivo a través de, por ejemplo, la técnica de RTqPCR, lo que tendría importancia tecnológica en los cultivos para la producción de vacunas.

Análisis genético del primer gen fimbrial

Debido a la dificultad que se tuvo en la extracción de fimbrias sumado a que *M. bovis* puede expresar dos tipos de fimbrias funcionalmente diferentes, nos interesó evaluar las fimbrias a nivel genético. Al comenzar con este trabajo no se disponía públicamente del genoma de *M. bovis* y sumado a la poca información disponible sobre las secuencias fimbriales, se utilizó una secuencia conocida públicamente de una fimbria de *M. bovis* (GenBank: M92155.1), sin saber a qué conformación de expresión de fimbria correspondía, a partir de la cual se diseñaron los cebadores. De esta manera, se amplificó un fragmento que incluyó la región aguas arriba del ADN codificante con respecto al primer gen fimbrial del *locus* de *M. bovis* y parte de la región codificante de dicho gen. A este producto de PCR se lo llamó *fim09* en este trabajo y se encontró en todas las cepas de *M. bovis* estudiadas, aunque no así en las dos cepas de *M. bovoculi* analizadas. Esto podría deberse a que las fimbrias de *M. bovis* y *M. bovoculi* son diferentes de manera que los cebadores que amplificaron en *M. bovis* no hibridaron en *M. bovoculi*. Esto es coherente con lo publicado por Calcutt y colaboradores (2014) sobre la diferencia entre las fimbrias de estas dos especies, ya que el cambio de fase fimbrial que presenta *M. bovis* no lo presenta *M. bovoculi*.

La región conservada que se observó en el extremo 5' y la región variable hacia el extremo 3' de las secuencias fimbriales de *fim09* coincide con lo observado por Atwell y colaboradores (1994), quienes determinaron que los extremos 5' de las secuencias fimbriales de *M. bovis* presentaban una homología de 70 % a 80 % entre sí y las secuencias aguas abajo

no eran homólogos (Atwell *et al.*, 1994). A su vez, esto concuerda con las características de las fimbrias tipo IV ya que el extremo N-terminal se encuentra conservado y el C-terminal es variable. La diversidad de las secuencias fimbriales observadas en *M. bovis* han sido detectadas también en las fimbrias tipo IV de *Dichelobacter nodosus*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Craig *et al.*, 2004; Mattick *et al.*, 1991). A las secuencias obtenidas de *fim09* no se le pudo atribuir a qué tipo de conformación de expresión de fimbria pertenecían (*tfpQ* ó *tfpI*). En base a estos resultados no fue posible saber en qué conformación se encontraba el *locus* fimbrial (*tfpQ* ó *tfpI*) en las cepas de *M. bovis*.

Análisis genético de los dos tipos de fimbrias (*tfpQ*, *tfpI*) por PCR

A partir de la secuenciación genómica de *M. bovis* por Ion Torrent fue posible diseñar cebadores para amplificar por separado ambos tipos de fimbrias y además conocer sus secuencias en diferentes cepas de *M. bovis*. Los resultados mostraron que 12 de 17 cepas analizadas presentaron coexistencia de ambos genes fimbriales *tfpQ* y *tfpI* en la conformación de expresión. Por lo tanto, una misma población presentó ambos tipos de fimbrias en la conformación de expresión cuando se los amplificó por PCR.

Análisis genético de los dos tipos de fimbrias (*tfpQ*, *tfpI*) por secuenciación genómica

El resultado por PCR mostró que una misma cepa amplificó los dos tipos de fimbrias en su conformación de expresión, aunque en el genoma de *M. bovis* EV345 se observó una sola copia del *locus* fimbrial y solamente en la conformación de expresión de *TfpI*. Debido a ésta diferencia entre los resultados de PCR y secuenciación genómica, se analizó esa región del genoma buscando secuencias invertidas a través de programas bioinformáticos. Esta búsqueda mostró que existían más cantidad de *reads* invertidos en la conformación de expresión de *TfpI* que de *TfpQ*, lo que explicaría el motivo por el que los ensambladores seleccionaran la conformación de expresión *TfpI*, y no *TfpQ*. Además, la técnica de PCR no es cuantitativa, y no es capaz de observar esta diferencia de *reads* entre *tfpI* y *tfpQ*.

Análisis genético del gen *tfpB*

El gen *tfpB* que codifica para la proteína *TfpB* con función desconocida (Rozsa & Marrs, 1991) participa en el cambio de fase, ya que se encuentra localizada entre los dos genes fimbriales. Esto se observó al analizar las secuencias obtenidas de *tfpQ* y *tfpI* que también contenían parte del gen *tfpB*. Las secuencias de *tfpB* en la conformación de expresión de Q son reversas complementarias a las secuencias de *tfpB* en conformación de expresión de I. Al

realizar los alineamientos y la filogenia de las secuencias fimbriales sin incluir la región intergénica entre el primer gen fimbrial (*tfpQ* ó *tfpI*) y el gen *tfpB* no fue posible conformar dos grupos diferenciados (*tfpQ* ó *tfpI*). Según Fulks y colaboradores (1990) dicha región intergénica podría estar involucrada en la terminación de la transcripción regulando así la cantidad de producto formado a partir de *tfpB*. Sin embargo, cuando se incluyó esta región en el análisis filogenético, fue posible generar una clara agrupación que incluyó las secuencias de *tfpQ* y otra conformada por las secuencias de *tfpI* (Fulks *et al.*, 1990).

Es importante tener en cuenta que aparentemente cuando el segmento de ADN se invierte y el gen *tfpI* estaría en la conformación de expresión, *tfpB* no se estaría expresando o sería transcrito por el promotor de la recombinasa (Farias, 2015).

De acuerdo a distintos autores, el tamaño del *locus* fimbrial varía según la cepa. En nuestro caso BM3A presentó un mayor tamaño del *locus* comparado con las cepas EV345, EPP63 y 771A. Atwell y colaboradores (1994) observó que diferentes cepas tenían un tamaño de *locus* de entre 2.1-2,9 Kb. Si bien contamos con los resultados de la secuenciación genómica de una cepa de *M. bovis* y conocemos su secuencia del *locus* fimbrial, en el futuro sería interesante conocer las secuencias de otros *locus* fimbriales de diferentes cepas de *M. bovis* para poder compararlos.

La fimbria tipo IV está presente en una variedad de bacterias Gram negativas como *M. bovis* y *M. lacunata*, estos microorganismos están muy relacionados, siendo *M. lacunata* el patógeno causante de la conjuntivitis en humanos. Ambos presentan diferencias en su secuencia y son capaces de realizar un cambio de fase a nivel de las fimbrias (Rozsa & Marrs, 1991). Existen otros mecanismos de variación de fase vistos en otros sistemas basados en un evento de inversión genética resultando en la expresión reversible entre solo dos estados alternativos (Silverman *et al.*, 1983). Uno de los más estudiados es el de la transición de fase flagelar H1 y H2 de *S. typhimurium* (Herrera-León *et al.*, 2007). Otros ejemplos de recombinación específica de segmentos ocurre en ciertos fagos donde un segmento invertible de ADN que en cierta orientación infecta a determinadas especies y cepas bacterianas, mientras que la otra orientación le suministra al fago la capacidad de infectar otras cepas e incluso especies (Grundy *et al.*, 1984; Chow *et al.*, 1978). El sistema de inversión de *M. bovis* se asemeja más al evento de inversión visto en el bacteriófago Mu (Marrs *et al.*, 1988).

Estructura secundaria de TfpQ y TfpI

Una comprensión completa de la diversidad entre las fimbrias, así como de las regiones conservadas es importante para el diseño de vacunas a base de fimbrias con amplia protección. A partir de las secuencias obtenidas por secuenciación genómica se pudo predecir

la estructura secundaria de TfpQ y Tfpl, las cuales resultaron muy similares entre sí. Las estructuras obtenidas corresponden con la estructura de la fimbria tipo IV donde el dominio N-terminal (región constante) comprende una α -hélice y el dominio C-terminal (variable) comprende un $\alpha\beta$ -loop, hojas- β y una región-D. El C-terminal abarca dos tercios de proteínas relativamente hidrófilas y contiene los principales sitios de variación estructural y antigénica (Craig *et al.*, 2004; Craig & Li, 2008). Varios estudios sugirieron que la región D de la fimbria tipo IV puede funcionar como el componente adhesivo de ésta, ya que anticuerpos específicos o inhibidores peptídicos competitivos fueron específicamente capaces de bloquear la unión mediada por la fimbria a una variedad de superficies (Giltner *et al.*, 2012). La exposición de la fimbria tipo IV en la superficie bacteriana los hace blancos de la respuesta inmune del huésped. Las *Neisseria* spp. desarrollan mecanismos para evitar el reconocimiento inmunológico de sus fimbrias, por ejemplo, la variación de fase, la variación antigénica, la modificación post-traducciona, etc (Hagblom *et al.*, 1985). Por lo tanto, si la región D de TfpQ y Tfpl es realmente la subunidad antigénica-inmunogénica de la proteína y corresponde a la región variable genéticamente (extremo 3') entre cepas, no podría proteger frente al desafío con una cepa diferente, incluso teniendo una gran similitud en el resto de la secuencia. Probablemente la variación antigénica y la variación de fase son razones importantes por las cuales la mayoría de las vacunas comerciales de cepas de *M. bovis* o de fimbrias purificadas presenten una eficacia relativa de la vacuna (Burns & O'Connor, 2008).

Comparación entre secuencias fimbriales de *M. bovis* y *M. bovoculi*

La variación genética observada en las secuencias fimbriales y las diferencias observadas entre cepas de una misma especie podrían evadir las respuestas del sistema inmune. Es por esto que se deben tener en cuenta diferentes características a la hora de seleccionar un posible antígeno efectivo en vacunas, como por ejemplo la expresión de epítopes superficiales, la conservación entre cepas, la expresión *in vivo* en sitios de patogénesis, la inmunogenicidad y la inducción de una respuesta protectora en el sistema inmune (Murphy, 2005). La comparación genómica entre *M. bovis* y *M. bovoculi*, particularmente la comparación de factores de virulencia, es muy importante ya que ambos microorganismos son utilizados hoy en día en vacunas. Al realizar la comparación entre la fimbria de *M. bovoculi* y los dos tipos de fimbrias (Q e I) de *M. bovis*, obtenidos a partir de la secuenciación genómica de ambas especies, se observó que *M. bovoculi* no presenta la conformación del *locus* fimbrial que tienen *M. bovis* y *M. lacunata*. Además, la fimbria de *M. bovoculi* presentó un 33 % y 43 % de identidad con la fimbria Tfpl y TfpQ de *M. bovis* respectivamente. Calcutt y colaboradores (2014) observaron un valor similar (38 %) cuando

secuenciaron la cepa de referencia de *M. bovoculi* BAA1259 y la compararon con una fimbria de *M. bovis* publicada en la base de datos, sugiriendo que las bacterinas fimbriadas de *M. bovis* podrían proveer una protección limitada a mínima contra la QIB causada por *M. bovoculi*. Esta diferencia entre *M. bovis* y *M. bovoculi* podría explicar porque no se amplificó el producto de PCR *fim09* en cepas de *M. bovoculi* y sí en todas las *M. bovis* evaluadas. Una vez más se muestran diferencias en las secuencias fimbriales de estas dos especies.

Por otro lado, en el genoma de *M. bovis* EV345 se encontró otro potencial gen fimbrial diferente a *tfpQ* y *tfpI*. Este gen se encontró en una posición aguas abajo con respecto al locus fimbrial y aparentemente no participaría en la recombinación que genera un tipo u otro de fimbria. La comparación a nivel de las secuencias de diferentes factores de virulencia (*mbxA*, *tolC*, *fur*, *pme79*, *pme-cd*, *pme-e*, *pme-m35*, *pme-j*, *pIB*) entre *M. bovis*, *M. bovoculi* y *M. catarrhalis* permitió observar que *M. bovis* presenta más similitud con *M. bovoculi* y, a su vez *M. bovoculi* con *M. catarrhalis*. Hasta el momento no hay trabajos que involucren esta comparación entre las tres especies.

Los resultados obtenidos en la primera parte de este trabajo demostraron que en un cultivo de *M. bovis* pueden estar presentes diferentes poblaciones conteniendo ambos tipos de fimbria en conformación de expresión. Por lo tanto, una cepa sería capaz de presentar al mismo tiempo los dos genes fimbriales en la conformación de expresión (ya sea en conformación Q ó I). Por otro lado, las secuencias nucleóticas y aminoacídicas de las fimbrias de distintas cepas de *M. bovis* presentan una alta variabilidad genética por lo que debería revisarse el uso de fimbrias como antígenos en vacunas. A su vez, se observó que las fimbrias de *M. bovis* y *M. bovoculi* no son similares a nivel de sus secuencias, y que ésta última no contiene la estructura del locus fimbrial que posee *M. bovis*.

PME-CD recombinante como potencial antígeno

Las vacunas que existen comercialmente buscan impedir la adhesión bacteriana al epitelio corneal bovino, etapa clave en el proceso infeccioso de *Moraxella* spp. En base a trabajos previos de nuestro grupo, se sabe que el gen *pme-cd*, que codifica para la adhesina PME-CD, está presente en aislamientos clínicos de *M. bovis* y *M. bovoculi* de Uruguay. Además, se ha determinado que la proteína se expresa y presenta reactividad con anticuerpos (Acquistapace, 2014). Este alto grado de conservación entre las cepas estudiadas es una característica deseable para un antígeno de vacuna, ya que la generación de una respuesta inmune protectora de un antígeno conservado podría inducir protección contra la infección de cepas heterólogas (Murphy *et al.*, 1998). Si bien esta proteína ha sido descrita en *M. catarrhalis* como potencial antígeno en vacunas (Saito *et al.*, 2013) no había sido estudiada en

M. bovis ni en *M. bovoculi*, por lo que no ha sido incorporada a formulaciones comerciales hasta el momento. En este sentido y teniendo en cuenta que además está conservada entre las cepas de *M. bovis* y *M. bovoculi* nos propusimos evaluar la expresión de la proteína PME-CD *in vitro* así como su reactividad con los anticuerpos a partir de la inmunización (vía subcutánea y mucosal) en modelos de animales de experimentación. Asimismo, la generación de la proteína PME-CD recombinante nos interesaba desde un punto de vista biotecnológico ya que la misma podría emplearse como antígeno en vacunas contra la QIB. La baja expresión de esta proteína en forma nativa haría dificultosa la producción a escalas más grandes. Por lo tanto, la producción de PME-CD de forma recombinante es una alternativa válida para producir esta proteína en más cantidades (Becker *et al.*, 2007).

En el presente trabajo se logró la expresión de la proteína recombinante, empleando el sistema pET, la que exhibió el peso molecular esperado para PME-CD. En nuestro laboratorio se han expresado con éxito otras proteínas recombinantes en *E. coli* empleando este sistema (Pellegrino *et al.*, 2003).

La PME-CD se expresó mayoritariamente en la fracción proteica insoluble de la célula, por lo que la purificación se realizó bajo condiciones desnaturalizantes empleando urea. Esto permitió solubilizar la proteína y obtener la fracción de interés con un alto grado de pureza, empleando cromatografía de afinidad en columnas de agarosa Ni-NTA. Además, la identidad de la proteína se corroboró por MALDI-TOF y secuenciación del plásmido de expresión pET-pme-cd.

Reactividad de los anticuerpos

Se corroboró la reactividad de los anticuerpos de las PME-CD recombinantes de *M. bovis* empleando la técnica *Western blot* utilizando sueros y lágrimas de animales sanos y enfermos. Si bien se normalizó utilizando la misma cantidad de proteínas totales de sueros y lágrimas de animales sanos y enfermos se observaron bandas notoriamente más intensas en los animales enfermos. La presencia de cierta reacción en animales sanos pudo 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 microbiota ocular normal (Pugh *et al.*, 1986, O'connor *et al.*, 2012). Esto mismo fue observado anteriormente por nuestro grupo de investigación cuando se analizó la PME-CD nativa en un extracto de PME con sueros y lágrimas de animales sanos y enfermos (Acquistapace, 2014).

Respuesta de anticuerpos en suero y BAL

A lo largo de muchos años se ha investigado sobre la patogénesis y la prevención de QIB a partir de la cual se han generado diversas conclusiones en cuanto a la importancia de la inmunidad local para determinar la resistencia a QIB (Nayar & Saunders, 1975a, Nayar & Saunders, 1975b). Por lo tanto, sería racional considerar la administración de una vacuna de *M. bovis* por vía mucosal (Angelos 2014). Estudios más recientes han evaluado la vía subconjuntival con una bacterina de *M. bovis* autógena, pero no encontraron diferencias entre los vacunados subconjuntivales versus los subcutáneos (Davidson *et al.*, 2003). También se ha evaluado una bacterina de *M. bovis* administrada en el ojo por aerosol (Misiura *et al.*, 1994a; Misiura *et al.*, 1994b), un antígeno de fimbria nativa de *M. bovis* administrada por vía intranasal (Zbrun *et al.*, 2012) y una bacterina de *M. bovis* administrada por la ruta intraocular (di Girolamo *et al.*, 2012). En el presente trabajo se propuso evaluar además de la vía sistémica, la vía intranasal como vía de inoculación de la PME-CD recombinante utilizando un adyuvante adecuado para dicha vía. La existencia de un sistema inmunitario común asociado a las mucosas estrechamente interconectado hace posible que la inmunización en una mucosa genere respuestas inmunitarias en otras distantes con respecto al sitio de inmunización (Haneberg *et al.*, 1994). Diferentes autores han sugerido que la vacunación por una ruta que estimula la IgA de mucosas contra *M. bovis* sería importante para desarrollar una vacuna eficaz contra dicha bacteria (Pugh *et al.*, 1985). Aunque es muy dificultoso generar anticuerpos mucosales a través de la vía parenteral, es posible obtener tanto anticuerpos mucosales como parenterales inoculando el antígeno por la ruta mucosal (Petrovsky *et al.*, 2004). De todas maneras, nos interesaba conocer cómo era la respuesta de anticuerpos tanto de IgG como de IgA en ambas rutas de inoculación.

Se pudo observar que la inmunización intranasal con PME-CD recombinante y PME-CD recombinante combinada con adyuvante indujo una respuesta significativa de anticuerpos IgA en BAL. Por otro lado, se observó que la administración subcutánea de la proteína PME-CD recombinante produjo sólo un aumento en IgG en suero. Es esperable que los niveles de IgG sean elevados debido a que la vía de inoculación fue la sistémica, además de que la IgG es la inmunoglobulina más abundante en suero.

Otra estrategia para mejorar la respuesta inmune de mucosas se basa en el uso de adyuvantes. En este trabajo se utilizó un adyuvante llamado CARBIGEN, consistente en una emulsión basada en carbómero (Carbopol 934P) el cual contiene ingredientes libres de origen animal. El carbómero es un polímero que encapsula el antígeno, proporcionando un efecto de liberación lenta y de depósito mejorando la presentación del antígeno a las células efectoras y proporcionando una mejora significativa de la respuesta inmune y la eficacia de la vacuna. Los

adyuvantes basados en Carbopol se han usado en vacunas veterinarias desde la década de 1970 y se ha demostrado que son seguros y efectivos cuando se usan en todas las especies animales. Este adyuvante ha sido utilizado intranasalmente para producir respuestas de IgA e IgG contra enfermedades respiratorias (Boletín técnico Carbigen, Hilgers *et al.*, 2000). La adición del adyuvante en la formulación mostró una mejora significativa en los niveles de anticuerpos comparados con la proteína sin adyugar. Por lo tanto el adyuvante mejoró la inmunogenicidad de la proteína y se podría evaluar su incorporación en futuras formulaciones de vacunas contra la QIB.

Niveles de citoquinas en los BAL

Para que una vacuna sea eficaz, debe ser capaz de generar una respuesta inmune suficiente y eficiente en el individuo vacunado. En este sentido, resulta de gran interés conocer el tipo de citoquinas que predomina (Seferian & Martínez, 2002; Palomo *et al.*, 2002; Abbas *et al.*, 2008). El patrón de citoquinas predominante determina el tipo de respuesta inmune inducida (Palomo *et al.*, 2002). Los linfocitos Th1 pueden producir IL-2 e IFN- γ y median una respuesta inmune celular. Por otro lado, los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-10 entre otras proteínas y median una respuesta inmune humoral (Abbas *et al.*, 2008).

El IFN- γ es producido por los linfocitos Th1, linfocitos citotóxicos y células NK y posee una importante actividad inmunoreguladora inhibiendo la proliferación de los linfocitos Th2 y favoreciendo por lo tanto el desarrollo de las respuestas inflamatorias (van Ginkel *et al.*, 2000). Por otro lado, la IL-4 tiene su origen en los linfocitos T activados y actúa preferentemente promoviendo la activación, proliferación y diferenciación de los linfocitos B. Interviene de forma decisiva en la inducción de las células Th2 que regulan la inmunidad humoral. La IL-10 es producida por los linfocitos T de tipo Th2 y con capacidad de inhibir la síntesis de IFN- γ y de IL-2 por parte de los linfocitos T, es la principal citoquina antiinflamatoria (Filella *et al.*, 2000).

En el presente trabajo se evaluaron los niveles de IFN- γ , IL-4 e IL-10 en los BAL obtenidos de los animales inmunizados por vía intranasal. En ninguno de los cuatro grupos de animales que se evaluaron se observó producción significativa de IFN- γ ni IL-10. Los resultados obtenidos revelaron que al utilizar la PME-CD sola aumentan los niveles de IL-4, en este sentido nos da una idea del tipo de respuesta inmunológica que podría llegar a tener la inmunización de la PME-CD sola siendo preferentemente de tipo Th2. De todas maneras para confirmar esto, se debería evaluar el patrón de citoquinas que determina el tipo de respuesta inmune inducida. Sorpresivamente, el grupo de la PME-CD con adyuvante no presentó niveles altos de IL-4, indicando que quizás pudo haber ocurrido una acción inhibitoria por parte del adyuvante, que haya generado la inhibición de las citoquinas. Becker y colaboradores (2007)

evaluaron la vacunación con PME-CD recombinante de *M. catarrhalis* mas un adyuvante mucosal en ratones resultando en la estimulación de células secretoras de IL-4 siendo más alta que la estimulación en animales inmunizados con PME-CD nativa más el adyuvante mucosal. Por otro lado, la vacunación con PME-CD nativa y adyuvante resultó en un aumento significativo en el número de producción de IL-2 e IFN- γ . Por lo tanto, nuestro resultado concuerda con el de estos investigadores donde el uso de PME-CD recombinante parece dar como resultado una respuesta de tipo Th2. (Becker *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El presente trabajo aportó resultados que pueden contribuir a una mejor comprensión del cambio de fase de las fimbrias de *M. bovis* utilizando diferentes cepas clínicas de *M. bovis*, a través del estudio de las secuencias de sus genes de biosíntesis. Ésto se demostró a través de la técnica de PCR y posterior confirmación por secuenciación genómica. En un cultivo de *M. bovis* pueden estar presentes diferentes poblaciones conteniendo ambos tipos de fimbrias en conformación de expresión. Por lo tanto, una cepa es capaz de presentar al mismo tiempo los dos genes fimbriales en la conformación de expresión (ya sea en conformación Q ó I). Sería necesario continuar con el análisis y comparación de diferentes genomas de *M. bovis* poniendo énfasis en sus *locus* fimbriales, lo que aportaría a avanzar en la comprensión del sistema de recombinación, así como evaluar la expresión de las fimbrias cuando se las cultiva en diferentes condiciones a través de la técnica de qPCR. Ésto podría tener implicancias tecnológicas para el seguimiento de la expresión fimbrial en la producción de vacunas comerciales.

Se confirmó que las secuencias fimbriales de distintas cepas de *M. bovis* presentan una alta variabilidad genética lo que cuestiona el uso de fimbrias como antígenos en vacunas. Se observó que la región variable genéticamente (extremo 3') entre cepas, incluye la región D la cual participa en la adhesión y no podría proteger frente al desafío con una cepa diferente.

Se demostró que el gen *tfpB*, que está entre los dos genes fimbriales (Q e I) de *M. bovis*, también participa en la recombinación, y su secuencia es importante para determinar *in silico* en qué conformación se encuentra la fimbria de expresión. Sería interesante evaluar el rol que cumple la proteína TfpB cuando esta en conformación Q ó I, para esto se podría predecir a través de programas bioinformáticos de modelado de proteínas.

Por otro lado, se determinó que las fimbrias de *M. bovis* y *M. bovoculi* no son similares, y que ésta última no presenta el cambio de un tipo a otro de fimbria que posee *M. bovis*. Es necesario profundizar en el análisis del genoma de *M. bovis* EV345 incluyendo la comparación genómica con *M. bovoculi* PRO y también con otros genomas disponibles públicamente de *M. bovoculi*. De esta manera podría realizarse vacunología reversa determinando potenciales antígenos en común.

Por otro lado, este trabajo fue el primer estudio de la PME-CD de *M. bovis* como posible antígeno de vacunas contra la QIB. En base a los resultados, se podría considerar a la PME-CD como un potencial antígeno protector ya que indujo niveles significativamente altos

de IgA en los BAL (con y sin adyuvante) cuando es administrada en animales de experimentación a través de la vía intranasal, y de IgG cuando es administrada a través de la vía sistémica. A su vez, la PME-CD demostró ser capaz de generar una respuesta inmune al presentar niveles significativamente altos de la citoquina IL-4. En el futuro, sería interesante evaluar un desafío en bovinos y analizar las secreciones oculares. Además, será necesario continuar con la optimización de la expresión de la proteína recombinante.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen con la comprensión de diversos aspectos vinculados a la patogenia de la QIB así como al diseño de estrategias dirigidas a su prevención. En especial, los resultados demuestran que existe una alta heterogeneidad antigénica en lo que respecta a las secuencias fimbriales de *M. bovis* y *M. bovoculi* poniendo en cuestión su inclusión en las formulaciones de vacunas, y por otro lado apoya el uso de antígenos conservados como la PME-CD para la prevención de la QIB.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acquistapace S (2014) Proteínas de membrana externa de *Moraxella bovis* y *Moraxella bovoculi* como componentes de vacunas contra la queratoconjuntivitis bovina. Tesis de Grado en Licenciatura en Bioquímica. UdelaR. Tutor Pablo Zunino.

Abbas A, Lichtman A, Pillai S (2008) Inmunología Celular y molecular. 6º Ed. Geo Consultoría Editorial. Barcelona, España. 566.

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.

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 (2015) Infectious bovine keratoconjunctivitis (pinkeye). Vet Clin North Am Food Anim Pract. 31:61-79.

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, Chigerwe M, Edman JM, Hess J (2016) Systemic and ocular immune responses in cattle following intranasal vaccination with precipitated or partially solubilized recombinant *Moraxella bovis* cytotoxin adjuvanted with polyacrylic acid. Am J Vet Res. 77:1411-1418.

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.

Aziz R, Bartels D, Best A, *et al.* (2008) The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics.* 9:75.

Atwell J, Tennent J, Lepper A, Elleman T (1994) Characterization of pilin genes from seven serologically defined prototype strains of *Moraxella bovis*. *J. Bacteriol.* 176:4875-4882.

Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich A, Dvorkin M, Kulikov A, Lesin V, Nikolenko S, Pham S, Prjibelski A, Pyshkin A, Sirotkin A, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev M, Pevzner P (2012) SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol.* 19: 455–477.

Baptista PJP (1979) Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. *Br Vet J.* 135:225-242.

Becker P, Bertot G, Souss D, Ebensen T, Guzmán C, Grinstein S (2007) Intranasal Vaccination with Recombinant Outer Membrane Protein CD and Adamantylamide Dipeptide as the Mucosal Adjuvant Enhances Pulmonary Clearance of *Moraxella catarrhalis* in an Experimental Murine Model. *Infection and Immunity.* 75:1778-1784.

Bingen E, Cohen R, Jourenkova N, Gehanno P (2005) Epidemiologic study of conjunctivitis-otitis syndrome. *Pediatr. Infect Dis J.* 24:731-732.

Boletín técnico Carbigen, <http://www.mvp-technologies.com/adjuvants/Carbigen.pdf>.

Bolger A, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 30:2114-2120.

Bosch A, Prieto C, Serra D, Martina P, Stämmeler M, Naumann D, Schmitt J, Yantorno O (2010). Type-IV pili spectroscopic markers: Applications in the quantification of piliation levels in *Moraxella bovis* cells by a FT-IR ANN-based model. *J. Biophoton.* 3:522-533.

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.

Bullock W, Fernández J, Short J (1987) XL1-Blue, high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with b-galactosidase section. *Biotechniques.* 5:376-379.

Burns M, O'Connor A (2008) Assessment of methodological quality and sources of variation in the magnitude of vaccine efficacy: A systematic review of studies from 1960 to 2005 reporting immunization with *Moraxella bovis* vaccines in young cattle. *Vaccine.* 26:144-152.

Cagatay T, Hickford J (2008) Glycosylation of type-IV fimbriae of *Dichelobacter nodosus*. *Vet Microbiol.* 126:160-167.

Calcutt M, Foecking M, Martin N, Mhlanga-Mutangadura, Reilly T (2014) Draft genome sequence of *Moraxella bovoculi* strain 237T (ATCC BAA-1259T) isolated from a calf with infectious bovine keratoconjunctivitis. *Genome Announcements.* 2:612-614.

Chow L, Broker T, Kahmann R, Kamp D (1978) Comparison of the G DNA inversion in bacteriophages Mu, P1, P7. *American Society for Microbiology.* 55-56.

Conceição F, Dellagostin O, Paolicchi F, Cobo A, Gil-Turnes C (2004) Molecular diversity of *Moraxella bovis* isolated from Brazil, Argentina and Uruguay over a period of three decades. *Vet. J.*, 167:53-58.

Craig L, Li J (2008) Type IV pili: paradoxes in form and function. *Current Opinion in Structural Biology*, 18: 267-277.

Craig L, Pique M, Tainer J (2004) Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 2:363-378.

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.

Chow L, Broker T, Kahmann R, Kamp D (1978) Comparison of the G DNA inversion in bacteriophages Mu, P1, and P7. *American Society for Microbiology.* 55-56.

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.

Davidson HJ, Stokka GL (2003) A field trial of autogenous *Moraxella bovis* bacterin administered through either subcutaneous or subconjunctival injection on the development of keratoconjunctivitis in a beef herd. *Can Vet J.* 44:577-580.

di Girolamo F, Sabatini DJ, Fasan RA, Echegoyen M, Vela M, Pereira CA, Maure P (2012) Evaluation of cytokines as adjuvants of infectious bovine keratoconjunctivitis vaccines. *Vet Immunol Immunopathol.* 145:563-566.

Dickey A, Loy J, Bono J, *et al.* (2016) Large genomic differences between *Moraxella bovoculi* isolates acquired from the eyes of cattle with infectious bovine keratoconjunctivitis versus the deep nasopharynx of asymptomatic cattle. *Veterinary Research.* 47:31.

Elleman T (1988) Pilins of *Bacteroides nodosus*: molecular basis of serotypic variation and relationships to other bacterial pilins. *Microbiol. Rev.* 52:233-247.

Elleman T, Hoyne P, Lepper A (1990) Characterization of the pilin gene of *Moraxella bovis* Dalton 2d and expression of pili from *M. bovis* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 58, 1678-1684.

Farias L (2015) Análise genotípica e filogenética com base nos genes do pilus tipo iv de *Moraxella bovis* e citotoxina de *M. bovis*, *Moraxella bovoculi* e *Moraxella ovis*. Tesis de doctorado. Santa Maria, RS, Brasil. Tutor: Prof. Dr Agueda Castagna de Vargas.

Farias L, Maboni G, Matter L, Scherer C, Libardoni F, de Vargas A (2015) Phylogenetic analysis and genetic diversity of 3' region of rtxA gene from geographically diverse strains of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*. *Vet Microbiol.* 178:283-287.

Farn J, Strugnell R, Hoyne P, Michalski W, Tennent J (2001) Molecular characterization of a secreted enzyme with phospholipase B activity from *Moraxella bovis*. *J Bacteriol.* 183:6717-6720.

Filella X, Alcover J, Zarco M, Beardo P, Molina R, Ballesta A (2000). Analysis of type T1 and T2 cytokines in patients with prostate cancer. *Prostate.* 44:271-274.

Fulks K, Marrs C, Stevens S, Green, M (1990) Sequence analysis of the inversion region containing the pilin genes of *Moraxella bovis*. *J. Bacteriol.* 172, 310-316.

Funk L, O'Connor AM, Maroney M, Engelken T, Cooper VL, Kinyon J, Plummer P (2009) A randomized and blinded field trial to assess the efficacy of an autogenous vaccine to prevent naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in beef calves. *Vaccine* 27:4585-4590.

Galdiero S, Falanga A, Cantisani M, Tarallo R, Della Pepa ME, D'Orlando 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.

Giltner C, Nguyen Y, Lori L (2012) Type IV Pilin Proteins: Versatile Molecular Modules. *Microbiol Mol Biol Rev.* 76:740–772.

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

Gould S, Dewell R, Tofflemire K, Whitley R, Millman S, Opriessnig T, Rosenbusch R, Trujillo J, O'Connor A (2013) Randomized blinded challenge study to assess association between *Moraxella bovoculi* and Infectious Bovine Keratoconjunctivitis in dairy calves. *Vet Microbiol.* 164:108-115.

Grundy F, Howe M (1984) Involvement of the invertible G segment in bacteriophage Mu tail fiber biosynthesis. *Virology* 134:296-317.

Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G (2013) QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* 29:1072-1075.

Hagblom P, Segal E, Billyard E, So M (1985) Intragenic recombination leads to pilus antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*. *Nature.* 315:156-158.

Hammer O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica.* 1-31.

Haneberg B, Kendall D, Amerongen H, Apter F, Kraehenbuhl J, Neutra M (1994). Induction of specific immunoglobulin A in the small intestine, colon-rectum, and vagina measured by a new method for collection of secretions from local mucosal surfaces. *Infect Immun.* 62:15-23.

Hansen R (2001) New tools in the battle against pinkeye. University of Nevada Reno UNR Coop. Ext. 5-8.

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.

Heinrich D, Glasgow, A (1997) Transcriptional Regulation of Type 4 Pilin Genes and the Site-Specific Recombinase Gene, *piv*, in *Moraxella lacunata* and *Moraxella bovis*. *Journal of Bacteriology,* 179:7298-7305.

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

Herrera-León S, McQuiston J, Usera M, Fields P, Garaizar J, Echeita A (2004) Multiplex PCR for distinguishing the Most Common Phase-1 Flagellar Antigens of *Salmonella* spp. J Clin Microbiol. 42:2581-2586.

Hermodson M, Chen K, Buchanan T (1978) *Neisseria* pili proteins: amino-terminal amino acid sequences and identification of an unusual amino acid. Biochemistry. 17:442-445.

Hilgers LA, Ghenné L, Nicolas I, Fochesato M, Lejeune G, Boon B (2000) Alkyl-polyacrylate esters are strong mucosal adjuvants. Vaccine. 18:3319-3325.

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.

INAC (2017) Informe estadístico año agrícola. Julio 2016-Junio 2017.

Jeeves M, Knowles TJ (2015) A novel pathway for outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria. Mol Microbiol. 97:607-611.

Kelley L, Mezulis S, Yates C, Wass M, Sternberg M (2015) The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction and analysis. Nat Protoc. 10: 845-858.

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.

Kowalski A, Maboni G, Gressler L, Espíndola J, Balzan C, Tasca C, Guizzo J, Conceição F, Frandoloso R, de Vargas A (2017). Antigenic characterization of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* strains with potential use in vaccines. Vet Microbiol. 210:56-63.

Lehr C, Jayappa G, Goodnow R (1985) Serologic and protective characterization of *Moraxella bovis* pili. Cornell Vet. 75:484-492.

Lepper A, Atwell J, Lehrbach P, Schwartzkoff C, Egerton J, Tennent J (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.

- Lepper A**, Barton J (1987) Infectious bovine keratoconjunctivitis: seasonal variation in cultural, biochemical and immunoreactive properties of *Moraxella bovis* isolated from the eyes of cattle. Aust. Vet. J. 64:33-39.
- Lepper A**, Elleman T, Hoyne P, Lehrbach P, Atwell J, Schwartzkoff C, Egerton J, Tennent J (1993) A *Moraxella bovis* pili vaccine produced by recombinant DNA technology for the prevention of infectious bovine keratoconjunctivitis. Vet Microbiol. 36:175-83
- Lepper A**, Hermans L (1986) Characterisation and quantitation of pilus antigens of *Moraxella bovis* by ELISA. Aust Vet J. 63:401-405.
- Lepper A**, 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.
- Li H**, Durbin R (2009a) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics. 25:1754-1760.
- Li H**, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N (2009b). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics. 25:2078-2079.
- 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.
- Low D**, Braaten B, Woude M (1996) Fimbriae *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. 146-157.
- Marrs C**, Rozsa F, Hackel M, Stevens SP, Glasgow A (1990) Identification, cloning, and sequencing of piv, a new gene involved in inverting the pilin genes of *Moraxella lacunata*. J Bacteriol. 172:4370-4377.
- Marrs C**, 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.
- Mattick J**, Anderson B, Cox P, Dalrymple B, Bills M, Hobbs M, Egerton J (1991) Gene sequences and comparison of the fimbrial subunits representative of *Bacteroides nodosus* serotypes A to I: class I and class II strains. Mol. Microbiol. 5:561-573.
- Mattick J** (2002) Type IV pili and twitching motility. Annu. Rev. Microbiol. 56:289-314.
- McConnel C**, Shum L, House J (2005) Infectious bovine keratoconjunctivitis vaccine development. Aust Vet J. 83:506-510.
- McConnel C**, Shum L, House JK (2007) Infectious bovine keratoconjunctivitis antimicrobial therapy. Aust Vet J. 85:65-69.

- Misiura M** (1994a) Estimation of fimbrial vaccine effectiveness in protection against keratoconjunctivitis infectiosa in calves considering different routes of introducing vaccine antigen. Arch Vet Pol. 34:177-186.
- Misiura M** (1994b) Keratoconjunctivitis infectiosa in calves attempt at elimination by active immunization. Arch Vet Pol. 34:187-194.
- Moore L**, Lepper A (1991) A unified serotyping scheme for *Moraxella bovis*. Vet Microbiol. 29:75-83.
- Moore L**, Rutter J (1987) Antigenic analysis of fimbrial proteins from *Moraxella bovis*. Journal of Clinical Microbiology. 25:2063-2070.
- Muñoz-Wolf N**, Rial A, Saavedra J, Chabalgoity J (2014) Sublingual immunotherapy as an alternative to induce protection against acute respiratory infections. J Vis Exp. 30;(90).
- Murphy TF** (2005) Vaccine development for non-typeable Haemophilus influenza and *Moraxella catarrhalis*: progress and challenges. Expert Rev Vaccines. 4:843-853.
- Murphy TF** (2009) *Moraxella catarrhalis*, a human respiratory tract pathogen. Clin Infect Dis. 49:124–131.
- Murphy TF**, Brauer A, Aebi C, Sethi S (2005b) Identification of surface antigens of *Moraxella catarrhalis* as targets of human serum antibody responses in chronic obstructive pulmonary disease. Infect. Immun. 73:3471–3478.
- Murphy TF**, Brauer A, Grant BJ, Sethi S (2005a) *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**, Kyd J, John A, Kirkham C, Cripps A (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.
- 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.

Nayar PS, Saunders JR (1975a). Infectious bovine keratoconjunctivitis II. Antibodies in lacrimal secretions of cattle naturally or experimentally infected with *Moraxella bovis*. Can J Comp Med 39:32-40.

Nayar PS, Saunders JR. (1975b). Infectious bovine keratoconjunctivitis I. Experimental production. Can J Comp Med 39:22-31

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.

O'Sullivan N, Montgomery P (2015) Ocular Mucosal Immunity. Mucosal Immunology (Fourth Edition).

Palomo I, Ferreira A, Sepúlveda C, Roseblatt M, Vergara U (2002) Fundamentos de inmunología básica y clínica. Editorial Universidad de Talca. 807.

Pellic V (2008) Type IV pili: e pluribus unum? Mol Microbiol. 68:827-837.

Pellegrino R, Galvalisi U, Scavone P, Sosa V, Zunino P (2003) Evaluation of *Proteus mirabilis* structural fimbrial proteins as antigens against urinary tract infections. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 36:103-110.

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.

Petrovsky N, Aguilar J (2004) Vaccine adjuvants: current state and future trends. Immunol Cell Biol. 82:488-496.

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.

Prieto C, Rodriguez M, Bosch A, Chirido F, Yantorno O (2003) Whole-bacterial cell enzyme-linked immunosorbent assay for cell-bound *Moraxella bovis* pili. Vet Microbiol. 91:157-68.

Proft T, Baker E (2009) Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. Cell Mol Life Sci. 66:613-635.

Pugh G, Hughes DE (1970) Comparison of the virulence of various strains of *Moraxella bovis*. Can J Comp Med. 34:333-340.

Pugh G, Hughes D, Booth G (1977) Experimentally induced infections bovine keratoconjunctivitis: effectiveness of a pilus vaccine against exposure to homologous strains of *Moraxella bovis*. Am J Vet Res. 38: 1519-1522.

- Pugh G**, Kopecky K, McDonald TJ (1985) Infectious bovine keratoconjunctivitis: subconjunctival administration of a *Moraxella bovis* pilus preparation enhances immunogenicity. Am J Vet Res. 46:811-815.
- Pugh G**, McDonald T (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.
- Quinlan A**, Hall I (2010) BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features Bioinformatics. 26: 841-842.
- Reddy M**, Murphy T, Faden H, Bernstein J (1997) Middle ear mucin glycoprotein: purification and interaction with nontypable *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* Otolaryngol. Head. Neck. Surg. 116:175-180.
- Reid G**, Sobel J (1987) Bacterial adherence in the pathogenesis of urinary tract infection: a review. Rev Infect Dis. 9:470-87.
- 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.
- Rozsa F**, Marrs C (1991) Interesting Sequence differences between the pilin gene inversion regions of *Moraxella lacunata* ATCC 17956 and *Moraxella bovis* Epp63. Journal of Bacteriology. 173: 4000-4006.
- Rutherford K**, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream M, Barrell B (2000) Artemis: sequence visualization and annotation. Bioinformatics. 16:944-945.
- 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, Fernández 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.
- Saito R**, Miharuru Y, Matsuoka S, Nonaka S, Fujinami Y, Okamura N (2015) The outer membrane protein CD is associated with resistance to penicillins in *Moraxella catarrhalis*. J Glob Antimicrob Resist. 3:224-225.
- Sambrook J**, Fritsch 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.
- Scheller E**, Cotter P (2015) *Bordetella* filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential. *Pathog Dis.* 73:ftv079.
- Seemann T** (2014) Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 30:2068-2069.
- Seferian P**, Martínez M (2000) Immune stimulating activity of two new chitosan containing adjuvant formulations. *Vaccine.* 19:661-668.
- Sekulovic O**, Garrett E, Bourgeois J, Tamayo R, Shen A, Camilli A (2018) Genome-wide detection of conservative site-specific recombination in bacteria. *PLoS Genet.* 14:e1007332.
- Shryock TR**, White DW, Werner CS (1998) Antimicrobial susceptibility of *Moraxella bovis*. *Vet Microbiol.* 61:305-309.
- Silverman M**, Simon M (1983) Phase variation and related systems, In J. Shapiro. 537-557.
- Slatter D**, Edwards M, Hawkins C, Wilcox G (1982) A national survey of the occurrence of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Australian Veterinary Journal*, 59:65-68.
- 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.
- 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**, Umpiérrez A, Acquistapace S, Zunino P (2015) Virulence genes in *Moraxella* spp. isolates from infectious bovine keratoconjunctivitis cases. *J Infect Dev Ctries.* 9:1028-1032.
- 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 J** (1997) Bacterial adhesins: determinants of microbial colonization and pathogenicity. *Adv Pediatr.* 44:43-72.

Steve PC, Lilly (1965) Investigations on transmissibility of *Moraxella bovis* by the face fly. JHJ Econ Entomol. 58:444-446.

Studier F, Moffatt B (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. Journal of Molecular Biology. 189:113-130.

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.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution. 30:2725-2729.

Thrift FA, Overfield JR (1974) Impact of pinkeye (infectious bovine kerato-conjunctivitis) on weaning and postweaning performance of Hereford calves. J Anim Sci. 38:1179-1184.

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.

van Ginkel F, Nguyen H, McGhee J (2000) Vaccines for mucosal immunity to combat emerging infectious diseases. Emerg Infect Dis. 6:123-132.

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.

Weisburg W, Barns S, Pelletier D, Lane D (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology. 173:697-703.

Whitchurch C, Hobbs M, Livingston S, Krishnapillai V, Mattick J (1991) Characterisation of a *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility gene and evidence for a specialised protein export system widespread in eubacteria. Gene. 101:33-44.

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.

Yu R, Schryvers A (2002) Bacterial lactoferrin receptors: insights from characterizing the *Moraxella bovis* receptors. Biochemistry and Cell Biology. 80: 81-90.

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 I

Tabla 1. Medios de cultivos comerciales utilizados en el presente trabajo

Medios de cultivo comerciales	Marca	N° Catálogo
Agar infusión cerebro corazon (Agar BHI)	Oxoid	CM1136B
Caldo infusión cerebro corazon (BHI)	Oxoid	CM1135B
Agar Triptosa Soja (TSA)	Oxoid	CM0131B
Caldo Triptosa Soja (TSB)	Oxoid	CM0129
Agar McConkey	Oxoid	CM0007
Agar bacteriológico	Oxoid	LP0011B

Tabla 2. Medios de cultivos preparados en el presente trabajo

Medios de cultivo preparados	Composición
Caldo Luria Bertani (LB)	Triptona 1%
	Extracto de Levadura 0,5 %
	NaCl 0,5%
Agar Luria Bertani (LB)	Triptona 1%
	Extracto de Levadura 0,5 %
	NaCl 0,5%
	Agar bacteriológico 1.5%

A continuación se describen las composiciones de los diferentes soluciones utilizadas en el presente trabajo:

Solución fisiológica: NaCl 0,9%

TBE: 108 g Tris, 55 g ácido bórico, 40 mL EDTA 0,5 M pH 8,0, en agua destilada c.s.p. 1 L

Buffer de lavado: TBS-Tween (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, NaCl 200 Mm, Tween 20 al 0,5 %)

Buffer de bloqueo: TBS-Tween-3 % Leche descremada (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, NaCl 200 Mm, Tween 20 al 0,5 %, leche descremada en polvo Conaprole al 3 % (p/v))

Buffer de dilución: TBS- Tween- 1 % leche descremada en polvo Conaprole (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, NaCl 200 Mm, Tween 20 al 0,5 %, leche descremada en polvo Conaprole al 1 % (p/v))

Solución del sustrato: Tris 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM

PBS: Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, NaCl 137 mM (pH 7,4)

PBS-T: 1 mL de Tween 20 en 1 L de PBS

Buffer de sensibilización: Buffer carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9,6 (1,58 g Na₂CO₃, 2,9g NaHCO₃ en agua bidestilada c.s.p. 1 litro)

PBS-T-L: PBS, 0,1 % Tween 20, 1 % leche en polvo descremada

Buffer de Glicina: Glicina 0,1 M pH 10,4, con $MgCl_2$ 1 Mm

Buffer Tris-glicina: Tris 0,3 %, glicina 1,9 %, SDS 1 %, pH 8,3

Buffer de muestra: Tris-HCl 125 mM, pH 6.75, glicerol 20 %, SDS 4 %, β -mercaptoetanol 10 % y azul de bromofenol 0,01 %

Colorante de 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

Solución decolorante: etanol 25 %, ácido acético 8 %

ANEXO II

Tabla 1. Programas informáticos utilizados con sus respectivos *links* y usos.

Programas utilizados	Links	Uso
Artemis	https://www.sanger.ac.uk/science/tools/artemis	Visualización de las secuencias genómicas
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Alineamiento de secuencias contra una base de datos conocida
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Base de datos públicos
MEGA 6.0	https://www.megasoftware.net/	Alineamiento de secuencias y generación de filogenia
FastQC	https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/	Análisis de calidad de secuencias
MIRA	http://mira-assembler.sourceforge.net/docs/DefinitiveGuideToMIRA.html	Ensamblador <i>de novo</i>
Spades	http://cab.spbu.ru/software/spades/	Ensamblador
RAST	http://rast.nmpdr.org/	Anotación del genoma
Prokka	https://github.com/tseemann/prokka	Anotación y predicción génica
PSORTb	http://psort1.hgc.jp/form.html	Predicción de la localización subcelular de las proteínas
Burrows-Wheeler Alignment Tool	http://bio-bwa.sourceforge.net/	Alineamiento
CLC Genomics Workbench 11	(https://www.qiagenbioinformatics.com)	Alineamiento y búsqueda de señales de inversión
Expasy Translate	https://web.expasy.org/translate	Traducción de secuencias nucleotídicas
Phyre	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2	Predicción de la estructura secundaria de una proteína
BioEdit	http://www.labtools.us/bioedit-sequence-alignment-editor/	Edición de secuencias
MASCOT	http://www.matrixscience.com/search_form_select.html	Análisis de resultados obtenidos por MALDI-TOF
PAST	https://folk.uio.no/ohammer/past/	Análisis estadísticos