

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Institut de Biotecnologia i Biomedicina

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

EXPRESIÓN RECOMBINANTE EN *E. coli*
DE ANTÍGENOS DE *Actinobacillus pleuropneumoniae*
PARA VACUNACIÓN Y DIAGNÓSTICO

Memoria presentada para adquirir el grado de Doctor en Ciencias (Sección
Biología) por Andrés Medrano Muñoz, Licenciado en Biología

Trabajo realizado en el Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat
Autònoma de Barcelona y en los Laboratorios HIPRA S.A. bajo la dirección de los
Drs. Montserrat Daban i Marin y Enrique Querol Murillo.

Dra. Montserrat Daban

Dr. Enrique Querol

Bellaterra 2003

• <u>Indice General</u>	
• Abreviaturas y acrónimos	I
• Resumen	1
• I Introducción	3
I.A. La pleuroneumonía porcina	3
I.A.1. Definición y alcance	3
I.A.2. Clínica	3
I.A.3. Tratamiento y control	5
I.B. <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	6
I.B.1. Definición y características	6
I.B.2. Factores de virulencia	8
I.B.2.a. Polisacáridos capsulares (CPS)	8
I.B.2.b. Fimbrias	9
I.B.2.c. Lipopolisacáridos (LPS)	9
I.B.2.d. Proteínas de membrana externa (OMP)	10
I.B.2.d.1. Proteínas de unión a transferrina	10
I.B.2.e. Proteasas	13
I.B.2.f. Exotoxinas	13
I.C. Inmunología y vacunas frente a la pleuroneumonía porcina	16
I.D. Diagnóstico de la pleuroneumonía porcina	20
I.D.1. Diagnóstico bacteriológico	21
I.D.2. Diagnóstico serológico	22
I.D.3. Diagnóstico por PCR	24
• II Objetivos	27

• III Material y Métodos	29
III.A. Equipo general	29
III.B. Material biológico	30
Cepas bacterianas	30
Vectores	30
Sueros	31
Anticuerpos secundarios	31
Animales de experimentación	31
III.C. Manipulación de bacterias y plásmidos	31
III.C.1. Medios de cultivo.....	31
III.C.2. Finalidad del cultivo.....	32
III.C.3. Detección de colonias recombinantes en membranas de nitrocelulosa	33
III.C.4. Tampones, disoluciones y antibióticos	34
III.C.5. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	34
III.C.6. Transformación de células competentes	35
III.D. Manipulación del DNA	35
III.D.1. Extracción de DNA genómico	35
III.D.2. Extracción de DNA plasmídico	36
III.D.3. Reacciones enzimáticas	38
III.D.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	40
III.D.5. Recuperación del DNA de geles de agarosa	41
III.D.6. Marcaje radioactivo de una sonda de DNA	41
III.D.7. Transferencia de DNA de geles de agarosa a membranas de nylon	42
III.D.8. Hibridación DNA-DNA	43
III.D.9. Secuenciación	43
III.D.10. Reacción en cadena de la polimerasa	46
III.D.11. Análisis de la secuencia de DNA, traducción a aminoácidos y predicción de la estructura secundaria de la proteína	47
III.E. Manipulación de proteínas.....	47

III.E.1. Electroforesis discontinua desnaturalizante en geles de SDS-PAGE.....	47
III.E.2. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.....	49
III.E.3. Detección de proteínas sobre membranas de nitrocelulosa.....	50
III.E.4. Determinación de la concentración de proteína total. Método de Bradford	51
III.E.5. Producción de proteínas recombinantes en el sistema pET y purificación.....	51
III.F. Pruebas de vacunación	53
III.G. Inmunoensayo ligado a enzima	53
III.G.1. Método de ELISA utilizado en el IBF	54
III.G.2. Método de ELISA utilizado en HIPRA	55
• IV Resultados y discusión	57
IV.A Clonación de los genes <i>tbp1</i> y <i>tbp2</i> . Secuenciación de <i>tbp1</i>	58
IV.B. Expresión de los antígenos proteicos	72
IV.B.1. Expresión del gen <i>tbp1</i>	72
Clonación y expresión de <i>tbp1</i> en el sistema pMAL	72
Clonación de <i>tbp1</i> en pET21a(+). Producción y purificación de Tbp1	73
Subclonaciones para la expresión de fragmentos de Tbp1	77
IV.B.2. Expresión del gen <i>tbp2</i>	78
Clonación de <i>tbp2</i> en pET21a(+). Producción y purificación de Tbp2.....	78
I.B.3. Clonación y expresión de los genes <i>apxI</i> y <i>apxIII</i>	80
Clonación y expresión de <i>apxIA</i> en pET21a(+)	80
Clonación y expresión de <i>apxIIIA</i> en pET21b(+)	82
IV.C. Ensayos de vacunación	84
IV.C.1. Desarrollo de un modelo de infección	84
IV.C.2. Pruebas de vacunación	85
Primera prueba de vacunación	86
Segunda prueba de vacunación	89
Tercera prueba de vacunación	91

Discusión de los resultados de vacunación	93
IV.D. Desarrollo de un ELISA indirecto para el diagnóstico de la pleuroneumonía porcina	97
IV.D.1. Uso de las proteínas recombinantes como antígenos en un ELISA indirecto	97
IV.D.2. Determinación, optimización y estandarización de los reactivos y la técnica.....	100
IV.D.3. Determinación de las características del ensayo	106
IV.D.4. Aplicación y seguimiento del funcionamiento del ensayo	111
• V Conclusiones	115
• VI Bibliografía	117
VII Anexos	129
VII.A. Artículo: Cloning and Sequencing of the Gene Encoding the Outer-Membrane Protein Tbp1 from <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> . Expression of Tbp1 and Tbp2.	
VII.B. Artículo: Cloning Sequencing and Expression of the Transferrin-Binding Protein 1 Gene from <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .	

TABLA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ABTS	2,2'-azinobis ácido-6-etilenbenzotiazolona
Ag	Antígeno
amp	Ampicilina
Apx	Exotoxina de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CIAP	Fosfatasa alcalina de intestino de ternera
Cly	Citolisina
CPLS	Polisacárido capsular
c.s.p.	Cantidad suficiente para
DMAB	Dimetil aminobenzaldehído
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidad óptica
DTT	Di-tiotreitol
EDTA	Etilendiamintetraacético
ELISA	Inmunoensayo ligado a enzima
FP	<i>Forward primer</i> de M13
<i>g</i>	Constante gravitatoria 9,8 m/s
Hly	Hemolisina
HRPO	<u>Peroxidasa de rábano</u>
<i>hsdR17</i>	Sistema de restricción endonucleásico 17
IPTG	β -D-isopropil-tiogalactopiranosido
IRPC	Índice relativo por cien
kb	kilobase
kDa	kilodalton
<i>lacIq</i>	Mutante que superproduce la proteína represora del operón lactosa
<i>lacZAM15</i>	Delección N-terminal en la β -D-galactosidasa
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LPS	Lipopolisacárido
LSI	<i>Laboratoire Service International</i>
MBP	Proteína de unión a la maltosa
MBTH	3-metil-2-benzotiazolinon hidrazona
NAD	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
OMP	Proteína de membrana externa
ORF	Pauta abierta de lectura
<i>proAB</i> ⁺	Mutante que requiere prolina para crecer en un medio mínimo
pb	Par de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PSA	Persulfato amónico
RP	<i>Reverse primer</i> de M13
rpm	Revoluciones por minuto

RTX	<i>Repeat in the toxin</i>
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SSC	Tampón de citrato sódico salino
<i>supE</i> ⁺	Supresora de mutaciones ámbar (UAG)
t.a.	Temperatura ambiente
TAE	EDTA 2mM, tris-acetato 40mM, pH 8,0
TBE	EDTA 2mM, tris-bórico 89 mM, pH 8,3
Tbp	Proteína de unión a la transferrina
<i>tbp</i>	Operón que contiene los genes codificantes para las Tbp 1 y 2
<i>tbp1</i>	Gen que codifica para la proteína Tbp1
<i>tbp2</i>	Gen que codifica para la proteína Tbp2
TE	Tampón Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletilenediamida
Tris	Tris(hidroximetil)-amino-metano
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

Actinobacillus pleuropneumoniae es una bacteria gramnegativa que provoca la pleuroneumonía porcina. En este trabajo se ha procedido a la producción y purificación, mediante técnicas de biología molecular, de antígenos proteicos de esta bacteria y a su uso en la formulación de una vacuna por subunidades y de un ELISA para diagnóstico. Los cuatro antígenos escogidos fueron dos proteínas de membrana externa (Tbp1 y Tbp2) y dos exotoxinas (ApxI y ApxIII).

La primera necesidad consistía en localizar y secuenciar el gen *tbp1* en el genoma de *A. pleuropneumoniae*. Para la detección de *tbp1* se clonó el gen *tbp2*, situado en posición 5' respecto del gen *tbp1*, y se utilizó como sonda. Tras su identificación, el gen *tbp1* fue clonado en el vector pUC119 y se obtuvo su secuencia completa, ésta se depositó en el Genbank con el código de acceso Z49708, habiéndose obtenido su patente europea EP0733708 y americana 08/624655. Finalmente, el resultado de este primer apartado fue publicado (Daban *et al.*, 1996; Medrano *et al.*, 1997) (Anexos VII.1 y VII.2).

Por otro lado, para la clonación de los genes *apxIa* y *apxIIIa* se utilizó una estrategia diferente. Al estar publicadas sus secuencias, se diseñaron cebadores de PCR en los cuales se introdujeron mutaciones que creaban dianas de restricción, permitiendo así la amplificación sobre el genoma y posterior clonación en vectores de expresión.

Una vez clonados los genes codificantes para las cuatro proteínas se pasó a la producción heteróloga en *Escherichia coli*. Para ello se utilizaron diversos vectores: pMAL, que generan como producto de expresión una proteína de fusión con la MBP (*maltose binding protein*) y vectores de la gama pET, con los cuales se ha desarrollado la mayor parte del trabajo. En ellos se han clonado y producido los cuatro antígenos en diversas construcciones, tanto las proteínas completas como péptidos de las mismas. A partir de los extractos obtenidos se procedió a la purificación de los antígenos por cromatografía de afinidad aprovechando fusiones con colas de histidinas.

Tras producir y purificar los cuatro antígenos (ApxI, ApxIII, Tbp1 y Tbp2) a escala de laboratorio, se procedió a la elaboración de una vacuna experimental. Se desarrollaron tres protocolos de vacunación sobre cerdos libres de anticuerpos frente a *A. pleuropneumoniae*. Se estudió la inocuidad y efectividad de esta vacuna.

Se determinó la respuesta humoral a partir de las muestras de suero obtenidas en los ensayos de vacunación mediante técnicas de transferencia Western-blot y de ELISA indirecto. Utilizando estas muestras y otras baterías de sueros de campo de animales con historias clínicas diversas se ha desarrollado un kit de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos frente a *A. pleuropneumoniae*. Los antígenos que se utilizan para la preparación de este ELISA son la Tbp2 y la ApxI producidas de forma recombinante. Este kit se comercializa actualmente bajo el nombre de CIVTEST™_{SUISAPP}.

I. INTRODUCCIÓN

I.A. La pleuroneumonía porcina

I.A.1 Definición y alcance

La pleuroneumonía porcina es una enfermedad respiratoria provocada por la bacteria gramnegativa *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Bendixen *et al.*, 1981). Su presencia ha sido descrita en todos los países con porcicultura industrializada (Rosendal y Boyd, 1982; Straw *et al.*, 1989; Desrosiers, 1986; Rodríguez, 2002). Esta patología presenta una incidencia creciente debido a la intensificación y la masificación en las explotaciones porcinas, siendo claves los intercambios comerciales para la extensión de esta enfermedad.

Las pérdidas económicas debidas a brotes agudos de la enfermedad son atribuibles principalmente a la elevada mortalidad y a los costes de la medicación (Desrosiers, 1986; Maes *et al.*, 2001). A pesar de que hay gran variabilidad en la virulencia, durante un brote agudo la mortalidad puede alcanzar el 100% de los lechones y el 25% de los adultos de engorde. Las pérdidas económicas causadas por los casos crónicos se deben a la disminución en la tasa de crecimiento de los individuos afectados. Según una estimación hecha hace algunos años, en Estados Unidos dichas pérdidas alcanzan los 200 millones de dólares (Rosendal y Boyd, 1982; Straw *et al.*, 1989). En España estas pérdidas pueden ser de 12 a 15 millones de euros anuales (esto último resulta difícil de determinar al no ser una enfermedad de declaración obligatoria). Además, la incidencia se valora muchas veces por la presencia de lesiones pulmonares en matadero, pudiendo haber desaparecido las mismas al llegar a esa etapa.

Para hacernos una idea de la importancia que puede tener la pleuroneumonía porcina debemos pensar que, sólo en España, existen aproximadamente 18 millones de cerdos, cerca de un 30% de los cuales se localizan en Cataluña y que la producción porcina representa más del 50% de la carne consumida en nuestro país.

I.A.2. Clínica

Para la evaluación de la sintomatología clínica provocada por la pleuroneumonía porcina hay que tener en cuenta que los cuadros causados por infecciones respiratorias suelen ser complicados, debido sobre todo a que es normal encontrar infecciones mixtas, polimicrobianas, con interacciones y sinergias que complican tanto el diagnóstico como el posible tratamiento de la enfermedad.

La transmisión de la enfermedad tiene lugar por vía respiratoria, a través del aire en distancias cortas (Torremorell *et al.*, 1997; Savoye *et al.*, 2000) o por transmisión indirecta de exudados contaminados procedentes de cerdos con infección aguda, a través del personal de las granjas. La introducción de animales portadores suele ser la causa de la transmisión entre diferentes explotaciones. En general, se acepta que el agente penetra en las vías respiratorias por inhalación, coloniza las tonsilas y de ahí, a través de la tráquea y los bronquios, llega a los alvéolos pulmonares.

Los síntomas clínicos de la pleuroneumonía porcina varían en función del estado inmunitario de los animales, el estrés producido por condiciones ambientales adversas, el grado de exposición al agente infeccioso y la cepa de la que se trate (Maes *et al.*, 2001). La enfermedad puede presentarse en cerdos de todas las edades, pero son los animales en crecimiento y cebo, entre los 2 y 6 meses de edad, los habitualmente afectados de forma más aguda.

Desde el punto de vista de la sintomatología clínica, la enfermedad se puede presentar en forma sobreaguda, aguda o crónica.

En la forma sobreaguda se observan extensas hemorragias y exudación fibrinosa en el parénquima pulmonar y en la cavidad pleural, definiéndose como una pleuritis fibrinosa y neumonía necrotizante hemorrágica que produce la muerte del animal en un plazo de 24 a 48 horas, o más corto aún en el caso de lechones.

La enfermedad aguda se caracteriza por una intensa respuesta inflamatoria, con hemorragias, edema y exudación fibrinosa, pudiendo provocar la muerte en pocos días.

Los animales que sobreviven a la enfermedad pueden convertirse en portadores crónicos del patógeno, soliendo ser asintomáticos. En estos animales puede agudizarse la enfermedad como consecuencia de otras infecciones o del estrés provocado por el transporte; desarrollan lesiones crónicas, con necrosis pulmonar, secuestros, abscesos, escaras y adherencias fibrinosas en la cavidad pleural (Nicolet, 1992). Estas lesiones solamente se pueden apreciar tras el sacrificio del animal, por lo que estos animales constituyen un doble riesgo: tendrán un índice de crecimiento menor y constituirán una constante amenaza para el contagio y rebrote de la enfermedad.

Es corriente que la infección por *A. pleuropneumoniae* se convierta en endémica en determinadas explotaciones, especialmente en las de ciclo continuo. En estas explotaciones, las madres transmiten el patógeno a su progenie y, al mismo tiempo, los

anticuerpos maternos. Se crea así un estado de equilibrio que evita la infección generalizada hasta que el título de anticuerpos maternos en las crías cae por debajo del límite protector. En este momento el patógeno coloniza las vías respiratorias inferiores y se genera una nueva situación que, en función de una serie de factores, conduce a la infección aguda o a la crónica (Chiers *et al.*, 2002).

I.A.3 Tratamiento y control

Las infecciones por *A. pleuropneumoniae* se han tratado tradicionalmente con diferentes antibióticos, aunque esta estrategia sólo es eficaz durante la fase inicial de la enfermedad (Desrosiers *et al.*, 1986), requiriendo la aplicación de altas dosis por vía parenteral. Además, cada vez resulta menos efectiva debido a la aparición de numerosas cepas portadoras de plásmidos con distintas resistencias, sobre todo a penicilinas y tetraciclinas (Gutiérrez *et al.*, 1993a), como resultado de una administración tradicionalmente indiscriminada. Es por ello que resulta recomendable proceder a un aislamiento previo del agente y a la determinación de su antibiograma para determinar el antibiótico adecuado en cada caso. Los agentes antimicrobianos recomendados en la actualidad son principalmente las cefalosporinas y las quinolonas, por ser los que, dentro del grupo de antibióticos frente a los que se han detectado un menor porcentaje de cepas resistentes, presentan mejor capacidad inhibidora a menores concentraciones (Rodríguez *et al.*, 2002).

La estrategia más efectiva y económicamente más rentable es un manejo de los animales basado en un diagnóstico combinado por serología y sintomatología clínica. En general, el tratamiento se hará siempre en función del porcentaje de animales seropositivos y de los efectos clínicos que éstos puedan presentar, siendo siempre necesario un correcto diagnóstico (aspecto que trataremos en el apartado I.D).

En las explotaciones libres la atención se centra siempre en el control de los animales de reposición, sobre los que será necesario aplicar una cuarentena y un control serológico exhaustivo para detectar animales con infecciones subclínicas, combinándolos, si es posible, con ensayos de detección de antígeno en vías respiratorias superiores. Ésta es una de las estrategias utilizadas en países con programas de erradicación, como es el caso de Dinamarca. Es precisamente en las explotaciones libres donde la entrada de un portador puede provocar brotes más virulentos.

El porcentaje de animales seropositivos dentro de una explotación es muy variable (Maes *et al.*, 2001). Resulta importante conocer la serología de los diferentes grupos de edad dentro de una explotación, el seroperfil, para determinar las posibles vías de entrada del patógeno y las medidas de control más adecuadas. Sólo cuando el porcentaje de animales seropositivos es inferior al 30% resulta posible mantener un control efectivo de la enfermedad. Para ello, se separan los animales seropositivos y se les somete a medicación intermitente dirigida a evitar la aparición de síntomas clínicos. Sobre todo es crítico el manejo de las cerdas y los lechones: seguimiento serológico de ambos grupos, destete precoz y creación de grupos de aislamiento por edades. Son medidas que minimizan la transmisión vertical y horizontal dentro de las explotaciones.

Cuando el porcentaje de seropositivos es alto y los síntomas clínicos son claros resulta imposible un control basado únicamente en el manejo y la medicación selectiva. Se impone entonces un sacrificio parcial o total de los animales y una reposición controlada.

Además del tratamiento terapéutico se han realizado numerosos intentos de desarrollar una buena profilaxis basada en estrategias de vacunación (aspecto que trataremos en el apartado I.C).

I.B. *Actinobacillus pleuropneumoniae*

I.B.1. Definición y características

A. pleuropneumoniae es una bacteria gramnegativa de la familia Pasteurellaceae, clasificada en el Manual Bergey (Holt *et al.*, 1994) dentro del subgrupo 3 del grupo 5, “Bacilos gramnegativos anaerobios facultativos”. Es un cocobacilo pleomórfico (véase la Figura I.1). Es capsulado y no esporulado y puede presentar formas filamentosas cuando las condiciones de crecimiento no son las óptimas. Se le consideraba inmóvil hasta que recientemente se ha descrito la presencia de flagelo y se ha observado movilidad *in vitro* (Negrete *et al.*, 2002).

Inicialmente se utilizó el nombre de *Haemophilus pleuropneumoniae* y también el de *Haemophilus parahaemolyticus*, estas designaciones se abandonaron y se pasó a incluir esta especie en el género *Actinobacillus* tras demostrarse por estudios de homología del DNA la estrecha relación con *A. lignieresii* (Pohl *et al.*, 1983).

El tamaño aproximado del genoma de esta bacteria es de unos 2,4 Mpb, con un contenido en G+C del 42,1% (Rodríguez, 2002). Se han determinado diversos mapas de restricción parcial del cromosoma, correspondientes a diferentes serotipos (Chevallier *et al.*, 1998; Oswald *et al.*, 1999).

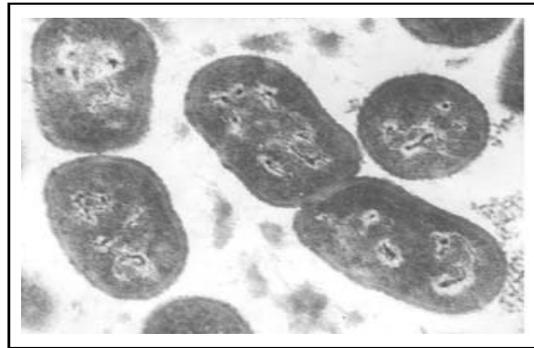


Figura I.1. Imagen de microscopía electrónica de *A. pleuropneumoniae*. Obtenida de www.affrc.go.jp/AVEM/Japanese/atlas/bacteria0.html.

Según su requerimiento de NADH se han descrito dos biotipos. El biotipo I, dependiente de NADH, comprende un total de 12 serotipos de *A. pleuropneumoniae* y engloba, en general, las cepas más virulentas (Desrosiers, 1986; Dom y Haesebrouck, 1992). En este grupo se encuentran los serotipos 1 y 5, cada uno de los cuales se divide en a y b (Musser *et al.*, 1987). El biotipo II, por su parte, reúne las cepas independientes de NADH, distinguiéndose tres serotipos. La determinación del serotipo se basa en los polisacáridos capsulares y los LPS (lipopolisacáridos) de membrana externa. En España se ha descrito la presencia de todos los serotipos del biotipo I, con predominio del 2, el 4 y el 7 (Gutiérrez *et al.*, 1997). Los serotipos más virulentos son los del biotipo I, dentro de estos hay grandes diferencias de virulencia entre serotipos e incluso cepas, en general los serotipos 1, 3, 5, 9, 10 y 11 se consideran los que provocan patologías más graves (Komal *et al.*, 1990).

A pesar de que la pleuroneumonía porcina resulta el efecto patológico principal y más conocido de *A. pleuropneumoniae*, no se descarta totalmente su posible implicación como factor etiológico en otros trastornos como la otitis (Duff *et al.*, 1996). Se ha descrito la presencia de esta bacteria en otros órganos no pertenecientes al sistema respiratorio porcino (Madsen *et al.*, 2001), como cerebro, riñón o corazón, asociada con casos de meningitis, nefritis o peri- y endocarditis, respectivamente. No obstante, a pesar de detectarse su presencia, no se ha podido demostrar su papel en estas patologías.

Por lo que respecta a la especificidad de hospedante, ésta es prácticamente total para la especie porcina, a pesar de lo cual se han descrito casos individuales de aislamiento a partir de lesiones artríticas en cordero y ternero (Gutiérrez *et al.*, 1997). Esta especificidad ha dificultado el desarrollo de modelos experimentales de infección en animales de laboratorio, a pesar de que se han descrito diversos experimentos exitosos de reproducción de la enfermedad, tanto en ratones como en ratas (Oishi *et al.*, 1993; Montaraz *et al.*, 1994). La utilidad de estos modelos ha sido puesta en duda (Rioux, 1998), y se ha descrito su utilidad solamente para emular infección aguda.

I.B.2. Factores de virulencia

Los factores de virulencia de *A. pleuropneumoniae* que intervienen en el desarrollo de la pleuroneumonía porcina son numerosos. La importancia relativa y el papel que juega cada uno de ellos en la patogenicidad son aspectos aclarados tan sólo parcialmente. A continuación describimos brevemente algunos de los más importantes, extendiéndonos algo más en las proteínas de unión a la transferrina y en las exotoxinas, proteínas en las cuales se ha basado este trabajo:

I.B.2.a Polisacáridos capsulares (CPS)

Todas las cepas de *A. pleuropneumoniae* poseen una cápsula que les protege parcialmente frente a la fagocitosis y a la lisis mediada por el complemento, tanto en presencia de anticuerpos específicos (vía clásica), como en ausencia de éstos (vía alternativa), lo cual se observó estudiando la acción del complemento sobre mutantes sin cápsula (Inzana *et al.*, 1988). Esta estructura se localiza alrededor de la membrana externa. Está formada por polisacáridos lineales no ramificados compuestos por subunidades disacáridas repetidas (Bertram, 1990) y es el antígeno utilizado para definir el serotipo. Se conoce también como antígeno K.

La cápsula contribuye a la virulencia del agente (Jensen *et al.*, 1986; Inzana *et al.*, 1988; Ward e Inzana, 1994; Ward *et al.*, 1998). Los anticuerpos dirigidos contra ella opsonizan la bacteria, pudiendo jugar un cierto papel en la protección parcial específica de serotipo inducida por la vacunación con bacterinas (Inzana *et al.*, 1988). La presencia de anticuerpos frente a la cápsula evita la mortalidad, pero no impide el desarrollo de

lesiones pulmonares (Hensel *et al.*, 1994). Se conoce la región del genoma donde se encuentran los genes implicados en la exportación de los CPS (Ward e Inzana, 1996).

I.B.2.b Fimbrias

Se ha descrito la presencia de fimbrias de 0,5 a 2 nm de diámetro y de 60 a 450 nm de longitud, identificadas por microscopía electrónica (Utrera y Pijoan, 1991). Éstas desaparecen con los primeros pases *in vitro*. Resultarían fundamentales para la adhesión al epitelio respiratorio.

I.B.2.c Lipopolisacáridos (LPS)

Son los componentes más abundantes de la membrana externa de las bacterias gramnegativas y se ha propuesto que juegan un papel básico en la adherencia esta bacteria al tracto respiratorio (Paradis *et al.*, 1994). Esto ha sido refrendado por la pérdida de adherencia en mutantes defectivos (Jacques, 2002). Los LPS consisten en una fracción polisacárida y una lipídica, siendo esta última una endotoxina. El polisacárido, llamado antígeno O, está integrado por un núcleo de ácido 3-desoxi-D-manoctulosónico, glucosa, heptosa y cadenas laterales (que incluyen repeticiones de oligosacáridos ramificados o lineales, según el serotipo), el antígeno O. El lípido, llamado antígeno A, está compuesto por ácidos grasos, grupos fosfato y glucosa.

En función del tipo de LPS se pueden clasificar los serotipos de dos formas distintas. Una de ellas, basada en la región del núcleo del LPS, distingue dos grupos: el primero comprende los serotipos 1, 6, 9 y 11, y el segundo engloba al resto (Jacques *et al.*, 1996). La otra clasificación se basa en la cadena lateral O, que se presenta completa en los serotipos 2, 4 y 7 (lisos), parcial en los serotipos 1 y 5 (semirrugosos) o ausente en el 3 y el 6 (rugosos) (Rodríguez, 2002).

Se han descrito cepas menos virulentas, caracterizadas por tener un menor contenido en LPS por gramo de peso seco (Jensen, 1986). Los LPS purificados inducen lesiones pulmonares no necróticas ni hemorrágicas en los cerdos, lo cual indica que no son responsables de las típicas lesiones producidas por el agente, si bien pueden contribuir a su formación (Jansen, 1994a).

I.B.2.d. Proteínas de membrana externa (OMP)

Son las moléculas más conservadas de la estructura externa bacteriana. Su perfil electroforético varía según la disponibilidad de diversos nutrientes y puede diferir entre los diferentes serotipos de *A. pleuropneumoniae* (Rapp *et al.*, 1986), si bien existen tres proteínas (de 14, 32 y 42 kDa) que se presentan inmunológicamente dominantes (MacInnes y Rosendal, 1987; Beaudet *et al.*, 1994). En 1989 se identificó, además, otra proteína de 24 kDa que se expresaba, en presencia de maltosa, en los serotipos 1, 2, 3, 5, 6 y 7 (Deneer y Potter, 1989a). Posteriormente, se caracterizaron otras dos proteínas: una lipoproteína de 40 kDa (lipoproteína OmlA), presente en los serotipos 1, 2, 5a, 8, 9, 11 y 12 (Gerlach *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1995) y una proteína de 48 kDa, común en los doce serotipos del biotipo I (Cruz *et al.*, 1996). Se ha observado que los sueros de animales convalecientes reconocen diversas OMP, que este reconocimiento favorece la opsonización (Thwaites *et al.*, 1993) y que la inmunización con un extracto crudo de membranas externas confiere una protección limitada frente al desafío con *A. pleuropneumoniae* (Beaudet *et al.*, 1994).

I.B.2.d.1. Proteínas de unión a transferrina

Son OMPs con un especial interés vacunal. Su importancia como factores de virulencia ha sido demostrada por la atenuación que se obtiene en cepas defectivas (Baltes *et al.*, 2002). Además, la inmunización de cerdos con proteínas de unión a transferrina confiere cierta protección frente al desafío con el agente patógeno (Rossi-Campos *et al.*, 1992; Gerlach *et al.*, 1993).

Estas proteínas se expresan en condiciones de carencia de hierro. Este elemento es esencial para el crecimiento bacteriano aunque resulta de difícil acceso, ya que se encuentra acomplejado en el medio extracelular con las glucoproteínas del hospedante (transferrina y lactoferrina). Éste es el motivo por el cual las bacterias patógenas han desarrollado diferentes estrategias dirigidas a la obtención del hierro. Así, las especies de los géneros *Actinobacillus*, *Pasteurella* y *Haemophilus* poseen un mecanismo de adquisición de hierro que implica la unión directa de la transferrina del hospedante a receptores proteicos situados en la superficie del patógeno. Dichos receptores se expresan tan sólo bajo condiciones de restricción de hierro (Deneer y Potter, 1989b; González *et al.*, 1990), y están constituidos por dos proteínas distintas: Tbp1 y Tbp2 (también conocidas como TbpA y TbpB), específicas para la transferrina del hospedador. En el caso de *A.*

pleuropneumoniae presentan unión específica para la región C terminal de la transferrina porcina (González *et al.*, 1995), hecho que podría constituir una de las claves de su limitación a la especie porcina (Litt *et al.*, 2000).

La proteína Tbp1 es una proteína transmembrana de 110 kDa que funciona como canal de transporte de hierro a través de la membrana externa. En este trabajo se describe la clonación y secuenciación del gen *tbp1* de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1.

La Tbp2 es una lipoproteína de 60 a 70 kDa que se encuentra anclada a la membrana externa mediante una cola lipídica N-terminal (Yu y Schryvers, 1994). Esta proteína es modificada y procesada secuencialmente por la gliceril y O-aciltransferasa, la peptidasa señal II y la N-aciltransferasa, resultando en una proteína madura que presenta una cadena triple-acil unida a su residuo de cisteína N-terminal. El péptido señal, eliminado en este proceso, consta de 19 aminoácidos. La variabilidad de Tbp2 entre los diferentes serotipos es mucho mayor que la de Tbp1, lo cual podría ser debido a una mayor accesibilidad de la primera (Vonder Haar *et al.*, 1994). Se definen 3 variantes de Tbp2 según el serotipo: la primera, una Tbp2 de 70 kDa, se presenta en los serotipos 1, 6, 8 y 12; el segundo tipo corresponde a los serotipos 2, 3, 4, 7, 9, 10 y 11 que expresan una Tbp2 de 60 kDa. Finalmente, en el serotipo 5 se expresa una variante de 65 kDa (Gerlach *et al.*, 1992; Bog *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2002).

Ambas proteínas, Tbp1 y Tbp2, se encuentran asociadas entre ellas merced a su disposición que implica un contacto íntimo entre ambas proteínas. Esta disposición parece facilitar su funcionalidad y reforzar la unión de la transferrina. Existe alguna hipótesis sobre qué regiones de cada proteína están implicadas en dicha interacción (Bog *et al.*, 2001), y se ha logrado demostrar, comparando proteínas Tbp de diferentes especies relacionadas, que se trata de dominios conservados (Fuller *et al.*, 1998). En la Figura I.2 se presenta un modelo de este sistema.

El proceso de captación del hierro unido a la transferrina por parte del sistema Tbp, interesa a otros componentes además de las proteínas Tbp1 y Tbp2. Es un proceso dependiente de energía, aportada por un complejo proteico, ExbD - ExbB, localizado en la membrana interna. Cuando un protón atraviesa el complejo en dirección al espacio periplasmático, provoca un cambio conformacional en una proteína de tipo TonB (proteína necesaria para la transducción de energía desde la membrana citoplasmática en procesos que ocurren en la membrana externa), encargada de proporcionar la energía

necesaria al par Tbp1/Tbp2 (Higgs *et al.*, 1998). La interacción de la transferrina con el complejo Tbp1/2 y la transducción de energía por parte de la proteína de tipo TonB conducen a un cambio conformacional en la molécula de transferrina y a la liberación de cationes férricos. Estos iones son transportados a través de Tbp1 y se asocian con la proteína periplásmica Fbp. Ésta transporta un catión férrico desde el espacio periplásmico hacia un complejo de permeasas de la membrana interna (Fpc1 y Fpc2) que transloca el ión Fe^{3+} hacia el citoplasma, Figura I.2. La transferencia de hierro a través de la membrana interna conlleva la reducción del ión férrico a ferroso, aumentando así su biodisponibilidad.

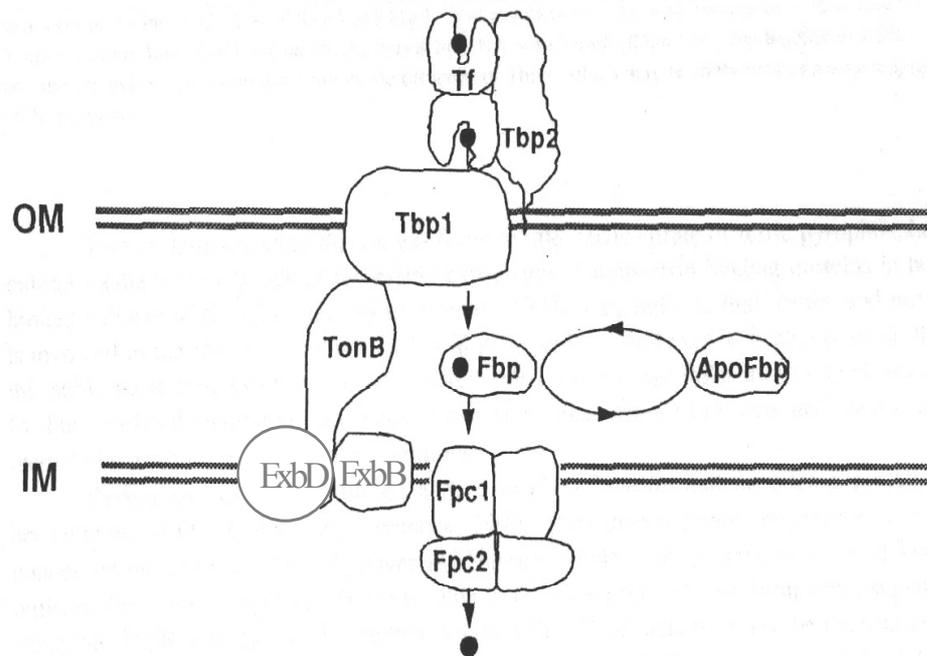


Figura I.2. Modelo de la captación de hierro en *A. pleuropneumoniae* a partir de la transferrina porcina mediante el sistema Tbp. Tbp: proteína de unión a transferrina; OM: membrana externa; IM: membrana interna; Tf: transferrina; Fbp: proteína periplásmica de unión a hierro; Fpc: permeasa de unión a hierro.

La interacción entre las Tbp y el sistema dependiente de TonB no se limita a aspectos funcionales, puesto que también la genética de ambos sistemas está íntimamente coordinada: se ha demostrado que los genes *tonB*, *exbB* y *exbD* se localizan adyacentes en posición 5' a los genes *tbp*, pudiéndose transcribir conjuntamente *exbB*, *exbD*, *tbp2* y *tbp1* (Tonpitak *et al.*, 2000). Además, se ha observado la incapacidad de ciertos mutantes $\Delta exbB$ de provocar la infección (Baltes *et al.*, 2001), lo cual pone a la vez de manifiesto la

importancia capital del sistema Tbp de obtención de hierro para la virulencia de este microorganismo.

I.B.2.e Proteasas

A. pleuropneumoniae secreta proteasas capaces de degradar la gelatina porcina, las IgA y la hemoglobina (Negrete-Abascal *et al.*, 1994), acción esta última que podría dirigirse a facilitar la colonización de las mucosas y la obtención del hierro combinado en esta proteína plasmática. Se ha observado, al menos *in vitro*, que estas proteasas se secretan al medio englobadas en vesículas que contienen también exotoxinas (Negrete-Abascal *et al.*, 2000).

I.B.2.f Exotoxinas

Proteínas con actividad tóxica que se secretan durante el proceso infeccioso. Son fuertemente inmunógenas y poseen actividad hemolítica y/o citotóxica. *A. pleuropneumoniae* produce cuatro exotoxinas:

Hemolisina I o Apx I: proteína de 105 kDa, con actividades hemolítica (Frey y Nicolet, 1988a) y citotóxica (Kamp *et al.*, 1991) fuertes.

Hemolisina II o Apx II: proteína de 103 kDa, presenta actividad hemolítica débil y citotóxica moderada (Kamp *et al.*, 1991).

Citolisina III o Apx III: proteína de 120 kDa, posee actividad citotóxica fuerte (Kamp *et al.*, 1991).

Apx IV: proteína de 202 kDa, con actividad hemolítica débil. Su identificación más tardía se debe principalmente a que no se expresa en cultivos *in vitro* de *A. pleuropneumoniae* (Schaller *et al.*, 1999).

Estas cuatro toxinas pertenecen a la familia de toxinas RTX formadoras de poros, ampliamente distribuidas entre bacterias patógenas gramnegativas. Su toxicidad se dirige contra macrófagos alveolares y neutrófilos (Bendixen *et al.*, 1981; Udeze y Kadish, 1992, Cullen y Rycroft, 1994; Jansen *et al.*, 1995b; Tarigan *et al.*, 1994), cuya membrana perforan, provocando un choque osmótico que conduce a la muerte celular (Lalonde *et al.*, 1989; Welch, 1991). La importancia de estas exotoxinas como factores de virulencia se demuestra no tan sólo por su acción tóxica directa, sino también por la atenuación

conseguida con cepas mutantes o defectivas para estas proteínas (Tascón *et al.*, 1994; Jansen *et al.*, 1995b; Reimer *et al.*, 1995; Stokhofe-Zurweiden *et al.*, 1996).

La distribución de las Apx en los distintos serotipos del biotipo I queda reflejada en la Tabla I.1. Es posible encontrar, sin embargo, algunas cepas de campo que no cumplen el patrón de Apx característico de su serotipo.

Tabla I.1. Apx expresadas por los diferentes serotipos de *A. pleuropneumoniae*

Combinación de Apx	Serotipos
Apx I y IV	10
Apx I, II y IV	1, 5a, 5b, 9 y 11
Apx II y IV	12
Apx II, III y IV	2, 3, 4, 6, 7 y 8

Los serotipos del biotipo II normalmente expresan tan sólo la ApxII, lo cual podría ser parte de la explicación de su menor virulencia (Dom *et al.*, 1994).

Se han clonado y secuenciado los genes estructurales de las proteínas ApxI (Frey *et al.*, 1991b), ApxII (Smits *et al.*, 1991; Frey *et al.*, 1992), ApxIII (Jansen *et al.*, 1993) y ApxIV (Schaller *et al.*, 1999).

Los genes de las Apx están organizados en operones, Figura I.3., que en el caso de las hemolisinas ApxI y III presentan 4 genes contiguos: *C*, *A*, *B* y *D*, mientras que para la ApxII sólo se han encontrado los genes *C* y *A*, por lo que necesita para su secreción la complementación en *trans* de los productos de los genes *B* y *D* del operón de la otra hemolisina presente en cada caso (MacDonald y Rycroft, 1993). El orden de estos genes en el operón es 5' *CABD* 3' (Chang *et al.*, 1993; Jansen *et al.*, 1994b). Su transcripción da lugar a dos especies de RNA, una mayoritaria que contiene el transcrito para *CA* y otra menos abundante que constituye el transcrito *CABD*. El gen *A* codifica la protoxina estructural, la cual activa postraduccionalmente, mediante una reacción de acilación, el producto del gen *C*. Los productos de los genes *B* y *D* codifican para proteínas asociadas a membrana, necesarias para la secreción de la toxina.

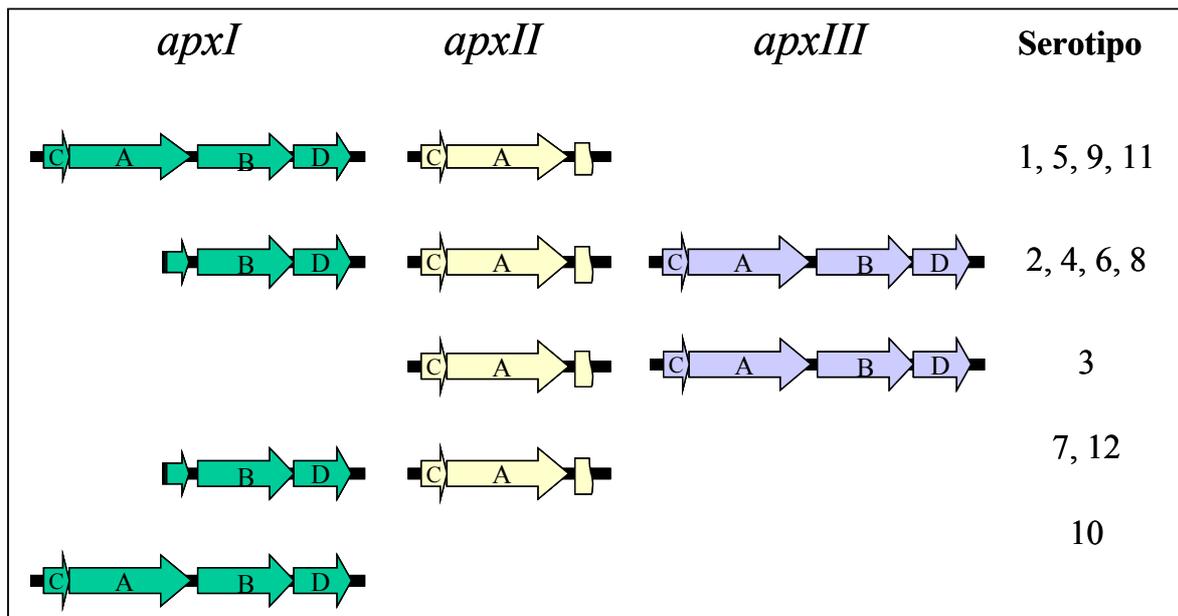


Figura I.3. Esquema de los operones *apx*. Se muestran tanto los operones completos como los incompletos que sirven para complementar en trans para los genes de transporte. C: gen de la proteína activadora. A: gen codificante para la exotoxina, B y D: genes de las proteínas de transporte.

La regulación de la transcripción del operón *apx* parece llevarse a cabo por la proteína Hlx, que se expresa en condiciones de falta de hierro o de anoxia. Esta proteína es homóloga a la proteína FNR de *Escherichia coli* (Soltes y MacInnes, 1994).

Existen elementos en común entre estas proteínas y las exotoxinas RTX de otros microorganismos, como entre la α -hemolisina de *E. coli* y la ApxI, o la LktA (leucotoxina) de *Pasteurella haemolytica* y la ApxII y, en menor grado, la ApxI (Koronakis *et al.*, 1987; Strathdee y Lo, 1989; Chang *et al.*, 1989). Este tipo de proteínas se caracteriza por la presencia de tres dominios hidrofóbicos en la región N-terminal, un dominio formado por nonapéptidos repetidos ricos en glicina, localizado en la segunda mitad de la proteína y finalmente una región hidrofílica en el extremo C-terminal (Coote, 1992).

También se ha descrito la producción de toxinas de la familia RTX en otras especies de *Actinobacillus*. Son análogas a ApxI y ApxII en el caso de *A. suis* y a ApxII en *A. rossii*. En otras especies como *A. lignieresii*, *A. seminis* y *A. equuli* están ausentes, aunque hay proteínas de peso molecular algo menor que muestran cierta reacción serológica cruzada (Schaller *et al.*, 2000).

Todas las Apx requieren Ca^{2+} para su actividad, ión que posiblemente se une a los dominios ricos en glicina del extremo C terminal (van Leengoed *et al.*, 1992). La actividad

hemolítica de estas exotoxinas podría ser la responsable de las hemorragias y las lesiones necróticas observadas, por lo que se contemplan como los principales factores de virulencia del patógeno (Smits *et al.*, 1992; Cruijssen *et al.*, 1996). La función biológica de las exotoxinas es diversa: permiten la liberación de NADH y grupos hemo a partir de los eritrocitos y ayudan a neutralizar la acción de los macrófagos (Udeze y Kadish, 1992; Jansen, 1995a; Cullen y Rycroft, 1994).

La actividad hemolítica más fuerte es la debida a la proteína ApxI (Frey y Nicolet, 1988a; Devenish *et al.*, 1990; Kamp *et al.*, 1991). Por su gran inmunogenicidad (Frey y Nicolet 1991a) consideramos inicialmente que se trataba de una proteína interesante para nuestros objetivos, tanto en la formulación de una vacuna como en el diseño de un método para diagnóstico.

Se ha obtenido protección parcial mediante inmunización de cerdos con RTX, en combinación con otros componentes bacterianos (Beaudet *et al.*, 1994). La presencia de anticuerpos neutralizantes frente a las exotoxinas determina una menor susceptibilidad a la infección (Cruijssen *et al.*, 1995a; Devenish *et al.*, 1990). Además, se ha visto que todos los animales que sobreviven a la infección presentan títulos elevados de anticuerpos frente a las hemolisinas (Stine *et al.*, 1994). No obstante, como ya hemos comentado anteriormente, resulta evidente que estas toxinas no son los únicos factores necesarios para generar una respuesta protectora.

I.C. Inmunología y vacunas frente a la pleuroneumonía porcina

La respuesta serológica es fundamental para la protección frente a *A. pleuropneumoniae*, habiéndose demostrado la correlación entre la presencia de esta respuesta humoral y el nivel de protección frente a la infección.

El perfil serológico de los animales que han sido expuestos presenta respuestas claramente definidas frente a la cápsula, los LPS (sobre todo el antígeno O), las OMPs y muy marcadamente frente a las Apx. Se ha comprobado, además, la ocurrencia de inmunización pasiva por transferencia de suero positivo y por vía materna (Bossé *et al.*, 1992; Oishi *et al.*, 1993; Chiers *et al.*, 2002). Los anticuerpos transmitidos por vía calostrual pueden persistir hasta nueve semanas, aunque a partir de las tres semanas de vida sus niveles disminuyen por debajo del umbral mínimo de protección (Nicolet, 1992). Esto

concordaría con la detección, por PCR, de antígeno en animales a partir de las 4 semanas de edad, cuando esta técnica se aplica en explotaciones con infecciones endémicas (Chiers *et al.*, 2002).

El microorganismo penetra por las vías respiratorias superiores, pudiendo colonizar en primer lugar las tonsilas. Debido a que las mucosas son la primera vía de contacto con el microorganismo, el papel de las IgA en esta etapa inicial es importante. La presencia de estas inmunoglobulinas en los fluidos nasales y broncoalveolares resulta básica para la opsonización y neutralización de la bacteria, antes de que ésta pueda alcanzar las vías respiratorias inferiores (Loftager y Eriksen, 1993). A las IgA les suceden las IgG, detectables en suero en estados más avanzados de la infección. Tras haber penetrado en las vías respiratorias se adhiere a la mucosa por acción combinada de las fimbrias, cápsula y lipopolisacáridos. Una vez en el pulmón se adhiere a los macrófagos alveolares y produce las exotoxinas, estas, son tóxicas para los macrófagos alveolares, las células endoteliales y epiteliales. La acción combinada de estas exotoxinas y la protección conferida por la cápsula permite eludir la barrera leucocitaria.

Además del papel jugado por los anticuerpos, la infección provoca la secreción de numerosas citoquinas inflamatorias, especialmente las IL-1 e IL-8 que podrían ser importantes en la respuesta local en alvéolos. Éstas aparecen al cabo de dos horas de iniciarse la infección y provocan la infiltración de neutrófilos y de macrófagos, lo cual puede contribuir a la formación de lesiones en el tejido pulmonar (Baarsch *et al.*, 1995). Como respuesta al estímulo de las endotoxinas se secretan también IL-1 y TNF, factores que generan hipertensión, fiebre y, eventualmente, contribuyen al choque séptico.

A partir de la demostración de la importancia que reviste la respuesta serológica en la protección frente a la infección, se han sucedido numerosos intentos de formular un compuesto vacunal capaz de inducir una respuesta protectora frente a esta enfermedad. No obstante, no se han logrado desarrollar hasta el momento métodos eficaces que induzcan una protección frente a la pleuroneumonía porcina. Las vacunas diseñadas hasta la fecha sólo proporcionan una protección limitada, disminuyendo o eliminando la mortalidad y reduciendo la aparición de lesiones. Sin embargo, no impiden la infección y su utilidad se ve reducida frente a serotipos heterólogos.

Se han utilizado diferentes estrategias en los numerosos intentos de formular compuestos vacunales. Podemos distinguir tres tipos de vacunas: las basadas en bacterinas, las de subunidades o las que utilizan cepas atenuadas.

Las bacterinas son preparados del microorganismo completo, inactivados por calor (a 60°C durante 2 horas) o formol (formaldehído 0,2%). La vacunación mediante bacterinas reduce y, en ocasiones, elimina completamente la mortalidad provocada por la infección con serotipos homólogos, pero generalmente no confiere protección heteróloga (Bossé *et al.*, 1992). Además, no impide ni el desarrollo de lesiones pulmonares ni la colonización por parte del microorganismo (Loftager *et al.*, 1993). Una posible explicación de esta protección limitada sería la ausencia de factores de virulencia secretados, como citolisinas y hemolisinas inmunógenas así como de ciertas proteínas de membrana externa, que no se expresarían en organismos cultivados *in vitro* e inactivados (Fedorka-Cray *et al.*, 1990). Esta reducida protección puede también ser el resultado de la desaparición de epítomos, desnaturalizados como consecuencia del tratamiento previo con formalina que se efectúa para inactivar las bacterinas. Esta hipótesis parece confirmarse por la obtención de una mejor protección utilizando bacterinas mejoradas, consistentes en estructuras externas de *A. pleuropneumoniae* obtenidas por lisis de la bacteria que no requieren ningún tratamiento que pueda desnaturalizar los antígenos (Hensel *et al.*, 2000).

La alternativa a la vacunación con bacterinas parece ser el uso de Apx y de ciertas proteínas de membrana externa, especialmente las proteínas de unión a transferrina, ya sea como vacunas por subunidades o como complementos en la formulación de vacunas con bacterinas.

Atendiendo a la demostración de la importancia de las Apx como factores de virulencia y de que provocan una respuesta neutralizante que confiere protección (Bendixen *et al.*, 1981; Fedorka-Cray *et al.*, 1990; Crujisen *et al.*, 1995a), se han llevado a cabo varios intentos de vacunación en los que se han utilizado estas toxinas como antígenos. En concreto, se ha comprobado que la vacunación con una preparación de ApxI+ApxII obtenida a partir del serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae* evitaba la mortalidad, en cerdos infectados con el propio serotipo 1, a pesar de que se detectaban lesiones pulmonares en los cerdos inmunizados (Devenish *et al.*, 1990). Posteriormente se ensayaron conjugados de Apx con polisacáridos capsulares. Aunque se consiguió un

efecto combinado de neutralización de la toxina y de opsonización de la bacteria, no se pudo demostrar protección frente a la infección (Byrd y Kadis, 1992). En cambio, la combinación de una preparación cruda de ApxI y ApxII del serotipo 1 con un extracto celular ofrecía buena protección contra la infección por los serotipos 1 y 5 (Beaudet *et al.*, 1994). Resultados equivalentes se obtuvieron utilizando estas proteínas producidas de manera recombinante (Ike *et al.*, 1996). Tras la vacunación con ApxII y una OMP de 60 kDa (posiblemente la Tbp2), ambas del serotipo 7 y obtenidas de forma recombinante, se obtuvo también una protección específica de serotipo (Rossi Campos *et al.*, 1992).

Dado que el patrón de expresión de las hemolisinas varía entre serotipos, es necesario contar tanto la ApxI como la ApxIII si se desea obtener una respuesta cruzada (Kamp *et al.*, 1992). La protección inducida por una vacuna que contiene ApxI, ApxII, ApxIII y una OMP de 42 kDa presente en todos los serotipos (combinación en la que se basa un preparado comercial), ha resultado ser la más eficaz de todas las mencionadas (van den Bosch *et al.*, 1992). También se han llevado a cabo pruebas de vacunación con bacterinas junto a hemolisinas obtenidas a partir de cultivo, aunque los datos de protección publicados no son concluyentes (Tarasiuk *et al.*, 1996).

Debido a la importancia de su función y a su accesibilidad, por su situación en la superficie bacteriana e importancia de su función, las proteínas de unión a transferrina (Tbp) se han considerado también antígenos con un gran potencial vacunal. Al igual que ocurre con otros antígenos de superficie (Thwaites y Kadis, 1991; Byrd *et al.*, 1992), los anticuerpos frente a las proteínas de membrana externa como las Tbp actúan como buenas opsoninas, promoviendo la acción de los fagocitos porcinos (Thwaites *et al.*, 1991). Su eficacia para inducir protección ha sido demostrada con Tbp nativas y con una Tbp2 recombinante (Rossi-Campos *et al.*, 1992). Parece ser que la variabilidad entre las Tbp2 de los diferentes serotipos no representa un gran obstáculo a una protección cruzada, ya que la región de la proteína principalmente reconocida por anticuerpos es la C-terminal, que también es la más conservada entre los diferentes serotipos (Stutzberg *et al.*, 1995). Recientemente se ha descrito un preparado inmunógeno basado en el sobrenadante de un cultivo obtenido en condiciones de restricción de hierro, compuesto básicamente por hemolisinas y proteínas no integrales de membrana externa, entre ellas la Tbp2. Según los autores, este preparado proporciona protección completa frente a serotipo homólogo (Goethe *et al.*, 2001).

Además de las inmunizaciones basadas en bacterinas o en subunidades, también se han ensayado vacunas basadas en cepas atenuadas. Para obtener estas variantes se han seguido múltiples estrategias: aislamiento de cepas de campo (Jensen y Bertram, 1986), inactivación por pases *in vitro* (Inzana *et al.*, 1993a), mutagénesis química (Inzana *et al.*, 1993b) y mutagénesis dirigida (Prideaux *et al.*, 1999; Fuller *et al.*, 2000; Ingham *et al.*, 2002). Un ejemplo de cepa atenuada procedente de un aislamiento de campo es la CM5 (Jensen y Bertram, 1986; Rosendal y McInnes, 1990), caracterizada por tener una cápsula reducida y un menor contenido de LPS. La inmunización con esta cepa protegía frente a la mortalidad pero no contra la aparición de lesiones tras la exposición a una cepa virulenta. Por lo que respecta al uso de cepas atenuadas por mutagénesis química, la bibliografía recoge una cepa mutante sensible a la temperatura que crecía a 30°C pero no a 40°C (Inzana *et al.*, 1993b). Y, por último, han sido numerosos los ensayos utilizando cepas atenuadas por mutagénesis dirigida, de las cuales aquí citaremos tan sólo algunos ejemplos. La inactivación del gen *apxIIC*, necesario para la activación de la hemolisina II, ha dado como resultado una cepa atenuada que proporciona protección cruzada entre serotipos en condiciones experimentales (Prideaux *et al.*, 1999). Otro ejemplo es el de una cepa auxótrofa para la riboflavina, construida por reemplazamiento de parte del operón que codifica para los enzimas implicados en la biosíntesis de la riboflavina por una resistencia antibiótica. Esta cepa también proporciona protección cruzada entre serotipos en condiciones experimentales (Fuller *et al.*, 2000).

Actualmente, también dentro de la colaboración entre el grupo de biología molecular del IBB y Laboratorios HIPRA S.A., se está llevando a cabo un proyecto para crear cepas atenuadas de *A. pleuropneumoniae* actuando sobre los genes *apx*.

A pesar de todas las cepas genéticamente modificadas que se han obtenido y de la potencialidad de algunas de ellas como vacunas, resulta especialmente difícil el registro para comercialización de estos microorganismos. La mayoría de estas cepas atenuadas han servido básicamente para estudiar la importancia funcional de determinados factores de virulencia.

I.D. Diagnóstico de la pleuroneumonía porcina

Los métodos de diagnóstico de las infecciones por *A. pleuropneumoniae* son muy diversos y han evolucionado mucho en los últimos años. Una de las principales

dificultades consiste en diferenciar esta enfermedad de otras patologías respiratorias como pueden ser las neumonías provocadas por *Pasteurella multocida* o por micoplasmas. Estas últimas pueden distinguirse en la necropsia por observación de las lesiones pulmonares. Una de las situaciones más frecuentes es la implicación de *A. pleuropneumoniae* en cuadros polimicrobianos en los que la importancia relativa de cada patógeno y, sobre todo, el agente etiológico original, resultan de difícil determinación.

El proceso más corriente para el diagnóstico de la pleuroneumonía es un diagnóstico de laboratorio mediante pruebas serológicas o bacteriológicas. A estas dos metodologías se les ha añadido recientemente el diagnóstico por PCR. A continuación se explica brevemente la aplicación de cada una de estas técnicas.

I.D.1. Diagnóstico bacteriológico

Los métodos bacteriológicos se basan en el cultivo e identificación a partir de muestras clínicas. El aislamiento puede hacerse a partir de muestras muy diversas: escobillones nasales, tonsilas, lavados traqueales o lesiones pulmonares. Las muestras deben ser frescas ya que la congelación disminuye en gran medida la viabilidad de la bacteria. Para el aislamiento de *A. pleuropneumoniae* se puede utilizar el co-cultivo con *Staphylococcus aureus* o *intermedius* que aportan el NADH que *Actinobacillus* requiere. Las cepas del biotipo I forman pequeñas colonias alrededor de la estría, rodeadas generalmente de una zona de hemólisis. Algunos de los medios de cultivo más empleados son agar chocolate, agar PPLO y agar sangre. En ocasiones estos medios han sido diseñados para permitir un aislamiento selectivo (Jacobsen y Nielsen, 1995). Normalmente, al cabo de unas 12 a 18 horas aparecen colonias de unos 2 mm de diámetro y de morfología no siempre uniforme. Suelen presentarse de dos tipos: unas de aspecto céreo y otras más blandas, que en placas de agar sangre suelen provocar un halo de hemólisis característico (Quinn *et al.*, 1994).

La diferenciación de otras especies dependientes de NADH (básicamente *Haemophilus* y otros *Actinobacillus*) se puede realizar mediante pruebas bioquímicas, algunas de las cuales se resumen en la Tabla I.2. Ejemplos de ellas son la actividad ureasa, la fermentación del manitol y el denominado *fenómeno CAMP* (Kielstein *et al.*, 2001). La mayoría de las veces, sin embargo, el aislamiento por cultivo es un complemento al diagnóstico *post mortem* a partir del análisis de las lesiones pulmonares.

Tabla I.2. Algunas de las propiedades bioquímicas de *A. pleuropneumoniae* biotipo I
(Quinn *et al.*, 1994, Rodríguez, 2002).

Factor V	Necesario	α -fucosidasa	–
CAMP (<i>Staphylococcus aureus</i>)	+	α -galactosidasa	+
Catalasa	V+	α -glucosidasa	–
Fosfatasa alcalina	+	α -manosidasa	–
Hemólisis	V+	β -galactosidasa (ONPG)	+
Indol	+	β - fucosidasa	–
Oxidasa	+	β -glucosidasa	–
Ureasa	+	Gas a partir de fructosa	+
Ácido a partir de arabinosa	–	Gas a partir de manosa	+
Ácido a partir de lactosa	–	Gas a partir de ribosa	+
Ácido a partir de maltosa	+	Gas a partir de xilosa	+
Ácido a partir de manitol	–	Hemaglutinación	–
Ácido a partir de melibiosa	–	SH ₂	+
Ácido a partir de sacarosa	+	Reducción de nitritos	+
Ácido a partir de trealosa	–	Reducción de nitratos	+

I.D.2. Diagnóstico serológico

Como complemento de las técnicas bacteriológicas o como herramienta independiente, se emplean métodos serológicos cuyo objetivo puede ser la detección de respuesta frente a *A. pleuropneumoniae*, independientemente del serotipo o con identificación de serotipo o serogrupo.

Las pruebas que buscan la identificación del serotipo son especialmente útiles para completar el diagnóstico bacteriológico, para determinar el tratamiento o para la preparación de autovacunas homólogas. Las pruebas independientes de serotipo pretenden ser métodos más generales de control de la prevalencia y del estado sanitario de las explotaciones.

Si lo que se pretende es definir el serotipo, resulta necesario basar el análisis de la respuesta en antígenos diferenciales como el antígeno O del LPS o los antígenos capsulares. El primero permite diferenciar anticuerpos específicos frente a tres grupos de serotipos: *a)* 1 y 9, *b)* 11 y 6 y *c)* 8, 4 y 7. Con los antígenos capsulares es posible llegar a

determinar el serotipo concreto frente al que se han generado los anticuerpos, sobre todo si se dispone de sueros policlonales o monoclonales específicos que permitan establecer ensayos de competición.

Dentro de las pruebas serológicas nos encontramos con una amplia gama de métodos: fijación del complemento, tests específicos, como la prueba de coaglutinación que detecta antígenos específicos de serotipo (Mittal *et al.*, 1987), el test de anticuerpos por fluorescencia (Nicolet, 1992), detección de antígenos bacterianos en tejidos mediante el test de la inmunoperoxidasa (Gutiérrez *et al.*, 1993b), aglutinación lenta en tubo, aglutinación rápida en portaobjetos, hemaglutinación indirecta, coaglutinación, etc. De todas ellas, la fijación del complemento es la más utilizada. Se trata de una técnica específica de serotipo, laboriosa y poco sensible, que no permite valorar todos los sueros debido a presencia de actividad anticomplementaria.

Ninguna de las técnicas de serología clásica permite la estandarización, automatización y versatilidad en el procesamiento de las muestras. Éstas son, sin embargo, las ventajas que ofrece el análisis serológico por ELISA. Esta prueba resulta la más adecuada para el análisis a gran escala y no se ve afectada por la posible actividad anticomplementaria de algunas muestras. La mayoría de los ELISA que se han desarrollado son de tipo indirecto, en los que diferentes antígenos de *A. pleuropneumoniae* se fijan en la placa de microtitulación, a estos antígenos se unen los anticuerpos presentes en el suero, finalmente estos se detectan mediante un suero anti-IgG porcina, conjugado con un enzima y añadiendo un substrato para este último.

Los ELISA descritos están basados en antígenos muy diversos. En la Tabla I.3 se presenta una enumeración de los que recoge la bibliografía sobre el tema, así como algunos disponibles comercialmente.

Aunque estos ensayos son, en general, más sensibles que la fijación del complemento, muchos de ellos pueden presentar reacciones inespecíficas (Frey y Nicolet, 1991a; Kamp *et al.*, 1994). Algunos autores han propuesto un cribado inicial de las muestras utilizando un ensayo tipo ELISA y una confirmación posterior por fijación del complemento de las muestras positivas (Enoe *et al.*, 2001). El coste de la estrategia combinada puede llegar a ser mucho menor que el derivado de utilizar directamente la fijación del complemento, especialmente en áreas de baja prevalencia de la enfermedad. Otro inconveniente puede ser que muchos de estos ELISA detectan un número limitado

de serotipos. Algunos de los sistemas desarrollados usando las toxinas Apx de *A. pleuropneumoniae* parecen ser poco específicos, probablemente debido a reacciones cruzadas con toxinas RTX producidas por *A. suis* o la α -hemolisina de *E. coli*.

Tabla I.3. Diferentes métodos de ELISA para el diagnóstico de la pleuroneumonía porcina.

Tip o de EL IS A	Tipo de antígeno o suero	Referencia
Indirecto	Extracto total con EDTA	Nicolet <i>et al.</i> , 1981 ; Willson <i>et al.</i> 1995
	Cápsula	Bossé <i>et al.</i> , 1990 y 1993; Gutiérrez <i>et al.</i> , 1991; Gottschalk <i>et al.</i> , 1994 y 1997
	Extracto salino	Gutiérrez <i>et al.</i> , 1991; Radacovici <i>et al.</i> , 1992, Gottschalk, 1994 y 1997
	Extracto total	Gutiérrez <i>et al.</i> , 1991
	LC-LPS	Gottschalk <i>et al.</i> , 1994 y 1997; Radacovici <i>et al.</i> , 1994; Broes <i>et al.</i> , 1996; SWINECHECK [®]
	ApxII recombinante	Leiner <i>et al.</i> , 1999
	ApxI, ApxII y ApxIII Tbp2 y ApxI recombinantes	Nielsen <i>et al.</i> , 2000 Este estudio (CIVTEST [™] _{SUISAPP})
Competición	Cadena O del LPS de serotipo 2	Stenbaek <i>et al.</i> , 1994
	LPS de serotipo 6	Klausen <i>et al.</i> , 2001
	LPS de serotipos 1, 9 y 11	Rodríguez <i>et al.</i> , 1996
Detección de Ag	IgG anti polisacáridos capsulares	Inzana <i>et al.</i> , 1995

I.D.3. Diagnóstico por PCR

El cada vez mayor nivel de conocimiento que se tiene sobre el genoma de *A. pleuropneumoniae* ha permitido el desarrollo de otro método de diagnóstico basado en la detección directa del patógeno por PCR, considerablemente más sensible que el aislamiento por cultivo y altamente específico (Gram *et al.*, 1996; Savoye *et al.*, 2000; Schaller *et al.*, 2001). Esta técnica, de la cual se recogen algunos ejemplos en la Tabla I.4, complementa a la serología, merced a lo cual es posible detectar portadores del patógeno serológicamente negativos. Por otro lado, si bien el aislamiento de la bacteria no resulta complicado a partir de animales con infecciones agudas, cuando los animales son portadores crónicos la bacteria puede encontrarse sólo en niveles muy bajos en el tracto respiratorio superior (Moller *et al.*, 1990), donde la flora comensal ofrece grandes impedimentos al aislamiento de la bacteria patógena. La identificación de estos

portadores crónicos resulta clave para controlar la introducción de nuevos animales en granjas libres.

Tabla I.4: Sistemas de detección por PCR de *A. pleuropneumoniae*

Secuencia amplificada	Amplicón (pb)	Muestra	Límite detección	Cita
Operones <i>apxI</i> y <i>apxIII</i>	diversos	Cultivos		Frey et al., 1995
Desconocida	985	Cultivo a partir de tonsilas	10 ³ CFU	Gram et al., 1996
<i>omlA</i>	950	Tejido pulmonar	10 ² CFU	Gram et al., 1998
Genes de síntesis y exportación CPLS	700 o 1100	Tejido pulmonar	10 ² CFU	Lo et al., 1998
<i>omlA</i>	866	Biopsia de tonsila o lavado traqueobronquial	10 ² CFU	Savoie et al., 2000
<i>apx</i>	diversos	Tejido pulmonar y tonsilas		Gram et al., 2000
<i>apxIV</i>	422	Tejido pulmonar Escobillón nasal		Schaller et al., 2001
<i>dsbE-like</i>	342	Escobillones nasales y tonsilares	10 ² CFU	Chiers et al., 2001
<i>omlA</i>	Real Time	Tonsilas y tejido pulmonar	1 CFU	Angen et al., 2001
<i>tbp1</i> y <i>tbp2</i>	2,7 y 1,7-1,9	Cultivo o tejidos	50-10 ² CFU	Rodríguez et al., 2002
<i>cps</i>		Cultivo a partir de tejido		Jessing, 2002

El uso de esta metodología es cada vez más frecuente ya sea para detección de *A. pleuropneumoniae* independientemente de su serotipo (Schaller *et al.*, 2001; Chiers *et al.*, 2001) o para tipificación (Frey *et al.*, 1995; Lo *et al.*, 1998; Gram *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2002). Numerosos laboratorios en todo el mundo ofrecen diagnóstico por PCR de *A. pleuropneumoniae* mediante ensayos de desarrollo propio que ofrecen como servicio o que comercializan en forma de kits.

Un paso más en el diagnóstico lo constituye el uso de la PCR en tiempo real, en concreto de tipo TaqMan nucleasa 5', para el diagnóstico de *A. pleuropneumoniae*. Este método se ha aplicado en la amplificación de un pequeño fragmento del gen *omlA*, resultando un ensayo donde el límite de detección llega a ser de 1 CFU. A pesar de la alta sensibilidad que aporta, aún es necesaria una optimización del método para evitar, al menos en este caso, falsos positivos (Angen *et al.*, 2001).

II OBJETIVOS

En concreto, los objetivos de este trabajo de tesis fueron: proceder a la expresión de diferentes antígenos proteicos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en forma heteróloga en *Escherichia coli* y estudiar la utilidad de los mismos como componentes de una vacuna por subunidades y de un kit de diagnóstico para la pleuroneumonía porcina.

Los antígenos propuestos fueron: las proteínas de membrana externa **Tbp1** (proteína 1 de unión a la transferrina porcina) y **Tbp2** (proteína 2 de unión a la transferrina porcina) y las exotoxinas **ApxI** (hemolisina I) y **ApxIII** (citolisina III).

Para alcanzar los objetivos generales mencionados nos propusimos cubrir los siguientes objetivos específicos:

A – Clonación de los genes de las proteínas de membrana externa Tbp1 y Tbp2

B.- Secuenciación del gen *tbp1*

C.- Clonación de los genes codificantes para las exotoxinas ApxI y ApxIII

D.- Expresión de las proteínas Tbp y Apx. Purificación de las proteínas expresadas

E.- Formulación de la vacuna y ensayos de vacunación

F.- Formulación de un kit de diagnóstico y estudios serológicos

III. Material y métodos

En este capítulo se exponen de manera breve, aunque pretendidamente explícita, los protocolos utilizados para la obtención de los resultados de esta tesis. Si bien muchos de ellos se refieren a técnicas de rutina en un laboratorio de biología molecular, he preferido no limitarme a incluir las citas originales. Con el tiempo he descubierto la utilidad de tener estos protocolos a mano. Por otro lado, creo en la conveniencia de conservar estas recetas de una manera ordenada cuando, cada vez más, se sustituyen los métodos estándar por kits comerciales cerrados; pronto la lista de métodos empleados en los trabajos experimentales podrá limitarse a una relación de los kits utilizados. No obstante y de momento, este capítulo no quiere ser un simple listado de productos comerciales.

III.A Equipo general

Para la realización de este trabajo de investigación se ha utilizado el equipo habitual de un laboratorio de biología molecular. El cuadro adjunto recoge la relación de marcas y modelos comerciales de los instrumentos a los que, en un momento u otro del estudio, se ha recurrido:

EQUIPO UTILIZADO EN ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

- Agitador de balanceo SBS, modelo AB-2
- Agitadores magnéticos SBS A-03 y Metrohm
- Agitador orbital P-Selecta, modelo Rotabit
- Agitador *vortex* Heidolph Top-mix 94323
- Autoclaves Matachana, modelos 140 L2 y 140 LE1
- Balanzas Sartorius B120S y PT1200
- Baños termostatzados Huber Polystat, LKB 2219 ,Multitemp II y Bioblock 92617
- Cámara fotográfica Polaroid MP-4
- Campana de flujo laminar Telstar AV-100
- Centrífuga Heraeus Minifuge T
- Centrífuga Sorvall RC5C
- Contador *geiger* Minimotor G-M tube
- Cubetas de electroforesis para geles de agarosa Bio-Rad
- Desionizador de agua Milli-Qplus
- Equipo de fotografía Bio-Rad, modelo Gel-Doc 1000 equipado con el *software* Molecular Analyst 1.5
- Equipo de secuenciación Macrophor, Pharmacia
- Espectrofotómetro Varian, Cary 1E
- Estufa de cultivos Memmert
- Estufa de secado Heraeus
- Fuentes de alimentación ISCO 453, GROC Instruments G-201 y LKB 2297 Macrodrive 5
- Incubadores de aire con agitación orbital: Certomat de Braun y G24 de New Brunswick Scientific.
- Kits Miniprotean II, Miniprotean III y Mini Trans Blot Cell de Bio-Rad
- Lámpara de iluminación UV Atom, Uvatom-70
- Medidor de pH Radiometer, pH Meter 26
- Microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415 C
- Rotores SS34, GSA y SW.27 para centrífuga Sorvall

- Sistema de cromatografía: Cromatógrafo Pharmacia GradiFrac System, bomba peristáltica Pharmacia LKB Pump p1, Optical Unit UV-1, Control Unit UV-1 y registrador REC 102
- Sonicador: Braun, modelo Labsonic U
- Termociclador MiniCycler. MJ Research

- Transiluminadores de radiación ultravioleta Ultra-Violet Products, TM-36 y TC-365-A

- Ultracentrífuga preparativa Beckman L8-M
- Dispensador para microplacas Multidrop 384, Labsystems.
- Lavador de microplacas Wellwash Ascent, Labsystems.
- Lector Multiskan EX, Labsystems.

III.B. Material biológico

CEPAS BACTERIANAS

a) La especie objeto de estudio en el presente trabajo es la bacteria gramnegativa *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Se han utilizado las siguientes cepas:

Cepa Hpn 1370: del serotipo uno, derivada de la ATCC (*American Type Culture Collection*) 27088.

Cepa ATCC33378: del serotipo cuatro.

b) Para los trabajos de propagación de plásmidos recombinantes se han utilizado las siguientes cepas de *Escherichia coli*:

XL1-Blue El genotipo de la cepa es *supE44 lac⁻ hsdR17 recA1 endA1 r_k⁻ Rec⁻ gyrA46 thi relA1 F' (proAB⁺ lacI^q Δ M15 Tn10 (tet^r))(Sambrook *et al.*,2001). Cepa *recA⁻* permisiva, supresora de mutaciones ámbar, que modifica pero no restringe el DNA transfectado y que permite la selección con β-galactosidasa.*

BL21(DE3): Con genotipo *F⁻ hsdS (r_B m_B) ompT lon gal (lcls857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7)* (Novagen). Cepa para expresión, lisógena del fago λDE3 que incorpora el gen de la T7-RNA polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5*. Inducible por IPTG, deficiente en TrxB (tioredoxina) y resistente a kanamicina.

VECTORES

a) De clonación:

pUC119 (Sambrook *et al.*, 2001): Este vector se utilizó tanto para clonaciones como para secuenciación. Es un plásmido que posee un replicón derivado de pMB1, con una mutación en el origen de transcripción que determina que se encuentre en alto número de copias (500-700 copias/célula). Posee un gen de la betalactamasa que confiere resistencia a la ampicilina. Expresa un fragmento del gen *lacZ* que puede complementarse en cepas con genotipo *Δ(lacZ)M15* (como en el caso de XL1-Blue), lo cual facilita la detección de los clones recombinantes. Si se inserta una secuencia de DNA foráneo en el lugar de clonación múltiple de pUC, ésta interferirá con la expresión del fragmento del gen *lacZ* y, de este modo, gracias a la α-complementación, en presencia de un sustrato cromogénico de la β-galactosidasa (X-Gal), las colonias de *E. coli* portadoras de pUC con inserto serán blancas, a diferencia de las no portadoras, que serán azules.

b) De expresión:

pET21a(+), pET21b(+) (Studier *et al.*, 1990; Novagen): Plásmidos utilizados como vectores de expresión que confieren resistencia a la ampicilina y que contienen un promotor T7*lac*, para expresión en fase con

una cola de histidinas que facilita la purificación del producto proteico recombinante en columnas de afinidad. El promotor T7 lac contiene la fusión del promotor de la T7 RNA polimerasa y el operador lac . Los fragmentos de DNA insertados sólo se expresarán en presencia de un agente inductor (como IPTG) y de una fuente de T7 RNA polimerasa. En este trabajo hemos utilizado la cepa de *E. coli* BL21(DE3) como fuente de esta polimerasa, ya que en ella la expresión de la T7 RNA polimerasa también se halla bajo el control del operón lac . Así, se establece un doble control, ya que tanto la expresión de la polimerasa como la de la proteína recombinante requieren la presencia del inductor.

PMAL-c2, pMAL-p2 (New England Biolabs): Vectores diseñados para la expresión de proteínas en forma de fusión al C-terminal de la MBP de *E. coli*. Poseen el origen de replicación y un gen de resistencia a la ampicilina derivados de pBR322. El vector pMAL-c2 es idéntico a pMAL-p2, salvo en la secuencia correspondiente al péptido señal del gen $malE$, que se encuentra deletada en el primero, siendo así su expresión citoplasmática en lugar de periplasmática. En ambos casos, las proteínas pueden ser purificadas en un solo paso gracias a la elevada afinidad de la MBP por la amilosa. La expresión está controlada por el promotor $Plac$, susceptible a la acción del represor $lacI$. Todos los plásmidos de la serie pMAL son portadores de una copia mutada del gen $lacI$, lo cual asegura una sobreexpresión de este represor en las células transformantes. Al igual que en los vectores de la serie pUC, se puede presentar un mecanismo de α -complementación que facilita el rastreo de las colonias recombinantes. Entre las secuencias del gen $malE$ y del $lacZ\alpha$, concretamente en posición 5' de la región de clonación múltiple, se encuentra la secuencia de corte del factor Xa, sistema que permite escindir la proteína expresada de la MBP. Debido a la presencia del $lacZ\alpha$ en posición 3' de la región de clonación múltiple, este vector no aporta señales de paro, las cuales deben estar contenidas en el fragmento insertado.

SUEROS (ANTICUERPOS PRIMARIOS)

Se han utilizado sueros porcinos, tanto de animales que estaban incluidos en protocolos experimentales de inmunización como procedentes de explotaciones porcinas de campo y sueros procedentes de inmunizaciones sobre conejos.

ANTICUERPOS SECUNDARIOS

Para los estudios serológicos se han utilizado diferentes anti-anticuerpos:

- Proteína A conjugada con HRPO (Sigma)
- Monoclonales anti IgG porcina, conjugados con HRPO (LSI)
- Anticuerpos policlonales *antiswine* IgG (H+L), conjugados con HRPO (SBS y The Binding Site, Ltd.)

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se han utilizado cerdos de la variedad Largewhite x Landrace, procedentes de la Granja Aulines (Girona), de cuatro a cinco semanas de edad y con un peso de entre 15 y 20 kg, y ejemplares de tres o cuatro meses, con pesos de 35 a 40 kg.

III.C. Manipulación de bacterias y plásmidos

III.C.1. Medios de cultivo

MEDIOS LÍQUIDOS

a) Medios para el cultivo de *E. coli*

Medio LB (Luria-Bertani ; composición por litro)
Bactotripton (ADSAmicro)

10 g

Extracto de levadura (ADSAmicro)	5 g
NaCl (Fluka)	5 g
H ₂ O destilada	c.s.p. 1 litro

Para cultivos con el sistema pMAL, el medio LB se complementa con glucosa al 0,2 %.

Medio 2xYT (Composición por litro)

Bactotripton (ADSAmicro)	16 g
Extracto de levadura (ADSAmicro)	10 g
NaCl (Fluka)	5 g
H ₂ O destilada	c.s.p. 1 litro

El medio debe complementarse con 50 µg/mL de ampicilina (Roche) para la propagación de los vectores portadores de resistencia frente a este antibiótico.

Medio 2SB (Composición por litro)

Peptona tripton de levadura	24 g
Extracto de levadura	48 g
Fosfato bipotásico	15,3 g
Fosfato de potasio	1,7 g
H ₂ O destilada	c.s.p. 1 litro

b) Medio para cultivo de *A. pleuropneumoniae*

Medio BHI (Infusión de cerebro-corazón; composición por litro)

BHI (Difco)	37 g
H ₂ O destilada	c.s.p. 1 litro

El medio debe ser complementado con 20 µg/mL de β-NAD (SIGMA).

MEDIOS SÓLIDOS

a) Medios para el cultivo de *E. coli*

Placas de LB, agar, ampicilina (por litro de medio LB)

Agar (ADSAmicro)	15 g
Ampicilina (Roche)	50 µg/mL

Placas de LB, agar, ampicilina, IPTG, X-gal (por litro de medio LB)

Agar (ADSAmicro)	15 g
Ampicilina (Roche)	50 µg/mL
IPTG (Roche)	50 µg/mL
X-gal (Roche)	50 µg/mL

b) Medio para el cultivo de *A. pleuropneumoniae*

Placas de agar-chocolate (composición por 500 mL)

Agar sangre triptosa (Difco)	16,5 g
Extracto de levadura (ADSAmicro)	1 %
NAD (Sigma)	20 µg/mL
Suero de pollo	1 %
Sangre de cordero	8 %
H ₂ O destilada	c.s.p. 500 ml

III.C.2. Finalidad del cultivo

CONSERVACIÓN

a) En placa de Petri

Conservación de la placa a 4 °C en posición invertida y sellada con «Parafilm». Resulta útil para mantener colonias viables durante un plazo no superior a dos meses.

b) En vial de agar

Inoculación del cultivo con un asa de Kolle sobre LB agar, a partir de un cultivo saturado. Se deja crecer una noche a 37 °C, con el tapón tan sólo parcialmente cerrado, tras lo cual se conservará el cultivo a 4 °C sellado herméticamente. Permite mantener la viabilidad del cultivo durante uno o dos años.

c) En glicerol

Para su preparación se mezcla una alícuota de un cultivo saturado con glicerol estéril a una concentración final de 15 %, tras lo cual se mantiene a -80 °C. En principio, estos cultivos son viables y estables indefinidamente.

CRECIMIENTO (PRECULTIVOS)

Se utilizan para preparar inóculos que serán transferidos a cultivos de mayor volumen, así como para extracciones de DNA plasmídico.

Preparación:

- 3 mL de medio de cultivo líquido
- 50 µg/mL de antibiótico selectivo, sólo para cepas portadoras de resistencia.
- Inocular una colonia única de un cultivo en placa o bien en 10 µL de un cultivo líquido, previamente glicerinado y congelado.

Condiciones:

- Incubación a 37 °C y a 300 rpm durante una noche (14 horas).

PRODUCCIÓN

Preparación (en frasco Erlenmeyer):

- 1 L de medio de cultivo al que se han añadido 50 µg/mL de antibiótico selectivo. Repartir el volumen en cuatro frascos de un litro.
- Inocular cada Erlenmeyer con 2,5 mL de precultivo centrifugado y resuspendido en medio fresco.

Condiciones:

- Incubación a 37 °C y a 300 rpm hasta alcanzar una D.O. de 0,6 unidades a 600 nm, momento en el que se induce la expresión de la proteína recombinante. Para ello se añade IPTG a una concentración final de 1 mM.
- Incubación durante unas 4 horas a partir del momento de la inducción.
- Centrifugar el cultivo a 5000 xg durante 10 minutos.

III.C.3 Detección de colonias recombinantes sobre membranas de nitrocelulosa

Esta técnica se utilizó para detectar el extremo 3' del gen *tbp1* del serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae*. El protocolo aplicado fue el siguiente:

TRANSFERENCIA DE COLONIAS SOBRE MEMBRANAS DE NITROCELULOSA

- 1- Replicación con palillos estériles de las colonias recombinantes sobre placas de LB ampicilina.

- 2- Se dejan crecer las colonias 16 horas a 37 °C, tras lo cual se reservan a 4 °C durante una hora.
- 3- Se colocan con precaución las membranas de nitrocelulosa sobre las placas y se mantienen cinco minutos.
- 4- Los filtros se pasan a una disolución de NaOH 0,5 N / NaCl 1,5 M durante 15 minutos. De este modo, se lisan las células y se desnaturaliza el DNA.
- 5- Las membranas se incuban 15 minutos en una solución Tris·HCl 1M (pH 8,0) / NaCl 1,5 M.
- 6- A continuación, las membranas se hornean durante 2 horas a 80 °C y al vacío, para fijar el DNA sobre ellas.

A este protocolo le sigue un proceso de prehibridación e hibridación con la sonda marcada que se encuentra descrito en el apartado III.D.8. (Hibridación DNA-DNA).

III.C.4. Tampones, disoluciones y antibióticos

Tampón TE: 10 mM Tris·HCl (pH 8,0) / 1 mM EDTA (pH 8,0).

X-gal: Se prepara a una concentración de 20 mg/mL en dimetilformamida y se conserva a 4 °C en la oscuridad. Actúa de sustrato de la β-galactosidasa, por lo que se emplea para identificar los clones *lacZ*⁺. La concentración de trabajo es de 50 µg/mL, que corresponde a 48,94 mM.

IPTG: La solución madre se prepara a 20 mg/mL en H₂O y se conserva a -20 °C. Su acción inactiva el represor de *lacZ*. La concentración de trabajo, en placa, es de 50 µg/mL, que corresponde a 83,96 mM.

Ampicilina: Se prepara a 100 mg/mL en H₂O, conservándose a -20°C. La concentración de trabajo es de 50 µg/mL.

III.C.5. Preparación de células competentes de *Escherichia coli*

Es preciso manipular previamente las células para alterar su permeabilidad, así se facilita la entrada del plásmido recombinante portador del fragmento que hemos clonado. A tal efecto, se sigue el protocolo de preparación de células competentes detallado a continuación.

PREPARACIÓN DE COMPETENTES

- 1- Se inoculan 3 mL de medio 2xYT con una colonia única, procedente de un cultivo en placa y se incuban 12 horas a 37 °C.
- 2- Se transfieren 300 µL del precultivo anterior a dos frascos Erlenmeyer conteniendo 100 mL de medio 2xYT y se incuban hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ aproximadamente de 0,5 unidades.
- 3- A continuación es preciso enfriar los frascos con el cultivo a 0 °C en un baño de agua con hielo picado.
- 4- Asimismo, debemos enfriar tubos estériles de 50 mL.
- 5- Se transfieren asépticamente los cultivos a los tubos, tras lo cual se centrifugan a 4000 xg durante 10 minutos y a 4 °C.
- 6- Se debe eliminar completamente el medio sobrenadante y resuspender el sedimento con la mitad del volumen inicial con CaCl₂ 50 mM estéril.
- 7- Se mantiene la suspensión de células de 15 a 30 minutos en hielo picado a 0 °C.
- 8- Se prosigue centrifugando de nuevo a 4000 xg durante 10 minutos y a 4 °C.
- 9- Igualmente, se elimina por completo el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 1/15 del volumen original de CaCl₂ 50 mM estéril.

- 10- Se mantiene la suspensión de células en hielo picado durante 1 hora a 4 °C.
- 11- Finalmente, se añade glicerol al 15 % (v/v) y se distribuye la suspensión en viales, en cantidades alícuotas de 150 µL.

III.C.6. Transformación de células competentes

Por el proceso de transformación de las células competentes de *E. coli*, se introduce el plásmido recombinante en el que hemos clonado el gen de interés.

TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

- 1- Partimos de un vial con 150 µL de suspensión de células competentes, preparadas según el protocolo anterior.
- 2- A éstas se añade una disolución de DNA plasmídico, generalmente procedente de una reacción de ligación, según la proporción siguiente:
150 µL de competentes + 100 ng de plásmido recombinante en 1 a 5 µL de TE.
- 3- Se establecen dos controles:
 - a) vector sin inserto, control positivo:
150 µL de competentes + 100 ng de plásmido no recombinante en 5 µL de TE
 - b) transformación sin vector, control negativo:
150 µL de competentes + 5 µL de TE.
- 4- Se incuban las mezclas en hielo picado durante 30 minutos.
- 5- Se transfiere a un baño a 42 °C durante 2 minutos (temperatura y tiempo exactos).
- 6- Se transfiere inmediatamente a hielo picado.
- 7- Se añaden 400 µL de medio rico (LB o 2xYT) y se incuba a 37 °C durante 1 hora, para permitir la expresión del fenotipo.
- 8- Se siembran las células transformadas en una placa de Petri con LB ampicilina.
- 9- Las placas se incuban invertidas durante 14 horas a 37 °C.

III.D. Manipulación del DNA

III.D.1. Extracción de DNA genómico

El siguiente protocolo es aplicable a la obtención de DNA genómico a partir de un cultivo líquido bacteriano.

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

- 1- Incubar un inóculo consistente en una colonia única en 50 mL del medio adecuado durante toda la noche a 37 °C y 300 rpm.
- 2- Centrifugar el cultivo durante 10 minutos a 4000 $\times g$ y a 4 °C.
- 3- Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento de células en 25 mL de tampón TE (pH 8,0).
- 4- Añadir SDS de una solución concentrada hasta el 0,5 % y 100 µg/mL de proteinasa K, e incubar 1 hora a 37 °C, en agitación suave.
- 5- Añadir NaCl 4 M hasta una concentración de 1,5 M. Agitar suavemente por inversión.

- 6- Añadir un volumen de fenol saturado y agitar por inversión suave. A continuación, centrifugar en tubos de vidrio Corex a 12 000 $\times g$ durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 7- Es preciso repetir última operación tres veces, antes de realizar la última extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1).
- 8- Precipitar el DNA con dos volúmenes de etanol a temperatura ambiente, invirtiendo el tubo con precaución para favorecer la precipitación.
- 9- Transferir el DNA por decantación a un nuevo tubo y lavar a continuación con etanol al 70 %.
- 10- Recoger el DNA por decantación en tubos de 5 mL y dejarlo secar.
- 11- Resuspender el DNA en 1 mL de H₂O destilada.
- 12- Leer la densidad óptica de la muestra a 260 nm para ajustar la concentración de solución de DNA a la deseada.

III.D.2. Extracción de DNA plasmídico

Preparación a pequeña escala

Las extracciones de DNA plasmídico se han basado en el protocolo de lisis alcalina a pequeña escala (Sambrook *et al.*, 1989), introduciendo algunas variaciones.

DISOLUCIONES

Disolución I: Glucosa 50 mM
Tris-HCl 25 mM (pH 8,0)
EDTA 10 mM (pH 8,0)

Esterilizar al autoclave y mantener a 4 °C

Disolución II: NaOH 0,2 N (a partir de una disolución madre 10 N)
SDS 1 %

Esta disolución se ha de preparar inmediatamente antes de ser usada.

Disolución III: Acetato potásico 5 M 60 mL
Ácido acético glacial 11,5 mL
H₂O bidestilada 28,5 mL

Conservar a 4 °C

PREPARACIÓN DE DNA PLASMÍDICO A PEQUEÑA ESCALA

- 1- Transferir con un palillo estéril una colonia única procedente de una placa a un tubo estéril de 10 mL, conteniendo 3 mL de medio LB suplementado con 50 µg/mL de ampicilina. Incubar toda la noche a 37 °C y 300 rpm
- 2- Transferir 1,5 mL del cultivo anterior a un tubo Eppendorf y centrifugar 30 segundos a 12 000 $\times g$. El resto del cultivo se mantiene a 4 °C.
- 3- Eliminar completamente el medio sobrenadante y resuspender el sedimento de células en 100 µL de disolución I, por agitación en *vortex*.
- 4- Añadir 200 µL de disolución II recién preparada. Mezclar enérgicamente por inversión varias veces.

- 5- Añadir 150 μL de disolución III y mezclar con el *vortex*, de manera que toda la superficie del tubo entre en contacto con la disolución. Mantener en hielo durante 5 minutos.
- 6- Centrifugar durante 5 minutos a 12 000 $\times g$ y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 7- Añadir un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y mezclar con el *vortex*, centrifugando a continuación 2 minutos a 12 000 $\times g$ transfiriendo el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 8- Añadir 2 volúmenes de etanol para precipitar el DNA, agitar con el *vortex* y mantener la mezcla a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 9- Centrifugar 5 minutos a 12 000 $\times g$ y eliminar el sobrenadante por aspiración. Dejar evaporar el etanol restante.
- 10- Lavar el sedimento con 1 mL de etanol al 70 %, centrifugar 5 minutos a 12000 $\times g$ eliminar el sobrenadante por aspiración, secando el DNA al vacío.
- 11- Disolver el sedimento en 50 μL de H_2O destilada. Añadir 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNasa y almacenar la disolución de DNA a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Preparación de DNA plasmídico a gran escala

Este proceso permite la obtención de DNA plasmídico a gran escala, con un alto grado de pureza. Hemos seguido el método indicado en Sambrook *et al.* (2001), introduciendo algunas modificaciones. Las disoluciones I, II y III son las mismas que las utilizadas en la preparación de DNA plasmídico a pequeña escala.

GRADIENTE DE CLORURO DE CESIO

- 1- El material de partida es 250 mL de cultivo bacteriano en fase logarítmica (aproximadamente 0,6 unidades a D.O. ₆₀₀). Se centrifuga 10 minutos a 7000 $\times g$ a $4\text{ }^\circ\text{C}$, resuspendiendo el sedimento en 8 mL de disolución I.
- 2- A un tubo de centrífuga de 50 mL con tapón de rosca se añade la suspensión de células anterior en 16 mL de disolución II, mezclando por inversión repetida y manteniendo la suspensión en hielo picado hasta que las células hayan sido completamente lisadas (5 a 10 minutos). A continuación, se añaden 12 mL de disolución III y se mezcla de nuevo por inversión.
- 3- Tras mantener la disolución en hielo picado durante 5 minutos, centrifugar a 3000 $\times g$ $4\text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos. El sobrenadante se distribuye en tubos de vidrio de centrífuga Corex, donde se precipita el DNA con 0,6 volúmenes de isopropanol. Se centrifuga el DNA a 12 000 $\times g$ $20\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos.
- 4- Lavar el sedimento resultante con etanol al 70 % y, una vez seco, disolverlo en 4,2 mL de tampón TE.
- 5- Añadir 4,3 g de CsCl, agitando con el *vortex* hasta su total disolución.
- 6- Añadir 420 μL de bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/mL. Agitar con el *vortex* y comprobar la densidad de la disolución resultante. Ésta ha de ser de 1,55 g/mL.
- 7- Transferir a tubos de policarbonato para ultracentrífuga (correspondientes a rotor Sorval SW27), sellando los tubos al calor y centrifugando a continuación de 12 a 15 horas a 65 000 rpm y a $20\text{ }^\circ\text{C}$.
- 8- El DNA se distribuirá a lo largo del gradiente según su densidad, siendo posible visualizarlo gracias a su afinidad por el bromuro de etidio. Por consiguiente, recoger la banda correspondiente al plásmido CCC (plásmido circular cerrado) y transferir la solución a un vial de 2 mL.
- 9- Realizar repetidas extracciones de la muestra con 1-butanol saturado con agua, hasta que desaparezca el bromuro de etidio, es decir, hasta que desaparezca el color de la disolución (controlar la última extracción iluminando

el tubo con radiación ultravioleta). Este proceso se realiza añadiendo un volumen de butanol saturado, agitando la mezcla y centrifugando 1 minuto a 12 000 $\times g$:

10- Diluir el DNA con 3 volúmenes de H₂O bidestilada para disminuir la concentración de CsCl de la disolución. Precipitar el DNA con 2 volúmenes de etanol, manteniéndolo a -80 °C durante 30 minutos.

11- Centrifugar 5 minutos a 12 000 $\times g$. Lavar el DNA con etanol al 70 % y resuspender el sedimento en 200 μ L de TE.

12- Realizar un control del espectro ultravioleta de la muestra para comprobar la concentración y pureza del DNA, ajustando con TE la concentración de la solución a la deseada (generalmente 100 ng/ μ L).

III.D.3. Reacciones enzimáticas

Restricciones

Las endonucleasas de restricción son enzimas que hidrolizan el DNA bicatenario en lugares específicos en función de su secuencia, dejando unos extremos característicos que permiten su posterior unión a otras moléculas de DNA con extremos compatibles. Además, es posible identificar un fragmento concreto de DNA mediante digestiones con dichas endonucleasas si su mapa de restricción es conocido.

Las digestiones de DNA con enzimas de restricción se realizaron de acuerdo con el siguiente patrón general:

DIGESTIÓN DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

- 1- Se diluye la cantidad de DNA a restringir en un volumen adecuado de agua destilada.
- 2- A continuación se añade el tampón de digestión adecuado. La concentración de los tampones suele ser 10 veces superior a la de trabajo, por lo que se añade generalmente 1/10 del volumen final de la reacción.
- 3- Se mezcla bien y se añade el enzima, en una proporción de 1-2 u/ μ g DNA y en un volumen máximo de 1/10 del volumen final. El enzima debe conservarse a -20 °C y mantenerse fuera del congelador el mínimo tiempo posible, siempre dentro de un bloque térmico.
- 4- La reacción se incuba unas 2 horas a la temperatura adecuada para el enzima. El tiempo de incubación se puede prolongar hasta toda una noche cuando se realizan digestiones totales preparativas sobre DNA genómico.
- 5- Finalmente, la reacción se puede detener inactivando el enzima con EDTA (pH 8,0) a una concentración final de 20 mM, agente que secuestra los iones Mg²⁺. También se puede cargar directamente la mezcla de digestión en un gel de agarosa, previa adición del tampón de carga, o conservarla a -20 °C hasta que se precise utilizar.

Si el DNA ha de ser digerido a continuación con otro enzima de restricción no es conveniente la adición de EDTA. En tal caso, cabe recurrir al calor para inactivar la reacción. Muchas endonucleasas de restricción son inactivas tras 15 minutos a 65 °C.

Es posible llevar a cabo dos digestiones de DNA simultáneas con distintos enzimas de restricción, siempre que el tampón y la temperatura de incubación para ambos sean compatibles. Si sólo varía la temperatura de reacción, se incuba primero con el enzima activo a menor temperatura. Si lo que varía es la composición del tampón, se puede digerir primero con el

enzima que requiere menor fuerza iónica y después con el siguiente, previa adición de los iones necesarios. En el caso de que las composiciones de los tampones sean muy diferentes, es conveniente intercalar entre ambas digestiones una extracción con fenol y una precipitación del DNA con etanol.

Defosforilación del DNA

El enzima utilizado a tal efecto fue la fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP; Roche), cuya acción cataliza la eliminación de los residuos fosfato en posición 5' del DNA, RNA, rNTP y dNTP. El objeto de la defosforilación es evitar la recircularización de los plásmidos digeridos con un único enzima de restricción.

DEFOSFORILACIÓN DE DNA CON CIAP

1- Añadir los siguientes componentes directamente al DNA digerido:

Tampón 10x para CIAP	10 µL
CIAP (Roche)	0,01 u/pmole de extremos
H ₂ O destilada	c.s.p.100 µL

2- Incubar la reacción 1 hora a 37 °C.

3- Para evitar la interferencia de la CIAP en el posterior proceso de ligación, se procede a su eliminación según el protocolo siguiente:

a- Añadir un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar y centrifugar 2 minutos a 12 000 xg.

b- Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo y añadir un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar y centrifugar como en el paso anterior.

c- Pasar la fase acuosa a un nuevo tubo, añadir la mitad del volumen de una solución de acetato amónico 7,5 M. Añadir 2 volúmenes de etanol y mantener a -80 °C unos 30 minutos. A continuación, recoger el sedimento de DNA centrifugando 5 minutos a 12 000 xg.

d- Lavar el sedimento con 1 mL de etanol al 70 %, tras lo cual se seca el DNA al vacío y se resuspende finalmente en el volumen de H₂O destilada deseado.

Ligación de fragmentos de DNA

Para la ligación de fragmentos de DNA hemos utilizado la ligasa del bacteriófago T4 (Roche). Se trata de un polipéptido de 68 kDa que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los grupos hidroxilo en posición 3' y fosfato en posición 5', con consumo de una molécula de ATP.

LIGACIÓN CON LIGASA DE T4

1- En un vial de 1,5 mL se disponen las cantidades necesarias de vector y de inserto. La proporción entre ellos puede variar, en función del tipo de clonación a realizar.

2- Se añade 1/10 del volumen final de reacción de tampón de ligación 10x, con la siguiente composición.

Tampón 10x:
Tris.HCl 660 mM (pH 7,5)
MgCl ₂ 50 mM
DTT 10 mM

ATP 10 mM

Es conveniente conservar el tampón a -20 °C, en cantidades alícuotas de 5 µL.

3- Finalmente, se añade 1 u de ligasa y se incuba la reacción a 16 °C durante toda la noche. Alternativamente, se puede hacer una incubación de 1 ó 2 horas a 25 °C; la eficiencia de ligación es similar, siempre y cuando los extremos del vector y del inserto sean cohesivos.

III.D.4. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa es una técnica rutinaria de gran utilidad que permite la separación, observación y purificación de muestras heterogéneas de DNA. El soporte en el que se resuelven las muestras es agarosa pura derivada de agar (SeaKen®).

DISOLUCIONES

Tampón TAE 50x:

Tris-base	242 g
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	100 mL
Ácido acético glacial	57,1 mL
H ₂ O destilada	c.s.p. 1 L

Se trabaja con TAE 1x en agua destilada, sin necesidad de ajustar el pH.

Tampón de carga del DNA 10x:

Azul de bromofenol	0,25 % (p/v)
Xilén cianol	0,25 % (p/v)
Glicerol	30 % en H ₂ O (v/v)

Alternativamente, también se ha utilizado:

Colorante Orange G	0,25 % (p/v)
Glicerol	30 % en H ₂ O (v/v)

Marcadores de peso molecular de DNA

Para facilitar la identificación de las bandas de DNA resueltas en los geles de agarosa o para determinar su tamaño, es conveniente reservar un pocillo para un marcador de peso molecular, este es una mezcla de fragmentos de DNA de distintos tamaños conocidos. En este estudio se han utilizado los siguientes controles de procedencia comercial: marcadores II y III de Roche y marcador Lambda DNA-Bs/EII de New England Biolabs.

ELECTROFORESIS DE DNA EN GEL DE AGAROSA

- 1- Pesar la agarosa con la que se preparará el gel en un frasco Erlenmeyer y añadirle el volumen de tampón TAE 1x necesario (el porcentaje p/v de agarosa dependerá del tamaño del DNA a resolver).
- 2- Calentar la mezcla, preferiblemente sin llegar a ebullición, pero procurando que toda la agarosa quede fundida.
- 3- Dejar enfriar hasta unos 50 °C y añadir la cantidad de agua necesaria para compensar la pérdida por evaporación. Verter en un soporte de electroforesis preparado para dejar solidificar la agarosa en él, disponiendo un peine de

pocillos en el lugar que deben ocupar éstos y sellando los extremos con cinta adhesiva para evitar que escape la mezcla de agarosa aún líquida. Dejar solidificar a temperatura ambiente.

4- Retirar el peine de pocillos y la cinta adhesiva. Colocar el soporte sobre la cubeta y rellenarla con tampón TAE 1x, de modo que cubra el gel.

5- Depositar en los pocillos las muestras, previamente preparadas con tampón de carga 1x.

6- Las electroforesis se han realizado de 40 a 80 V, en función del tamaño del gel (1-5 V/cm), de la concentración de agarosa y del tipo de muestra a analizar. Los geles de DNA genómico se deben resolver lentamente, a 15 V durante toda la noche.

7- La visualización del DNA se consigue tiñendo el gel con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) en tampón TAE 1x durante 20 minutos e iluminando el gel con radiación UV. A menudo, es conveniente eliminar previamente el exceso de bromuro de etidio sumergiendo el gel en agua durante unos 10 minutos.

III.D.5 Recuperación del DNA de geles de agarosa

Generalmente se aplica la electroforesis en gel de agarosa al análisis electroforético del DNA con el que vamos a trabajar. En ocasiones resulta muy útil para resolver y aislar fragmentos de distintos tamaños dentro de una población heterogénea de DNA, como la que se obtiene tras una restricción enzimática. El método usado para purificar muestras de DNA procedente de geles de agarosa es también válido para la recuperación o concentración de pequeñas cantidades de DNA en disoluciones acuosas.

En este trabajo se ha empleado un kit comercial, GeneClean (Bio101) y, en algunos casos, el kit EZNA (Omega Biotech). Para consultar el protocolo seguido en ambos casos recomendamos recurrir a las instrucciones de los respectivos fabricantes.

III.D.6. Marcaje radioactivo de una sonda de DNA

El marcaje radioactivo de DNA se realizó mediante cebadores hexanucleótidos al azar, utilizando puntualmente algunos reactivos del kit Prime-a-gene® de Promega. El protocolo que se aplicó está basado en las instrucciones proporcionadas por el fabricante:

MARCAJE RADIOACTIVO DE DNA AL AZAR POR CEBADORES HEXANUCLEÓTIDOS

1- Descongelar los componentes del sistema en hielo picado.

2- Disolver el DNA en agua destilada estéril, a una concentración final de 1 a 25 µg/mL y desnaturalizarlo a 95 ó 100 °C durante 2 minutos, manteniendo a continuación el vial en hielo picado.

3- Mezclar los siguientes componentes, conservándolos en hielo picado:

Tampón de marcaje 5x	10 µL
Mezcla de dNTPs no marcados	2 µL (20 µM de cada uno)
DNA molde desnaturalizado	25 ng
BSA acetilada (10 mg/mL)	2 µL
α- ³² P(dNTP)	5 µL (50 µCi)
Klenow	5 u
H ₂ O destilada estéril	c.s.p. 50 µL

4- Incubar el vial de reacción a temperatura ambiente durante unas 12 horas (o toda la noche).

5- Terminar la reacción calentando a 95 ó 100 °C 2 minutos y pasando el tubo a hielo picado. Añadir EDTA 0,5 M (pH 8,0) hasta 20 mM. Según las indicaciones del fabricante, el DNA se puede usar directamente para hibridación o conservar a -20 °C. Sin embargo es conveniente, de cara a evitar

posibles hibridaciones inespecíficas, eliminar de la reacción de marcaje los nucleótidos no incorporados. Ello se puede conseguir precipitando el DNA con 2 volúmenes de etanol y lavando el precipitado con etanol al 70 %. Si repetimos la operación de lavado sucesivas veces, podemos comprobar con el contador *geiger* cuándo dejan de detectarse dNTP no incorporados en el sobrenadante de los lavados, momento en el que se deja secar el precipitado, para resuspenderlo posteriormente en el volumen de H₂O deseado.

III.D.7. Transferencia de DNA de geles de agarosa a membranas de nylon

DISOLUCIÓN DE TRANSFERENCIA SSC

SSC 20x: NaCl 175,3 g
 Citrato sódico 88,2 g
 H₂O destilada c.s.p. 1 L

TRANSFERENCIA SOUTHERN

1- El gel en el cual se ha hecho migrar la muestra que deseamos transferir puede ser teñido con bromuro de etidio antes de la transferencia para visualizar el resultado de la electroforesis. De hecho, la exposición a la radiación UV favorece la posterior transferencia a la membrana. A continuación se puede proceder a la desnaturalización del DNA contenido en el gel bañándolo en una disolución de NaOH 0,5 M / NaCl 1,5 M de 45 a 60 minutos.

2- Posteriormente, se neutraliza el DNA con NaCl 1,5 M / Tris·HCl 0,5 M (pH 8,0). El pH es un parámetro muy importante en el resultado final de la transferencia. Es conveniente realizar tres lavados sucesivos en este tampón, de 15 a 20 minutos cada uno.

3- Para preparar la transferencia se colocan en una bandeja llena de 10xSSC, por este orden:

- un soporte de una cierta altura sobre el que se procederá al montaje del conjunto
- una placa de vidrio de un tamaño ligeramente mayor que el gel desde el que transferiremos el DNA
- una capa de papel Whatman 3 MM, cuyos extremos sobresalgan de la placa de vidrio y entren en contacto, a ambos lados, con el tampón que baña la bandeja. El papel debe estar completamente mojado para crear un puente conductor. Es preciso eliminar todas las burbujas entre éste y el soporte; para lograrlo resulta útil hacer rodar con precaución un tubo sobre la superficie del papel

- el gel que contiene el DNA a transferir se deposita sobre el 3MM, eliminando todas las burbujas del modo ya descrito. A continuación, se colocan unos fragmentos de «Parafilm» enmarcando y aislando el gel, y cubriendo la superficie de papel 3 MM expuesta. Ello evitará un contacto entre ésta y las capas de papel superiores

- se recorta una membrana de nylon Schleicher & Schuell del mismo tamaño que el gel y se sumerge en SSC 2x durante 5 ó 10 minutos, tras lo cual se deposita sobre el gel, eliminando de nuevo todas las burbujas

- se disponen a continuación tres papeles de Whatman 3MM del mismo tamaño que el gel y la membrana, previamente sumergidos durante 5 ó 10 minutos en SSC 2x, eliminando de nuevo las burbujas

- se coloca sobre el conjunto un grueso de papeles de filtro hasta una altura de unos 10 centímetros

- sobre los papeles de filtro se sitúa una placa de vidrio, que servirá de soporte a un peso cuya función será favorecer la circulación del tampón por capilaridad.

4- Se deja progresar la transferencia durante un mínimo de 12 horas a temperatura ambiente.

5- Una vez completado el proceso, se recupera la membrana. Es recomendable marcar los pocillos del gel sobre ella para facilitar su orientación. Se deja secar y se fija el DNA transferido por entrecruzamiento inducido por radiación UV durante 5 ó 10 minutos. La membrana puede utilizarse directamente en reacciones de hibridación o conservarse a temperatura ambiente, protegida entre dos capas de papel de filtro.

III.D.8. Hibridación DNA-DNA

El fundamento de esta técnica es la formación de moléculas de DNA de doble cadena a partir del acoplamiento de bases entre cadenas sencillas complementarias (Meintock y Wahl, 1984). Los procesos de hibridación se aplican al reconocimiento de secuencias complementarias con sondas radioactivas especialmente diseñadas. Las secuencias a identificar deben estar fijadas a un soporte sólido y las condiciones de hibridación deben establecerse empíricamente para cada caso, aunque las variaciones a introducir son pequeñas y en todos los casos se sigue una pauta similar. En nuestro caso hemos procedido de acuerdo a un protocolo descrito para la hibridación y detección con sondas no radioactivas (Nonradioactive labelling kit, Roche), que se encuentra descrito en el manual de DIG DNA labelling (Roche). Las disoluciones empleadas se indican a continuación:

DISOLUCIONES

Disolución de hibridación:

SSC 5x (ver preparación del tampón SSC en II.D.7)	
Formamida	50 % (v/v)
N-laurosilsarcosinato sódico (sarkosyl)	0,1 % (v/v)
SDS	0,02 % (p/v)
Reactivo bloqueante	5,0 % (p/v)

Esta disolución debe prepararse alrededor de 1 hora antes de ser usada, manteniéndose a 45 °C para disolver completamente el bloqueante.

Disolución de lavado I:

SSC 2 x
SDS 0,1 % (v/v)

Disolución de lavado II:

SSC 0,1 x
SDS 0,1 % (v/v)

III.D.9. Secuenciación

En este trabajo se ha utilizado la polimerasa de T7 y el kit ¹⁷Sequencing de Pharmacia, según el método de secuenciación enzimática de Sanger (Sanger *et al.* 1977) que comprende las siguientes etapas:

DES NATURALIZACIÓN Y PRECIPITACIÓN DEL DNA

- 1- El DNA a secuenciar se somete, en primer lugar, a extracción por GeneClean (Bio-101), para obtener un molde de la mayor pureza posible.
- 2- A una cantidad de 2 a 2,5 µg de plásmido se añade H₂O destilada hasta un volumen de 32 µL.
- 3- Se adicionan 8 µL de NaOH 2 M, agitando con cuidado la disolución. Se centrifuga la mezcla 2 segundos a 12 000 xg y se deja desnaturalizar el DNA 10 minutos a temperatura ambiente.
- 4- Se añaden 7 µL de acetato sódico 3 M (pH 5,3), 4 µL de H₂O destilada y 120 µL de etanol.
- 5- Precipitar el DNA a -80 °C, de 30 minutos a toda la noche.
- 6- Se centrifuga durante 15 minutos a 12 000 xg
- 7- A continuación, se lava el sedimento con 400 µL de etanol al 70 %.
- 8- Finalmente, se centrifuga 10 minutos a 12 000 xg y se deja secar el sedimento.

APAREAMIENTO (*ANNEALING*)

- 1- El sedimento final de la reacción de desnaturalización se resuspende en 9,5 µL de H₂O para cada cebador.
- 2- A la mezcla se añaden 10 pmol del cebador correspondiente en 2,5 µL (4 pmol/µL).
- 3- Se adicionan 2 µL de tampón de apareamiento, tras lo cual se mezcla y centrifuga la disolución a 12 000 xg 2 minutos.
- 4- Se mantiene la reacción durante 5 minutos a 65 °C.
- 5- Seguidamente, se transfiere a 37 °C, donde se deja proceder durante 10 minutos.
- 6- Para terminar, se mantiene la reacción a temperatura ambiente durante 5 minutos.

TABLA III.1. Cebadores oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de *thp1*
 Los subíndices utilizados para designar los oligonucleótidos indican la posición del nucleótido 5' en la secuencia de *thp1*.

<i>Oligonucleótido</i>	<i>Secuencia</i>
O313	5' GGGCTTGGCATTAGACGGTTTGCC 3'
O470	5' GCGGGTTCGGTGCAATTCCG 3'
O596	5' GCGGGTACTCACAATGGCTTTGATGCTC 3'
O699	5' CCCGAGTAGGAGTGGAAACCAACGAG 3'
O928	5' GCGTCTAAATGCTCAGGATTACACTGGTG 3'
O1413	5' CAGTTGTTCTCTCTCAAGCGGGTAG 3'
O1776	5' GTAGCACAATCAGCCCTACC 3'
O1902	5' GCCCAGCGATGAGTGCTACGG 3'
O1959	5' CGTCATTCCCTATCGCTCTCTATCGAG 3'
O2435	5' GTTGTAGGAGTGGGGTACTATCAGCC 3'
<i>Forward primer</i> de M13	5' G ^T AAAACGACGGCCAGT 3'
<i>Reverse primer</i> de M13	5' AACAGCTATGACCATG 3'

REACCIONES DE SECUENCIACIÓN

- 1- Mientras la reacción de apareamiento está a 37 °C, se preparan 4 tubos para cada reacción de terminación, A, C, G y T, con 2,5 µL del reactivo de terminación con los dideoxinucleótidos correspondientes.
- 2- Durante el tiempo que se mantiene la reacción de apareamiento a temperatura ambiente, se prepara una dilución de polimerasa de T7, a razón de 1,5 u/µL de tampón de dilución del enzima
- 3- Se prepara la disolución enzimática (*enzyme premix*) según las siguientes proporciones:

Mezcla de marcaje (<i>labelling mix</i>) dATP	n x 3 µL
Dilución de T7	n x 2 µL
α- ³⁵ S (dATP)	n x 1 µL

(n= número de cebadores)
- 4- Se añaden 6 µL de disolución enzimática a cada una de las reacciones de apareamiento.
- 5- A continuación, se incuba la reacción a temperatura ambiente 4 minutos, tiempo durante el cual se atemperan a 37 °C los tubos con los reactivos de terminación.
- 6- Se añaden 4,5 µL de reacción a cada terminación, mezclando e incubando a 37 °C durante 4 minutos.
- 7- Seguidamente, se agregan 5 µL de disolución de paro, manteniendo los tubos en hielo picado.
- 8- Antes de cargar se debe desnaturalizar el DNA a 80 °C durante 4 minutos.

GEL DE SECUENCIACIÓN: ELECTROFORESIS Y AUTORADIOGRAFÍA

Para la preparación de los geles de secuenciación se utilizó el sistema Macrophor de Pharmacia-LKB.

Preparación del gel

- 1- Partimos de una disolución de acrilamida 19 %/bisacrilamida 1 % en H₂O destilada.
- 2- Se prepara la siguiente mezcla en un vaso de precipitados, con agitación y calor:

Acrilamida/bisacrilamida (19/1)	10 mL
Tampón TBE x 5	20 mL
Urea	24,3 g

Se ajusta a 50 mL con H₂O destilada.
- 3- A continuación, se filtra la disolución a través de una membrana de 0,22 µm de poro, desgasificándola con una trompa de vacío durante unos 10 minutos.

Tratamiento de las placas y montaje del gel

El sistema consta de dos placas de vidrio entre las que se vierte el gel. La placa inferior está dotada de una camisa termostatizadora. El sistema requiere un tratamiento previo de las placas, de manera que el gel quedará unido a la placa libre (no termostatizada) cuando se proceda a desmontar el sistema.

- 4- Se trata el vidrio libre con una mezcla de 10 mL de etanol, 300 µL de ácido acético al 10 % y 30 µL de *Binding-silane* de Pharmacia. Para ello se procede a extender una capa uniforme del producto sobre el vidrio con la ayuda de un papel de filtro. Una vez seco el silano de unión se recomienda frotar el vidrio

tratado con un papel seco para eliminar restos del producto. Se efectúa la operación dos veces.

5- Se trata el vidrio termostatzado con 5 mL de *Repel-silane* de Pharmacia, siguiendo la misma pauta que con el silano de unión. A continuación se procede al montaje del gel.

6- Se montan los vidrios y los espaciadores, dejando un espacio entre ambos vidrios que llenaremos por capilaridad.

7- A la disolución del gel previamente preparada se le añaden 400 µL de persulfato amónico al 10 % y 40 µL de TEMED.

8- Se vierte la disolución entre los vidrios, evitando la formación de burbujas.

9- Se fijan los vidrios presionando con pinzas y se sitúa el peine formador de bolsillos en posición invertida (para crear un bolsillo único cuyo fondo perforaremos más tarde con los dientes del peine, para crear los compartimentos en los que cargar las muestras).

10- Se deja polimerizar un mínimo de 1 hora y un máximo de 12.

Electroforesis y autorradiografía

11- Se conecta la camisa termostatzadora a un baño recircularizador a 54 °C.

12- Se efectúa una preelectroforesis del gel a 3000 V, de 30 minutos a 1 hora.

13- Se desnaturaliza el DNA de las muestras (cada una de las cuatro reacciones de terminación) durante 4 minutos a 80 °C y se mantiene en hielo picado.

14- Cargar de 2,5 a 3 µL de cada reacción por bolsillo.

15- Se deja proseguir la electroforesis a 3000 V. Su duración dependerá de la longitud de la secuencia que queramos leer (generalmente de 2 a 3 horas).

16- Una vez desconectada la fuente eléctrica se separa el vidrio libre con el gel adherido y se fija en ácido acético al 10 % durante 15 minutos.

17- Secamos el gel en una estufa a 80 °C durante 2 horas.

18- Seguidamente, se deposita sobre el gel una película autorradiográfica, fijando el conjunto con pinzas y envolviéndolo todo en papel de aluminio para preservarlo de la luz.

19- Se expone de 12 a 48 horas, tras lo cual se revela y fija la película. Una vez seca, se puede proceder a la "lectura" de la secuencia.

Secuenciación automática

En el caso de los insertos de expresión, la confirmación de su identidad se llevó a cabo con el sistema de secuenciación automática BigDye (Perkin Elmer), utilizando el servicio de secuenciación de los Servicios Científico-Técnicos de la facultad de Biología de la Universidad Barcelona.

III.D.10. Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR es un método para la síntesis enzimática *in vitro* de secuencias definidas de DNA. La reacción emplea dos cebadores oligonucleótidos, complementarios a secuencias que flanquean el fragmento a amplificar. La elongación a partir de estos está mediada por una DNA polimerasa termoestable. Series repetidas de ciclos que implican desnaturalización del molde, la hibridación de los cebadores y la elongación a partir de ellos, conducen a una acumulación exponencial del fragmento de DNA específico. La técnica de la PCR se ha utilizado en este trabajo para amplificar diferentes secuencias de DNA y, al mismo tiempo, por mutagénesis dirigida, introducir dianas de restricción que facilitasen su clonación.

Tabla III.2: Cebadores oligonucleótidos para la subclonación y expresión de *tbp1*

En negrita se indican las bases mutadas para crear las dianas de restricción.

Oligonucleótido	Secuencia
EX5'	5' GCCTATTTGCCGTACAT TAT GTATGCAGAACAACG 3'

OLIGO A	5' CTTTGGTCTCGAGTCCCCAAG 3'
OLIGO B	5' GAGGTAAGCCATATGATTAAGCC 3'
OLIGO C	5' GAGGTAAGCCATATGATTAAGCC 3'
OLIGO D	5' GAGCATTTAGAAAGCTTTGTAATATG 3'
OLIGO E	5' GAGAACCAAAAACATATGACAGAGCG 3'
OLIGO F	5' GTGCCACTCCTCGAGAAAACGAGC 3'
OLIGO G	5' GAAATTGGTATCATATGAATAATGC 3'
OLIGO H	5' CTCAAAATCTCGAGGCGTTTTAAGG 3'
OLIGO I	5' GGGTAAACATCAATTACATATGTTATTAGG 3'
OLIGO J	5' GCGACTATGCCAAGCTTCCACGCAC 3'
OLIGO K	5' CGCTAAGCATATGTTCCGTAGCAC 3'
OLIGO L	5' GCACATTAATAAGTTAAAGCTTTGATTGAG 3'
OLIGO LL	5' CAAAAATGACCATAATGAGTTAATTGC 3'
EX3'	5' TACTCTAAACTCGAGTTTCATTTTCAATGAAA 3'
OLIGO2435	5' GTTGTAGGAGTGGGGTACTATCAGCC 3'

III.D.11. Análisis de la secuencia de DNA, traducción a aminoácidos y predicción de estructura secundaria de la proteína

Para el análisis de la secuencia de nucleótidos se han utilizado los siguientes programas informáticos:

- En el rastreo y análisis de los bancos de datos de EMBL, GenBank y PIR y para realizar las búsquedas de secuencias similares, se utilizó el *software* «Lasergene» (DNASTAR Inc.) y el paquete de herramientas del GCG (*Genetics Computer Group*, Accelrys desde 2001), así como la página web del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Genome).
- Para el alineamiento múltiple entre diferentes proteínas se utilizó el programa «Clustal V» (Higgins *et al.*, 1991), disponible en la página web del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), perteneciente al EMBL (www.ebi.ac.uk/clustalw).
- La predicción de la estructura secundaria de la proteína se estableció según un programa desarrollado por Clotet *et al.* (1994).
- Los motivos funcionales dentro de la secuencia de la proteína se realizaron con la ayuda de un programa descrito por Fuchs (1994), que rastrea los bancos de patrones funcionales «PROSITE» (Bairoch, 1992) y «BUILDING BLOCKS» (Henikoff y Henikoff, 1991).

III.E. Manipulación de proteínas

III.E.1. Electroforesis discontinua desnaturizante en geles de SDS-Poliacrilamida

La electroforesis discontinua en SDS-PAGE (Laemmli, 1970) permite el análisis de mezclas complejas de proteínas. El método utiliza un soporte físico constituido por cadenas de monómeros de acrilamida entrecruzadas con bis-acrilamida que polimerizan en disolución, en presencia de radicales libres. Estos radicales libres los aporta el persulfato amónico y quedan estabilizados por el TEMED. La densidad final de la malla depende de la concentración de monómeros de acrilamida y de la proporción que guarda con la bisacrilamida.

En esta electroforesis discontinua se utilizan dos tipos de gel simultáneamente: uno superior o de apilamiento y otro inferior o de resolución. El superior contiene una menor proporción de acrilamida y el tampón que interviene en su preparación posee una fuerza iónica y un pH menores que en el gel inferior. La baja densidad del entramado de acrilamida en este gel hace que las moléculas encuentren menor resistencia física a su paso. Por otro lado, una fuerza iónica más baja implica mayor resistencia eléctrica y, por tanto, una diferencia de potencial más elevada. Como consecuencia, las proteínas avanzarán más rápidamente que en el gel de resolución, acumulándose en la frontera entre este gel y el de resolución. El resultado de este fenómeno será que una población heterogénea de proteínas se concentrará en un espacio

muy pequeño antes de penetrar en este segundo gel, favoreciendo la migración de las proteínas en bandas muy finas que incrementan la resolución de la técnica.

El SDS es un detergente iónico que desnatura las proteínas. Se une a ellas en una relación constante igual a 1,4 g SDS/g proteína, enmascarando su carga y consiguiendo que migren de forma proporcional a su peso molecular. Las condiciones reductoras que puede inducir la adición de los tampones de carga permiten mantener reducidos posibles puentes disulfuro que podrían modificar la movilidad de las proteínas.

TAMPONES Y DISOLUCIONES

Tampón de resolución (inferior) 4x:

Tris-base	181,71 g (1,5 M final). Ajustar el pH a 8,8 con HCl
SDS	4 g (0,4 % final)
H ₂ O destilada	c.s.p. 1L

Tampón de apilamiento (superior) 4x:

Tris-base	60,58 g (0,5 M final). Ajustar el pH a 6,8 con HCl
SDS	4 g (0,4 % final)
H ₂ O destilada	c.s.p. 1L

Solución acrilamida 40 %/bis-acrilamida 1,06 % (37,5:1)

Utilizamos una solución comercial (Bio-Rad).

Tampón de cubetas 10x:

Glicina	1,92 M
Tris-HCl	0,25 M
SDS	1 %

Tampón de carga de proteínas 4x:

Tris-HCl	200 mM, pH 6,8
DTT	400 mM
SDS	8 %
Azul de bromofenol	0,4 %
Glicerol	40 %

Disolución del gel de resolución (para un grosor de gel de 0,75 mm. Si utilizamos separadores de 1,5 mm, doblaremos las cantidades de cada componente).

<i>Gel Resolución</i>	<i>Cantidad de cada componente según el % final de acrilamida</i>				
Componente	15 %	14 %	12 %	10 %	7,5 %
Tampón inferior	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
H ₂ O destilada	2,25 mL	2,4 mL	2,7 mL	3,0 mL	3,375 mL
Acrilamida 40 %/Bis1 %	2,25 mL	2,1 mL	1,8 mL	1,5 mL	1,125 mL
TEMED	12 µL	12 µL	12 µL	12 µL	12 µL
PSA 10 %	96 µL	96 µL	96 µL	96 µL	96 µL

El porcentaje de acrilamida/bis-acrilamida a preparar dependerá del peso molecular de las proteínas que queramos resolver. En general, podemos aplicar el criterio recogido en la siguiente tabla:

<i>Concentración de acrilamida (%)</i>	<i>Rango lineal de separación (kDa)</i>
15	12-43
10	16-68
7,5	36-94

Disolución del gel de apilamiento

<i>Gel de apilamiento</i>	<i>Acrilamida 3,5 %</i>
Componente	Cantidad
Tampón superior	1,5 mL
H ₂ O	3,94 mL
Acrilamida 37,5 %/Bis 1 %	0,56 mL
TEMED	24 µL
PSA 10 %	240 µL

PREPARACIÓN DE LOS GELES Y CONDICIONES DE ELECTROFORESIS

Se describe el procedimiento para el sistema de electroforesis Mini-Protean (Bio-Rad):

- 1- Montar los vidrios y la cubeta utilizando los separadores de 1,5 ó 0,75 mm, en función del volumen muestra que queramos analizar.
- 2- Preparar la disolución de resolución según la tabla correspondiente.
- 3- Verter el gel inferior entre los dos vidrios y dejarlo polimerizar, cubierto por una fina capa de agua destilada o isopropanol.
- 4- Cuando el gel de resolución esté polimerizado, eliminar la capa de agua o isopropanol que se ha depositado anteriormente aclarando abundantemente con agua y verter el gel de apilamiento, que prepararemos como se indica en la tabla correspondiente.
- 5- Colocar rápidamente el peine y esperar a que el gel polimerice por completo.
- 6- Preparar la solución de proteínas con tampón de carga 1x y hervir durante 5 minutos.
- 7- Colocar el «sándwich» de vidrios en la cubeta de electroforesis y verter el tampón de cubetas. Extraer con cuidado el peine y eliminar con tampón los residuos de acrilamida del interior de los pocillos.
- 8- Aplicar las muestras y los marcadores de peso molecular y resolver la electroforesis a 20 mA hasta que el colorante alcance el final del gel.
- 9- Teñir con azul de Coomassie. Este método es cuantitativo y específico para proteínas. Su umbral de detección es de 0,3-1 µg por banda de proteína. Todos los pasos se realizan con agitación suave a temperatura ambiente:
 - a- se tiñe el gel con una solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma) al 1 %, disuelto en ácido acético:metanol:agua (1:4,5:4,5), de 15 a 30 minutos.
 - b- a continuación, se destiñe el gel en una solución de ácido acético 7-10 %, efectuando varios cambios hasta que destaquen las bandas de proteína sobre el fondo del gel.

III.E.2. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa

La unión de proteínas a membranas de nitrocelulosa y su posterior detección (en el presente trabajo, con anticuerpos o con transferrina porcina, según el caso) es una técnica cualitativa rápida y sensible, con múltiples aplicaciones, como la identificación de proteínas específicas a partir de una mezcla heterogénea.

Las proteínas se pueden fijar a la membrana por transferencia, previa resolución en un gel de poliacrilamida (transferencia Western), o pueden ser aplicadas directamente sobre la membrana en forma de gota (*dot blot*). La razón por la que se transfieren proteínas desde geles a membranas es hacerlas más accesibles a distintas pruebas, ya que la poliacrilamida no es muy adecuada para la difusión de grandes moléculas

TRANSFERENCIA WESTERN

- 1- Resolver en un gel de SDS-PAGE las proteínas a analizar junto a un marcador de peso molecular preteñido, como SeeBlue (Novex) o BenchMark (Life Technologies). Es conveniente resolver los geles por duplicado para teñir uno y transferir otro.
- 2- Finalizada la electroforesis, preequilibrar el gel en tampón de transferencia (Tris·HCl 25 mM, pH 8,3-8,4 / glicina 192 mM / metanol 20 % (v/v) / SDS 0,1 % (v/v)) durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación suave.
- 3- Cortar una pieza de papel de nitrocelulosa (BA85, Schleicher & Schuell) de un tamaño algo mayor que el del gel. Hidratarlo con agua destilada y a continuación con tampón de transferencia.
- 4- Cortar cuatro recuadros de papel Whatman 3MM de tamaño igual al papel de nitrocelulosa y humedecerlos en tampón de transferencia.
- 5- Sumergido en una cubeta con tampón de transferencia y evitando que queden burbujas atrapadas entre cualquier de sus componentes, montar el «sándwich» en el orden siguiente: cátodo (polo -), esponja, 2 papeles Whatman, gel, nitrocelulosa, 2 papeles Whatman, esponja, ánodo (polo +).
- 6- Instalar el «sándwich» en la cubeta con tampón de transferencia e insertar un acumulador de agua congelada (BioIce, Bio-Rad) y una varilla magnética.
- 7- Realizar la transferencia a 100 V (0,25 A) durante 1 hora con agitación.
- 8- Si la electrotransferencia se ha desarrollado satisfactoriamente, los colorantes de los controles de peso molecular preteñidos se observarán marcados nítidamente en la nitrocelulosa. Asimismo, tras teñir el gel transferido, no se deben observar en éste las bandas que deseábamos transferir.

III.E.3. Detección de proteínas con anticuerpos sobre membranas de nitrocelulosa

El tipo más común de prueba al que se someten las proteínas inmovilizadas es la detección con un anticuerpo. El complejo antígeno-anticuerpo se visualiza por inmunoensayo enzimático indirecto, usando un sustrato cromogénico que generará un producto insoluble. Resulta una técnica interesante porque permite simultáneamente determinar la antigenicidad de una proteína y su masa molecular (al combinar electroforesis y detección por anticuerpos).

INMUNOENSAYO SOBRE MEMBRANA DE NITROCELULOSA

(Todas las incubaciones siguientes se llevan a cabo con agitación)

- 1- Bloquear la membrana a la que se han transferido las proteínas a detectar con PBS/BSA 3 % (p/v) / Tween-20 0,1 % (v/v), de 30 minutos a 12 h (a 4 °C). Con este tratamiento se evita la adsorción inespecífica de anticuerpos a la membrana.
- 2- Lavar con PBS / Tween-20 0,1 % (v/v) durante 10 minutos y con PBS durante 10 minutos.
- 3- Incubar la membrana con el anticuerpo, a la dilución apropiada para cada caso, en PBS / BSA 0,5 % durante 2 horas a temperatura ambiente.

- 4- Realizar tres lavados consecutivos:
 - a- con PBS / Tween-20 0,1 % (v/v) durante 10 minutos
 - b- con PBS / Tween-20 0,1 % (v/v) / NaCl 1M durante 10 minutos y
 - c- con PBS durante 10 minutos.
- 5- Incubar con el anti-anticuerpo (Anti-Pig IgG (H+L), The Binding Site, Ltd.), a una dilución 1/2000 en PBS / Tween-20 0,1 % (v/v) durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 6- Lavar con PBS/Tween-20 0,1 % (v/v) durante 10 minutos y con PBS durante otros 10.
- 7- Para la detección con el sustrato cromogénico, preparar la siguiente mezcla:

HRPO Color Development Buffer Bio-Rad (20mM Tris-HCl, pH 7,5/500mM NaCl)	10 mL
Reactivo B, Bio-Rad (H ₂ O ₂)	60 µl
Reactivo A, Bio-Rad (4-cloro-1-naftol)	2 mL
- 8- Sumergir la membrana de nitrocelulosa en la solución de revelado.
- 9- Detener la reacción con H₂O destilada cuando obtengamos la señal deseada.
- 10- Secar la membrana al aire y conservar entre dos papeles de filtro.

III.E.4. Determinación de la concentración de proteína total (Método de Bradford, 1976)

Este método colorimétrico se basa en la especificidad de unión del colorante azul de Coomassie a las proteínas y en el viraje del color del reactivo al unirse a éstas, en presencia de una solución ácida, aumentando la absorbancia de 465 a 595 nm. Para su realización se ha seguido el manual que adjunta el producto Coomassie Brilliant Blue (Pierce), el cual incluye un protocolo basado en el método de Bradford.

III.E.5. Producción de las proteínas recombinantes en el sistema pET y purificación

Ya hemos comentado en el apartado III.B las propiedades de los plásmidos de la serie pET utilizados para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Los genes son clonados bajo el control de señales de transcripción y, opcionalmente, de traducción del bacteriófago T7, y su expresión se induce al proporcionar una fuente de RNA polimerasa del fago T7 al medio en el que se cultiva la célula hospedante. Este enzima es muy activo y selectivo, lo cual provoca que la mayor parte de los recursos de la célula se inviertan en la producción de la proteína recombinante. Otra ventaja importante de este sistema es la posibilidad de mantener silente el gen recombinante hasta el momento de la inducción, circunstancia que resulta especialmente útil para proteínas potencialmente tóxicas. Generalmente, el proceso de transformación sigue dos pasos. En el primero se transforma con el plásmido recombinante una cepa que no posea copia cromosómica del gen de la RNA polimerasa de T7. Una vez estabilizado así, el plásmido se pasa a una cepa que sí contenga copia de la polimerasa, bajo el control de *lacUV5*, pudiéndose inducir en esta cepa la expresión mediante la adición de IPTG. Este sistema se ha empleado en la producción de la mayoría de los antígenos objeto de estudio en la presente tesis. El proceso se divide en tres etapas: producción, tratamiento de la muestra y posterior purificación.

DISOLUCIONES

Tampón de unión 8x

Imidazol	40 mM
NaCl	4M
Tris-HCl	160 mM pH 7,9

Tampón de carga 8x

NiSO ₄	400 mM
-------------------	--------

Tampón de lavado 8x

Imidazol	480 mM
NaCl	4M
Tris-HCl	160 mM pH 7,9

Tampón de elución 4x

Imidazol	4M
NaCl	2M
Tris-HCl	80 mM pH 7,9

A todos los tampones excepto al de carga se les añade urea 6M al reconstituirlos a 1x.

PRODUCCIÓN

- 1- A partir de un cultivo glicerinado se inocula con la ayuda de un asa de Kolle una estría sobre una placa de LB ampicilina (50 µg/mL) y se incuba 12 horas a 37°C.
- 2- Se pica una colonia única, con la que se inoculan 3 mL de medio LB ampicilina (en un tubo de 10 mL) y se incuba a 37 °C con agitación hasta que la D.O. del medio a 600 nm alcance 0,6 unidades.
- 3- Transferir 2 mL de este precultivo a 2 viales, en los cuales se centrifugará para eliminar el medio sobrenadante y recuperar el sedimento de células.
- 4- Resuspender el sedimento con 2 mL de medio LB fresco y transferir la suspensión celular a un frasco de 250 mL con 50 mL de LB ampicilina, incubando el cultivo a 37 °C con agitación hasta que la D.O. a 600 nm sea de 0,6 unidades.
- 5- Inocular un volumen de 5 mL de este cultivo en cada uno de los 4 frascos que debemos tener preparados a este efecto, en los que hemos dispuesto 250 mL de LB ampicilina. Incubar a 37 °C con agitación hasta que la D.O. a 600 nm sea de 0,6.
- 6- Inducir la expresión de la proteína recombinante con IPTG a una concentración final de 1 mM.
- 7- Incubar durante unas 4 horas a partir del momento de la inducción.
- 8- Centrifugar el cultivo a 5000 xg durante 10 minutos y eliminar el sobrenadante.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

- 9- Resuspender el sedimento obtenido en el paso anterior (correspondiente a 1 L de cultivo) en 320 mL de tampón de unión.
- 10- Sonicar durante 30 minutos a una potencia de 50 W.
- 11- Centrifugar a 20 000 xg durante 15 minutos.
- 12- Resuspender el sedimento en 160 mL de tampón de unión y sonicar durante 15 minutos a 50 W.
- 13- Centrifugar 20 000 xg durante 15 minutos.
- 14- Resuspender el sedimento en 20 mL de una solución de tampón de unión con urea 6M, incubando 1 hora a 4°C.
- 15- Centrifugar a 39 000 xg durante 20 minutos.
- 16- Filtrar el sobrenadante a través de un filtro de 0,45 µm.

PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA

- 17- Preparar la columna de purificación empaquetando por gravedad 2,5 mL de resina fast Flow Sepharose de Pharmacia.
- 18- Conectar la columna dentro del circuito del cromatógrafo.
- 19- Ajustar el flujo de forma que cada minuto circule por ésta 1/10 de su volumen total. En el caso que describimos, 250 $\mu\text{L}/\text{min}$.
- 20- Efectuar un primer lavado con 7,5 mL de H_2O desionizada.
- 21- A continuación, hacer circular 12,5 mL de tampón de carga.
- 22- Pasar 7,5 mL de tampón de unión con 6 M urea.
- 23- Cargar la muestra tal como se obtiene tras la filtración descrita en el paso 16 de este protocolo.
- 24- Lavar la columna con 25 mL de tampón de unión.
- 25- Efectuar un segundo lavado con 15 mL de tampón 20 mM imidazol (para su preparación se mezclan 11 mL de tampón de unión con 4,1 mL de tampón de lavado). Recoger fracciones de 3 mL.
- 26- Recuperar la proteína recombinante, fusionada a las colas de histidina, con 15 mL de tampón de elución (puede diluirse con tampón de unión para obtener concentraciones de imidazol de 300 mM). Recoger fracciones de 1 mL.
- 27- Para dejar la columna en condiciones de ser reutilizada se hacen circular por ésta 15 mL de tampón de regeneración.
- 28- Con la ayuda del cromatograma registrado por el cromatógrafo y con una posterior comprobación por SDS-PAGE y Bradford se puede valorar y cuantificar la proteína producida y purificada, la cual puede conservarse a -20°C en el mismo tampón en el que ha sido eluída.

III.F. Pruebas de vacunación

Los ensayos de vacunación con los animales a los que se ha hecho referencia en el apartado II.B se llevaron a cabo en el Centro de Experimentación, Análisis y Control (CEYC) de los Laboratorios HIPRA S.A. Las inoculaciones se realizaron por inyección vía intramuscular, aplicando las pautas de vacunación y las dosis que se indican en el apartado IV.C.2.

III.G. Inmunoensayo ligado a enzima

El ELISA es un ensayo cuantitativo basado en la interacción específica antígeno-anticuerpo, en el que se utilizan conjugados consistentes en anticuerpos o antígenos ligados a un enzima cuya actividad es capaz de generar productos detectables por colorimetría o por fluorescencia.

Este ensayo permite una cuantificación precisa de la interacción antígeno-anticuerpo, pero a diferencia del inmunoensayo enzimático indirecto sobre membrana de nitrocelulosa que se lleva a cabo tras una transferencia Western, si no se realiza directamente sobre muestras de antígeno purificado resulta complicado determinar el grado de respuesta frente a otros componentes de la mezcla. Por este motivo, utilizamos el ensayo indirecto sobre membrana principalmente para detectar la presencia de un antígeno en un extracto celular total o en diferentes fracciones celulares, mientras que aplicamos el ELISA a ensayos posteriores a la purificación del antígeno o a valoraciones de sueros.

Existen dos tipos generales de ELISA: competitivo y no competitivo. En el primero se establece una competición entre dos reactivos por un mismo sustrato, uno de los cuales se encuentra en concentración conocida o constante. El ensayo permite cuantificar de manera relativa o absoluta el reactivo competidor. En los ensayos no competitivos se mide la interacción del analito problema, ya sea antígeno o anticuerpo, en relación a controles de reactividad conocida.

En ambos tipos de ELISA es posible detectar antígenos y anticuerpos. En la detección de anticuerpos mediante ELISA no competitivo se distinguen dos tipos de ensayo: de captura e indirectos. En el presente trabajo se ha empleado el ensayo indirecto por considerarse el mejor formato para la cuantificación de anticuerpos específicos en muestras de suero. Para ello, se inmovilizan los antígenos en la placa y sobre ellos se incuba la muestra de suero diluida. A continuación, y tras un lavado para eliminar los anticuerpos no unidos, se aplica un anticuerpo contra anticuerpos porcinos conjugado con el enzima peroxidasa, cuya actividad hace virar un sustrato cromogénico específico que permite valorar por colorimetría la reacción.

En este trabajo hemos aplicado dos métodos distintos, en función de las necesidades del momento y de los medios a nuestro alcance. En los estudios realizados en el IBB, cuyo objetivo era el desarrollo de un ensayo de uso interno para la valoración de los sueros procedentes de los experimentos de vacunación, se utilizó el sistema descrito en el apartado III.G.1, mientras que en la parte del trabajo que se ha llevado a cabo en los Laboratorios HIPRA, que corresponde a un proceso más sistemático de desarrollo de un método de ELISA como fin y no como medio, y que se dirigía a la consecución de uno de los objetivos generales de esta tesis, el desarrollo de un kit de diagnóstico comercializable, se ha aplicado el sistema descrito en III.G.2.

III.G.1. ELISA. Método 1 (ensayo interno aplicado en el IBB)

DISOLUCIONES

Tampón carbonato 0,1 M, pH 9,6:

Solución A:	Na ₂ CO ₃	2,76 g
	H ₂ O MilliQ	130 mL

Solución B:	NaHCO ₃	6,22 g
	H ₂ O MilliQ	370 mL

Preparación del tampón:

Solución A	26 %
Solución B	74 %

Solución Salina-Tween:

NaCl	1,5 M	(90 g/L)
Tween 20	0,5 %	(5mL/L)

PBS-Tween:

Tween 20	0,05 %
Tampón PBS	

MBTH:

a) Tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0:

KH ₂ PO ₄	5,3 g
NaH ₂ PO ₄	8,65 g
H ₂ O	c.s.p. 1 L

b) Se preparan 500 mL de una disolución de MBTH (3-metil 2-benzotiazolinona cloruro de hidrazona monohidrato) 1,8 mM en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0 de la siguiente manera:

i) 210 mg MBTH en 400 mL de tampón fosfato

ii) ajustar el pH a 6,5 con HCl

iii) agitar 1 hora a temperatura ambiente

iv) añadir tampón fosfato hasta 500 mL, ajustando el pH a 6,5 y filtrando a través de 0,22 µm.

v) medir la D.O. a 258 nm de una dilución 1/10 de la disolución anterior. Para calcular la concentración de MBTH en la misma, es preciso tener en cuenta que la D.O.₂₈₅ de una solución de MBTH 1,8 mM es 0,93.

vi) distribuir la solución en cantidades alícuotas de 9,3 mL y conservarla a -20°C protegida de la luz (es fotosensible).

DMAB

- a) Tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0 (preparado según se ha indicado para en el caso del MBTH).
- b) Preparar 200 mL de una disolución de DMAB (ácido 3-dietilaminobenzoico) 180 mM en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0, como se señala a continuación:
 - i)* 6 g DMAB en 160 mL de tampón fosfato
 - ii)* ajustar el pH a 7,0 con NaOH 5M
 - iii)* agitar 1 hora a temperatura ambiente, ajustando periódicamente el pH.
 - iv)* añadir tampón fosfato hasta 200 mL, ajustando de nuevo el pH a 7,0 y filtrando a través de 0,22 µm.
 - v)* medir la D.O. a 305 nm de una dilución 1/200 de la disolución anterior, que ha de ser 1,29. Conservar a -20°C en alícuotas de 2,35 mL.

Mezcla de revelado:

DMAB 180 mM	3,2 mL
MBTH 1,8 mM	8,5 mL
PBS	6 mL
H ₂ O ₂ 30 %	7 µl

ELISA. MÉTODO 1

- 1-** Depositar en cada pocillo de la placa de ELISA 50 µL de disolución de antígeno en tampón carbonato. Es conveniente hacer duplicados de los pocillos y dejar un par de pocillos sin antígeno como control negativo. Incubar 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. La cantidad de antígeno que se aplica por pocillo debe optimizarse para cada caso.
- 2-** Eliminar la disolución de antígeno por decantación vigorosa, lavar los pocillos tres veces con 180 µL de solución salina-Tween. En cada lavado, llenar los pocillos y vaciarlos por decantación. Después del último lavado, secar la placa golpeando contra papel secante.
- 3-** Bloquear añadiendo a cada pocillo 150 µL de PBS-Tween/BSA 3 %. Incubar 1 hora en cámara húmeda.
- 4-** Repetir el paso 2.
- 5-** Aplicar 50 µL de una dilución de 1/10 a 1/500 de suero en PBS/BSA 0,5% (generalmente 1/50).
- 6-** Repetir el paso 2.
- 7-** Incubar el complejo antígeno-anticuerpo con 50 µL/pocillo de una disolución 1/2000 en PBS-Tween del segundo anticuerpo, conjugado a HRPO (Anti-Pig IgG (H+L)-HRPO, The Binding Site, Ltd.). Mantener 1h a 37 °C en cámara húmeda.
- 8-** Repetir el paso 2, comprobando que los pocillos queden bien secos.
- 9-** Añadir a cada pocillo 100 µL de mezcla de revelado e incubar en la oscuridad hasta que los pocillos presenten un tono azulado; controlar que éste no se presenta en los pocillos control. En general, el tiempo máximo es de unos 5 minutos.
- 10-** Detener la reacción con una disolución de H₂SO₄ 2M (40 µL por pocillo).
- 11-** Determinar la absorbancia de la reacción a 620 nm.

III.G.2. ELISA. Método 2 (utilizado en Laboratorios HIPRA S.A.)

DISOLUCIONES

En este método se han utilizado los tampones carbonato y PBS-Tween preparados como se indica en el apartado III.G.1.

Durante el desarrollo del ensayo se utilizaron diferentes soluciones de bloqueo y de dilución de muestras:

Soluciones de bloqueo:

- a) Leche en polvo desnatada al 3 % p/v en PBS Tween 0,05 %
- b) Lactosa 2 % en PBS-Tween 0,05 %
- c) Lactosa 5 % + Stabilcoat (Surmodics®) 20 % en PBS-Tween 0,05 %

Soluciones diluyentes de muestras:

- a) Leche en polvo desnatada al 3 % p/v en PBS Tween 0,05 %
- b) Peptona-triptona 10 g/L en PBS Tween 0,05 %
- c) Suero de bovino adulto (Hyclon®) al 4 % v/v en PBS Tween 0,05 %

ELISA. MÉTODO 2

- 1- Cargar una disolución de antígeno en tampón carbonato (50 µL por pocillo). Se incuba 18 horas a 4 °C en cámara húmeda. La concentración de antígeno que se aplica por pocillo debe optimizarse para cada caso.
- 2- Lavados: utilizando el lavador automático, lavar los pocillos dos veces con 300 µL de tampón PBS.
- 3- Añadir por medio de un dispensador automático a cada pocillo 150 µL de una solución de bloqueo, incubando a continuación 1 hora en cámara húmeda.
- 4- Decantar manualmente las placas y secar incubándolas durante 1,5 horas en una estufa de aire forzado a 37 °C.
- 5- Una vez secas, las placas pueden almacenarse en bolsas selladas con una bolsita de sílice a 4 °C hasta su uso, o utilizarse una vez atemperadas.
- 6- Aplicar el primer anticuerpo, incubando la muestra con 50 µL de suero diluido durante 1 hora a 37 °C. La dilución del suero puede ir de 1/10 a 1/500 según el caso, siendo la más usual 1/200 en diluyente de muestras.
- 7- Lavar, por medio del lavador automático, dos veces cada pocillo con 300 µL de una disolución PBS-Tween 0,05 %.
- 8- Incubar la placa con el anticuerpo conjugado a la HRPO: añadir a los pocillos 50 µL de una disolución 1/2000 del segundo anticuerpo en PBS-Tween, incubando 1 hora a 37 °C en cámara húmeda.
- 9- Repetimos el paso 7, asegurándonos que los pocillos quedan bien secos.
- 10- Para el revelado, añadir a cada pocillo 50 µL de disolución de revelado (ABTS) e incubar en la oscuridad 10 minutos a temperatura ambiente.
- 11- La reacción se detiene añadiendo a cada pocillo 50 µL de disolución de paro (ácido oxálico 0,3 M en H₂O).
- 12- Se procede a la lectura de la placa a una longitud de onda de 405 nm.
- 13- Los resultados se expresan como IRPC (índice relativo por cien), que se calcula a través del cociente de la absorbancia de la muestra problema respecto a la de los controles, según la siguiente fórmula:

$$\text{IRPC} = \left[\frac{\text{D.O}_{405}\text{Muestra} - \text{Media DO}_{405} \text{ Control Negativo}}{\text{Media DO}_{405} \text{ Control Positivo} - \text{Media DO}_{405} \text{ Control Negativo}} \right] \times 100$$

IV. Resultados y discusión

El objetivo de este trabajo, como ya se ha indicado en el apartado II, ha sido la formulación de dos herramientas para el control de la pleuroneumonía porcina: una vacuna por subunidades y un método de ELISA indirecto para el diagnóstico serológico. Fue necesario, en ambos casos, determinar previamente los antígenos a utilizar, que debían ser antigénicos e inmunógenos, es decir, capaces de provocar una respuesta detectable por métodos serológicos, como parte de la respuesta protectora generada.

Una de las consideraciones previas más importantes era la gran diversidad de serotipos que presenta *A. pleuropneumoniae*. Era preciso descartar antígenos cuya gran variabilidad entre serotipos provocara respuestas propias de serotipo y no de especie. De los diferentes factores de virulencia con capacidad antigénica se desestimaron los polisacáridos capsulares (CPS) y los lipopolisacáridos (LPS), debido a que los primeros poseen poca capacidad antigénica por sí mismos y son específicos de serotipo y los segundos, a pesar de ser buenos antígenos y poseer acción como adyuvante, resultan muy tóxicos y específicos de serotipo. Nos inclinamos, en cambio, por las proteínas de membrana externa (OMP) y las exotoxinas.

En concreto, los antígenos escogidos fueron las OMP que funcionan como receptores de la transferrina, Tbp1 y Tbp2 (Rapp *et al.*, 1986; Deneer y Potter, 1989a y 1989b; González *et al.*, 1990); la hemolisina I o ApxI (proteína de unos 105 kDa con actividad fuertemente hemolítica y citotóxica; Frey y Nicolet, 1988a y 1991; Kamp *et al.*, 1991; Jansen *et al.*, 1992; Jansen *et al.*, 1993) y la citolisina III o ApxIII (proteína de unos 120 kDa con actividad citotóxica alta; Jansen *et al.*, 1992; Van Leengoed y Dickerson, 1992; Jansen *et al.*, 1993). Otras citolisinas o hemolisinas, como la Apx II, presentan baja actividad hemolítica o citolítica, por lo que descartamos su uso en una vacuna recombinante. En la introducción se describen más ampliamente las propiedades de estas proteínas, su papel como factores de virulencia (ver I.B.2.), componentes de vacunas (ver I.C) y como antígenos para el diagnóstico (ver I.D).

Tras determinar cuáles serían los antígenos empleados, fue necesario definir una estrategia para su obtención. Se plantearon dos opciones: su purificación a partir de cultivos de *A. pleuropneumoniae* o su producción como proteínas recombinantes de forma heteróloga en *E. coli*. La obtención a partir de cultivos de *A. pleuropneumoniae* se presentó

desde el principio como la opción menos atractiva, al estar descritos los bajos rendimientos que se obtenían para ambos tipos de antígenos en el caso de *A. pleuropneumoniae* y otras especies relacionadas (Frey y Nicolet, 1988b; Byrd y Kadis, 1992). Además, no parecía presentarse como un método estandarizable que permitiese obtener unos resultados aplicables a escala industrial. Por otra parte, las vacunas preexistentes basadas en extractos bacterianos, como consecuencia de los métodos de extracción, contenían cantidades muy pequeñas de algunas de las citolisinas y hemolisinas inmunógenas y, a la vez, incluían compuestos fuertemente tóxicos, como lipopolisacáridos y polisacáridos capsulares.

Nuestro grupo de investigación poseía experiencia en los métodos de producción de proteínas recombinantes en *E. coli* (Molina *et al.*, 1992). Este hecho, unido a la gran disponibilidad de vectores de clonación/expresión/secreción y a la facilidad de control y economía del cultivo, nos llevó a decantarnos por la producción en forma recombinante de las proteínas antigénicas. No obstante, también se procedió, por fraccionamiento a partir de cultivos de *A. pleuropneumoniae*, a la obtención a escala analítica de todos los antígenos que, parcialmente purificados, se utilizaron como control positivo en algunas pruebas diseñadas para caracterizar la respuesta obtenida frente a los antígenos de origen recombinante.

IV.A. Clonación de los genes *tbp1* y *tbp2* y secuenciación de *tbp1*

El primer requisito para poder expresar de forma recombinante las proteínas escogidas era conocer la secuencia de sus genes codificantes. De las cuatro proteínas con las que se pretendía trabajar (Tbp1, Tbp2, ApxI y ApxIII), la secuencia del gen codificante para Tbp1 era la única que no estaba descrita en la bibliografía. Para localizar el gen en el genoma de *A. pleuropneumoniae*, tomamos como referencia el operón *tbp* de *Neisseria meningitidis*, descrito previamente (Legrain *et al.*, 1993; Pintor *et al.*, 1993). En éste, el gen *tbp1* tiene su extremo 5' a 87 pb del extremo 3' del gen *tbp2*. En la figura IV.1 se muestra un esquema de esta disposición del operon *tbp*.

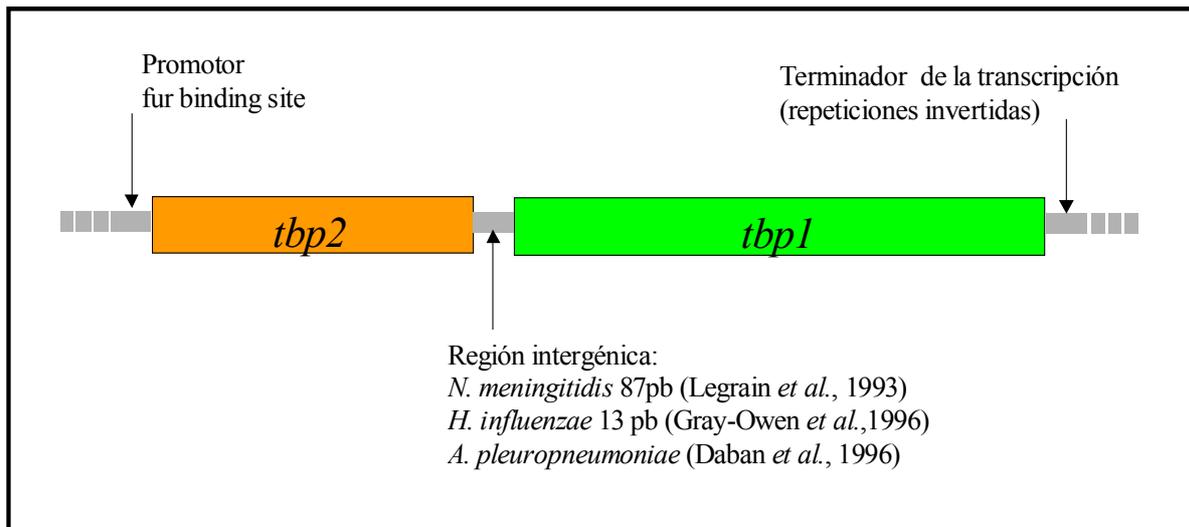


Figura IV.1. Modelo del operón *tbp*. En el se indica la posición relativa de los genes *tbp2* y *tbp1*

La proximidad filogenética de ambas especies, *A. pleuropneumoniae* y *N. meningitidis*, y la utilización de un mismo sistema para la obtención de hierro nos indujo a pensar que *A. pleuropneumoniae* podía presentar el mismo modelo de operón, en el que el gen *tbp1* se localizaría a continuación del gen *tbp2*. Reforzando esta idea, en la secuencia publicada del gen *tbp2* de *A. pleuropneumoniae* (Gerlach *et al.*, 1992) se observaba una pauta abierta de lectura (ORF), situada a 13 pb del codón de fin de traducción de *tbp2*, la cual pensamos que podía corresponder a la secuencia codificante para Tbp1. Por todo ello, se utilizó el gen *tbp2* como sonda para localizar el gen *tbp1* en el genoma de *A. pleuropneumoniae*, proceso esquematizado en la figura IV.2.

El gen *tbp2* del serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae* está flanqueado por las dianas *Nsi* I y *Acc65* I, las cuales se utilizaron para liberar el gen *tbp2* previamente a su clonación. *Nsi* I digiere en la posición +5 de *tbp2* y *Acc65* I lo hace fuera del gen, a 116 pb del extremo 3' de *tbp2*.

El fragmento *Nsi* I- *Acc65* I que contiene el gen *tbp2* tiene 1893 pb. Por tanto, se procedió a digerir completamente DNA genómico de *A. pleuropneumoniae* con *Nsi* I y *Acc65* I, recuperándose a partir de geles de agarosa al 1% en TAE los fragmentos comprendidos entre 1800 y 2000 pb. Estos fragmentos fueron clonados en el vector pUC119, entre las dianas *Pst* I (compatible con *Nsi* I) y *Acc65* I, ambas pertenecientes a la región de clonación múltiple y situadas, respectivamente, en las posiciones 250 y 277 de esta secuencia del vector. Con el resultado de esta ligación se transformaron células

competentes de *E. coli* de la cepa XL1-Blue, las cuales se sembraron en placas de LB agar, amp, IPTG y X-gal.

Para rastrear los clones positivos con la secuencia de *tbp2* insertada, se hizo una extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina de las colonias portadoras de plásmidos recombinantes y se digirió con *Bgl* II. Éste es un enzima que no tiene dianas en pUC119 y que reconoce dos puntos de corte en *tbp2*. El clon positivo debía liberar dos fragmentos: una fracción del inserto de 753 pb y una banda de 4,3 Kb, correspondiente a la suma del vector y el resto del inserto. De las 50 colonias portadoras de plásmidos recombinantes, tan sólo una presentaba la restricción esperada, liberando el fragmento de 753 pb.

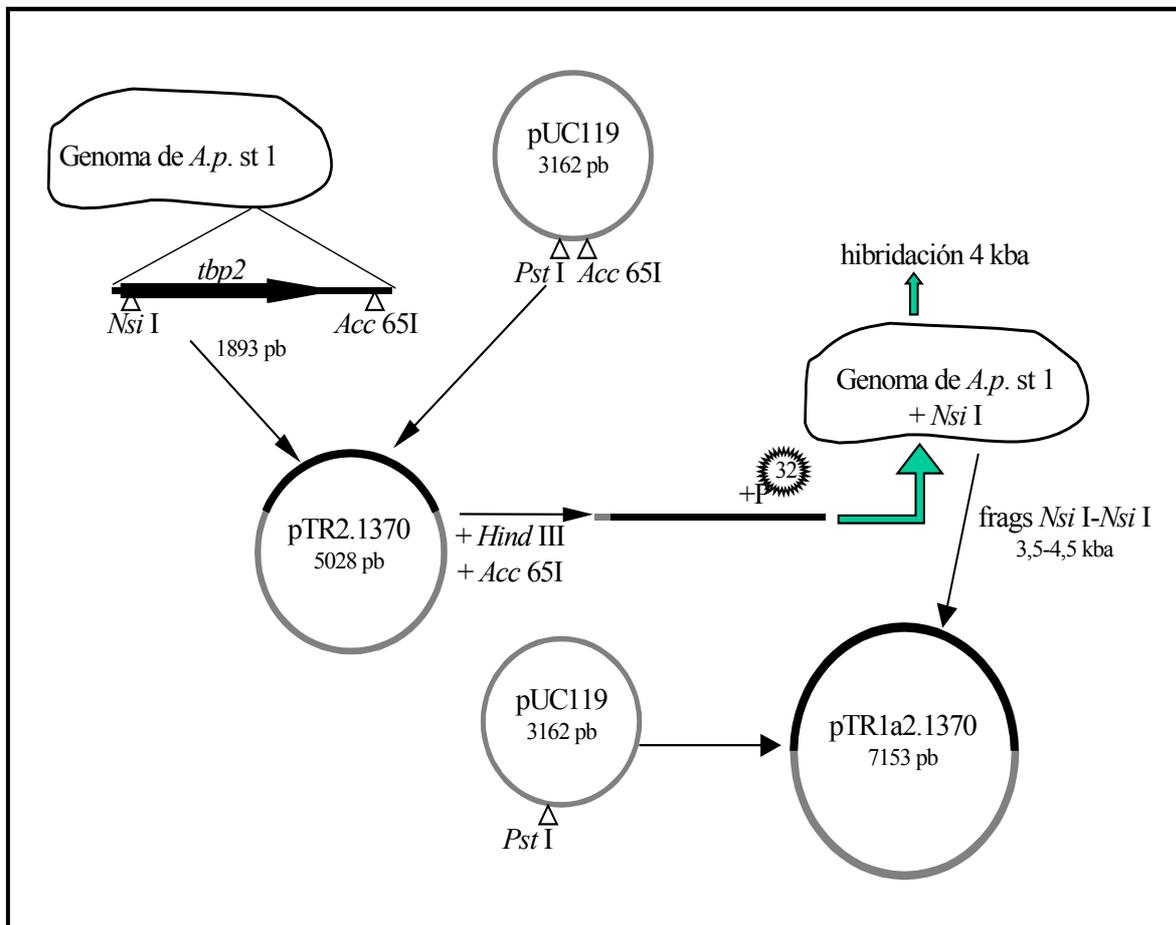


Figura IV.2. Esquema de la estrategia seguida para la localización de *tbp1* en el genoma de *A. pleuropneumoniae*. Liberación de *tbp2*, clonación en pUC119, marcaje radioactivo, hibridación sobre digestión de genómico y clonación de los fragmentos de 3,5 a 4,5 kb.

La identidad del clon recombinante se confirmó por secuenciación enzimática, usando como cebador el *universal reverse primer* del M13. La secuencia resultante

correspondía al extremo 5' de *tbp2*, tal como se comprobó sobre la secuencia publicada (Gerlach *et al.*, 1992). Al plásmido recombinante se le dio el nombre de pTR2.1370.

A partir de esta construcción se obtuvo la sonda de *tbp2*, de acuerdo con el siguiente proceso: el plásmido pTR2.1370 fue digerido con *Hind* III y *Acc*65 I, liberándose un fragmento de 1906 pb que contenía el gen *tbp2* y que se marcó con α -³²P(dCTP) por cebado aleatorio con el kit «*Prime-a-gene*» (Promega).

Por otro lado, para la preparación del DNA genómico sobre el cual debíamos utilizar esta sonda se digirió el DNA de *A. pleuropneumoniae* (serotipo 1) con las siguientes combinaciones de enzimas de restricción: *Nsi* I; *Nsi* I + *Bam*H I; *Nsi* I + *Eco*R I. Los productos de estas digestiones se resolvieron en un gel de agarosa al 0,8% y se pasaron por transferencia Southern a una membrana de nylon (Schleicher & Schuell). A continuación, se procedió a la hibridación de la sonda marcada radioactivamente con estas digestiones de DNA genómico sobre la membrana de nylon. La autorradiografía resultante permitió detectar una única banda de hibridación para cada digestión, de un tamaño que, en todos los casos, se situaba alrededor de las 4 kb. Este resultado sugería que probablemente no existían dianas para *Bam* HI y *Eco* RI dentro del fragmento *Nsi* I-*Nsi* I, por lo cual se escogió este último enzima para digerir el DNA a clonar. Se repitió el proceso de digestión de DNA genómico con *Nsi* I, se resolvió el producto en un gel de agarosa al 0,8%, se transfirió a una membrana de nylon y se hibridó con la sonda marcada.

La hibridación se produjo sobre una banda única situada sobre las 4 kb; su tamaño e intensidad hicieron de ésta una buena candidata para contener el gen de la Tbp1, por lo que se procedió a su clonación. A partir de una restricción total preparativa con *Nsi* I sobre DNA genómico de serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae*, resuelta en un gel de agarosa 0,8% en TAE, se recuperaron los fragmentos correspondientes al rango 3500-4500 pb (que probablemente incluirían la banda de hibridación de unos 4000 pb) y se clonaron en pUC119 previamente digerido con *Pst* I y defosforilado en sus extremos. Con el resultado de la ligación se transformó la cepa XL1-Blue de *E. coli*; sembrando las células transformadas en placas de LB agar, amp, IPTG, X-gal. Se rastrearon 84 clones recombinantes, de nuevo con *Bgl* II, cinco de los cuales resultaron portadores de plásmidos con el patrón de restricción esperado. Estos plásmidos se digirieron con otros

enzimas de restricción (*Hind* III + *Bam*H I, *Hind* III + *Bam*H I + *Kpn* I, y *Bgl* II + *Hba* I) para confirmar su identidad, resultando tan sólo positivos los clones 68 y 76.

Si bien ambos clones (68 y 76) contenían el mismo inserto, su orientación era inversa en ambas construcciones. Proseguimos el trabajo con el clon 68, que pasamos a denominar como pTR1a2.1370. Para confirmar su identidad, se sometió el extremo 5' del inserto a secuenciación enzimática parcial, usando como cebador el *forward primer* de M13 (ver tabla III.1). La secuencia de este extremo 5' correspondía efectivamente a la secuencia de *tbp2* esperada.

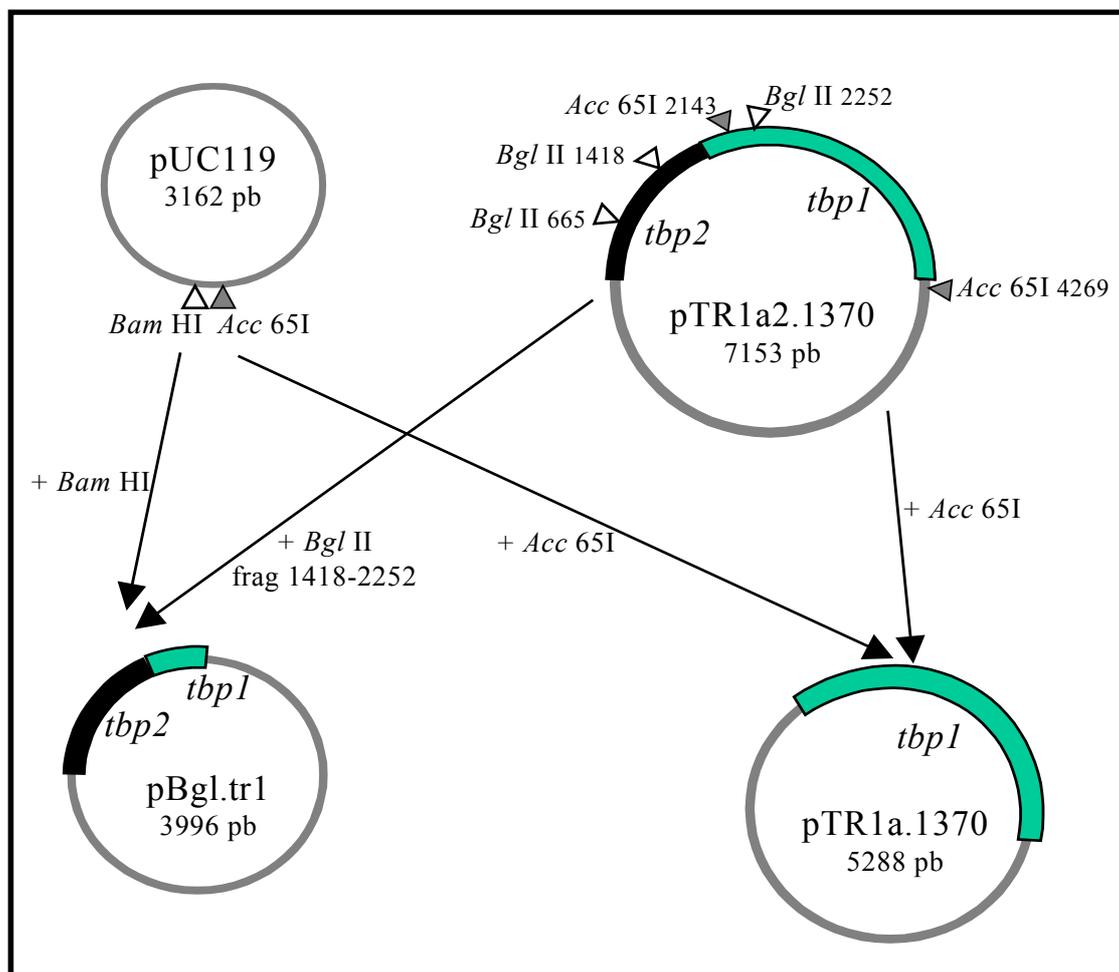


Figura IV.3. Esquema de la subclonación del gen *tbp1* para su posterior secuenciación. El inserto se indica en tramo grueso, *tbp2* está indicado en negro y *tbp1* en gris.

Para secuenciar el gen *tbp1* se subclonó éste según se muestra en el esquema de la figura IV.3. Una primera digestión de pTR1a2.1370 con *Bgl* II liberaba un fragmento de

834 pb que fue clonado en el vector pUC119, previamente digerido con *Bam* HI (este enzima genera extremos compatibles con *Bgl* II). El plásmido resultante, de 3996 pb, fue denominado pBgl.tr1. Una segunda digestión con *Acc*65 I liberaba un fragmento de 2,1 kb que fue clonado en pUC119, digerido también con *Acc*65 I. El resultado fue un plásmido de 5,3 kb que llamamos pTR1a.1370. Procedimos a la secuenciación enzimática del inserto del plásmido pTR1a.1370 y del extremo 3' del inserto de pBgl.tr1. Ambas secuenciaciones se realizaron con el T7 Sequencing Kit de Pharmacia.

En el caso del plásmido pBgl.tr1 se utilizó como cebador el *forward primer* de M13 (tabla III.1). Como resultado se obtuvo la secuencia de los primeros 230 pb del fragmento, correspondientes al extremo 5' de *tbp1* y a la región intergénica entre *tbp2* y *tbp1*. Para secuenciar el inserto del clon pTR1a.1370 se utilizaron los oligonucleótidos cebadores que se indican en la tabla III.1. El resultado de la secuenciación de ambas construcciones fue la secuencia del gen *tbp1*, desde el nucleótido 1 al 2212. La pauta de lectura observada correspondía a una cadena polipeptídica que mostraba grandes similitudes con otras Tbp1 conocidas. No obstante, estos 2212 primeros pares de bases no constituían la secuencia completa de *tbp1*.

Para la detección del extremo 3' del gen *tbp1* se utilizó como sonda el fragmento situado entre las bases 114 y 2212 de la secuencia codificante. La figura IV.4 muestra el proceso seguido, según el cual el fragmento indicado se liberó a partir de pTR1a.1370 con *Acc* 65 I y se marcó con α -³²P(dCTP) por el método «*Prime-a-gene*» (Promega).

Paralelamente, se digirió el DNA genómico de *A. pleuropneumoniae* (serotipo 1) con *Acc* 65 I. Dentro de la secuencia conocida del gen no había diana para este enzima y era probable, debido a su baja frecuencia de corte, que no encontráramos otra en el resto de gen. La digestión del DNA genómico se resolvió en un gel de agarosa al 0,8% en TAE durante 12 horas a 15V, para obtener una buena separación entre bandas, y se transfirió por transferencia Southern a una membrana de nylon (Schleicher & Schuell). La sonda marcada radioactivamente detectó, sobre esta digestión transferida, una única banda de unas 5,5 kb.

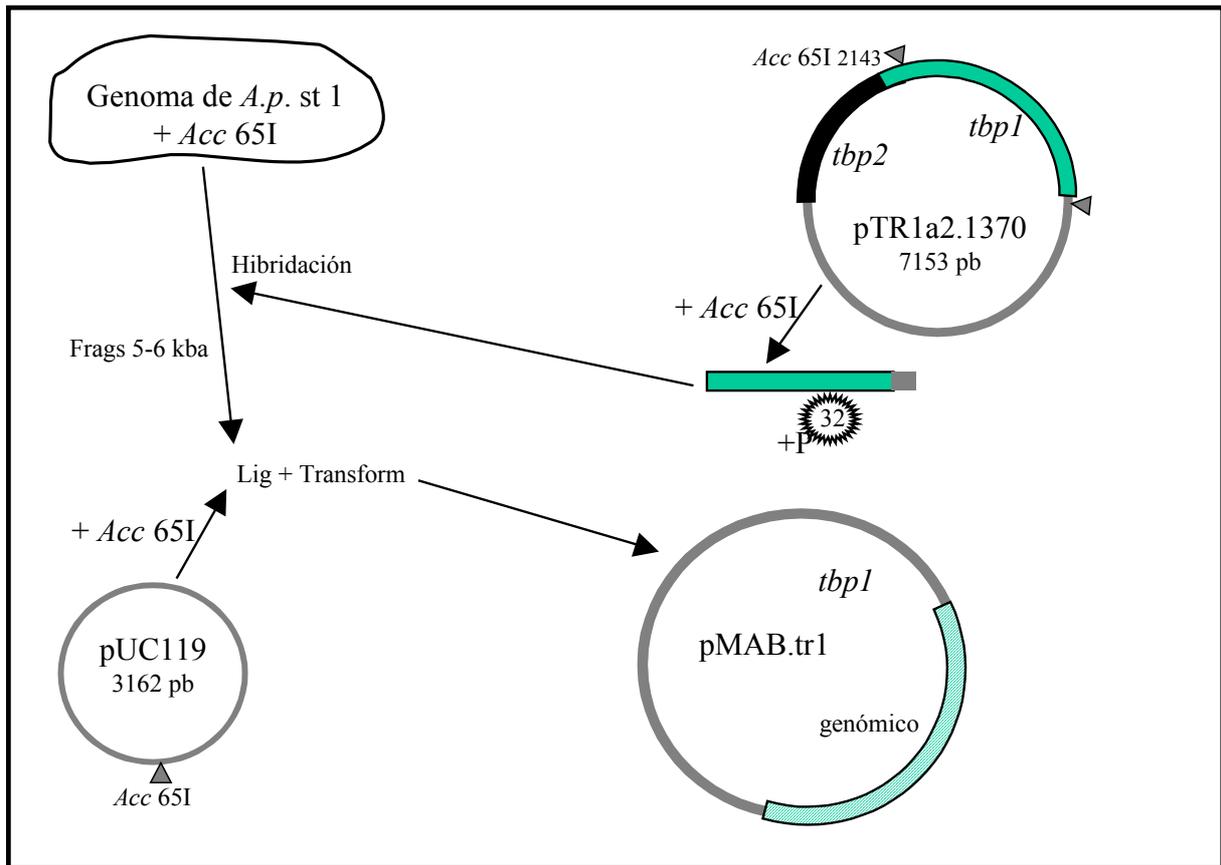


Figura IV.4. Clonación del extremo 3' del gen *tbp1*. Liberación con *Acc* 65I y marcaje radioactivo. Hibridación sobre digestión de genómico y clonación sobre pUC119 de fragmentos de 5 a 6 kba originados por digestión con *Acc* 65I sobre DNA genómico de *A. pleuropneumoniae*.

A partir de una digestión preparativa de DNA genómico de *A. pleuropneumoniae* (serotipo 1) con *Acc*65I, resuelta en un gel de agarosa al 0,8% en TAE, se recuperaron con el kit de GeneClean (Bio101) los fragmentos comprendidos entre 5000 y 6000 pb, que se clonaron en pUC119 previamente digerido con *Acc*65I. Con el resultado de la ligación se transformaron células de la cepa XL1-Blue de *E. coli*, que se sembraron en placas de LB agar, amp, IPTG, X-gal. Se hicieron réplicas en placa de las colonias portadoras de plásmidos recombinantes, que posteriormente se transfirieron a membranas de nylon para detectar por hibridación los clones positivos. Para su detección se utilizó como sonda el fragmento comprendido entre los nucleótidos 114 y 2212, marcado con α -³²P(dCTP). Esta hibridación permitió identificar dos colonias positivas portadoras de la misma construcción, que denominamos pMAB.tr1. Este plásmido contenía un gran fragmento de *tbp1*, desde el nucleótido 114 al extremo 3' del gen, seguido de una secuencia genómica de *A. pleuropneumoniae* (serotipo 1) que se prolongaba hasta la siguiente diana *Acc* 65 I.

Se secuenció el gen *tbp1* entre el nucleótido 2213 y el extremo 3', utilizando los cebadores que se indican en la tabla III.1. Encontramos un codón de paro de traducción que determinaba una longitud total de la secuencia codificante de 2793 pb, tamaño que se correspondía con el estimado por comparación con la proteína Tbp1 de *N. meningitidis* (Cornelissen *et al.*, 1992.; Legrain *et al.*, 1993), cabía esperar un producto correspondiente a un polipéptido de unos 900 aminoácidos.

La secuencia completa de nucleótidos correspondiente al gen *tbp1*, junto con su traducción a aminoácidos, se presenta en la figura IV.5. La secuenciación avanzó hasta 27 pb después de la señal de paro de traducción, encontrándose unas repeticiones invertidas en la secuencia de nucleótidos que podrían constituir una señal de paro para la transcripción. La secuencia está depositada en el banco de datos del EMBL con el número de acceso Z49708. Se han obtenido las patentes europea y americana sobre la secuencia, con referencias EP0733708 y 08/624655 respectivamente. Los resultados han sido publicados (Daban *et al.*, 1996; Medrano *et al.*, 1997). Los resultados fueron corroborados al obtener otro grupo de investigación (González *et al.*, 1995) igual secuencia para este mismo gen.

En la posición -10 respecto al codón de inicio de traducción se encuentra una secuencia de cuatro bases (GGAA), correspondiente al posible lugar de unión del ribosoma. El codón de paro para *tbp2* está situado 13 nucleótidos antes del codón de inicio de *tbp1*. Con esto se estableció para *A. pleuropneumoniae* la disposición contigua de los genes *tbp* dentro de un mismo operón, tal y como se había observado para *N. meningitidis* (Legrain *et al.*, 1993) y *N. gonorrhoeae* (Anderson *et al.*, 1994). En estos casos, la transcripción comenzaba a partir de un solo promotor 5' respecto a *tbp2*. La falta de secuencias promotoras consenso en la región intergénica coincidía con lo descrito para otras especies de los géneros *Neisseria* (Legrain *et al.*, 1993) y *Haemophilus* (Gray-Owen *et al.*, 1995). Karhoff y colaboradores describieron en 1994 una zona en la región promotora de *tbp2* de *N. meningitidis* que guardaba una similitud significativa con el lugar de unión de la proteína Fur en *E. coli*. Fur es una proteína reguladora que se une específicamente a secuencias promotoras cuando los niveles de hierro del medio son suficientes. Fur se acompleja al Fe²⁺ en una secuencia rica en histidinas de su región C terminal, provocando un cambio en su N terminal que hace que se una al DNA, bloqueándose así la transcripción de los genes regulados por el hierro. Comparando la secuencia consenso de

unión a Fur con la situada 5' respecto al gen *tbp2* de *A. pleuropneumoniae*, observamos una similitud que inducía a considerar un posible papel de este represor en el control de la expresión de los genes *tbp2* y *tbp1* en *A. pleuropneumoniae*, dado que ya se conocía la regulación de éstos por el nivel de hierro aunque no el mecanismo responsable.

La expresión de ambos genes bajo la regulación de un promotor común fue confirmada posteriormente por otros autores, de manera que no sólo los genes de las dos Tbp sino también los que codifican para las proteínas ExbB y ExbD estarían bajo un control común, pudiendo formarse un transcrito único a partir de los genes *exbB*, *exbD* y *tbp2* (Tonpitak *et al.*, 2000). Esta asociación del proceso de regulación de la transcripción entre los genes *exb* y *tbp* no se da en otras especies relacionadas, lo cual apunta hacia la existencia de organizaciones genómicas claramente diferenciadas entre los miembros de la familia de las Pasteureláceas, a pesar de la alta similitud que presentan los genes individuales. Por consiguiente, la transcripción de los genes *tbp* parece estar bajo el control de un regulador tipo Fur, que mantendría silenciados los genes mientras el nivel de hierro libre en el medio es suficiente. Podría actuar sobre dos promotores, uno situado en posición 5' respecto al gen *exbB* y el otro a 5' de *tbp2*, dando como resultado diferentes productos de transcripción en cada caso.

```

      ggaa ttgct   atg aaa aat aaa tta aat ctg att agc ctt gct ctt ctt agc cta ttt gcc gta caa agc
      M K N K L N L I S L A L L S L F A V Q S
61  tat gca gaa caa gcg gta caa tta aat gat gtt tat gtc aca ggt acc aaa aag aaa gca cat aaa aaa gag
      Y A X E Q A V Q L N D V Y V T G T K K K A H K K E
133 aac gaa gtc aca ggc tta ggg aaa gta gtt aaa aca cca gat act ctt agt aag gag caa gtg tta gga ata
      N E V T G L G K V V K T P D T L S K E Q V L G I
205 cga gat ctg act cgt tac gac ccc ggt att tct gtc gta gaa caa ggg aga ggt gcg act aca ggc tac tca
      R D L T R Y D E G Y S V V E Q G R G A T T G Y S
277 att cgc ggg gta gat cgt aat cgt gtg ggc ttg gca tta gac ggt ttg cca cag att caa tcc tat gta agc
      I R G V D R N R V G L A L D G L P Q I Q S Y V S
349 caa tat tca cgt tcc tca agc ggt gcc att aat gaa ata gaa tac gaa aat ctg cgt tcg atc caa att agt
      Q Y S R S S S G A I N E I E Y E N L R S I Q I S
421 aaa ggg gct agt tct tct gag ttt ggt agt ggc tca cta ggc ggt tcg gtg caa ttc cgt acc aaa gag gta
      K G A S S S E F G S G S L G G S V Q F R T K E V
493 agc gac att att aag cca ggg caa tct tgg gga tta gat acc aaa agt gcc tac agt agc aaa aat caa caa
      S D I I K P G Q S W G L D T K S A Y S S K N Q Q
565 tgg tta aac tca ctt gct ttt gcg ggt act cac aat ggc ttt gat gct ctt gtg att tac act cac cgt gat
      W L N S L A F A G T H N G F D A L V I Y T H R D

```

637 ggt aag gaa acg aaa gct cat aaa gat gca gag agt cgt tct cag aat atc acc cga gta gga gtg gaa acc
G K E T K A H K D A E S R S Q N I T R V G V E T
709 aac gag ctt gat acc tca aat aga tat act gcg acg acg aat aat caa cat act tat ggc tgg ttt ttg att
N E L D T S N R Y T A T T N N Q H T Y G W F L I
781 aaa gat gaa tgt cca acg tta gat tgt acg ccg aaa cag atg gct agg gtg aca aaa gat acg cca tct ttc
K D E C P T L D C T P K Q M A R V T K D T P S F
853 cgt tct tac cct gaa tat act cct gag gaa aaa cag gct tat gag aac caa aaa cat att aca gag cgt cta
R S Y P E Y T P E E K Q A Y E N Q K H I T E R L
925 aat gct cag gat tac act ggt gaa tat aga gct tta cct gat ccg ctt aaa tat aaa tct gat tct tgg ctg
N A Q D Y T G E Y R A L P D P L K Y K S D S W L
997 gtt aaa tta gga tac aca ttc tct ccg aaa cat tat gtc gct ggt act tat gaa cat agc aaa cag cgt tac
V K L G Y T F S P K H Y V A G T Y E H S K Q R Y
1069 gac acc cga gat atg acc tat acc gct tat tgg caa cca tcg gat tta ctt aga act ggt aga aat tgg tat
D T R D M T Y T A Y W Q P S D L L R T G R N W Y
1141 cca atg aat aat gct aaa gga tta tat cgt gat aat gct tta gat ggt gtt gct att gac tac ttt acg gaa
P M N N A K G L Y R D N A L D G V A I D Y F T E
1213 gat ggt gtg aaa tca tca aaa ggt tta cgt tgg gca aaa gct cgt ttt att gac gag tgg cac act cgt gat
D G V K S S K G L R W A K A R F I D E W H T R D
1285 cgc tta ggt gct tta tat cgt tat acc aat caa gat gga aat cgt ctg att gat aga cta tcc ttg agt ttc
R L G A L Y R Y T N Q D G N R L I D R L S L S F
1357 gat cag caa aaa att aat tta tct acc cgc ttg aga gag aac aac tgt tcc gaa tat cca acc ata gat aag
D Q Q K I N L S T R L R E N N C S E Y P T Y D K
1429 aat tgc cgt gca act ctt gat aaa ctt tgg tct tca act aaa aat gag caa agt tct tat gaa gaa aaa cac
N C R A T L D K L W S S T K N E Q S S Y E E K H
1501 gac act att cag ctc tcg tta gat aaa acc gta caa acg gga ttg ggt aaa cat caa tta aat atg tta tta
D T I Q L S L D K T V Q T G L G K H Q L N M L L
1573 ggt tca gac cgt ttc aat tcc acc tta aaa cgc cac gaa att ttg agt gaa ttt tct gtg gga act tgg cat
G S D R F N S T L K R H E I L S E F S V G T W H
1645 cgt atc aga ggt aac ggt tat aaa gat aca cct tac atc tat gag cta aaa gat cag gca att tat agt aaa
R I R G N G Y K D T P Y I Y E L K D Q A I Y S K
1717 aat gaa tgt gat tat agt ggc act att gca ggt agg gct gat tgt gct aca agt aaa act aaa ggg cat aat
N E C D Y S G T I A G R A D C A T S K I K G H N
1789 cac tac atc gct ctg aga gat aat ttt gcc ata acc aag tat ttg gat att ggt ttg ggt tac cgt ttc gat
H Y I A L R D N F A I T K Y L D I G L G Y R F D
1861 aag cat aaa ttc cgt agc act cat cgc tgg gca aat caa ggc gat tat aaa aac agt gcg tgg aat att ggc
K H K F R S T H R W A N Q G D Y K N S A W N I G
1933 ata gtc gca aaa cca acg tca ctc cta tcg ctc tct tat cga gca tca tct ggc ttt aga gtg cca agt ttc
I V A K P T S F L S L S Y R A S S G F R V P S F
2005 caa cag cta ttt ggc tta cgt tat gat ggt gca atg aaa ggc tcc agc gat gct tac caa aaa aca gag aag
Q E L F G L R Y D G A M K G S S D A Y Q K T E K
2077 tta tct cct gaa aaa tcc tta aac caa gag gtt gct gcg act ttc aaa ggt gat ttt ggt gtc gtt gaa gtc
L S P E K S L N Q E V A A T F K G D F G V V E V
2149 agt tat ttc aaa aat gac tat aag cag tta att gct cca gca gaa aga atg cat caa act caa tca atg att
S Y F K N D Y K Q L I A P A E R M H Q T Q S M I
2221 aac tat ttt aat gtg caa gat att aaa ttg gac ggc att aat ctt att ggt aag cta gat tgg aat ggg gta
N Y F N V Q D I K L D G I N L I G K L D W N G V

Nme	TAKIRH NLSVNLGFDRFGSNLRHQDY YYYQH ANRAYSSNTPPQNNGKKISPNGSETSPYWV	549
Ngo	TAKIRH NLSVNLGYDRFGSNLRHQDY YYYQ ANRAYSLKTPPQNNGKKTSPNGREKNPYWV	549
Hin	QNLWLT HQIVFNLGFDDFTSALQHKDYLTRRVTATANIISG-TVAGKRR--NGYEKQPYLY	543
App	TGLGKH QLNMLLGSDFRNFSTLKRHEILSEFSVGTWHRIRG-----NGYKDTPIY	562
	*:: . ** * * * *::: . : ** : **	
Nme	TIGRGNVVTGQICRLG--NNTYTDCTPRISINGKSYAAVRDNRVRL GR WADVGAGLRYDYR	607
Ngo	SIGRGNVVTROICLFG--NNTYTDCTPRISINGKSYAAVRDNRVRL GR WADVGAGLRYDYR	607
Hin	SKPKVDFVGGDHCNYKGSSSNYS DCKVRL IKGKNYFAARNMAL GKY IDLGLGIRYDVS	603
App	ELKDQAIYSKNECDYSGTIAGRADCATSKI KGHNHY IALRDNFAI TKY LDIGLGYRFDKH	622
	. : * : ** *::: * * *:: . : : * * * * *	
Nme	STHSDDGSVSTGTHRTL SWNAGIVL KPTDW LD LT YRTST GFR LPSFA EMYGWRAG-----	662
Ngo	STHSDDGSVSTGTHRTL SWNAGIVL KPADW LD LT YRTST GFR LPSFA EMYGWRSG-----	662
Hin	RTKANESTISV GKFNFS WNTGIVIKPTEW LD LSYRLSTGFRNPSFAEMYGWRYGNN--	661
App	KFRSTHRWANQGDYKNSAWNIGIVAKPTS FLS LSYRASSGFRVPSFQELFGLGIRGAMKG	682
	:: . . * :. : ** ** *::: *	
Nme	---VQSKAVKIDPEKSFNKEAGIVFK GDF GNLEASWFNNAYRDLIVRGYEAQIKDGKEEA	719
Ngo	---DKIKAVKIDPEKSFNKEAGIVFK GDF GNLEASWFNNAYRDLIVRGYEAQIKDGKEQV	719
Hin	---SDVYVGKFKPETS RNQE FGLALK GDF GNIEISHFSNAYRNLIA--FAEELSKNGTTG	716
App	SSDAYQKTEKLSPEKSLNQEVAATFK GDF GVVEVSYFKNDYKQLIAP--AERMHQ TQSMI	740
	. *:: *	
Nme	KGDPAYLNAQSARITGINILGKIDWNG VWDKL PEGWYSTFAYNRVVRD IKK RADRTDIQ	779
Ngo	KGNPAYLNAQSARITGINILGKIDWNG VWDKL PEGWYSTFAYNRVVRD IKK RADRTDIQ	779
Hin	KGN YGYHNAQ NAKLVGVNITAQLDFNG LWKRI PYGYATFAYNRVKVDQKINAGLASVS	776
App	N---YFNVQDIKLDGINLIGKLDWNG VFDKI PEGIYTTLAYSKMRVKEVKNYQGYMNR	796
	: * * * * . : : * * * * . : : * * * * . : : * * * * . : : * * * * . : : * * * * . : :	
Nme	SHLFDAIQPSRYVVG LYDQ PEGKGVNGMLTYSKAKEITELLGSRALLNGNSRNTKATA	839
Ngo	SHLFDAIQPSRYVVG SGYDQ PEGKGVNGMLTYSKAKEITELLGSRALLNGNSRNTKATA	839
Hin	SYLFDAIQPSRYIIGLYDHPSTWGIN TMFTQ SKAKSQNELLGQRALGN-NSRNVKSTR	835
App	SPLLDTIQPARYVVG YDQ PDEKGVNLTMT HS GKNPNELRGNEQVGFANYERT-ATK	855
	* *	
Nme	RRTRPWYIVDVS GYTV VKKH FTLRAGVYNLLNRYVTWENVRQTAGGAVNQHKNVGVYNR	899
Ngo	RRTRPWYIVDVS GYTV VKKH FTLRAGVYNLLNRYVTWENVRQTAGGAVNQHKNVGVYNR	899
Hin	KLTRAWHILDVS GYM ANKN IMLR LG YNLFNRYVTWEAVRQTAQGAVNQHQNVGSYTR	895
App	KRTLSWHTFDLTGYIT PWKH TTVRAGVYNLMNRYTTWESVRQSSLNAIHQHTNVKDYAR	915
	: * . * : . * : *	
Nme	YAAPGRNYTFSLEMKF	915
Ngo	YAAPGRNYTFSLEMKF	915
Hin	YAASGRNYTTLLEMKF	911
App	YAAPGRNYVVSFEMKF	931
	*** . **** . : : ****	

Figura IV.6. Alineamiento de las secuencias de Tbp1 de *A. pleuropneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y *H. influenzae*. Con el asterisco y el doble punto se indican las posiciones con igual aminoácido en las cuatro y en como mínimo dos de las proteínas respectivamente. En base a una predicción de estructura para la Tbp1 de *N. gonorrhoeae* (Boulton *et al.*, 2000), se han destacado en negrita los posibles loops intracelulares y subrayados los extracelulares.

La figura IV.6 muestra un alineamiento de Tbp1 con tres Tbp de especies relacionadas, siendo la similitud global del 41 % para *H. influenzae* y del 40 % para *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae*. Sin embargo, existen dominios específicos con una similitud

mucho más alta, particularmente en las regiones N y C terminales de la proteína madura. Hay secuencias de hasta 34 aminoácidos de longitud (por ejemplo, desde la Ile⁶⁸ hasta la Val¹⁰¹) con un 100% de similitud con al menos una de las otras secuencias.

La estructura de todas estas proteínas correspondería a la del modelo de barril beta, que formaría un canal en la membrana externa de la bacteria a través del cual se captarían los iones Fe³⁺. El canal estaría opcionalmente ocluido por un dominio globular periplasmático que correspondería a la región N terminal. Los bucles extracelulares son los responsables de la interacción con la transferrina, extremo que se ha demostrado en *N. gonorrhoeae* delecionando proteínas (Boulton *et al.*, 2000). En la figura IV.6 se ha indicado la correspondencia de las secuencias con las posibles disposiciones topológicas que adoptarían estas proteínas en a la membrana externa.

El último residuo de la proteína correspondería a una fenilalanina, lo cual constituye una característica común para muchas proteínas bacterianas de membrana externa. Se ha propuesto incluso su papel fundamental para la correcta integración de la proteína en dicha membrana externa (Struyve *et al.*, 1991). Posteriormente a este estudio se han secuenciado los genes *tbp1* correspondientes a otros serotipos de *A. pleuropneumoniae*, que muestran un alto grado de similitud entre sí. Este gen muestra una menor variación entre serotipos que *tbp2*, lo cual había sido descrito ya para *N. meningitidis* (Legrain *et al.*, 1993). Esta menor variabilidad podría estar condicionada por su accesibilidad y por los consiguientes requisitos de presión por parte del sistema inmunitario que pudiesen conducir a variaciones antigénicas. Incluso puede observarse en la alineación de la figura IV.6 que las regiones de menor homología se corresponden mayoritariamente con los posibles bucles externos, alternándose las regiones variables y conservadas en correspondencia con las zonas expuestas y transmembrana, respectivamente.

IV.B Expresión de antígenos proteicos

Tras obtener la secuencia del gen *tbp1* ya disponíamos de las secuencias codificantes para los cuatro factores de virulencia que pretendíamos expresar de forma recombinante: las proteínas Tbp1, Tbp2, ApxI y ApxIII. El siguiente paso consistió en la expresión heteróloga de estas cuatro proteínas en *Escherichia coli*.

IV.B.1 Expresión del gen *tbp1*

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE *tbp1* EN EL SISTEMA pMAL

Para un primer ensayo de expresión de *tbp1* se utilizó el vector pMAL-c2 (ver apartado III.B). La elección del vector se basó en criterios estructurales. Al ser Tbp1 una proteína integral de membrana, esperábamos que la proteína recombinante fuera insoluble, lo cual se confirmó más adelante. Una forma de favorecer su expresión en forma soluble sería a través de una fusión con la proteína de unión a maltosa, MBP, codificada por secuencias comprendidas en ambos vectores. En la bibliografía se encontraban recogidos ejemplos en los que este tipo de fusiones favorecía la solubilidad de proteínas recombinantes con características similares al caso que nos ocupaba (Morino *et al.*, 1995, Naval *et al.*, 1997).

Para la clonación del gen *tbp1* en pMAL se procedió en primer lugar a la amplificación de su secuencia por PCR, introduciendo dos dianas de restricción para los enzimas *EcoRI* y *XbaI* mediante los siguientes cebadores:

- **ex5** (5'GCTATGCAGAATTCGCGGTACAATTAAATG3')
- **ex3** (5' GGGACTCTAGATTAGAATTTTCAT TTC 3')

El molde para la reacción en cadena de la polimerasa fue el plásmido pMAB.tr1. El DNA amplificado se digirió con *EcoRI* y *XbaI* y clonó en fase en el vector pMAL-c2, entre dichas dianas de restricción. El plásmido recombinante se utilizó para transformar la cepa XL1Blue de *E. coli*, tras lo cual se procedió a realizar los ensayos de expresión de *tbp1*. Como resultado se produjo una proteína de fusión Tbp1-MBP que, sin embargo, se presentaba en forma insoluble, por lo que la expresión de Tbp1 como proteína de fusión con la MBP no quedaba justificada.

A continuación se procedió a clonar el mismo inserto de *tbp1* en el plásmido pMAL-p2. Este plásmido tiene las mismas características que pMAL-c2, con la diferencia de que la proteína se produce en fase con un péptido señal para su exportación al espacio periplasmático. El rendimiento de este plásmido en cuanto a cantidad absoluta de proteína fue menor y tampoco se consiguió obtener la proteína Tbp1 en forma soluble.

En vista de los resultados obtenidos con la fusión anterior, pasamos a trabajar con otros vectores de expresión que permiten unos rendimientos elevados y un proceso de purificación simple, como son los plásmidos del tipo pET (Novagen).

CLONACIÓN DE *tbp1* EN pET21a(+). PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE TBP1

El sistema de expresión en pET es uno de los más eficaces que se han desarrollado hasta el momento para la clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. En el sistema del plásmido pET21 utilizado, el gen insertado se encuentra bajo el control del promotor *T7lac*. La transcripción permanece reprimida hasta el momento de la inducción mediante IPTG. Para facilitar la identificación y purificación de la proteína expresada el sistema incorpora distintas secuencias adyacentes a los lugares de clonación que codifican para diversas “colas”. Una de las opciones, utilizada por nosotros, es la fusión C-terminal de un dominio de oligohistidinas (His•Tag®), formado por una secuencia de 6 a 10 residuos de histidina consecutivos que permiten la purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad, al poder coordinarse con cationes divalentes (como Ni²⁺) inmovilizados sobre una resina de quelación metálica His•Bind® (Novagen). Tras el lavado de las proteínas no unidas, la proteína recombinante se puede recuperar por elución con imidazol o por cambios de pH en el tampón cromatográfico.

La secuencia codificante para la proteína Tbp1 en su estado procesado (sin el péptido señal) fue amplificada por PCR con la polimerasa DynaZyme™, utilizando como molde el plásmido pMAB.tr1. Las dianas de restricción para las enzimas *Nde* I y *Xho* I fueron introducidas a través de los cebadores *tbp1.5* y *tbp1.3*, respectivamente. Gracias a ello, el producto de PCR pudo ser sometido a digestión doble con los enzimas mencionados y clonado en el vector de expresión pET21a(+). El plásmido resultante recibió el nombre de pET21.tr1 (ver figura IV.7).

Se procedió a continuación a expresar en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* la proteína Tbp1 clonada en pET21.tr1. El resultado de esta expresión fue un fragmento comprendido entre los aminoácidos 21 y 930 de la proteína Tbp1, en fase con la metionina N-terminal y con la cola de histidinas C-terminal (figura IV.7.B), aportadas por pET21a(+).

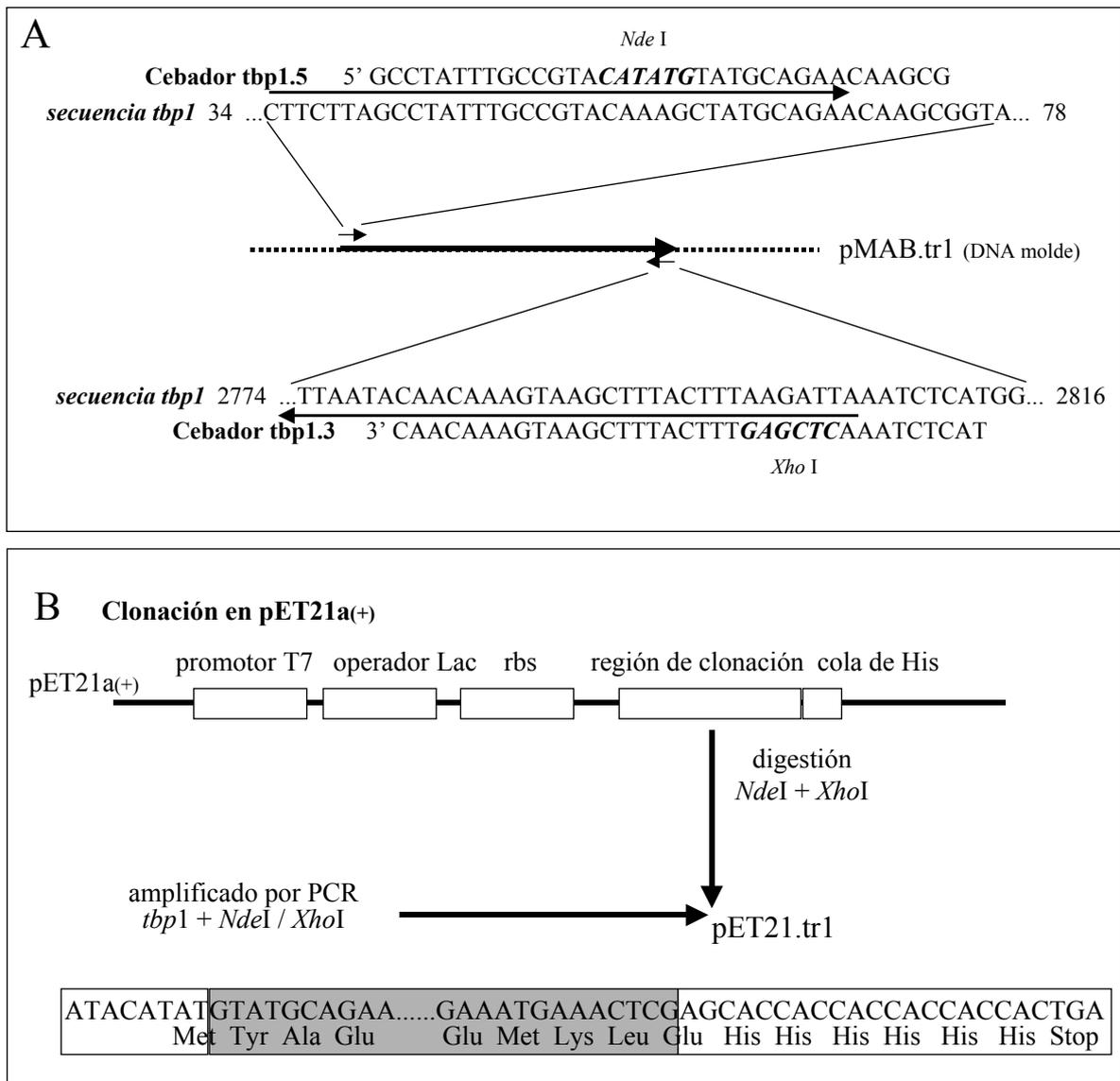


Figura IV.7: **A:** Amplificación por PCR de *tbp1* e introducción de las dianas de restricción *Nde* I y *Xho* I. **B:** Clonación en pET21a(+) y fase de la proteína recombinante.

La proteína expresada se acumulaba en el citoplasma en forma de cuerpos de inclusión, observables al microscopio óptico por contraste de fases. Para obtener la proteína de forma soluble se aplicó un método de extracción de proteínas insolubles basado en el protocolo recomendado en el manual Novagen para el sistema pET (ver III.E.5). Tras la solubilización se procedió a la purificación por cromatografía en una columna de afinidad para secuencias ricas en histidinas. Para resuspender los cuerpos de inclusión era preciso aumentar la concentración de urea en el tampón de 0 a 6 M. Además, un paso intermedio de lavado utilizando una concentración baja de agente desnaturizante (urea) podía favorecer la pureza del solubilizado final, mejorando así el

rendimiento cromatográfico. El rendimiento obtenido para la Tbp1 era de unos 2,5 mg por litro de cultivo. Las figuras IV.8 y IV.9 muestran, respectivamente, los análisis electroforéticos de las muestras de expresión de Tbp1 y de la proteína purificada.

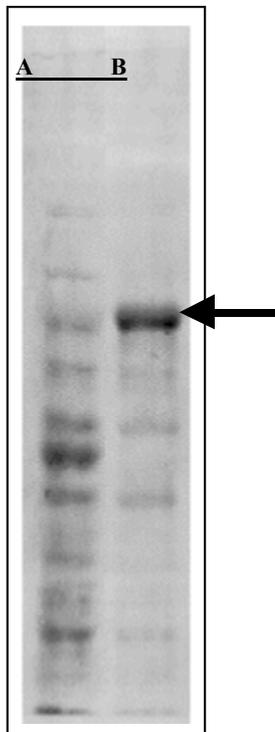


Figura IV.8. Expresión heteróloga de *tbp1* en *E. coli* BL21(DE3). Carril A: marcador de peso molecular. Carril B: Proteína Tbp1 producida en pET21a.tr1.

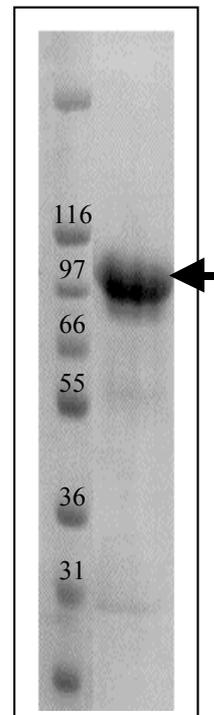


Figura IV.9. Purificación de la proteína Tbp1 recombinante, la banda de proteína purificada tiene un peso molecular aparente de 97 kDa.

Por exigencias del proceso de preparación de la muestra, en la última etapa se obtenía la proteína purificada en un tampón que contenía urea 6 M, siendo preciso a continuación reducir el contenido en este agente desnaturizante. Debíamos dializar la muestra disminuyendo en una unidad la molaridad de la urea en cada cambio de tampón, hasta llegar a una concentración de urea de 0,5 a 1 M. Una disminución brusca conducía a la precipitación de la proteína. También, por debajo de estas concentraciones de agente desnaturizante, la proteína precipitaba de forma parcialmente reversible. La probabilidad de precipitación durante la diálisis aumentaba con la concentración de proteína, lo que se

podría explicar por la existencia de interacciones hidrofóbicas entre residuos normalmente inaccesibles que resultan expuestos en la superficie de la proteína cuando ésta se encuentra en una conformación distinta a la nativa.

El tratamiento por diálisis se mantuvo para los usos vacunales de la proteína, para evitar un posible efecto tóxico, pero no para el empleo de la proteína como antígeno de ELISA, al comprobarse que la presencia de urea no interfería con su inmovilización e inmunodetección en la placa.

Uno de los grandes problemas a los que nos enfrentamos durante todo el proceso de producción y purificación de las proteínas recombinantes en las que se basa este trabajo es su insolubilidad. Intentamos mejorar esta condición aplicando diversas soluciones, algunas de las cuales analizamos a continuación.

Agentes reductores:

La secuencia de Tbp1 contiene seis residuos de cisteína. Al ser la cepa BL21(DE3) defectiva en tiorredoxina era posible que al acumularse la proteína en el citoplasma se formaran puentes disulfuro. Para romper los posibles puentes disulfuro interproteicos que pudiesen colaborar en la estabilización de los cuerpos de inclusión y reducir las cadenas laterales de las cisteínas se incluyó en la formulación de los tampones para su resuspensión la presencia de mercaptoetanol 10 mM. Sin embargo, no se obtuvo ninguna mejora en el rendimiento de la resuspensión y la presencia de la urea continuaba siendo imprescindible para mantener la proteína en forma soluble. Esta modificación en la formulación del tampón de resuspensión se aplicó también para los otros tres antígenos sin efecto apreciable para ninguno de ellos.

Temperatura:

En la bibliografía se encontraba descrito que la solubilidad de algunos antígenos expresados de forma recombinante en *E. coli* mejoraba si el cultivo se incubaba a 30 °C en lugar de 37 °C (Han *et al.*, 1999). Por consiguiente, aplicamos estas condiciones al cultivo preparativo de los cuatro antígenos, sin obtenerse sin embargo aumentos apreciables en la proporción de proteína soluble.

SUBCLONACIONES PARA LA EXPRESIÓN DE FRAGMENTOS DE Tbp1

Tras comprobar que la proteína Tbp1 completa se expresaba en forma insoluble, nos planteamos estudiar la utilidad antigénica de algunos fragmentos de la proteína. En consecuencia, procedimos a clonar nueve fragmentos de Tbp1, de unos 100 aminoácidos cada uno, cuyas secuencias se solapaban entre ellas cubriendo prácticamente toda la proteína. La amplificación por PCR de dichos fragmentos a partir del gen *tbp1* clonado en pMAB.tr1, con los cebadores que se muestran en la tabla III.2, permitió introducir dianas que facilitaban su subclonación en el plásmido pET21b(+) para su posterior expresión y purificación.

En la tabla IV.1 se indican las posiciones de cada fragmento, los oligonucleótidos utilizados, los enzimas para la clonación y el resultado de las pruebas de expresión. Como se puede ver, uno de los fragmentos, el primero, se expresó en forma completamente soluble, mientras que el fragmento 2 resultó mayoritariamente insoluble. Todos los demás fragmentos se expresaban de forma totalmente insoluble. También era destacable las diferencias de rendimiento en la expresión de los distintos fragmentos.

Al tratarse de una proteína integral de membrana, tal vez hubiera resultado recomendable, de cara a obtener expresión soluble de los fragmento, recurrir a la producción de péptidos de menor tamaño, correspondientes a las regiones expuestas y que no contuvieran fragmentos de los dominios transmembrana. De hecho, los dos únicos fragmentos con expresión soluble son los que cubren el extremo aminoterminal de la proteína, lo cual concuerda con el modelo estructural propuesto para la familia de proteínas a las que pertenece Tbp1 (véase el apartado IV.A.; Boulton *et al.*, 2000). En este modelo la región N-terminal correspondería a un dominio periplasmático sin regiones transmembrana. No obstante, estos fragmentos solubles no resultan potencialmente eficaces como inmunógenos o como antígenos en pruebas de ELISA, ya que al pertenecer a una región de la proteína no expuesta no serían capaces de inducir anticuerpos protectivos. El resto de fragmentos expresados incluirían tanto bucles extracelulares como zonas transmembrana, lo cual podría explicar su insolubilidad.

Tabla IV.1 Subclonaciones de *tbp1*

Fragmento	Localización	oligonucleótidos	Enzimas	Solubilidad	Rendimiento
-----------	--------------	------------------	---------	-------------	-------------

	(pb)	(amplificación)	(subclonación)		(mg/L)
1	58-290	EX5'-OLIGO A	+ <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI	Soluble	0,4
2	210-525	EX5'-OLIGO B	+ <i>Bgl</i> II+ <i>Xho</i> I	Sol/Insol	2,5
3	500-920	OLIGOC-OLIGOD	+ <i>Nde</i> I + <i>Hind</i> III	Insoluble	6
4	910-1260	OLIGOE-OLIGO F	+ <i>Nde</i> I + <i>Xho</i> I	Insoluble	0,6
5	1140-1620	OLIGOG-OLIGO H	+ <i>Nde</i> I + <i>Xho</i> I	Insoluble	1
6	1560-1925	OLIGO I-OLIGO J	+ <i>Nde</i> I + <i>Hind</i> III	Insoluble	1
7	1855-2240	OLIGOK-OLIGO L	+ <i>Nde</i> I + <i>Hind</i> III	Insoluble	0,6
8	2155-2445	OLIGO LL- EX3'	+ <i>Nde</i> I + <i>San</i> 3AI	Insoluble	0,4
9	2445-2800	OLIGO ₂₄₃₅ - EX3'	+ <i>Nde</i> I + <i>Bam</i> HI	Insoluble	2,5

IV.B.2 Expresión del gen *tbp2*

CLONACIÓN DE *tbp2* EN pET21a(+). PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE TBP2

La secuencia codificante para la proteína Tbp2 fue amplificada mediante PCR utilizando la polimerasa DynaZyme™. Las dianas de restricción para los enzimas *Nde* I y *Xho* I fueron introducidas en los cebadores Tbp2.5 y Tbp2.3 (figura IV.10.A). El resultado de la PCR, una vez digerido con ambos enzimas, fue clonado en el lugar de clonación múltiple del plásmido pET21a(+). El plásmido resultante de este proceso recibió el nombre de pET21.tr2 y se utilizó para expresar en *E. coli* BL21 (DE3) el fragmento que incluía los aminoácidos 4 al 590 de la proteína Tbp2, en fase con la metionina del extremo N-terminal y la cola de histidinas del extremo C-terminal aportados por el vector pET21a(+) (figura IV.10.B).

Para esta proteína recombinante se aplicó el mismo proceso de extracción y purificación que el descrito para Tbp1. El rendimiento de las expresiones de Tbp2 fue de aproximadamente 3 mg por litro de cultivo. La figura IV.11 muestra los análisis electroforéticos de la expresión y purificación de Tbp2. Si no se utiliza agente reductor en el tampón de carga de electroforesis, la proteína se resuelve parcialmente en forma de dímeros, posiblemente estabilizados por puentes disulfuro.

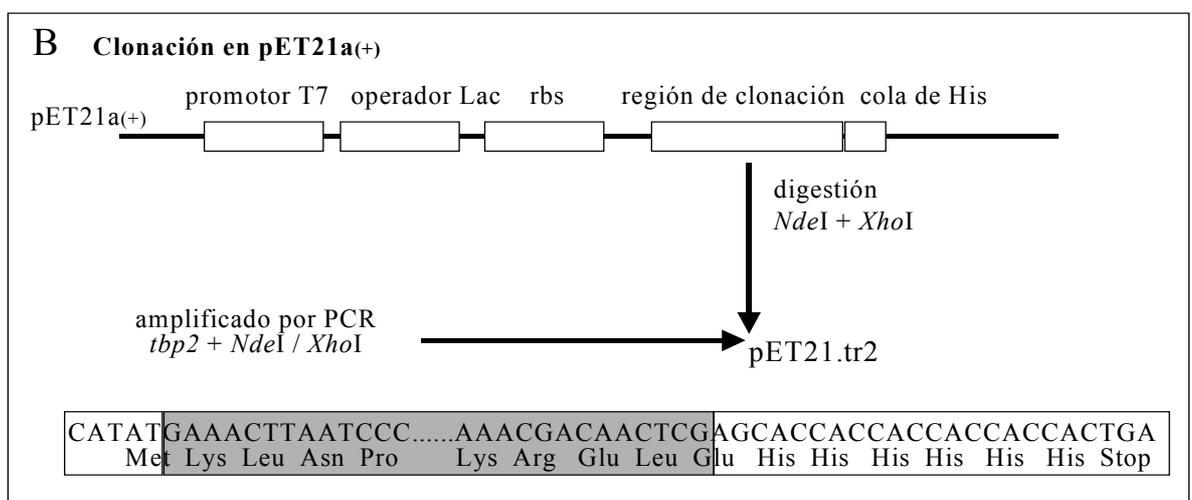
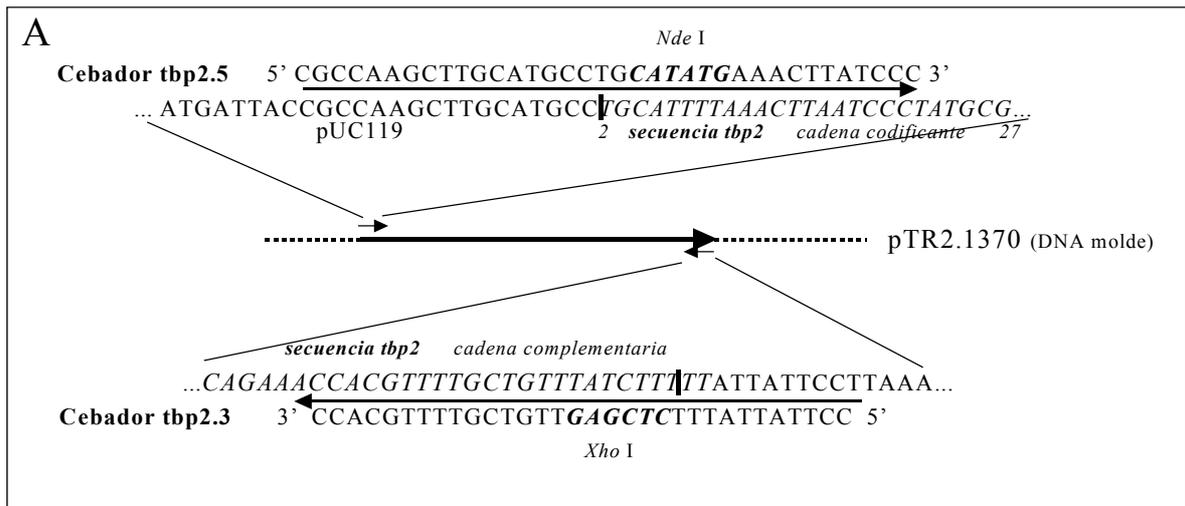


Figura IV.10. A: Amplificación por PCR de *tbp2* e introducción de las dianas de restricción *NdeI* y *XhoI*.
B: Clonación en pET21a(+) y fase de la proteína recombinante.

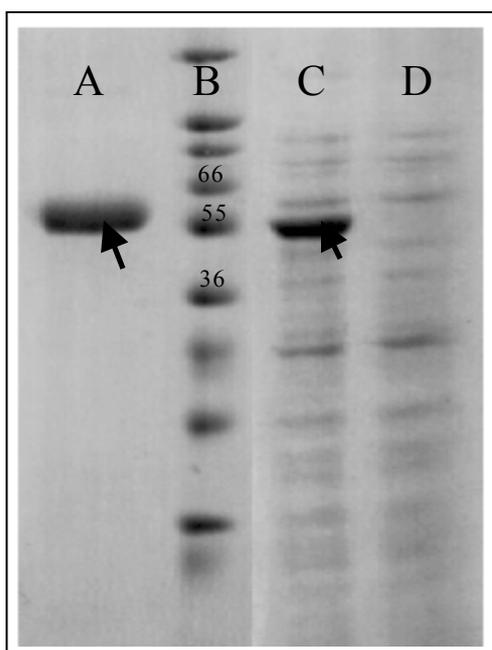


Figura IV.11. Expresión y purificación de la proteína Tbp2. Carril D: Muestra de expresión de *E. coli* BL21 portadora de pEt21a sin inserto. Carril C: Muestra de expresión de *E. coli* BL21 portadora de pET21a con el inserto de *tbp2*. Carril B: Marcador de peso molecular. Carril A: Proteína Tbp2 purificada; se observa una banda de un peso molecular aparente de unos 55 kDa.

IV.B.3. Clonación y expresión de los genes *apxI* y *apxIII*

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE *apxIA* EN pET21a(+)

Amplificamos por PCR con la polimerasa de DynaZyme™ un fragmento de DNA que comprendía la secuencia *apxIA*, codificante para la hemolisina ApxI, a partir de DNA genómico de *A. pleuropneumoniae* del serotipo 1. Se introdujeron en el proceso las dianas de restricción para *Nde I* y *Sal I*, mediante los oligonucleótidos cebadores *apxI.5* y *apxI.3* (figura IV.12.A).

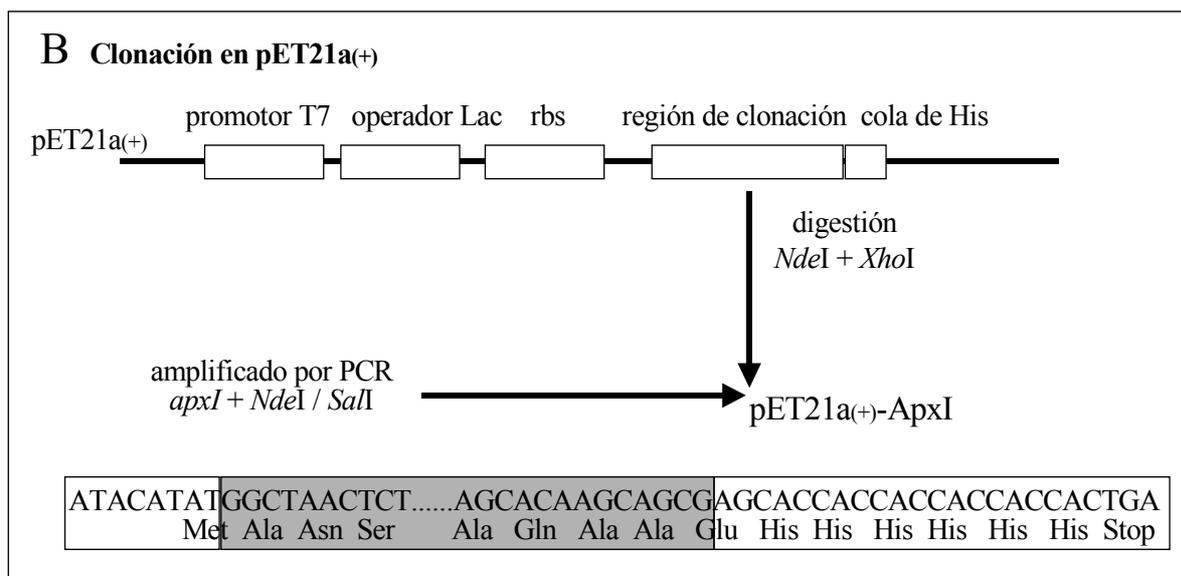
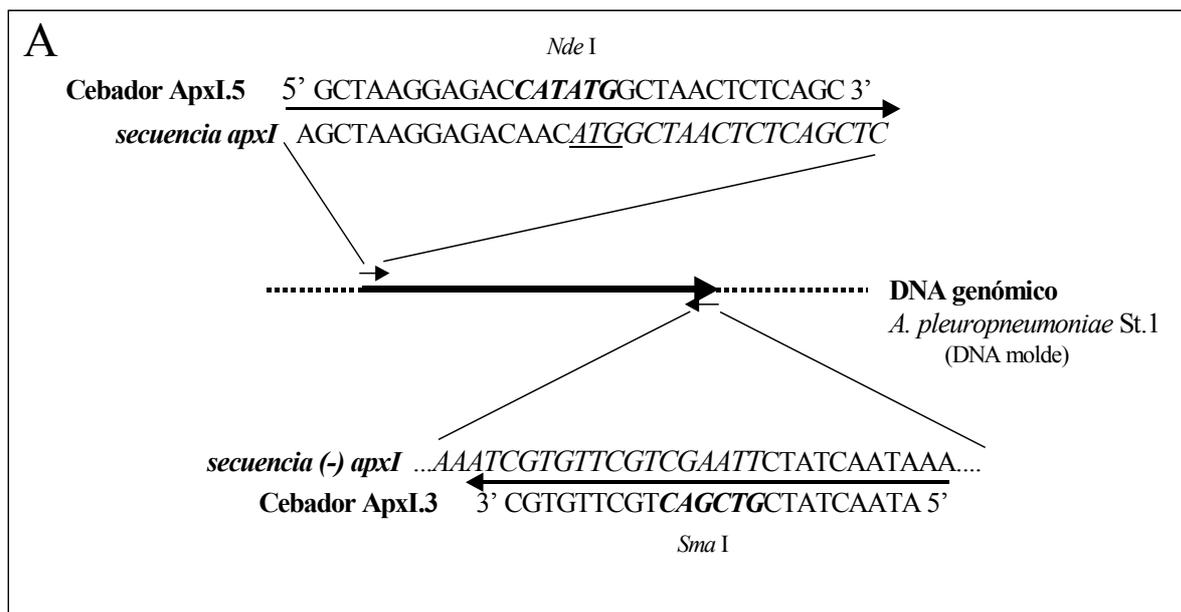


Figura IV.12. A. Amplificación por PCR de *apxI* e introducción de las dianas de restricción *Nde I* y *Xho I*.

B: Clonación en pET21a(+) y fase de la proteína recombinante.

Tras digerir el producto de la amplificación con los dos enzimas se clonó entre las dianas *Nde* I y *Xho* I (la digestión con este último origina extremos compatibles con *Sal* I) del lugar de clonación múltiple del plásmido pET21a(+). El plásmido recombinante resultado de esta clonación recibió el nombre de pET21a.ApxI y se utilizó para expresar la proteína ApxI en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*, concretamente un fragmento de ésta comprendido entre los aminoácidos 2 y 1041. La clonación en fase de este fragmento con la metionina N-terminal aportada por el vector y la cola de seis histidinas fusionadas al extremo carboxilo (figura IV.11.B) permitió su posterior producción y purificación. Estos procesos se llevaron a cabo de la misma forma que para las proteínas anteriores, Tbp1 y Tbp2. El rendimiento en este caso fue de unos 4 mg de proteína purificada por litro de cultivo. Las figuras IV.13 y IV.14 muestran los análisis electroforéticos de la producción y purificación de este antígeno.

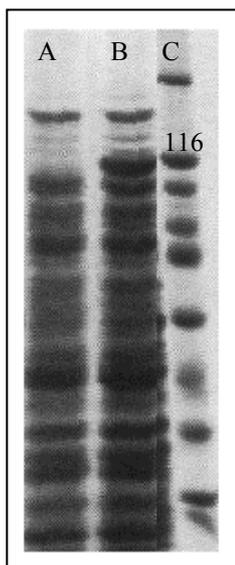


Figura IV.13. Expresión de *apxI*. Carril A: muestra de expresión de *E. coli* BL21 portadora de pET21a(+) sin inserto. Carril B: muestra de expresión de *E. coli* en pET21a(+) recombinante portador del gen *apxI*. C: Marcador de peso molecular.

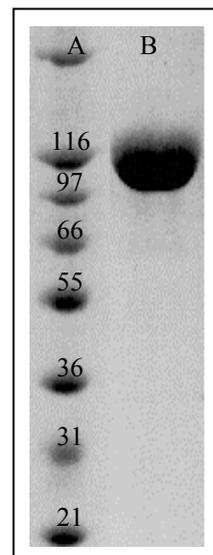


Figura IV.14. Purificación de ApxI. A: Carril con marcador de peso molecular. B: Carril con ApxI purificada.

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE *apxIIIA* EN pET21b(+)

ApxIII es el gen codificante para la hemolisina III. Al igual que en el caso del gen de la hemolisina I, su secuencia se encontraba descrita en la bibliografía (Jansen *et al.*, 1992). Basándonos en la secuencia publicada para el serotipo 4 diseñamos unos cebadores de PCR para amplificar el gen a partir del DNA genómico de *A. pleuropneumoniae* de este serotipo. Las dianas de restricción para los enzimas *NdeI* y *XhoI* fueron introducidas en los cebadores denominados ApxIII-5 y ApxIII-3, respectivamente. El producto de la PCR fue sometido a una doble digestión con los enzimas mencionados y clonado en el vector de expresión pET21b(+). El plásmido resultante recibió el nombre de pET21b.ApxIII. La figura IV.15 muestra el proceso descrito.

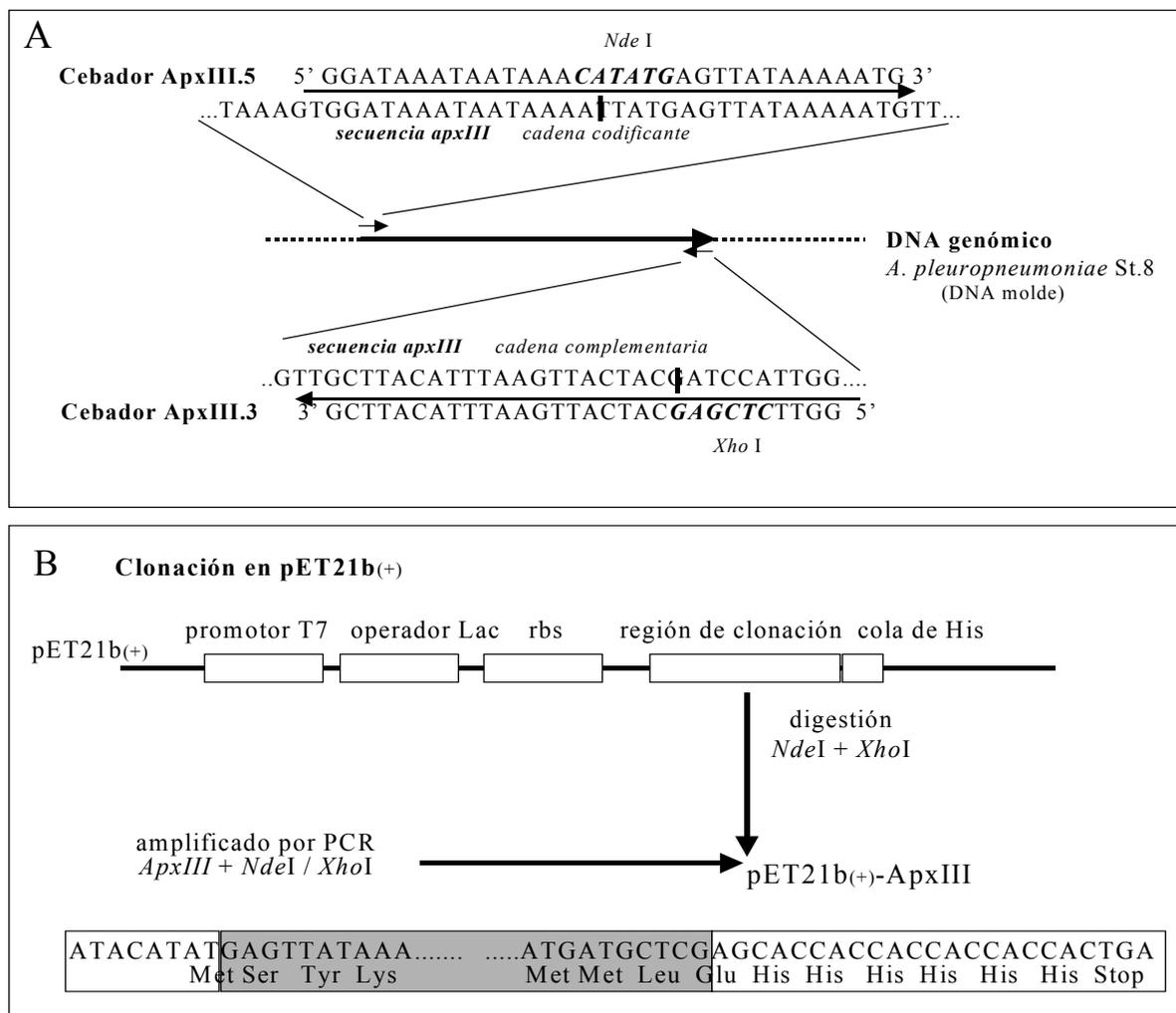


Figura IV.15. A: Amplificación por PCR de la secuencia codificante para ApxIII e introducción de las dianas de restricción *NdeI* y *XhoI*. **B:** Clonación en pET21b(+) y fase de la proteína recombinante.

Para la producción y purificación de la proteína ApxIII procedió del modo descrito para los otros tres antígenos. El rendimiento en este caso fue de unos 3 mg por litro de cultivo. Las figuras IV.16 y IV.17 muestran el resultado de la expresión y de la purificación de ApxIII.

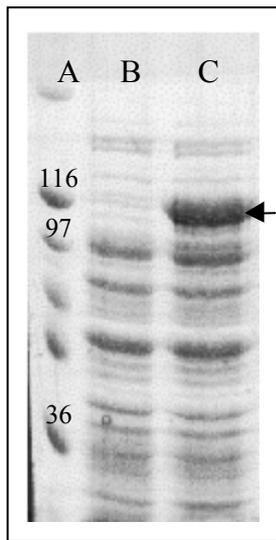


Figura IV.16. Expresión heteróloga en *E. coli* BL21(DE3) de *apxIII* en pET21b(+). Carril A: marcador de peso molecular. Carril B: muestra de expresión de BL21 (DE3) portadora de pET21b(+) con inserto de *apxIII*.

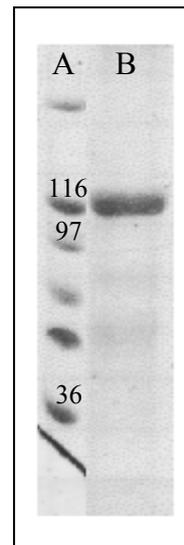


Figura IV.17. Purificación de la proteína ApxIII. Carril A: Marcador de peso molecular. Carril B: muestra de purificación de ApxIII. Se observa una banda con un peso molecular aparente de 116 kDa.

IV.C Ensayos de vacunación

Una vez producidos los antígenos recombinantes, el siguiente objetivo fue proceder a la evaluación preliminar de su potencial como componentes de una vacuna por subunidades. Esta vacuna sería de composición definida y contendría sólo algunos de los antígenos de *A. pleuropneumoniae*, por lo cual resultaría potencialmente marcadora, permitiendo diferenciar serológicamente los animales vacunados de los infectados.

Los ensayos de vacunación se llevaron a cabo en el Centro de Experimentación, Análisis y Control (CEYC) de los Laboratorios HIPRA S.A. Como fase previa a estos ensayos fue necesario definir una serie de parámetros, como son la formulación del compuesto a inyectar, los métodos de vacunación y el las condiciones del reto posterior por infección.

IV.C.1 Desarrollo de un modelo de infección

Si bien trabajábamos con cerdos, que son el hospedante específico, para emular lo mejor posible la infección natural fue necesario determinar previamente las condiciones de infección experimental. Se pretendía conseguir una infección homogénea de todos los animales que permitiese valorar el efecto protector de la vacunación. Los factores a determinar fueron la cepa de *A. pleuropneumoniae* que debía utilizarse, la preparación de la misma, la dosis y la vía de administración. Se utilizó una cepa del serotipo 1 proveniente de un aislado de campo, evitando así utilizar cepas con pasajes *in vitro* que pudiesen haber sido atenuadas parcialmente. La cepa empleada fue la más virulenta de las disponibles, perteneciente a un serotipo representativo por su prevalencia dentro de los aislados de campo.

Se ensayaron cuatro vías de inoculación diferentes: intranasal, intravenosa, intratraqueal y por aerosol. Por vía intranasal se emplearon dosis de 5 mL, con títulos de 10^7 , 10^8 , 10^9 y 10^{11} cfu/mL, sobre grupos de cuatro animales para cada uno de los títulos. Se produjo tan sólo una muerte en el grupo de 10^9 . Por otro lado, los síntomas y lesiones pulmonares observados resultaron variables y sin correlación aparente con el título infectivo.

Al inocular por vía intravenosa se produjo la muerte de todos los animales, observándose las típicas lesiones pulmonares en la necropsia. A pesar de ser un sistema que garantizaba la infección de todos los animales, se descartó esta vía de inoculación debido a que no correspondía a las condiciones naturales de entrada del microorganismo

y porque el choque séptico que provocaba aceleraba y distorsionaba el curso clínico habitual, por lo que no resultaba útil para evaluar el nivel de protección obtenido tras la vacunación.

Como tercera posibilidad se ensayó la infección por vía intratraqueal. Para ello se procedió a anestésiar a los animales y a inocularles mediante una sonda 5 mL de cultivo con un título de 10^9 cfu/mL. La infección se logró establecer con éxito, por lo que los resultados que se derivaron de este procedimiento resultaron más satisfactorios. No obstante, la gravedad de los síntomas era muy variable entre diferentes animales, pudiendo ir desde fiebre y abatimiento hasta la muerte en 24 horas.

Finalmente, la cuarta vía de infección que se ensayó fue la exposición de los animales a una nebulización en estancia cerrada con las mismas dosis de cultivo bacteriano. Si bien este procedimiento emulaba mejor que ningún otro las condiciones naturales de infección, al emplear el mismo título que para la inoculación por vía intratraqueal se obtenían resultados similares. Dado que no se observaron diferencias significativas entre estas dos últimas vías de inoculación, se utilizaron ambas en los ensayos vacunales.

Anteriormente se habían probado también otros animales de experimentación para ser utilizados como modelo de infección, en concreto cobayos y ratones, a los que se inoculó intraperitonealmente la misma cepa del serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae*. No se observó mortalidad en los cobayos y sí en ratones, aunque sólo a partir de dosis de 0,5 mL, a partir de títulos de 4×10^9 . Aparentemente, la muerte sobrevenía por choque séptico, observación que coincidía con datos anteriores que establecían que el modelo en ratones sólo serviría para valorar la infección aguda (Rioux *et al.*, 1998). Tras estas pruebas se descartaron los modelos experimentales y nos decantamos por el cerdo ya que, a pesar de tener un coste mucho mayor y presentar dificultades para una infección homogénea de los animales, permitía valorar la protección de la vacuna sobre el hospedante natural de la enfermedad.

IV.C.2. Pruebas de vacunación

Se llevaron a cabo tres ensayos de vacunación, con los que se pretendió establecer una valoración inicial de la utilidad potencial de los antígenos recombinantes en la formulación de una vacuna por subunidades capaz de proteger frente a la infección por

A. pleuropneumoniae. Todos los ensayos siguieron un esquema similar. Se establecieron: un grupo de animales a los que se inoculó un compuesto formulado con los antígenos recombinantes, un segundo grupo al que se aplicó una vacuna comercial y finalmente otros grupos de animales control a los que se vacunaba con sólo adyuvante o incluso sólo tampón, según el caso. A continuación se recogen los resultados obtenidos con cada uno de los protocolos de vacunación.

PRIMERA PRUEBA DE VACUNACIÓN

Se establecieron cuatro grupos (A, B, C y D), con seis animales en cada uno. El protocolo consistió en una vacunación de los animales de los grupos A, B y C a día 0; revacunación de estos tres grupos a día 21; infección a día 42 y sacrificio a día 49. Los animales del grupo A se vacunaron intramuscularmente con el compuesto comercial Porcillis-App de Laboratorios Intervet, que contiene las tres hemolisinas de *A. pleuropneumoniae* y una proteína de membrana externa de 42 kDa (probablemente la OmlA), todas ellas preparadas a partir de extractos de cultivos y adyuvantadas con un compuesto oleoso basado en el tocoferol. Esta es una vacuna que se empleaba en ese momento para el control de la pleuroneumonía porcina y que se utilizó como control positivo. Inoculamos a los animales del grupo B con un compuesto formulado con los antígenos recombinantes ApxI, ApxIII, Tbp1 y Tbp2 (10 µg de cada uno de ellos por mL de compuesto). La vacuna contenía un 50% (v/v) de adyuvante, que consistía en carbomer-934 (0,120%), hidrocloreuro de levamisol (0,045%), dióxido de titanio (0,038%), bisulfito sódico (0,003%) e hidróxido sódico (0,050%) (p/v). Los animales del grupo C fueron inoculados con tampón PBS + adyuvante y los del grupo D fueron mantenidos como grupo control sin inocular ni infectar.

Se vacunaron los animales con dosis de 2 mL/animal, revacunándose a los 21 días con la misma dosis. En el día 42 del protocolo se procedió a la infección por vía intratraqueal con 5 mL de cultivo a un título de 8×10^8 cfu/mL.

Se controlaron durante todo el proceso parámetros como la temperatura del animal, la evolución de su peso y ciertos signos clínicos locales y generales. Tras el sacrificio de los animales se procedió a la valoración de la infección por necropsia, analizándose la zona de inoculación y los órganos respiratorios. Además, se llevaron a cabo extracciones de sangre de todos los animales en los días -7, 0, 21, 42 y 49, respecto

al día de la primera inoculación, sobre estas extracciones se realizaron análisis serológicos por ELISA y por Western para determinar la evolución de la respuesta humoral para todos los animales.

Valoración

Uno de los parámetros utilizados para controlar la inocuidad de una vacuna es el seguimiento de la evolución de la temperatura de los animales tras la vacunación y la revacunación. Se establecieron los límites aceptables para este parámetro tomando la media de la temperatura de los animales del grupo control no vacunado más 2 veces el valor de su desviación estándar. En la medición correspondiente a siete horas tras la vacunación inicial los animales del grupo A presentaban una temperatura media de 41,2°C. En los del grupo B alcanzaba los 40,5°C de media y en el grupo C, compuesto por animales vacunados con adyuvante, no se presentó ningún aumento de temperatura. El límite superior establecido para las temperaturas de los animales del grupo D, no vacunados, era de 40,4°C.

En la revacunación se procedió a realizar el mismo seguimiento de la temperatura. Se observó que la vacuna A volvía a producir fiebres superiores a la B, resultando una media de 41,2°C para el grupo A y de 40,6°C para el grupo B; en ambos casos se superaba el límite superior tolerado (40,2°C). Los animales revacunados con la vacuna C no experimentaban variaciones de temperatura significativas y sus valores se mantenían muy próximos a los del grupo control D.

En ningún caso se observaron reacciones locales en el punto de inoculación, por lo que se puede concluir que la absorción de las vacunas fue correcta. Tampoco se mostraron signos clínicos tras ninguna de las inoculaciones a día 0 o día 21. La evolución del aumento de peso de los animales no se vio afectada por las vacunaciones. Todos estos parámetros permitieron establecer la seguridad e inocuidad del compuesto vacunal ensayado, requisito previo que debe cumplir toda vacuna, de acuerdo con las normas dictadas por la farmacopea europea.

Además de valorar la inocuidad de la vacuna, había que evaluar el parámetro que define su utilidad, es decir, el nivel de protección conferido por la misma. Para ello se procedió a infectar por vía intratraqueal los animales de los grupos A, B y C, tal como se ha comentado anteriormente. Como resultado de este reto por infección no se observó ninguna baja entre los animales y tampoco se pudieron describir signos clínicos aparentes.

Sin embargo, y a pesar de no observarse lesiones pulmonares cuando se sacrificaron los animales al cabo de una semana de la infección, se pudieron obtener aislados de *A. pleuropneumoniae* de pulmones procedentes de animales de todos los grupos infectados.

A partir de este primer protocolo experimental se determinó la inocuidad del compuesto vacunal aunque, debido al limitado efecto de la infección, no se pudo establecer ninguna conclusión sobre su capacidad protectora. La valoración serológica por ELISA confirmó que la infección no había sido efectiva, no observándose seroconversión tras la infección. La respuesta a día 49 permanece a niveles similares al día de infección, siendo el grupo B el único que presenta resultados positivos, con un índice relativo porcentual (IRPC) superior a 20. Esto se debe a la respuesta a la vacunación, que alcanza valores positivos tras la primera vacunación pero presenta un aumento mayor aún por efecto de la revacunación, pasando el valor del IRPC de 33,1 a 97,2. En esta valoración por ELISA se utilizó el kit CIVTESTTM_{SUISAPP}, cuyo desarrollo corresponde al apartado IV.D de este trabajo. La vacuna administrada a los animales del grupo A contiene hemolisinas. Por consiguiente, al ser ApxI uno de los antígenos del ensayo ELISA, cabría esperar detección de respuesta serológica. Sin embargo, no se observó seroconversión tras la vacunación en este grupo. Estos resultados coinciden con otras observaciones en las que no se detectaron anticuerpos frente a las hemolisinas tras vacunación con Porcillis (Chiers *et al.*, 1998). La tabla IV.2 resume los datos de las valoraciones sobre los animales de este protocolo experimental.

Tabla IV.2. Valoraciones sobre los animales del primer protocolo de vacunación

	Día 0	Día 21			Día 42			Día 49	
	ELISA	ELISA	T. rectal	Signos clínicos	ELISA	T. rectal	Signos clínicos	ELISA	Signos clínicos
Grupo A	Med: -3,4 SD: 0,7	Med: -1,9 SD: 0,7	41,2°C SD: 0,5	–	Med: 3,2 SD: 3,5	41,2°C SD: 0,6	–	Med: 7,5 SD: 19,7	–
Grupo B	Med: -3,0 SD: -1,0	Med: 33,1 SD: 26,6	40,5°C SD: 0,3	–	Med: 97,2 SD: 26,3	40,6°C SD: 0,4	–	Med: 90,4 SD: 17,4	–
Grupo C	Med: -0,6 SD: 2,1	Med: -1,0 SD: 0,9	40,2°C SD: 0,2	–	Med: 5,1 SD: 7,4	40,3°C SD: 0,2	–	Med: 11,9 SD: 11,3	–

SD: desviación estándar.

Los sueros obtenidos se ensayaron también por transferencia Western e inmunodetección sobre los antígenos recombinantes utilizados para la vacunación, valorándose así la respuesta individual frente a cada uno de ellos. Se observó respuesta específica frente a todos ellos en todos los animales del grupo B a partir del día 21. Esto demostraba la antigenicidad de las cuatro proteínas incluidas en la vacuna recombinante. Estos resultados se confirmaron en los otros dos protocolos de vacunación para los grupos vacunados con la vacuna recombinante. Tras la infección se detectaron respuestas por Western frente a ApxI y Tbp2 en los otros grupos de animales. Esta respuesta postinfección no se observó en el primer protocolo, confirmándose así la ineficiencia de la infección en esta primera prueba de vacunación.

SEGUNDA PRUEBA DE VACUNACIÓN

Se establecieron cuatro grupos (A, B, C y D) con seis animales en cada uno. El protocolo consistió en una vacunación de los animales de los grupos A, B y C a día 0, revacunación de estos tres grupos a día 28, infección a día 49 y sacrificio a día 56. Los animales del grupo A se vacunaron con el compuesto comercial Porcillis-App que se utilizó como control positivo. Los animales del grupo B de esta segunda prueba se inocularon con el mismo compuesto que en el grupo B de la primera prueba de vacunación, formulado con los antígenos recombinantes. Los animales del grupo C fueron inoculados con PBS + adyuvante y los del grupo D fueron mantenidos como grupo control sin inocular ni infectar.

La dosis de vacunación fue de 2 mL por animal, aplicando igual dosis en la revacunación que tuvo lugar a los 28 días. En el día 49 del protocolo se procedió a la infección por vía intratraqueal con 5 mL de cultivo con un título de 4×10^9 cfu/mL.

Durante el proceso se valoraron los mismos parámetros que en el primer protocolo experimental.

Valoración

En la medición de la temperatura de los animales correspondiente a siete horas tras la vacunación inicial el grupo A presentaba una temperatura media de 41,7°C, en el B era de 40,3°C y en el grupo C, compuesto por animales vacunados con adyuvante, no se presentaba ningún aumento de temperatura. Se estableció el límite superior en 40,4°C, a partir del valor de temperatura alcanzado por los animales del grupo D, no vacunados. En la revacunación se observó que las vacunas A y B producían aumentos de temperatura

tales (41,5°C para el grupo A y 41°C para el B), que llevaban a las temperaturas medias del grupo a superar el límite tolerado de 40,3°C. En la revacunación del grupo C no se observaron variaciones de temperatura considerables y sus valores fueron muy próximos a los del grupo control D.

Se confirmaron las observaciones del primer protocolo experimental en cuanto a que no se produjo en ningún caso reacción local en el punto de inoculación, por lo que la absorción de las vacunas, determinada por observación directa tras vacunación y por estudio en necropsia, fue correcta. En cuanto a los signos clínicos, sí se observaron los efectos de las vacunaciones: todos los animales del grupo A y dos del grupo B presentaron síntomas de abatimiento durante las 24 horas postvacunación. Sin embargo, no se observaron efectos tras la revacunación. Todos estos parámetros permitieron establecer la seguridad e inocuidad del compuesto vacunal ensayado.

El reto por infección se aplicó sobre los animales de los grupos A, B y C, del mismo modo que en la primera prueba vacunal, aunque en este caso el título del inóculo fue de 4×10^9 cfu/mL, algo mayor al utilizado en el protocolo anterior. Como resultado de este reto por infección se observó una baja en el grupo A, otra en el grupo B y dos en el C. Además, se pudieron describir signos clínicos aparentes en los tres grupos, se valoró la presencia de anorexia, postración, abatimiento, vómito y disnea. Aplicando una valoración de 0 a 3 para cada uno de estos síntomas, según su intensidad, los resultados obtenidos fueron:

- grupo A $\rightarrow 29,8 \pm 37,7$
- grupo B $\rightarrow 28,4 \pm 42,9$
- grupo C $\rightarrow 41,3 \pm 49,4$

A partir de estos datos, a pesar de que proceden de una valoración subjetiva, se desprende una gran variabilidad interna que invalida cualquier pequeña diferencia entre grupos. De hecho, ni siquiera se puede hablar de diferencias entre los grupos A y B. En cualquier caso, sí se observa que los grupos de animales vacunados presentan, en promedio, menos síntomas clínicos. Cuando, al cabo de una semana de la infección, se

sacrificaron los animales, se pudieron hacer aislamientos de *A. pleuropneumoniae* a partir de muestras de pulmones de animales de todos los grupos infectados.

La valoración serológica por ELISA confirmó que en este segundo protocolo experimental la infección había sido efectiva, observándose seroconversión tras la infección en los grupos A y C. El grupo B, por su parte, ya mostraba respuestas positivas por ELISA tras la revacunación. Ello se debe a las propias características del sistema, ya que el ELISA estaba formulado con los antígenos recombinantes, tal y como se explica con más detalle en el apartado correspondiente al desarrollo del ELISA para diagnóstico. Consecuencia de todo ello es que este ensayo resultaba sensible a la respuesta provocada por la inmunización con las propias proteínas o por la infección.

En la tabla IV.3 se resumen los datos de la valoración de los animales de este protocolo experimental.

Tabla IV.3. Valoraciones sobre los animales del segundo protocolo experimental

	Día 0	Día 28			Día 49			Día 56	
	ELISA	ELISA	T. rectal	Signos clínicos	ELISA	T. rectal	Signos clínicos	ELISA	Signos clínicos
Grupo A	Med: 0,2 SD: 1,9	Med: 2,0 SD: 1,8	41,7°C SD: 0,2	–	Med: 4,3 SD: 5,0	41,5°C SD: 0,6	–	Med: 57,0 SD: 24,2	+
Grupo B	Med: -0,2 SD: 2,2	Med: 9,0 SD: 7,9	40,3°C SD: 0,3	–	Med: 87,2 SD: 20,6	41,0°C SD: 0,4	–	Med: 83,3 SD: 23,3	+
Grupo C	Med: 0,0 SD: 3,3	Med: 1,5 SD: 3,1	40,1°C SD: 0,1	–	Med: 4,8 SD: 3,9	40,3°C SD: 0,5	–	Med: 48,8 SD: 30,0	++

SD: desviación estándar

TERCERA PRUEBA DE VACUNACIÓN

En este tercer protocolo de vacunación se introdujo un nuevo método de infección, el aerosol (en el apartado IV.C.1 hemos comentado la validez de este método de infección) con la intención de mejorar la eficiencia observada en los protocolos anteriores. Se utilizó un cultivo con un título de 1×10^9 cfu/mL, pero por lo demás se mantuvo un esquema similar a los dos primeros protocolos de vacunación. Se establecieron tres grupos de animales, aislados unos de otros: grupo A (vacunado con Porcillis), grupo B (vacunado con el compuesto de las proteínas recombinantes) y grupo C (vacunado con tampón más adyuvante). En esta tercera prueba se siguió un esquema de

vacunación a día 0, revacunación a día 28, infección a día 54 y sacrificio a día 61. Los resultados de las mediciones de temperatura y de los análisis serológicos se muestran en la tabla IV.4.

Tabla IV.4 Valoraciones sobre los animales del tercer protocolo experimental

	Día 0	Día 28			Día 54			Día 61	
	ELISA	ELISA	T. rectal	Signos clínicos	ELISA	T. rectal	Signos clínicos	ELISA	Signos clínicos
Grupo A	Med: 0,1 SD: 1,9	Med: 2,1 SD: 1,8	41,3°C SD: 0,6	–	Med: 2,9 SD: 5,0	41,6°C SD: 0,6	–	Med: 38,0 SD: 12,4	+
Grupo B	Med: 1,2 SD: 2,3	Med: 8,4 SD: 6,8	40,5°C SD: 0,3	–	Med: 67,2 SD: 8,2	40,1°C SD: 0,4	–	Med: 76,6 SD: 11,4	+++
Grupo C	Med: 0,0 SD: 1,1	Med: 1,3 SD: 1,0	40,1°C SD: 0,2	–	Med: 3,7 SD: 2,5	40,0°C SD: 0,3	–	Med: 37,0 SD: 11,6	++++

SD: desviación estándar.

En este tercer protocolo se consiguió provocar una infección de máxima virulencia, originando síntomas acusados e incluso la muerte de algunos animales. La protección frente a la morbilidad se valoró por signos clínicos externos y por presencia de lesiones pulmonares en necropsia. La evolución de la enfermedad fue rápida, a las 24 horas la mayoría de los animales presentaban síntomas que variaban en gravedad, según el grupo que se considerase. En el grupo control la mayoría de los animales presentaban postración, problemas respiratorios y disnea, que condujeron a la muerte de dos animales a las 24 horas, de otro a las 48 y de tres más al cabo de 72 horas de la inoculación. El grupo B presentó un cuadro algo menos grave en cuanto a síntomas respiratorios, aún así los animales mostraban postración y se produjeron cuatro muertes al cabo de 48 horas. Finalmente, el grupo A presentó también postración tras la infección, con síntomas respiratorios claros en dos animales; aún así, los signos clínicos fueron mucho más leves en este grupo y no provocaron la muerte de ningún animal. Esta protección parcial corresponde a lo descrito en la bibliografía (Chiers *et al.*, 1998). Por lo que respecta a la evaluación de las lesiones en los pulmones por necropsia, no se observaron diferencias entre los grupos B y C, con lesiones generalizadas en todos los lóbulos. También se observaron lesiones en los animales del grupo A, aunque de menor extensión, con menor presencia de lesiones hemorrágicas y con áreas de necrosis más pequeñas.

En total murieron seis animales del grupo control (un 66,7 % de la muestra), 4 del grupo B (el 57,1%) y ninguno del grupo A. Al no haber diferencias significativas entre los grupos B y C, según el test de Fisher, se estableció que la vacuna B no protegía frente a la mortalidad provocada por un reto con un título de 10^9 administrado por vía aerosol. En condiciones naturales cabría esperar que los títulos a los que se enfrentaría un animal vacunado fuesen inferiores, por lo que a partir de este experimento no se puede determinar la capacidad protectora de la vacuna B frente a infecciones en condiciones de campo. Para posteriores evaluaciones de éste o de otros compuestos vacunales frente a la pleuroneumonía porcina será necesario trabajar en la puesta a punto del método de infección. Este método debería ser capaz de provocar la infección administrando inóculos de bacteria con títulos inferiores, entre 10^6 y 10^3 , tal y como está descrito en la bibliografía (Furesz *et al.* 1997; Chiers *et al.*, 1998; Goethe *et al.*, 2001).

Una vacuna debe cumplir dos requisitos fundamentales para ser aprobada: debe ser segura y eficiente. El termino eficiencia es relativo, no significa que la vacuna deba inducir una inmunidad completa bajo cualquier condición que se pueda encontrar en el campo. Las valoraciones preliminares realizadas en el presente estudio permiten establecer la seguridad del compuesto vacunal utilizado, aunque no su eficiencia.

La baja protección aparente de los animales del grupo B respecto a la vacuna del grupo A hizo descartar la posibilidad de proceder a evaluaciones de campo de la vacuna.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE VACUNACIÓN

A pesar de que la vacunación fue capaz de provocar una respuesta humoral específica frente a los antígenos utilizados, no pudo conferir una protección suficiente frente a la infección. Los factores que influyeron en los resultados de estas pruebas vacunales pudieron ser muy diversos: el adyuvante, la vía de administración, los antígenos utilizados y el hecho de trabajar con antígenos recombinantes.

La elección de un buen adyuvante puede determinar el éxito de una vacuna. La inmunización con una vacuna adyuvantada desencadena una serie de respuestas leucocitarias diferentes a las que provoca un antígeno sin adyuvante. En el caso de *A. pleuropneumoniae* se había descrito el uso de múltiples adyuvantes: adyuvante de Freund, polietilenglicol, hidróxido de aluminio, compuestos comerciales mixtos y aceites vegetales y minerales (Hall *et al.*, 1989; Straw *et al.*, 1990; Willson *et al.*, 1995; San Gil *et al.*, 1999). En

estas pruebas se había intentado determinar el adyuvante ideal para conseguir el compromiso entre activación de la respuesta inmunitaria y toxicidad. En este estudio se eligió un adyuvante complejo, que contenía levamisol como estimulante de los linfocitos T, carbomer como polímero regulador de la difusión de los antígenos, conservantes y antioxidantes. La elección del adyuvante puede determinar también el equilibrio entre respuesta celular y humoral. En nuestro estudio nos centramos en el seguimiento y determinación de la respuesta humoral. Por lo que respecta a la celular, es posible que, a pesar de incluir en la formulación un estimulante de los linfocitos T como el levamisol, no se alcanzase una activación suficiente de esta respuesta, lo cual habría impedido una buena protección frente a la infección.

La vía de administración también es un factor importante que determina el tipo de respuesta que genera una vacunación. En el caso de *A. pleuropneumoniae* nos enfrentamos a un patógeno del sistema respiratorio, siendo necesaria por tanto una buena protección local en las mucosas del epitelio respiratorio para hacer frente a la colonización por parte del microorganismo. Esta protección local tendrá una de sus bases en un nivel suficiente de anticuerpos IgA. Al medir por ELISA indirecto los niveles de IgA en suero frente a los antígenos recombinantes, no se detectó un aumento de respuesta específica en ninguno de los grupos vacunados. Esta medición en suero resulta una buena estimación de los niveles de IgA en mucosas (Loftager *et al.*, 1993), por lo que esta inexistencia de respuesta humoral local podría explicar en parte la limitada eficiencia de las vacunas. La vía de administración ideal para estimular la producción de anticuerpos IgA en la mucosa debería emular la vía de entrada natural del microorganismo, siendo por tanto las vías intranasal o por aerosol las más adecuadas. Otra vía para la que se ha descrito activación de la respuesta en mucosas es la intraperitoneal (Hall *et al.*, 1989). Sin una buena inducción de esta inmunidad local, la más sofisticada de las vacunas no podría proteger mejor que la más tradicional de las bacterinas.

Otro factor que pudo determinar la insuficiencia de la protección pudo ser la formulación de la vacuna en base a cuatro antígenos proteicos, pudiendo faltar algún otro antígeno fundamental para obtenerse protección. Se ha descrito que los antígenos capsulares se encuentran entre los responsables de inducir la respuesta protectora, sobre todo como señalizadores para la opsonización de la bacteria. La inclusión, por tanto, de estos en la vacuna podría haberse hecho en forma de conjugado con los antígenos

proteicos, presentación que sería un requisito en animales jóvenes, más susceptibles a la infección e incapaces de reconocer los antígenos independientes de timo (como es el caso de los polisacáridos), sobre los que debería aplicarse la vacuna. La presentación de los componentes de la cápsula conjugados a proteínas ha demostrado ser capaz de inducir respuesta protectora y anamnésica en el caso de *Neisseria meningitidis* (Lesinsky *et al.*, 2001; Cripps *et al.*, 2002). Sin embargo, se presenta la dificultad de la gran variabilidad entre antígenos capsulares de diferentes cepas y serotipos.

Es posible que, a pesar de haberse generado anticuerpos potencialmente protectivos, éstos no pudiesen ser efectivos. Se ha descrito que la bacteria se puede asociar íntimamente *in vivo* con las células del epitelio alveolar y los cilios de los bronquiolos, asociación que podría mediar la liberación efectiva de las exotoxinas de la bacteria a las células diana y provocar la destrucción de estas últimas incluso en presencia de anticuerpos neutralizantes frente a las toxinas (Haesebrouk *et al.*, 1997). Este efecto de circunvenir la respuesta protectora estaría reforzado de nuevo por la dosis que tuvo que emplearse para obtener la infección. Para minimizar esta asociación sería quizás necesario incluir en la vacuna los elementos responsables de la adhesión, entre ellos las fimbrias. Éste es un antígeno que normalmente no se expresa *in vitro*, aunque no son las fimbrias el único antígeno que es expresado *in vivo* y no *in vitro*, ya que lo mismo ocurre con ApxIV y, posiblemente, con otros antígenos. Ello podría explicar también la protección limitada de muchas vacunas formuladas a partir de bacterias inactivadas.

El hecho de que los antígenos se presentasen con una conformación no nativa pudo contribuir a la insuficiencia de la protección. Frecuentemente los anticuerpos neutralizantes corresponden a epítomos conformacionales, muchos de los cuales no se presentarían en las proteínas recombinantes al no estar plegadas en una conformación nativa. La respuesta frente a los epítomos lineales no sería por tanto suficiente para conferir protección. Para el caso de las Tbp sería posible pensar en su presentación adyuvantada con liposomas, aproximación empleada con éxito en la presentación de proteínas de membrana en su conformación nativa (Christodoulides *et al.*, 1998).

Por todo lo observado en estos ensayos y por la limitada efectividad que presentan otras vacunas de subunidades, se consideró apropiado establecer otra estrategia para desarrollar una vacuna efectiva frente a la pleuroneumonía porcina. En estos esfuerzos se enmarcan los que actualmente se están desarrollando, también en colaboración entre el

grupo de Biología Molecular del IBB y Laboratorios HIPRA S.A., encaminados a crear cepas defectivas de *A. pleuropneumoniae* que puedan utilizarse como vacunas vivas. Estas cepas no tendrían los problemas derivados de la presentación de los antígenos en forma no nativa, podrían actuar emulando la infección natural y deberían ser capaces de inducir inmunidad local y completa. Actualmente algunas de estas cepas se encuentran en fase de ensayo sobre animales.

IV.D. Desarrollo de un ELISA indirecto para el diagnóstico de la pleuroneumonía porcina

El objetivo de esta parte del trabajo fue desarrollar un ELISA indirecto que permitiese detectar anticuerpos específicos frente a *A. pleuropneumoniae* en sueros porcinos. Debía ser un ensayo sensible a la respuesta frente a cualquier cepa de *A. pleuropneumoniae*, específico de especie y no de serotipo. El propósito era preparar un producto que se pudiese comercializar, adecuado para la determinación del estatus serológico de explotaciones porcinas basada en el análisis de grupos de animales.

El desarrollo de un ELISA para diagnóstico no es más que un proceso de validación de la técnica para un uso determinado, para ello es necesario superar un mínimo de cuatro etapas: 1) establecimiento de su viabilidad, 2) determinación, optimización y estandarización de los reactivos y la técnica, 3) definición de las características del ensayo y 4) seguimiento continuo de su funcionamiento. A continuación se describe el desarrollo del método de diagnóstico siguiendo este esquema de actuación.

IV.D.1. Uso de las proteínas recombinantes como antígenos en ELISA indirecto

En primer lugar hubo que determinar si era posible desarrollar un método de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos frente a *A. pleuropneumoniae* utilizando como antígenos las proteínas producidas de forma recombinante. Eran numerosas las citas en la bibliografía que señalaban la presencia de anticuerpos frente a las Apx y las Tbp en sueros de animales infectados (Devenish *et al.*, 1990; Gerlach *et al.*, 1992; Crujisen *et al.*, 1995a; Stine *et al.*, 1994). A partir de aquí era necesario establecer si esta respuesta frente a las proteínas nativas se podía detectar utilizando los antígenos recombinantes. Para ello se empleó una colección de sueros procedentes de animales de estatus conocido para *A. pleuropneumoniae*. Las muestras se analizaron por ELISA utilizando las proteínas recombinantes como antígenos.

En primer lugar valoramos por separado los cuatro antígenos. Para ello se tapizó sobre una microplaca cada uno de ellos a diluciones seriadas entre 1000 y 0,5 ng por pocillo, en dos tampones diferentes, PBS pH 7,5 y carbonato bicarbonato pH 9,6. La figura IV.18 muestra los resultados obtenidos al valorar los antígenos frente a una seroteca que incluía sueros negativos y positivos para los serotipos 1 y 4. Las condiciones de tapizado óptimas se definieron como aquellas que permitían una mejor diferenciación entre los animales infectados y los libres de *A. pleuropneumoniae*. En estos primeros ensayos se evidenció que la Tbp1 resultaba el antígeno menos útil, ya que ofrecía un rendimiento inferior y permitía una menor diferenciación, descartándose su uso como antígeno en el ELISA. Ésta era un resultado previsible debido a que es la menos expuesta de las cuatro proteínas y para la que se ha descrito una menor respuesta humoral. Con los otros tres antígenos se podía obtener una clara diferenciación con los sueros utilizados. Este contraste se conseguía utilizando concentraciones intermedias de los antígenos. Cuando se empleaban concentraciones altas de antígeno se perdía el contraste como consecuencia del aumento de la respuesta inespecífica, acompañado de una saturación en la detección de la respuesta específica. A concentraciones bajas se perdía la diferenciación por falta de diana para la unión de los anticuerpos específicos. Figura IV.18.

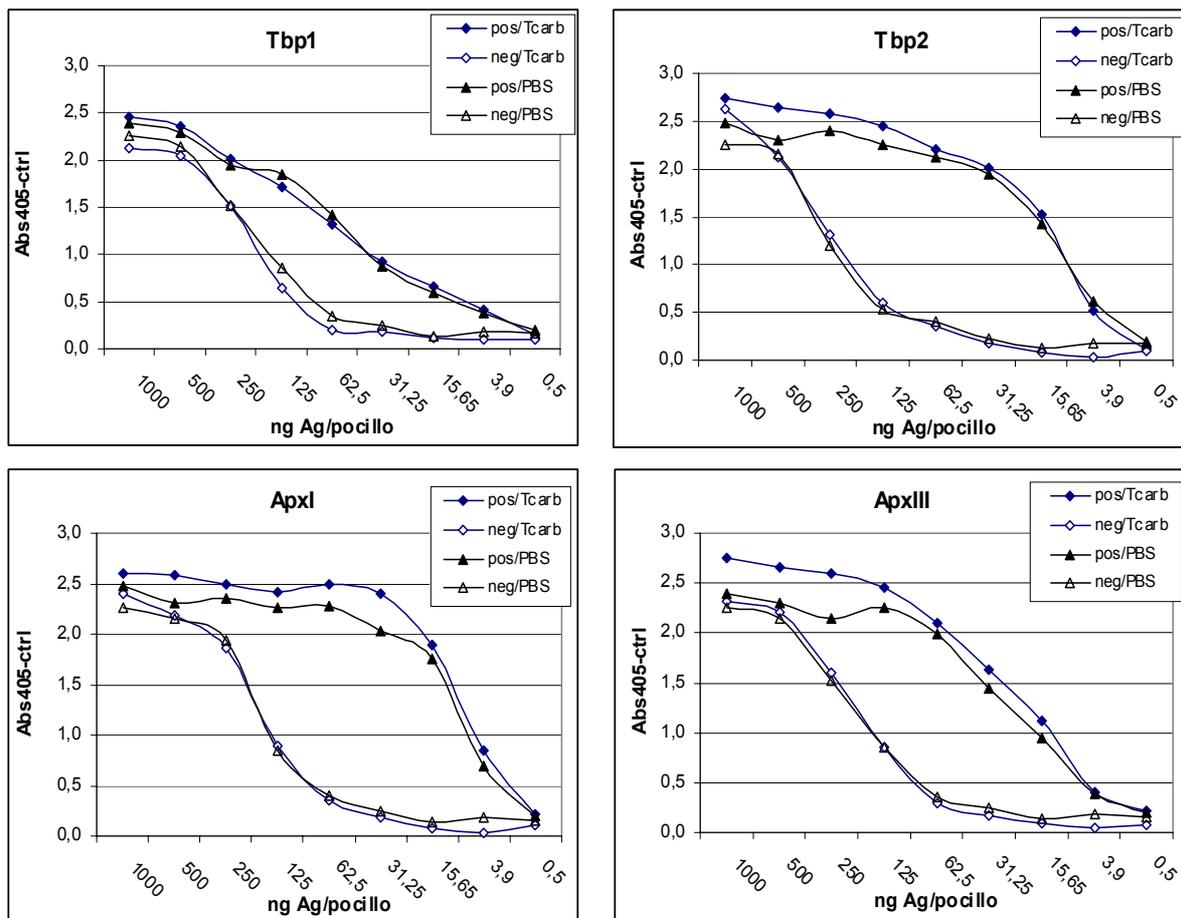


Figura IV.18. Detección de anticuerpos en muestras de suero de animales infectados y libres de *A. pleuropneumoniae*, utilizando diluciones seriadas de los cuatro antígenos en dos tampones diferentes.

La presencia de anticuerpos contra las exotoxinas en la respuesta frente a la infección y el hecho de que prácticamente todas las vacunas por subunidades propuestas contengan estas proteínas, justifican el uso de una exotoxina como antígeno. Además, se ha determinado que la presencia de anticuerpos frente a las Apx es un requisito imprescindible para una respuesta inmunitaria completa que proporcione protección. En cambio la de anticuerpos frente a LPS o a polisacáridos capsulares, antígenos utilizados en algunos ensayos comerciales, no lo es (Furesz *et al.*, 1997).

La presencia de reacción cruzada entre ambas hemolisinas (Nielsen *et al.*, 2000) nos permitió incluir una sola de ellas en el ensayo, y nos

decantamos por la ApxI por ser representativa de los serotipos más comunes y virulentos en nuestro país.

Hay cepas de *A. pleuropneumoniae* que no producen hemolisinas, es por ello que no se puede basar el ensayo tan sólo en ApxI y por lo que la inclusión de Tbp2 no únicamente mejora la detectabilidad sino que aumenta también la sensibilidad. La inclusión de Tbp2 también resulta útil para aumentar la sensibilidad frente a infecciones por serotipos que no expresan ApxI. En estos casos tan sólo se detectaría la respuesta cruzada de las hemolisinas, esto podría resultar en un ensayo con una baja sensibilidad para animales infectados con estos serotipos.

A continuación se comprobó el uso combinado de los dos antígenos para detectar la respuesta humoral frente a la infección. Para ello se infectaron tres animales con una cepa de *A. pleuropneumoniae* del serotipo 1, manteniéndose otro animal como control no infectado. Sobre estos animales se practicaron extracciones de sangre seriadas y las muestras obtenidas se analizaron sobre la combinación de los dos antígenos. Los resultados se muestran en la figura IV.19. La respuesta se expresa en forma de IRPC (índice relativo porcentual). Éste es un valor que se obtiene de la corrección de la densidad óptica de la muestra que se analiza con la de los controles negativo y positivo que se incluyen en cada prueba (ver III.G.2) y que permite estandarizar resultados entre diferentes ensayos. Como veremos más adelante, el punto de corte del ELISA se estableció en un IRPC de 20. Siguiendo este criterio se puede comprobar la seroconversión entre 2 y 4 semanas postinfección. Esta sensibilidad a la respuesta postinfección coincide con lo descrito en la bibliografía para otros métodos de detección de anticuerpos (Bossé *et al.*, 1993).

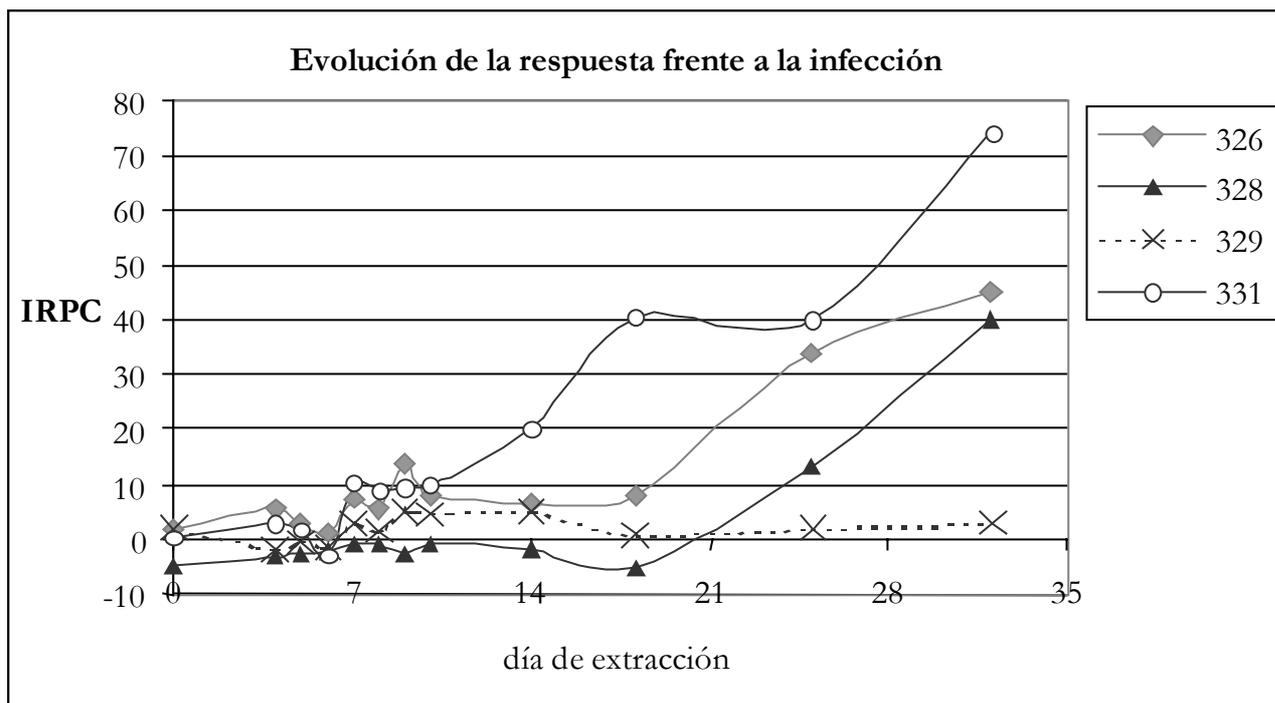


Figura IV.19. Detección de la respuesta serológica post infección. Se indica la respuesta post infección observada por ELISA. Se infectaron tres animales (referencias 326, 328 y 331) y se mantuvo un animal sin infectar (referencia 329). La respuesta se expresa en forma de IRPC (índice relativo porcentual).

Con estos ensayos se confirmó la utilidad de los antígenos recombinantes para la diferenciación entre sueros de animales infectados o no por *A. pleuropneumoniae*. A partir de aquí se trabajó con la combinación de Apx1 y Tbp2 como antígenos para el ELISA, ajustando la concentración de ambas proteínas para cada nuevo lote de producto mediante ensayos de titulación cruzada frente al conjugado. El procedimiento utilizado se describe en el siguiente apartado.

Una vez determinados los antígenos a utilizar, el siguiente paso fue definir el resto de reactivos y el protocolo óptimo para el ensayo.

IV.D.2. Determinación, optimización y estandarización de reactivos y técnicas

La siguiente etapa en el desarrollo del ensayo fue la estandarización de los reactivos y de la técnica, es decir, la determinación del método de tapizado del antígeno, bloqueo de las placas y la formulación de los reactivos líquidos necesarios. Este

trabajo lo llevamos a cabo en el departamento de desarrollo de métodos de diagnóstico de los Laboratorios HIPRA S.A.

El reactivo base del ensayo es el antígeno tapizado en la microplaca de poliestireno, bloqueada posteriormente con una solución que permite por un lado la saturación de los lugares de unión al plástico y, por otro, la estabilización de los antígenos en el pocillo. Sobre la base de los resultados obtenidos en el apartado anterior se estableció el tampón carbonato bicarbonato como el disolvente adecuado para el tapizado del antígeno.

La determinación del método de bloqueo se estableció en paralelo a la formulación del diluyente de muestras. Para la preparación de estas soluciones de bloqueo y diluyentes de muestras se tomó como base tampón PBS pH 7,5 tween-20 0,05 %, sobre el que se ensayaron diferentes mezclas de proteínas y azúcares. El sistema utilizado para las primeras valoraciones de los antígenos en el IBB: bloqueo con BSA 3% y dilución de las muestras con BSA 0,5%, originaba un elevado ruido de fondo. Para conseguir que ésta inespecificidad disminuyera y poder aumentar la diferenciación entre muestras negativas y positivas se utilizaron las combinaciones de bloqueo y diluyente de muestras que se muestran en la tabla IV.5.

Tabla IV.5. Resultados de la valoración de sueros porcinos antes y después de la infección, utilizando diferentes soluciones de bloqueo y diluyente de muestras.

Bloqueo	BSA 3%	BSA 3%	BSA 3%	Triptona 3%	Triptona 3%	Triptona 3%	Suero 10%	Suero 10%	Suero 10%
Diluyente	BSA 0,5%	Triptona 1%	Suero 4%	BSA 0,5%	Triptona 1%	Suero 4%	BSA 0,5%	Triptona 1%	Suero 4%
Muestra									
preinfec-1	0,857	0,784	0,741	0,601	0,482	0,402	0,638	0,568	0,483
preinfec-2	1,377	1,258	1,261	0,462	0,450	0,399	0,525	0,624	0,502
preinfec-3	0,942	0,750	0,680	0,541	0,395	0,381	0,625	0,534	0,450
preinfec-4	0,568	0,580	0,530	0,321	0,301	0,290	0,490	0,337	0,285
preinfec-5	0,811	0,710	0,641	0,384	0,251	0,276	0,553	0,306	0,290
preinfec-6	1,093	0,841	0,815	0,376	0,290	0,287	0,481	0,450	0,304
postinfec-1	2,962	2,840	2,514	2,574	2,603	2,632	2,962	2,777	2,651
postinfec-2	1,182	1,204	1,321	1,341	1,205	1,315	1,182	1,427	1,520
postinfec-3	2,943	3,015	2,984	2,874	2,615	2,651	2,933	2,462	2,514
postinfec-4	3,673	3,025	3,150	3,702	3,054	3,187	3,673	3,601	3,524
postinfec-5	2,516	2,540	2,489	2,615	2,451	2,351	2,516	2,408	2,381
postinfec-6	2,213	2,105	2,047	0,145	2,098	2,184	2,113	2,082	2,102
media neg	0,941	0,821	0,778	0,448	0,362	0,339	0,552	0,470	0,386
media infec	2,582	2,455	2,418	2,209	2,338	2,387	2,563	2,460	2,449
infect / neg	2,742	2,992	3,107	1,663	6,467	7,037	4,643	5,235	6,349

Como puede observarse, la inclusión de triptona o de suero fetal bovino en el bloqueo provoca una clara disminución de la reacción inespecífica. También disminuye al incluirlos en el diluyente, esta reducción se debería al bloqueo en solución de las interacciones inespecíficas y que no llegarían a observarse por tanto, en la fase sólida. En base a los resultados obtenidos se adoptó la solución 3% triptona como bloqueo y la 4% suero bovino como diluyente de muestras.

Utilizando las condiciones establecidas en los ensayos anteriores se observó una pérdida progresiva de las propiedades de las microplacas tapizadas tras permanecer varias semanas a 4°C. Se estudiaron dos posibles soluciones para este problema de estabilidad. Por un lado la adopción de un nuevo método de secado y almacenamiento de las placas y, por otro, la inclusión de azúcares en la solución de bloqueo.

Tras la decantación de la solución de bloqueo las placas se secaban a temperatura ambiente durante 24 horas y posteriormente se sellaban con una película adhesiva para evitar la entrada de humedad. Comparamos la utilidad de este método frente al secado en estufa de aire forzado a 37°C, sellado y almacenamiento en bolsa cerrada conteniendo gel de sílice. Con este método se minimiza la humedad presente y se evitaría la degradación por hidrólisis de las proteínas tapizadas. El nuevo método de secado y el efecto de la inclusión de azúcares en la solución de bloqueo se estudió en una prueba de estabilidad acelerada de las placas tapizadas, que fueron mantenidas a 37°C durante una semana. El resultado se muestra en la figura IV.20. En ella se observa cómo el método de secado tiene un efecto claro sobre la estabilidad inmediata, pudiendo la presencia de un 5% de lactosa contribuir a la estabilización a más largo plazo.

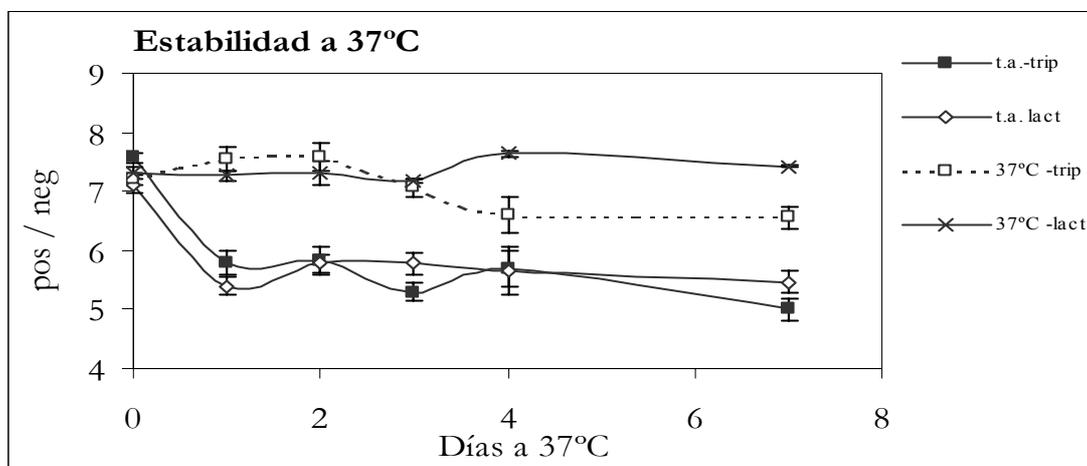


Figura IV.20. Cocientes entre las respuestas promedio de muestras positivas y negativas a lo largo de una semana a 37° C, utilizando microplacas estabilizadas con bloqueos con y sin lactosa al 5% y secado a 37°C o a temperatura ambiente.

El equilibrio del ensayo se estableció por un ajuste de las concentraciones óptimas de antígeno y de conjugado, las cuales se determinaron mediante ensayos de titulación cruzada. El conjugado que se utilizó fue la proteína A unida a peroxidasa, que muestra afinidad por las IgG porcinas. Este se empleó para detectar los anticuerpos que se unen durante la incubación de la muestra diluída sobre el antígeno inmovilizado en la microplaca. Como diluyente de conjugado se utilizó una solución tamponada a pH 7,5 con Tris·HCl 20 mM que contenía BSA 3 % como estabilizante y timerosal 0,1 % como conservante. Esta solución se coloreó utilizando rojo ponceau de xilidina 40 mg/L. Las concentraciones de conjugado óptimas pueden variar en función de la eficiencia de conjugación del lote de proteína A.

Tabla IV.6 Resultados de una prueba de ajuste cruzado para determinar las concentraciones de los dos antígenos (ng/pocillo) y de conjugado (ng/ml). Los resultados se expresan en IRPC.

Ag pocillo//[Conj]		50 ng/ml	40 ng/ml	33,3 ng/ml	28,5 ng/ml	25 ng/ml
Tbp2 100 ng ApxI 75 ng	suero 1	96,9	98,5	98,4	92,1	93,5
	suero 2	52,5	53,5	50,3	54,5	55,7
	suero 3	23,2	24,3	20,2	19,6	21,5
	suero neg	10,7	9,8	10,3	9,5	9,2
Tbp2 75 ng ApxI 100 ng	suero 1	95,4	98,3	97,2	97,4	96,5
	suero 2	48,5	48,9	50,3	49,5	45,3
	suero 3	25,4	26,5	26,8	25,4	25,7
	suero neg	3,2	5,4	4,6	3,5	3,4
Tbp2 90 ng ApxI 120 ng	suero 1	99,4	100,3	100,5	106,3	97,3
	suero 2	51,3	52,4	52,6	51,3	52,5
	suero 3	28,9	27,5	26,8	27,6	25,8
	suero neg	6,2	7,1	8,3	6,5	5,4
Tbp2 120 ng ApxI 90 ng	suero 1	102,5	105,3	102,4	99,4	103,5
	suero 2	57,6	56,9	57,9	56,5	57,4
	suero 3	29,9	28,7	28,5	28,4	27,5
	suero neg	13,6	11,3	11,5	10,3	11,2

Rangos de IRPC para los distintos sueros: suero 1: 94,6-105,4; suero 2: 46,8-59,3; suero 3: 21,8-32,0; suero negativo: < 10. En sombreado se indican los valores fuera de rango.

Para cada nuevo lote de producto la combinación óptima de conjugado y antígenos será aquella que cumpla un mínimo de cuatro requisitos: los valores de IRPC deben estar dentro de los rangos admitidos, el valor de densidad óptica del control positivo será superior a 1,5; el valor de densidad óptica del control negativo será inferior a 0,25 y el cociente entre los controles será superior a 7. Los rangos de variación permitidos se establecieron según las pruebas de repetitividad que se describen en este mismo

apartado. Para el caso mostrado en la tabla IV.6, dos combinaciones de antígenos (75 ng de Tbp2/ 100 ng de ApxI; 90 ng de Tbp2/ 120 ng de ApxI) cumplían estos requisitos a concentraciones de conjugado entre 33,3 y 50 ng/mL. Una vez establecida la concentración de antígeno adecuada se tapizan y bloquean las placas del lote de producto y a continuación se determina sobre ellas la concentración óptima del conjugado que debe prepararse.

Se utilizó ABTS como sustrato para la HRPO, reactivo empleado en otros ensayos de la misma línea comercial. Se eligió según criterios de disponibilidad, facilidad de producción y coherencia con el resto de la línea donde debía incluirse este nuevo producto. Los reactivos y el protocolo del ensayo constituyen la base del producto. La reproducibilidad y el mantenimiento de las características de la prueba se aseguran mediante un control de calidad sobre cada nuevo lote. Los criterios utilizados se establecieron a partir de estudios de repetitividad y reproducibilidad a los que se procedió en la fase inicial del desarrollo.

Para llevar a cabo los ensayos de repetitividad se prepararon tres lotes de producto, para ello se utilizaron lotes diferentes de los antígenos y de los demás reactivos, así se pretendía reproducir la variabilidad que podrían presentar los subsiguientes lotes de producción. Sobre estos tres lotes de producto se ensayaron cuatro muestras de referencia, en tres días diferentes, por parte de tres operarios distintos, así se pretendía maximizar la variabilidad debida a posibles diferencias en la manipulación. Los resultados se muestran en la tabla IV.7. Con los datos obtenidos se estableció un rango de variabilidad permitida para cada uno de los sueros de control interno. Estos tres sueros se ensayan desde entonces sobre todos los lotes de producto, sirviendo a los procesos de producción y control de calidad para asegurar el mantenimiento de las características de la prueba entre diferentes lotes.

Tabla IV.7 Resultados de la prueba de reproducibilidad del ensayo sobre tres lotes de producto generados por tres operarios diferentes.

	Total			Operario 1			Operario 2			Operario 3		
	Suero 1	Suero 2	Suero 3	Suero 1	Suero 2	Suero 3	Suero 1	Suero 2	Suero 3	Suero 1	Suero 2	Suero 3
Tres lotes												
Media	100,0	53,0	26,9	100,0	53,6	27,7	100,0	52,6	26,2	100,0	52,8	26,8
SD	3,6	4,2	3,4	3,6	3,6	3,0	3,7	4,6	4,1	3,6	4,1	2,8
+1,5SD	105,4	59,3	32,0	105,4	59,1	32,2	105,5	59,5	32,3	105,4	59,1	31,1
-1,5SD	94,6	46,8	21,8	94,6	48,2	23,1	94,5	45,8	20,1	94,6	46,6	22,6
CV	3,6%	7,8%	12,7%	3,6%	6,8%	10,9%	3,7%	8,7%	15,5%	3,6%	7,9%	10,6%
Lote 1												
Media	100,0	51,1	24,7	100,0	52,0	25,2	100,0	50,3	22,9	100,0	51,2	24,7
SD	3,7	2,6	2,1	3,6	3,4	1,7	3,9	5,3	3,9	3,5	2,6	2,2
+1,5SD	105,5	55,0	27,9	105,4	57,1	27,7	105,8	58,3	28,7	105,3	55,0	28,9
-1,5SD	94,5	47,1	21,6	94,6	46,9	22,6	94,2	42,4	17,0	94,7	47,1	21,3
CV	0,0%	5,2%	8,5%	3,6%	6,5%	6,7%	3,9%	10,5%	17,1%	3,5%	5,2%	8,5%
Lote 2												
Media	100,0	53,7	28,0	100,0	53,0	29,8	100,0	52,9	28,1	100,0	53,7	28,0
SD	3,6	5,1	2,6	3,9	2,7	2,8	4,0	4,3	2,3	2,9	5,1	2,6
+1,5SD	105,5	61,3	32,0	105,8	57,0	34,0	106,0	59,4	31,6	104,4	61,3	32,0
-1,5SD	94,5	46,0	24,1	94,2	49,0	25,6	94,0	46,4	24,7	95,6	46,0	24,1
CV	3,6%	9,5%	9,3%	3,9%	5,0%	9,4%	4,0%	8,2%	8,1%	2,9%	9,5%	9,3%
Lote 3												
Media	100,0	53,8	27,7	100,0	55,9	28,0	100,0	54,7	27,6	100,0	53,8	27,7
SD	3,5	3,8	2,5	3,1	3,6	2,4	3,0	2,5	3,5	4,2	3,8	2,5
+1,5SD	105,2	59,4	31,4	104,7	61,3	31,7	104,5	58,5	32,9	106,3	59,4	31,4
-1,5SD	94,8	48,1	23,9	95,3	50,5	24,3	95,5	50,9	22,4	93,7	48,1	23,9
CV	3,5%	7,0%	9,0%	3,1%	6,4%	8,7%	3,0%	4,6%	12,6%	4,2%	7,0%	9,0%

Rangos para el control de la producción

Media	100,0	53,0	26,9
SD	3,6	4,2	3,4
+1,5SD	105,4	59,3	32,0
-1,5SD	94,6	46,8	21,8

Rangos para el control de calidad

Media	100,0	53,0	26,9
SD	3,6	4,2	3,4
+2SD	107,2	61,4	33,7
-2SD	92,8	44,7	20,1

Al tratarse de un método de diagnóstico destinado a ser comercializado, fue necesario determinar también una caducidad que pudiera garantizar una vida mínima del producto. Para ello se realizaron estudios de estabilidad del ensayo. En la figura IV.21 se muestran los resultados de estas pruebas correspondientes a las medias de la respuesta de unos sueros testigo valorados sobre tres lotes diferentes de producto a lo largo de 15 meses.

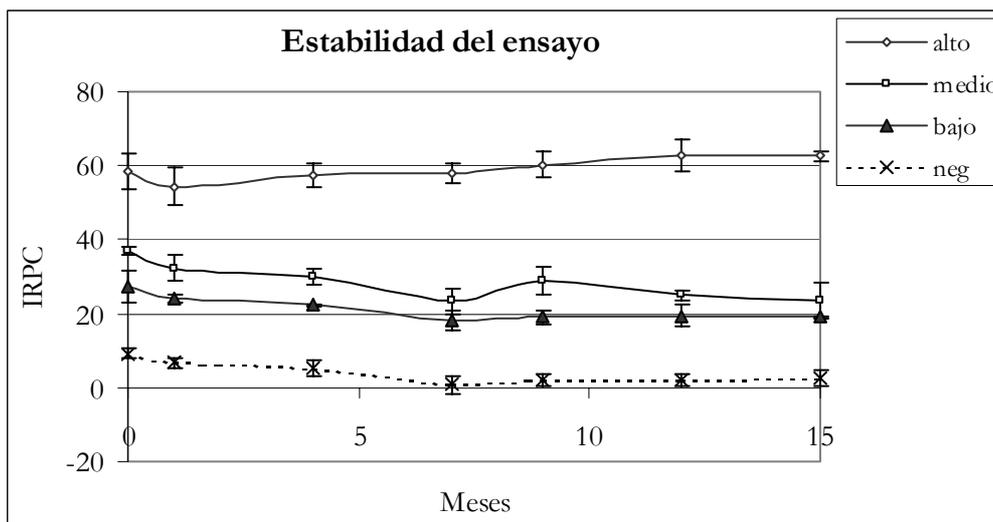


Figura IV.21. Estabilidad del ensayo a lo largo de 15 meses a 4° C. Se mantuvieron los reactivos a 4°C y se realizaron ensayos utilizando cuatro sueros de referencia interna con distinto título (alto, medio, bajo y negativo).

A partir de estos resultados se estableció una caducidad de 12 meses a partir de la fecha de fabricación. Para realizar un seguimiento de la estabilidad de los diferentes lotes se estableció un método consistente en el análisis a 1, 4, 7, 9, 12 y 15 meses postfabricación de todos los lotes de producto.

IV.D.3 Determinación de las características del ensayo

Una de las principales dificultades que se presentó para el desarrollo del método de diagnóstico fue la inexistencia de una técnica patrón de referencia, *gold standard*, para el diagnóstico serológico de *A. pleuropneumoniae*, frente a la cual se pudiese establecer la validez de métodos de diagnóstico alternativos. La técnica de la fijación del complemento, considerada en algunos aspectos la prueba de referencia, presenta una baja sensibilidad (Gottschalk *et al.* 1994), es por ello que la validación de este ensayo se llevó a cabo a partir de muestras de estatus conocido y no estableciendo su equivalencia al diagnóstico ofrecido por otra técnica validada.

Para establecer la especificidad del ensayo se determinó la respuesta de una población de 233 muestras obtenidas en explotaciones negativas, estas provenían de diez granjas de diferentes orígenes: tres explotaciones de Cataluña, dos de Gran Bretaña y cinco de Dinamarca, estas últimas obtenidas en granjas de erradicación y con resultado negativo por fijación del complemento, proporcionadas por la Doctora Vibeke Sorensen (Danish Veterinary Institute).

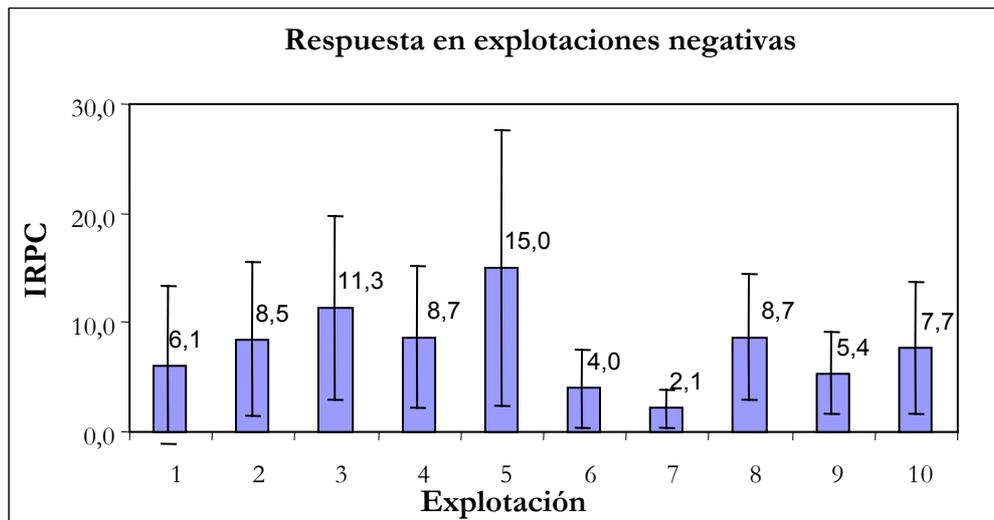


Figura IV.22. Resultados de la valoración de muestras provenientes de explotaciones libres de *A. pleuropneumoniae*. Se indica la media de cada grupo y la dispersión de los datos definida por la desviación estándar de cada grupo.

La especificidad del ensayo sobre esta población es de un 100 % si se considera el diagnóstico sobre explotaciones y de un 93,6 % si se consideran los animales individualmente. Por tanto, teniendo en cuenta la muestra estudiada, el ensayo ofrecía una especificidad adecuada para el diagnóstico sobre grupos de animales.

Se han descrito proteínas similares tanto a ApxI como a Tbp2 en otras especies bacterianas, que podrían ser responsables de posibles falsos positivos en muestras procedentes de explotaciones infectadas con estas otras especies. De entrada, podemos descartar la mayoría de ellas por no tener al cerdo como su hospedante natural, aunque quedarían básicamente tres especies que podrían originar problemas de falsos positivos: *E.coli* hemolítica, *Haemophilus parasuis* y *Actinobacillus suis*. La primera especie podría presentar reacción cruzada por la similitud de su hemolisina con la ApxI, aunque podríamos descartarla fácilmente ya que provoca una sintomatología completamente diferente a la pleuroneumonía. En los otros dos casos se ha descrito la presencia de proteínas similares a Tbp, ApxI y ApxIII de *A. pleuropneumoniae*. A pesar de conocerse esta reacción cruzada no pudimos comprobarla sobre nuestro ensayo por no disponer de colecciones de sueros monoespecíficos frente a estas especies bacterianas. Estos organismos pueden también presentar respuesta cruzada en los ensayos que utilizan componentes capsulares como antígeno (Bossé *et al.*, 1990). Para poder descartar los posibles falsos positivos en explotaciones con presencia de infecciones por estas otras especies bacterianas, deben complementarse los resultados de ELISA con aislamientos

periódicos que lleven a la caracterización de las bacterias presentes. Éstos pueden acompañarse de análisis por PCR, siendo recomendable basar su diseño en secuencias específicas debido a que la gran similitud de algunos genes como los *apxaI* a *apxaIII* puede llevar a falsas interpretaciones (Ostaaajnen *et al.*, 1997). Sin embargo, *apxaIV* podría ser una buena diana al no estar presente en estos otros géneros relacionados. Otro posible enfoque para aumentar la especificidad del ensayo sería convertirlo en un ELISA de bloqueo basado en un anticuerpo monoclonal específico de alguno de los antígenos de *A. pleuropneumoniae* frente a algún epítipo no compartido con otras especies. El riesgo de este diseño radicaría en la posible pérdida de sensibilidad por la existencia de variantes que no presentasen el epítipo específico o de animales que respondiesen de una manera insuficiente frente a éste. Dichas posibilidades no son descartables debido a la gran variabilidad observada entre cepas de campo pertenecientes a diferentes serotipos o incluso al mismo, y a la variabilidad de la respuesta entre individuos. Esta pérdida de sensibilidad se ha descrito para ensayos de competición desarrollados para los serotipos 8 y 12 (Stenbaek *et al.*, 1994).

Junto con la especificidad, otro parámetro que caracteriza a un método de diagnóstico es su sensibilidad, que se definiría no sólo por la capacidad de detectar los animales positivos sino también de hacerlo para todos los serotipos de *A. pleuropneumoniae*. A priori cabría esperar que fuese así, ya que todos los serotipos expresan Tbp2, habiéndose descrito también previamente la reacción cruzada frente a ApxI de sueros de animales infectados con cualquiera de los serotipos de *A. pleuropneumoniae* (Nielsen *et al.*, 2000). La posibilidad de coinfecciones con más de un serotipo hace difícil determinar la especificidad de las muestras de campo (Maes *et al.*, 2001; Chiers *et al.*, 2002), incluso si existe aislamiento y determinación del serotipo del patógeno. Por tanto, para comprobar la reacción cruzada utilizamos muestras provenientes de animales infectados experimentalmente por vía aerosol con serotipos definidos, muestras que de nuevo nos fueron proporcionadas por V. Sorensen. La figura IV.23 muestra los resultados de analizar un total de 73 muestras pertenecientes a infecciones por vía aerosol con ocho serotipos diferentes de *A. pleuropneumoniae*.

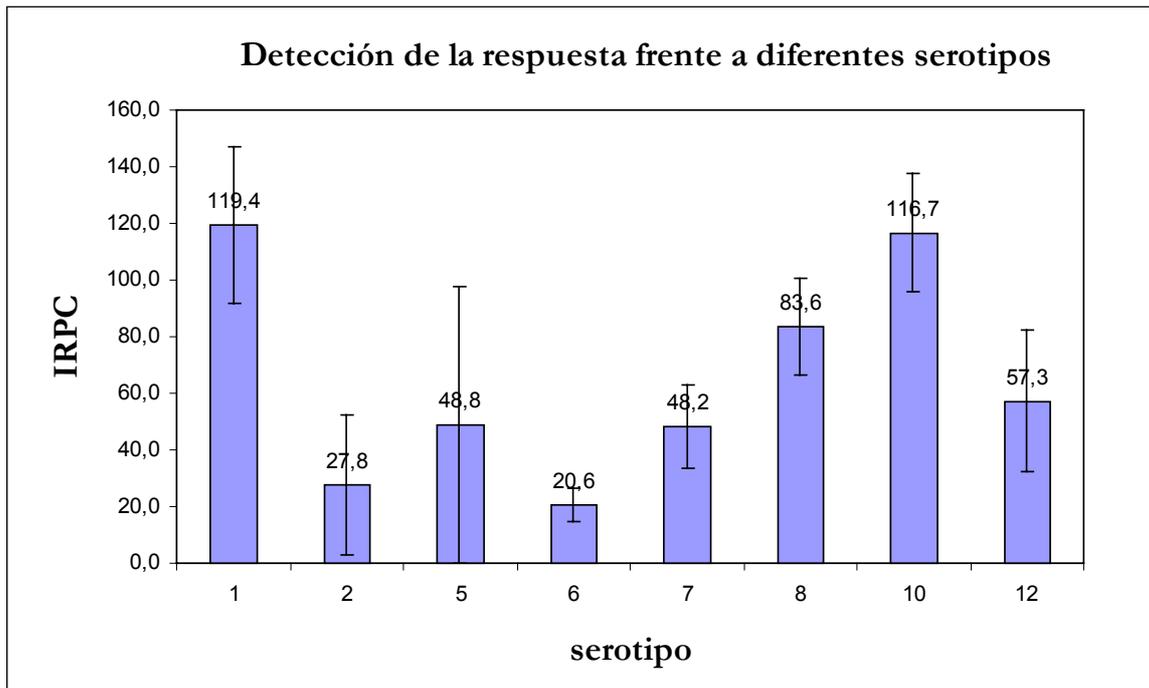


Figura IV.23. Resultados de la valoración de muestras provenientes de animales infectados con cepas de referencia de *A. pleuropneumoniae*. Se indica la media de cada grupo y la dispersión de los datos definida por la desviación estándar de cada grupo.

En todos los grupos de animales estudiados se produce una clara detección de la respuesta. La sensibilidad considerada sobre los grupos es del 100 % y del 81,9 % si se valoran los resultados individualmente. El manejo de los resultados serológicos con animales de abasto siempre debe hacerse sobre los datos generados a partir de un grupo, siendo la finalidad del análisis conocer el estatus de la explotación y no de cada uno de los animales, el cual puede ser muy variable en función de factores individuales. La prevalencia serológica detectada dentro de una explotación puede presentar una variabilidad significativa, correlacionándose ésta con el serotipo y las condiciones en las que se mantiene a los animales (Chiers *et al.*, 2001; Maes *et al.*, 2001). Además, hay que tener en cuenta que se estaba valorando la respuesta frente a una infección vía aerosol, y que por este método no todos los cerdos se infectan al mismo tiempo, pudiendo deberse los diferentes grados de respuesta a posibles infecciones por el reto experimental o por contacto con animales del mismo grupo.

Además de los datos obtenidos con sueros de infecciones experimentales, analizamos 150 muestras provenientes de diez explotaciones con problemas de pleuroneumonía porcina, confirmados por aislamientos de diferentes serotipos de *A.*

pleuropneumoniae y observaciones en necropsia. La sensibilidad en este caso volvió a ser del 100 % sobre grupos y de un 80 % al considerar muestras individuales.

A partir de estos resultados se concluyó que el ensayo resultaba sensible para detectar respuesta serológica frente a la infección, confirmando también esta observación los datos obtenidos en los protocolos de vacunación (ver apartado IV.C).

Se determinó asimismo la sensibilidad del ensayo frente a una colección de sueros provenientes de la AFFSA (Agencia Francesa para la Seguridad Alimentaria), originados por vacunación con una bacterina del serotipo 2. Los resultados se muestran en la tabla IV.8.

Tabla IV.8 Resultados obtenidos sobre muestras procedentes de vacunación con bacterinas utilizando un ensayo basado en lipopolisacáridos (Biovet) y el ensayo descrito en este trabajo (CIVTEST).

	Kit Biovet serotipo 2		CIVTEST APP	
	D.O.	Diagnóstico	IRPC	Diagnóstico
Vacunados con bacterina	1,030	positivo	3	negativo
	0,491	positivo	4	negativo
	0,690	positivo	4	negativo
	0,350	positivo	5	negativo
	0,748	positivo	1	negativo
	0,512	positivo	3	negativo
	0,140	negativo	10	negativo
Infectados	1,394	positivo	25	positivo
	1,347	positivo	58	positivo
	1,199	positivo	58	positivo
	1,387	positivo	21	positivo
	1,094	positivo	31	positivo
	0,383	positivo	73	positivo

Nuestro ensayo, a diferencia de otros basados en lipopolisacáridos, no detecta la respuesta provocada por la bacterina. Este resultado era previsible, ya que este tipo de vacunas no contiene hemolisinas y se prepara a partir de cultivos en condiciones no restrictivas para el hierro, por lo que la bacterina no contiene hemolisinas ni Tbp. Este resultado valida el ensayo para diferenciar muestras provenientes de animales infectados de las muestras de vacunados con bacterinas. Estas vacunas, a pesar de no proporcionar protección heteróloga, son muy utilizadas para generar protección homóloga en forma de autovacunas.

Los datos de sensibilidad y especificidad expuestos hasta aquí fueron los obtenidos al establecer un punto de corte en un IRPC de 20. El punto de corte representa siempre un compromiso entre la máxima especificidad y la máxima sensibilidad, pudiéndose potenciar alguno de estos parámetros si la

prevalencia de la enfermedad o la situación epidemiológica así lo indica. Este punto de corte se determinó teniendo en cuenta el análisis de todos los sueros de estatus conocido que se han mencionado en los estudios de sensibilidad y especificidad (véase tabla IV.9).

Tabla. IV.9. Diferentes puntos de corte y valores de sensibilidad y especificidad al aplicar cada uno de ellos sobre poblaciones de estatus conocido frente a *A. pleuropneumoniae*.

Punto de corte (IRPC)	16	18	20	22	24	52	9
Especificidad %	85,8	89,3	93,6	94,4	96,1	100	63,9
Sensibilidad %	84,9	82,2	81,9	79,5	72,6	30,1	100

IV.D.4 Aplicación y seguimiento del funcionamiento del ensayo

Una de las aplicaciones de este ensayo es la obtención de seroperfiles de granjas. Para ello, se toman muestras de grupos de animales de diferentes edades dentro de una explotación y se analizan por ELISA. Con los resultados es posible establecer si existe circulación del patógeno y sus posibles vías de entrada en la explotación, información que resulta fundamental a la hora de establecer el manejo más adecuado y aplicar las medidas preventivas necesarias. También resultan útiles para determinar la efectividad de un tratamiento, ya sea terapéutico (comprobando cómo ha afectado éste a la circulación del patógeno dentro de la explotación) o profiláctico (comprobando la respuesta frente a la vacunación). A continuación se exponen una serie de ejemplos de seroperfiles obtenidos utilizando el ensayo desarrollado en este trabajo.

En primer lugar se realizaron 16 seroperfiles secuenciales sobre lechones de diferentes explotaciones porcinas de ciclo cerrado. En total se analizaron 1157 sueros, distribuidos en diferentes grupos de edad dentro de cada uno de los seroperfiles. El número de muestras en los seroperfiles seleccionados oscilaba para cada grupo de edad entre 8 y 15. Los resultados de estos seroperfiles se agrupan en la tabla IV.10.

Tabla IV.10. Valoraciones del estatus serológico frente a *A. pleuropneumoniae* sobre animales de diferentes edades en 16 explotaciones porcinas

Seroperfil	Tipo	3 sem.	5 sem.	7 sem.	9 sem.	12 sem.	15 sem.	19 sem.	>20 sem.
1	3	11		2		2		14	1
2	1	52	26	4	3			3	8
3	2	78			20	2	3	5	30

4	1		40	19	15	10	6	4	9
5	3	9		2		5		12	6
6	3		11		18	11	13		22
7	3		8		6	5		3	4
8	3	21		2	6	11		10	11
9	2	49		8	5	6		75	
10	1	48	23	3	9	3	7	9	12
11	2	59	16	3	6	8	13	42	
12	1	33		3	13		1		8
13	1		87	67	5	2			14
14	3	25	23	5	5	5	3	7	13
15	2		55		14	30	52		108
16	2	51	2		14		20	40	50

Los seroperfiles obtenidos pueden agruparse en tres tipos fundamentales:

- grupo 1: explotaciones en las que hay valores positivos de anticuerpos maternos que negativizan progresivamente
- grupo 2: granjas en las que hay elevados niveles de anticuerpos maternos que disminuyen pero en las que vuelve a aumentar la respuesta serológica haciendo que se alcancen valores positivos a final de engorde, y
- grupo 3: aquellos sin inmunidad pasiva y con títulos negativos durante todo el engorde.

Las cerdas inmunes transmiten la respuesta humoral a sus descendientes, confiriéndoles inmunidad pasiva mediante los anticuerpos calostrales. Estos anticuerpos pueden persistir de cinco a nueve semanas, aunque su efecto protector no parece durar más de tres (Nicolet *et al.*, 1992). Los grupos 1 y 2 son lechones de madres positivas, sin embargo en el 1 no existiría recirculación de la bacteria y las madres transmitirían la inmunidad pero no la bacteria, cosa que sí puede estar sucediendo en las explotaciones del grupo 2. El descenso observado del título de anticuerpos entre las 3 y las 12 semanas se correspondería con el aumento, descrito para estas edades, de la presencia de *A. pleuropneumoniae* en las tonsilas de los lechones (Vigre *et al.*, 2002; Chiers *et al.*, 2002). Esta colonización corresponde a una primera etapa de la infección y puede durar de 5 a 7 semanas antes de provocar una infección del sistema respiratorio inferior. El aumento de anticuerpos observado para las explotaciones del tipo 2 entre las 12 y 20 semanas correspondería a la respuesta frente a esta colonización del sistema respiratorio por parte

de *A. pleuropneumoniae*. La representación en la figura IV.24 de los valores medios para los diferentes grupos permite ver los tres tipos de seroperfiles claramente diferenciados.

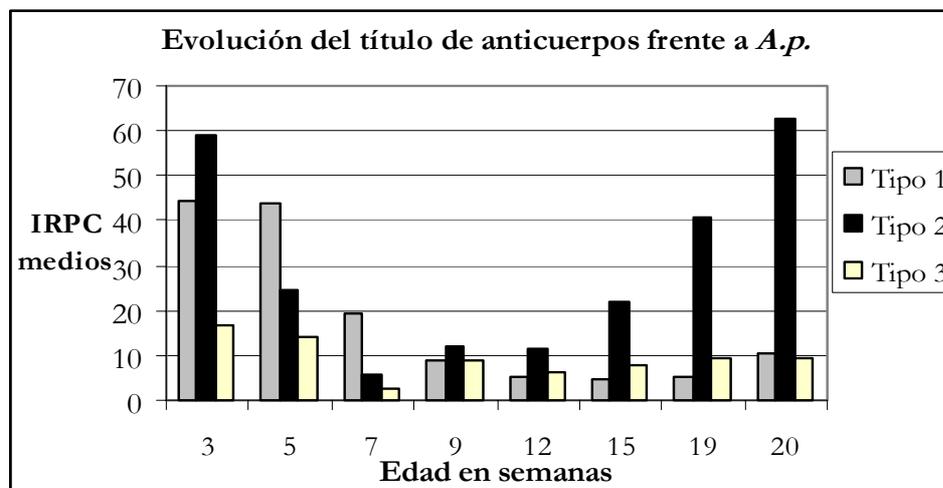


Figura IV.24 Representación de las medias de las respuestas obtenidas, agrupadas según los tres tipos de seroperfiles.

La valoración por ELISA del estatus serológico de una explotación resulta un método rápido y genera una información valiosa para el manejo de los animales. De todas formas, es necesario tener en cuenta que esta valoración es sólo una herramienta más para establecer el diagnóstico y las medidas más adecuadas. Es posible que infecciones subclínicas que sólo afecten a las vías respiratorias superiores pasen inadvertidas, al no generar una respuesta humoral detectable (Chiers *et al.*, 2002). Es por esto que en planes de erradicación o de muy baja prevalencia deben complementarse los análisis por serología con métodos de detección de antígeno, como puede ser la PCR. En la situación contraria, infecciones endémicas con alta prevalencia, puede utilizarse un método de ELISA como el presentado en este trabajo para un cribado inicial y establecerse el diagnóstico final con técnicas menos sensibles, pero altamente específicas como la fijación del complemento. El coste de la estrategia combinada resulta mucho menor que el derivado de utilizar directamente la fijación del complemento (Enoe *et al.*, 2001).

El uso que se pueda dar a este ensayo dependerá de la situación que se dé en cada explotación con respecto a *A. pleuropneumoniae*. En las granjas libres o con planes de erradicación debería utilizarse este ensayo para determinar el estatus de los animales de reemplazo y para analizar diferentes perfiles de edad periódicamente, la finalidad será siempre eliminar o no permitir la incorporación de los animales positivos. Cuando hay

presencia de *A. pleuropneumoniae* se puede optar por mantener un equilibrio basado en el correcto manejo, lo cual permite mantener la infección subclínica sin necesidad de eliminar animales. Es corriente la presencia de infecciones endémicas en muchas explotaciones de ciclo completo, en las que la aplicación de planes de destete precoz y de grupos de aislamiento permite evitar el efecto de las posibles infecciones. Para controlar esta actuación deberán establecerse seroperfiles que indiquen la distribución del patógeno en los diferentes grupos de aislamiento. A partir de aquí se podrá determinar a qué edades se infectan los animales y qué contactos entre grupos conviene limitar.

La información obtenida sobre el estado serológico frente a *A. pleuropneumoniae* debe valorarse conjuntamente con la disponible en relación a otros patógenos respiratorios comunes como micoplasma y el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, entre otros. Todos ellos pueden actuar sinérgicamente provocando lo que se conoce como el complejo respiratorio porcino y pueden determinar un manejo diferente de la situación en función de su presencia o no en la explotación.

Como resultado de esta parte del trabajo se desarrolló el ensayo comercial CIVTEST™ SUI APP que viene comercializándose con éxito en numerosos países. Teniendo siempre en cuenta que el uso del ensayo necesita de un correcto manejo de los resultados, puede considerarse como una herramienta útil para determinar el estatus serológico de explotaciones porcinas frente a *A. pleuropneumoniae*.

V. CONCLUSIONES

1. El protocolo de identificación y aislamiento de secuencias génicas utilizado en este trabajo ha permitido aislar, clonar y secuenciar el gen *tbp1* del serotipo 1 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, situado en posición 3' respecto al gen *tbp2*, que codifica para la proteína 2 de unión a transferrina, uno de los componentes del receptor de transferrina porcina de dicho patógeno.
2. El gen *tbp1* secuenciado contiene 2793 pb. La predicción de la secuencia polipeptídica codificada por este gen indica que se trata de una proteína de 931 aminoácidos, con una masa molecular de 106 kDa. Presenta un péptido señal de 22 residuos, así como diversas características estructurales propias de las proteínas bacterianas de membrana externa (OMP), como hélices transmembrana y presencia de residuos hidrofóbicos en ciertas posiciones del extremo carboxilo, entre ellos una fenilalanina en posición C-terminal.
3. La comparación de la secuencia polipeptídica de Tbp1, deducida por predicción de secuencia a partir del gen *tbp1* de *A. pleuropneumoniae* sujeto de nuestro estudio, con las de otras proteínas de unión a transferrina de especies filogenéticamente próximas, permite establecer unos porcentajes de similitud significativos: 41 % para *Haemophilus influenzae* y 40 % para *Neisseria meningitidis* y *N. gonorrhoeae*. Se trata de proteínas homólogas con una función equivalente, confirmándose así la identidad del polipéptido sujeto de nuestro estudio como la proteína 1 de unión a transferrina de *A. pleuropneumoniae*, que forma parte del receptor de transferrina porcina de este patógeno.
4. Los genes codificantes para la proteína de unión a transferrina *tbp2* y las hemolisinas *apxI* y *apxIII*, han sido aislados en este estudio por PCR siguiendo la información acerca de sus secuencias disponible en la bibliografía. La clonación en plásmidos de expresión tipo pET de Tbp1, Tbp2, ApxI y ApxIII permite la expresión recombinante en *E. coli* de estas cuatro proteínas de *A. pleuropneumoniae*.
5. La inducción de la expresión de estos cuatro antígenos resulta en una acumulación de proteínas recombinantes en el citoplasma, en forma de cuerpos de inclusión. La fusión a dichos antígenos de colas de histidinas en posición N-terminal favorece su purificación por cromatografía de afinidad.
6. La infección de cerdos con *A. pleuropneumoniae* da lugar a la aparición de anticuerpos específicos en suero que reaccionan frente a las proteínas recombinantes. Sin embargo, la inmunización de cerdos con un preparado que contiene las cuatro proteínas producidas de forma recombinante no genera una protección efectiva frente al reto con *A. pleuropneumoniae*.

7. El ensayo de ELISA indirecto desarrollado en este trabajo, que utiliza como antígenos las proteínas ApxI y Tbp2 producidas de forma recombinante, permite distinguir muestras de suero procedentes de cerdos con *A. pleuropneumoniae* de las obtenidas de animales no infectados.
8. La sensibilidad y especificidad del ensayo de ELISA desarrollado para el análisis de individuos son del 81,9% y 93,6%, respectivamente. Para el análisis de grupos de animales se obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad del 100%. Estos datos corresponden a una población de muestras obtenidas en explotaciones porcinas con estado conocido para *A. pleuropneumoniae*.
9. Mediante el ensayo ELISA desarrollado es posible distinguir la respuesta serológica provocada por una vacunación con bacterinas de la que se presenta frente a la infección con *A. pleuropneumoniae*. Asimismo, el ensayo ELISA presentado en este trabajo permite determinar el estado serológico de explotaciones porcinas respecto *A. pleuropneumoniae*. Esta determinación puede aplicarse sobre animales de diferentes grupos de edad para determinar la circulación del patógeno dentro de la explotación.

BIBLIOGRAFÍA

- Angen, O.; Jensen, J. & Lavritsen, D.T. <<Evaluation of 5' Nuclease Assay for Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *J. Clin. Microbiol.* 39:(1) 260-265 (2001)
- Baarsch, M.J.; Scamurra, R.W.; Burger, K.; Foss, D.L.; Maheswaran, S.K. & Murtaugh, M.P. <<Inflammatory Cytokine Expression in Swine Experimentally Infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *Infect. Immun.* 63:(9) 3587-3594 (1995)
- Baltes, N.; Tonpitak, W.; Gerlach, G.F.; Henning-Pauka, I.; Hoffmann-Moujahid, A.; Ganter, M. & Rothkötter, H.J. <<*Actinobacillus pleuropneumoniae* Iron Transport and Urease Activity: Effects on Bacterial Virulence and Host Immune Response>>. *Infect. Immun.* 69:(1) 472-478 (2001)
- Baltes, N.; Hennig-Pauka, I. & Gerlach G-F. <<Both Transferrin Binding Proteins are Virulence Factors in *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 7 Infection>>. *FEMS. Microbiol. Lett.* 209: 283-287 (2002)
- Beaudet, R.; McSween, G.; Boulay, G.; Rousseau, P.; Bisailon, J.G.; Descoteaux, J.P. & Ruppner, R. <<Protection of Mice and Swine against Infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* by Vaccination>>. *Vet. Microbiol.* 39: 71-81 (1994)
- Beck, M.; van den Bosch, J.F.; Jongenelen, I.M.; Loeffen, P.L.; Nielsen, R.; Nicolet, J. & Frey, J. <<RTX Toxin Genotypes and Phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* Field Strains>>. *J. Clin. Microbiol.* 32:(11) 2749-54 (1994)
- Bendixen, P.F.; Shewen, P.E.; Rosendal, S. & Wilkie, B.N. <<Toxicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* for Porcine Lung Macrophages, Peripheral Blood Monocytes, and Testicular Cells>>. *Infect. Immun.* 33: 673-676 (1981)
- Bertram, T.A. <<*Actinobacillus pleuropneumoniae*: Molecular Aspects of Virulence and Pulmonary Injury>>. *Can. J. Vet. Res.* 54: S53-56 (1990)
- Bog, Y.S.; Andresen, L.O.; Bastholm, L.; Elling, F.; Angen, O & Heegaard, M.H. <<The Transferrin Receptor of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Quantitation of Expression and Structural Characterization Using a Peptide Specific Monoclonal Antibody>>. *Vet. Microbiol.* 81: 51-64 (2001)
- Bossé, J.T.; Johnson, R.P.; Nemeč, M., & Rosendal, S. <<Capsular Polysaccharide Antigens for Detection of Serotype-specific Antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *Can. J. Vet. Res.* 54: 320-325 (1990)
- Bossé, J.T.; Johnson, R.P.; Nemeč, M., & Rosendal, S. <<Protective Local and Systemic Antibody Responses of Swine Exposed to an Aerosol of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1>>. *Infect. Immun.* 60:(2) 479-484 (1992)
- Bossé, J. T.; Friendship, R.; Rosendal, S. & Fenwick, B. W. <<Development and Evaluation of a Mixed-Antigen ELISA for Serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotypes 1, 5, and 7 Infections in Commercial Swine Herds>>. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5: 359-362 (1993)
- Boulton, I.C.; Yost, M.K.; Anderson, J.E. & Cornelissen, C.N. <<Identification of Discrete Domains within Gonococcal Transferrin Binding Protein A that Are Necessary for Ligand Binding and Iron Uptake Functions>>. *Infect. Immun.* 68:(12) 6988-6996 (2000)
- Bradford, M.M. <<A Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding>>. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)
- Broes, A.; Gottschalk, M.; Boutin, R.; Dufour, J.; Ethier, R.; Donval, J.-C., Bigras-Poulin, M. & Martineau, G.-P. <<*Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1 ELISA Serology: Influence of Age on Background Reactivity>>. Proceedings of the 14th IPVS congress. (1996)

- Byrd, W. & Kadis, S. <<Preparation, Characterization and Immunogenicity of Conjugate Vaccines Directed against *Actinobacillus pleuropneumoniae* Virulence Determinants>>. *Infect. Immun.* 60: 3042-3051 (1992)
- Clotet, J.; Cedano, J. & Querol, E. <<An Excell Spreadsheet Computer Program for Prediction of Structural Characteristics of Proteins>>. *Comput. Appl. Biosci.* 10: 495-500 (1994)
- Coote, J.G. <<Structural and Functional Relationship among the RTX Toxin Determinants of Gram-Negative Bacteria>>. *FEMS. Microb. Rev.* 88: 137-162 (1992)
- Cornelissen, C.N.; Biswas, G.D.; Tsai, J.; Paruchuri, D.K.; Thomson, S.A. & Sparling, P.F. <<Gonococcal Transferrin-Binding Protein 1 is Required for Transferrin Utilisation and is Homologous to TonB-Dependent Outer Membrane Receptors>>. *J. Bacteriol.* 174: 5788-5797 (1992)
- Cornelissen, C.N.; Andreson, J.A.; Boulton, I.C. & Sparling, P.F. <<Antigenic and Sequence Diversity in Gonococcal Transferrin-Binding Protein A>>. *Infect. Immun.* 68:(8) 4725-4735 (2000)
- Cripps, A. W.; Foxwell, R. & Kyd J. << Challenges for the Development of Vaccines against *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*>> *Curr Opin Immunol.* 14:(5) 553-7 (2002)
- Crujisen, T.; Leengoed, L.A.M.G.; Kamp, E.M.; Bartelse, A.; Korevaar, A. & Verheijden, J.H.M. <<Susceptibility to *Actinobacillus pleuropneumoniae* Infection in Pigs from an Endemically Infected Herd is Related to the Presence of Toxin-Neutralizing Antibodies>>. *Vet. Microbiol.* 47: 219-228 (1995)a
- Crujisen, T.; Leengoed, L.A.M.G.; Ham-Hoffies, M. & Verheijden, J.H.M. <<Convalescent Pigs Are Protected Completely Against Infection with a Homologous *Actinobacillus pleuropneumoniae* Strain but Incompletely against a Heterologous-Serotype Strain>>. *Infect. Immun.* 63:(6) 2341-2343 (1995)b
- Crujisen, A. L. M.; Van Leengoed, L. A. M. G.; Stockhofe-Zurwieden, N.; Kamp, E. M.; Widjaja, A.; Broekhuysen, P.; Ham, M. & Verheijden, J. H. M. <<Pathogenicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 9 Depends upon Toxin Production>>. *Proceedings IPVS.* (1996)
- Cruz, W.T.; Nedialkov, Y.A.; Thacker, B.J. & Mulks, M.H. <<Molecular Characterization of a Common 48-kilodalton Outer Membrane Protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *Infect. Immun.* 64: 83 (1996)
- Cullen, J.M. & Rycroft, A.N. <<Phagocytosis by Pig Alveolar Macrophages of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 2 Mutant Strains Defective in Haemolysin II (ApxII) and Pleurotoxin (ApxIII)>>. *Microbiol.* 140:(Pt 2) 237-244 (1994)
- Chang, Y.; Young, R.; Moulds, T.L. & Struck, D.K. <<Secretion of the Pasteurella Leukotoxin by *Escherichia coli*>>. *FEMS Microb. Lett.* 60: 169-174 (1989)
- Chang, Y.; Shi, J.; Ma, D-P.; Shin, S.J. & Lein, D.H. <<Molecular Analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX Toxin-III Gene Cluster>>. *DNA Cell. Biol.* 12:(4) 351-362 (1993)
- Chevallier, B.; Dugourd, D.; Tarasiuk, K.; Harel, J.; Gottschalk, M.; Kobish, M. & Frey, J. <<Chromosome Sizes and Phylogenetic Relationships between Serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *FEMS. Microbiol. Lett.* 160: 209-216 (1998)
- Chiers, K.; Donné, E.; Van Overbeke, I.; Baele, M.; Ducatelle, R. & Haesebrouck, F. <<*Actinobacillus pleuropneumoniae* Infections in Closed Swine Herds: Infection Patterns and Serological Profiles>>. *Vet. Microbiol.* 85: 343-352 (2002)
- Chiers, K.; Van Overbeke, I.; Donne, E.; Baele, M.; Ducatelle, R.; De Baere, T. & Haesebrouck, F. <<Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Cultures from Nasal and Tonsillar Swabs of Pigs by a PCR Assay Based on the Nucleotide Sequence of a *dsbE*-like Gene>>. *Vet. Microbiol.* 83:(2) 147-159 (2001)

- Chiers, K.; Van Overbeke, I.; Laender, P.; Ducatelle, R.; Carel, S. & Haesebrouck, F. <<Effects of Endobronchial Challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 9 of Pigs Vaccinated with Inactivated Vaccines Containing the Apx Toxins>>. *Vet. Quart.* 20: 65-69 (1998)
- Christodoulides, M; Brooks, J.L.; Rattue, E. & Heckels, J.E. <<Immunization with Recombinant Class 1 Outer-Membrane Protein form *Neisseria meningitidis*: Influence of Liposomes and Adjuvants on Antibody Avidity, Recognition of Native Protein and the Induction of a Bactericidal Immune Response against Meningococci>>. *Microbiol.* 144: 3027-3037 (1998)
- Daban, M.; Medrano, A. & Querol E. <<Cloning, Sequencing and Expression of the Transferrin-Binding Protein 1 Gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *Biochem. J.* 315: 257-264 (1996)
- Deneer, H.G. & Potter, A.A. <<Identification of a Maltose-Inducible Major Outer Membrane Protein in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*>>. *Microb.Pathog.* 6: 425 (1989)a
- Deneer, H.G. & Potter, A.A. <<Effect of Iron Restriction on the Outer Membrane Proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*>>. *Infect. Immun.* 57: 798-804 (1989)b
- Desrosiers, R. <<Therapeutic Control and Economic Aspect of Porcine Pleuropneumonia in Finishing Units>>. *Vet. Rec.* 119: 89-90 (1986)
- Devenish, J.; Rosendal, S. & Bosse, J.T. <<Humoral Antibody Response and Protective Immunity in Swine Following Immunization with the 104-Kilodalton Hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *Infect. Immun.* 52:(12) 3829-3832 (1990)
- Dom, P. & Haesebrouck, F. <<Comparative Virulence of NAD-Dependent and NAD-Independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* Strains>>. *J. Vet. Med.* 39: 303-306 (1992)
- Dom, P; Haesebrouck, F.; Kamp, E.M. & Smits, M.A. <<NAD-Independent *Actinobacillus pleuropneumoniae* Strains: Production of RTX Toxins and Interactions with Porcine Phagocytes>>. *Vet. Microbiol.* 39:(3-4) 205-218 (1994)
- Duff, J. P.; Scott, W. A.; Wilkes, M. K. & Hunt, B. <<Otitis in a Weaned Pig: a New Pathological Role for *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*>>. *Vet. Rec.* 139: 561-563 (1996)
- Enoe, C.; Andersen, S.; Sorensen, V. & Willeberg, P. <<Estimation of Sensitivity, Specificity and Predictive Values of two Serologic Tests for the Detection of Antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in the Absence of a Reference Test (Gold Standard)>>. *Prev. Vet. Med.* 51: 227-243 (2001)
- Fedorka-Cray, P. J.; Huether, M. J.; Stine, D. L. & Anderson, G. A. <<Efficacy of a Cell Extract from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* Serotype 1 against Disease in Swine>>. *Infect. Immun.* 58(2): 358-365 (1990)
- Frey, J & Nicolet, J. <<Purification and Partial Characterization of Hemolysin Produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* Type Strain 4074>>. *FEMS Microb. Let.* 55: 41-46 (1988)a
- Frey, J. & Nicolet, J. <<Regulation of Hemolysin Expression in *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1 by Ca²⁺>>. *Infect. Immun.* 56:(10) 2570-2575 (1988)b
- Frey, J. & Nicolet, J. <<Immunological Properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Hemolysin I>>. *Vet. Microbiol.* 28: 61-73 (1991)a
- Frey, J.; Meier, R.; Gygi, D. & Nicolet, J. <<Nucleotide Sequence of the Hemolysin I Gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *Infect. Immun.* 59:(9) 3026-2032 (1991)b

- Frey, J.; Bosch, H.; Segers, R. & Nicolet, J. <<Identification of a Second Hemolysin (Hly II) in *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1 and Expression of the Gene in *Escherichia coli*>>. *Infect. Immun.* 60:(4) 1671-1676 (1992)
- Frey, J.; Beck, M.; van den Bosch, J.F.; Segers, P.A.M. & Nicolet, J. <<Development of an Efficient PCR Method for Toxin Typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Strains>>. *Mol. Cell. Probes.* 9: 277-282 (1995)
- Fuller, C. A.; Yu, R.; Irwin, S. W. & Schryvers, A. B. <<Biochemical Evidence for a Conserved Interaction between Bacterial Transferrin Binding Protein A and Transferrin Binding Protein B>>. *Microb. Pathol.* 24: 75-87 (1998)
- Fuller, T.E.; Thacker, B.J.; Duran, C.O. & Mulks, M.H. <<A Genetically-Defined Riboflavin Auxotroph of *Actinobacillus pleuropneumoniae* as a Live Attenuated Vaccine>>. *Vaccine.* 18: 2867-2877 (2000)
- Furesz, S.E.; Mallard, B.A.; Bossé, J.T.; Rosendal, B.N.; Wilkie & MacInnes, J.I. <<Antibody and Cell-Mediated Immune Responses of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Infected and Bacterin Vaccinated Pigs>>. *Infect. Immun.* 65:(2) 358-365 (1997)
- Gerlach, G.; Anderson, C.; Potter, A.A.; Klashinsky, S. & Willson, P.J. << Cloning and Expression of a Transferrin-Binding Protein form *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *Infect. Immun.* 60:(3) 892-898 (1992)
- Gerlach, G-F. ; Anderson, C.; Klashinsky, S.; Rossi-Campos, A; Potter, A.A. & Willson, P.J. <<Molecular Characterization of a Protective Outer Membrane Lipoprotein (OmlA) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype I>>. *Infect. Immun.* 61: 565 (1993)
- Goethe, R.; Flores, O.; Lindner, T. & Gerlach, G.-F. A. <<Novel Strategy for Protective *Actinobacillus pleuropneumoniae* Subunit Vaccines: Detergent Extraction of Cultures Induced by Iron Restriction>>. *Vaccine.* 19: 966-975 (2001)
- González, G.C.; Caamano, D.L. & Schryvers, A.B. <<Identification and Characterization of a Porcine-Specific Transferrin Receptor in *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *Mol. Microbiol.* 4:(7) 1173-1179 (1990)
- González, G. C.; Yu, R. H.; Rosteck, P. R. Jr. & Scryvers, A. B. <<Sequence, Genetic Analysis, and Expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Transferrin Receptor genes>>. *Microbiol.* 141:(10) 2405-2416 (1995)
- Gottschalk, M.; De Lasalle, F.; Rodocovici, S. & Dubreuil, J. D. <<Evaluation of Long Chain Lipopolysaccharides (LC-LPS) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 for the Serodiagnosis of Swine Pleuropneumonia>>. *Vet. Microbiol.* 38: 315-327 (1994)
- Gottschalk, M.; Altman, E.; Charland, N.; De Lasalle, F. & Dubreuil, J. D. <<Evaluation of Saline Boiled Polysaccharides and Long-Chain Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1 as Antigen for the Serodiagnosis of Swine Pleuropneumonia>>. *Vet. Microbiol.* 42: 91-104 (1994)b
- Gottschalk, M.; Altman, E.; Lacoutre, S.; De Lasalle, F. & Dubreuil, J. D. <<Serodiagnosis of Swine Pleuropneumonia due to *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotypes 7 and 4 Using Long-chain Lipopolysaccharides>>. *Can. J. Vet. Res.* 61:(1) 62-65 (1997)
- Gram, T.; Ahrens, P. & Nielsen, J.P. <<Evaluation of a PCR for Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Mixed Bacterial Cultures from Tonsils>>. *Vet. Microbiol.* 51: 95-104 (1996)
- Gram, T. & Ahrens, P. <<Improved Diagnostic PCR Assay for *Actinobacillus pleuropneumoniae* Based on the Nucleotide Sequence of an Outer Membrane Lipoprotein>>. *J. Clin. Microbiol.* 36:(2) 443-448 (1998)
- Gram, T.; Ahrens, P.; Andreassen, M. & Nielsen, J.P. <<An *Actinobacillus pleuropneumoniae* PCR Typing System Based on the *apx* and *omlA* Genes Evaluation of Isolates from Lungs and Tonsils of Pigs>> *Vet. Microbiol.* 75: 43-57 (2000)

- Gray-Owen, S.D.; Loosmore, S. & Schryvers, A.B. <<Identification and Characterization of Genes Encoding the Human Transferrin-Binding Proteins from *Haemophilus influenzae*>>. *Infect Immun.* 63:(4) 1201-1210 (1995)
- Gutiérrez, C. B.; Tascon, R. I.; Vázquez, J. A. & Rodríguez-Ferri, E. F. <<Cross-reactivity between *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotypes Comparing different Antigens and Serological tests>>. *Res. Vet. Sci.* 50: 308-310 (1991)
- Gutiérrez, C.B.; Piriz, S.; Vadillo, S. & Rodríguez-Ferri, E.F. <<In vitro Susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Stains to 49 Antimicrobial Agents>>. *Am. J. Vet. Res.* 54: 546 (1993)a
- Gutiérrez, C.B.; Rodríguez-barbosa, J.I.; Suárez, J.; Tascón, R.I. & Rodríguez-Ferri, E.F. <<Evaluation of an Immunoperoxidase Technique using an only Biotin-Labeled Antibody for the Demonstration of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Tissue Sections>>. *J. Vet. Med.* B40: 81-88 (1993)b
- Gutiérrez, C.B.; Suárez, J.; González, O.R. & Rodríguez Ferri, E.F. <<Epidemiología y Formas Clínicas>>. *Porci.* 37: 47-59 (1997)
- Hall, W.; Molitor, T.W.; Joo, H.S. & Pijoan, C. <<Comparison of Protective Immunity and Inflammatory Response of Pigs following Immunization with different *Actinobacillus pleuropneumoniae* Preparations with and without Adjuvants>>. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 22:(2) 175-186 (1989)
- Han, K.G.; Lee, S.S. & Kang, C. <<Soluble Expression of Cloned Phage K11 RNA Polymerase Gene in *Escherichia coli* at low Temperature>>. *Prot. Expr. Purif.* 16:(1) 103-108 (1999)
- Hensel, A.; Pabst, R.; Bunka, S. & Petzold, K. <<Oral and Aerosol Immunization with Viable or Inactivated *Actinobacillus pleuropneumoniae* Bacteria: Antibody Response to Capsular Polysaccharides in Bronchoalveolar Lavage Fluids (BALF) and Sera of Pigs>>. *Clin. Exp. Immunol.* 86: 91-97 (1994)
- Hensel, A.; Huter, V.; Katinger, A.; Raza, P.; Strnistschie, C.; Roesler, U.; Brans, E. & Lubitz, W. <<Intramuscular Immunization with Genetically Inactivated (Ghosts) *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 9 Protects Pigs against Homologous Aerosol Challenge and Prevents Carrier State>>. *Vaccine.* 18: 2945-2955 (2000)
- Higgs, P.I.; Myers, P.S. & Postle, K. <<Interactions in the TonB-Dependent Energy Transduction Complex: ExbB and ExbD from Homomultimers>>. *J. Bacteriol.* 180:(22) 6031-6038 (1998)
- Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Stanley, J.T. & Williams, S.T. <<Genus *Actinobacillus*>>. En *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th Ed. *Williams and Wilkins*, Baltimore: 194-195 (1994)
- Ike, K.; Kurotaki, T. & Kume, K. <<Studies on Immunogenicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Apx-Toxins>>. *Proc. 14th IPVS Congress.* (1996)
- Ingham, A.; Zhang, Y. & Prideaux, C. <<Attenuation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by Inactivation of *aroQ*>>. *Vet. Microbiol.* (84): 263-273 (2002)
- Inzana, T. J. <<Simplified Procedure for preparation of Sensitized Latex Particles to Detect Capsular Polysaccharides: Application to Typing and Diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *J. Clin. Microbiol.* 33(9): 2297-2303 (1995)
- Inzana, T.J.; Ma, J.; Workman, R.P. & Gogolewski, P. <<Virulence Properties and Protective Efficacy of the Capsular Polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* Serotype 5>>. *Infect. Immun.* 56: 1880-1889 (1988)
- Inzana, T.J.; Todd, J.M. & Veit, H. <<Isolation, Characterization, and Evaluation of Virulence and Immunoprotective Properties of Temperature-Sensitive Mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *Immun. Infect. Dis.* 3: 17-22. (1993)a

- Inzana, T.J.; Todd, J.M. & Veit, H. <<Safety, Stability and Efficacy of noncapsulated Mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for Use in Live Vaccines>>. *Infect. Immun.* 61(5): 1682-1686 (1993)b
- Ito, H.; Uchida, I.; Sekizaki, T.; Ooishi, E.; Kawai, T.; Okabe, T.; Taneno, A. & Terakado, N. <<Molecular Cloning of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* Outer Membrane Lipoprotein (Oml A) from Serotype 5a>>. *Microb. Pathog.* 18: 29-36 (1995)
- Izard, J.W. & Kendall, D.A. <<Signal Peptides: Exquisitely Designed Transport Promoters>>. *Mol. Microbiol.* 13: 765-773 (1994)
- Jacobsen, M.J. & Nielsen, J.P. <<Development and Evaluation of a Selective and Indicative Medium for Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from Tonsils>>. *Vet. Microbiol.* 47: 191-197 (1995)
- Jacques, M.; Rioux, S.; Paradis, S.E.; Begin, C. & Gottschalk, M. <<Identification of two Core Types in Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Representing Serotypes 1 to 12>>. *Can. J. Microbiol.* 42: 855 (1996)
- Jacques, M. <<Surface Polysaccharides and Iron Uptake Systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *Int. Pasteurellaceae Soc. Conference. Speaker Abstracts S7* (2002)
- Jansen, R.; Briaire, J.; Kamp, E.M.; Gielkens, A.L.J. and Smits, M.A. <<Cloning and Characterization of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* -RTX Toxin III (Apx III) Gene>>. *Infect. Immun.* 61(3): 947-954 (1993)
- Jansen, R. <<The RTX Toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. PhD>>. Thesis. Utrecht, The Netherlands (1994)a
- Jansen, R.; Briaire, J.; van Geel, A.B.M.; Kamp, E.M.; Gielkens, A.L.J. & Smits, M.A. <<Genetic Map of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-Toxin (Apx) Operons: Characterization of the ApxIII Operons>>. *Infect. Immun.* 62:(10) 4411-4418 (1994)b
- Jansen, R.; Briaire, J.; Kamp, E.M.; Gielkens, A.L.J. & Smits, M.A. <<The CAMP Effect of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is Caused by Apx Toxins>>. *FEMS Microb. Lett.* 126:(2) 139-143 (1995)a
- Jansen, R.; Briaire, J.; Smith, H.E.; Dom, P.; Haesebrouck, F.; Kamp, E.M.; Gielkens, A.L.J. & Smits, M.A. <<Knockout Mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1 that Are Devoid of RTX Toxins Do Not Activate or Kill Porcine Neutrophils>>. *Infect. Immun.* 63:(1) 27-37 (1995)b
- Jensen, A.E. & Bertram, T.A. <<Morphological and Biochemical Comparison of Virulent and Avirulent Isolates of *Haemophilus pleuropneumoniae* Serotype 5>>. *Infect. and Immun.* 51:(2) 419-424 (1986)
- Jessing, S.; Inzana, T. & Angen. O. <<Evaluation of a Multiplex PCR Test for Differentiation between Serotypes 2, 5 and 6 of *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *Int. Past. Soc. Congress.* (2002)
- Kamp, E.M.; Pompa, J.K.; Anakotta, J. & Smits, M.A. <<Identification of Haemolytic and Cytotoxic Proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by Using Monoclonal Antibodies>>. *Infect. Immun.* 59: 3079-3085 (1991)
- Kamp, E.M.; Vermeulen, T.M.M.; Cruysen, T.; van Dijk, J.E., Riepema, K.; Smits, M.A. & van Leeuwen, J.M. <<*Actinobacillus pleuropneumoniae* Cytolysins: Cross Protective Effect of a Crude Cytolysin Vaccine>>. *Int. Pig. Vet. Con.* 209 (1992)
- Kamp, E.M.; Vermeulen, T.M.M.; Smits, M.A. & Haagsma, J. <<Production of Apx Toxins by Field Strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*>>. *Infect. Immun.* 62:(9) 4063-4065 (1994)
- Karhoff, R.R.; Scryvers, A.B. & Schweizer, H.P. <<Cloning and Sequence Analysis of the *fur* Gene Encoding an Iron-Regulatory Protein on *Neisseria meningitidis*>> *Gene* 141: 139-140 (1994)

- Kielstein, P.; Wuthe, H.H.; Angen, O.; Mutters, R. & Ahrens, P. <<Phenotypic and Genetic Characterization of NAD-Dependent *Pasteurellaceae* from the Respiratory Tract of Pigs and their Possible Pathogenetic Importance>>. *Vet. Microbiol.* 81: 243-255 (2001)
- Klausen, J.; Andresen, L. O.; Barfod, K. & Sorensen, V. <<Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 6 in Pig Serum>>. *Vet. Microbiol.* 79: 11-18 (2001)
- Komal, J. P. S. & Mittal, K. R. <<Grouping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of Serotypes 1 through 12 on the basis of their Virulence in Mice>>. *Vet. Microbiol.* 25: 229-240 (1990)
- Koronakis, V.; Cross, M.; Senior, B.; Koronakis, E. & Hughes, C. <<'The Secreted Hemolysins of *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, and *Morganella morganii* Are Genetically Related to each other and to the Alpha-Hemolysin of *Escherichia coli*>>. *J. Bacteriol.* 169(4): 1509-15 (1987)
- Laemmli, U.K. <<Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of Head of Bacteriophage T4>>. *Nature.* 227: 680-685 (1970)
- Lalonde, G.; McDonald, T.V.; Gardner, P. & O'Hanley, P.O. <<Identification of a Hemolysin from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and Characterization of its Channel Properties in Planal Phospholipid Bilayers>>. *J.Biol. Chem.* 264:(23) 13559-13564 (1989)
- Leiner, G.; Franz, B.; Strutzberg, K. & Gerlach, G.F. <<A Novel Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using the Recombinant *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxII Antigen for Diagnosis of Pleuropneumonia in Pig Herds>>. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6:(4) 630-632 (1999)
- Lesinski, G.B. & Westerink, M.A. <<Novel Vaccine Strategies to T-Independent Antigens>> *J. Microbiol. Methods.* 47:(2) 135-49 (2001)
- Litt, D.L.; Palmer, H.M. & Borriello, S.P. <<*Neisseria meningitidis* Expressing Transferrin Binding Proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Can Utilize Porcine Transferrin for Growth>>. *Infect. Immun.* 68:(2) 550-557 (2000)
- Lo, T.M.; Ward, C.K. & Inzana, T.J. <<Detection and Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 5 by Multiplex PCR>>. *J. Clin. Microbiol.* 36:(6) 1704-1710 (1998)
- Loftager, M.K. & Eriksen, L. <<Protective Immunity Following Immunisation of Pigs with Aerosol of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 2>>. *Res. Vet. Sci.* 55: 281-286 (1993)
- MacDonald, J. & Rycroft, A.N. <<*Actinobacillus pleuropneumoniae* Haemolysin II is Secreted from *Escherichia coli* by *A. pleuropneumoniae* Pleurotoxin Secretion Gene Products>>. *FEMS Microbiol. Lett.* 109: 317-322 (1993)
- MacInnes, J.I. & Rosendal, S. <<Analysis of Major Antigens of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* and Related Organisms>>. *Infect. Immun.* 55: 1626-1634 (1987)
- Madsen, L.W.; Boye, M.; Jensen, T.K. & Svensmark, B. <<*Actinobacillus pleuropneumoniae* Demonstrated *in situ* in Exudative Meningitis and Nephritis>>. *Vet. Rec.* 149:(24) 746-747 (2001)
- Maes, D.; Chiers, K.; Haesebruck, F.; Laevens, H.; Verdonck, M. & de Kruif, A. <<Herd Factors Associated with the Seroprevalences of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serovars 2, 3 and 9 in Slaughter Pigs from Farrow-to-finish Pig Herds>> *Vet. Res.* 32:(5) 409-419 (2001)
- Medrano, A.; Querol, E. & Daban, M. <<Cloning and Sequencing of the Gene Encoding the Outer-Membrane Protein Tbp1 from *Actinobacillus pleuropneumoniae* Expression of Tbp1 and Tbp2>>. *Bebring. Inst. Mitt.* 98: 410-423 (1997)

- Mittal, K.R.; Higgins, R. & Lariviere, S. <<An Evaluation of Agglutination and Coagglutination Techniques for Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* Isolates>>. *Am. J. Vet. Res.* 48:(2) 219-226 (1987)
- Molina, M.A.; Marino, C.; Oliva, B; Aviles, F.X. & Querol, E. <<C-Tail Valine is a Key Residue for Stabilization of Complex between Potato Inhibitor and Carboxypeptidase A>>. *J. Biol. Chem.* 269:(34) 21467-21472 (1994)
- Moller, K & Killian, M. <<V Factor Dependent Members of the Family *Pasteurellaceae* in the Porcine Upper Respiratory Tract>>. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2711-2716 (1990)
- Montaraz, J.A.; Rosales, M.E.; Bautista, E.; Barcenas, G. & Lara, V. <<A Novel Experimental Model for the Study and Evaluation of Experimental Vaccines to *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *Vet. Immun. Immunopathol.* 41: 375-380 (1994)
- Morino, S.; Teraoka, Y.; Doi, M.; Ishida, T.; Ueda, H. & Uesugi, S. <<Soluble Expresión of a Synthetic Gene for Human Translation Initiation Factor 4E in *Escherichia coli*>>. *Biol. Pharm. Bull.* 18:(2) 372-376 (1995)
- Musser, J.M.; Rapp, V.J. & Selander, R.K. <<Clonal Diversity in *Haemophilus pleuropneumoniae*>>. *Infect. and Immun.* 55: 1207-1215 (1987)
- Naval, J; Piñol, J.; Rebordosa, X.; Serra-Hartmann, X; Perez-Pons, J.A. & Querol, E. <<Expresión in *Escherichia coli* and Purification of Soluble forms of the F Protein of Bovine Respiratory Syncytial Virus>>. *Prot. Expr. Purif.* 9:(2) 298-294 (1997)
- Negrete-Abascal, E.; Tenorio, V.R.; Serrano, J.J.; García, C. & de la Garza, M. <<Secreted Proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1 Degraded Porcine Gelatin, Hemoglobin and Immunoglobulin>>. *A. Can. J. Vet. Res.* 58: 83-86 (1994)
- Negrete-Abascal, E.; García, R.M.; Reyes, M.E.; Godínez & de la Garza, M. <<Membrane Vesicles Released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* Contain Proteases and Apx Toxins>>. *FEMS Microbiol. Lett.* 191: 109-113 (2000)
- Negrete-Abascal, E.; Reyes, M.E.; García, R.M.; Vaca, P.; Girón, P.A.; Andrade, O. & de la Garza, M. <<Flagella and Motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*>> *Int. Pasteurellaceae Soc. Conference.* Poster Abstracts 37 (2002)
- Nicolet, J. <<*Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. En: Leman, A.D.; Straw, B.; Mengeling, W.L.; D'Allaire, S. & Tayllor, D.J. (Eds.) *Diseases of Swine.* Ames, Iowa State University Press, pp. 401-408 (1992)
- Nicolet, J.; Paroz, Ph.; Krawinkler, M. & Baumgartner, A. <<An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, using and EDTA-Extracted Antigen for the serology of *Haemophilus pleuropneumoniae*>>. *Am. J. Vet. Res.* 42:(12) 2139-2142 (1981)
- Nielsen, R.; Van den Bosch, J. F.; Plambeck, T.; Sorensen, V. & Nielsen, J. P. <<Evaluation of an indirect enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for detection of antibodies to the Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *Vet. Microbiol.* 71: 81-87 (2000)
- Oishi, E.; Hiroya, I.; Okabe, T. & Terakodo, N. <<Passive Protection of Mice against *Actinobacillus pleuropneumoniae* Infection by Monoclonal Antibodies>>. *J. Vet. Med. Sci.* 55:(5) 711-715 (1993)
- Ostaaijen, J.; Frey, J.; Rosendal, S. & MacInnes, J.I. <<*Actinobacillus suis* Strains Isolated form Healthy and Diseased Swine Are Clonal and Carry *apxICABD*_{var. suis} Toxin Genes>>. *J. Clin. Microbiol.* 35:(5) 1131-1137 (1997)

- Oswald, W.; Konine, D.V.; Rohde, J. & Gerlach, G.F. <<First Chromosomal Restriction Map of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and Localization of Putative Virulence-Associated Genes>>. *J. Bact.* 181:(14) 4161-4169 (1999)
- Paradis, S.E.; Dubreuil, D.; Rioux, S.; Gottschalk, M. & Jaques, M. <<High-molecular Mass Lipopolysaccharides are Involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* Adherence to Porcine Respiratory Tract Cells>>. *Infect. Immun.* 62: 3311-3319 (1994)
- Pohl, S.; Bertschinger, H. U.; Frederiksen, W. & Manhein, W. <<Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like Organism Causing Porcine Necrotic Pleuropneumonia to the Genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. Nov) on the basis of Phenotypic and Deoxyribonucleic Acid Relatedness>>. *Inst. J. Syst. Bacteriol.* 33: 512-514 (1983)
- Prideaux, C.T.; Lenghaus, C.; Krywult, J. & Hodgson, A.L.M. <<Vaccination and Protection of Pigs against Pleuropneumonia with a Vaccine Strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Produced by Site-Specific Mutagenesis of the ApxII Operon>>. *Infect. Immun.* 67:(4) 1962-1966 (1999)
- Quinn, P.J.; Carter, M.E.; Markley, M.E. & Carter, G.R. <<Clinical Veterinary Microbiology>>. *Ed. Mosby-Yer Book Ltd.* p.253 (1994)
- Radocovici, S.; Lallier, R.; Lariviere, S. & Dubreuil, J. D. <<Biochemical Characterization of an Antigenic Saline Extract of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 5 and Identification of a Serotype-Specific Antigen for ELISA Serodiagnosis>>. *Vet. Microbiol.* 30: 369-385 (1992)
- Radocovici, S.; Gottschalk, M. and Dubreuil, J. D. <<Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* (serotype 1): a Readily Obtainable Antigen for ELISA Serodiagnosis of Pig Pleuropneumonia>>. *Vet. Microbiol.* 39: 219-230 (1994)
- Rapp, V.J.; Munson Jr. , R.S. & Ross, R.F. <<Outer Membrane Protein Profiles of *Haemophilus pleuropneumoniae*>>. *Infect. Immun.* 25: 414-420 (1986)
- Reimer, D.; Frey, J.; Jansen, R.; Veit, H.P. & Inzana, T.J. <<Molecular Investigation of the Role of ApxI and ApxII in the Virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 5a>>. *Microb. Pathog.* 18: 197-209 (1995)
- Riox, S.; Girard, C.; Dubreuil, J. D. & Jacques, M. <<Evaluation of the Protective Efficacy of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1 Deoxygenated Lipopolysaccharides or O-polysaccharide-protein Conjugate in Pigs>>. *Res. Vet. Sci.* 65: 165-167 (1998)
- Rodríguez-Ferri, E.F. <<Caracterización y Prevalencia de Cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en España>>. *Anaporc.* 219: 5-51 (2002)
- Rodríguez Barbosa, J. I.; Gutiérrez Martín, C. B.; Tascon, R. I.; González, O. R.; Mittal, K. R. & Rodríguez-Ferri, E. F. <<Characterization of Monoclonal Antibodies that Recognize common Epitopes Located on O Antigen of Lipopolysaccharide of Serotype 1, 9 and 11 of *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 16:(3-4) 173-181 (1996)
- Rosendal, S. & Boyd, D.A. <<*Haemophilus pleuropneumoniae* Serotyping>>. *J. Clin. Microbiol.* 16:(5) 840-843 (1982)
- Rosendal, S. & MacInnes, J.I. <<Characterization of an Attenuated Strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Serotype 1>>.. *Am. J Vet. Res.* 51:(5) 711-717(1990)
- Rossi-Campos, A.; Anderson, C.; Gerlach, G.F.; Klashinsky, S.; Potter, A.A. & Willson, P.J. <<Immunization of Pigs against *Actinobacillus pleuropneumoniae* with two Recombinant Protein Preparations>>. *Vaccine.* 10:(8) 512-518 (1992)

- Sambrook, J. & Russel, D.W. <<Molecular Cloning, a Laboratory Manual>>. 3rd Ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, N.Y. (2001)
- San Gil, F.; Turner, B.; Walker, M.J.; Djordjevic & Chin, J.C. <<Contribution of Adjuvant to Adaptive Immune Response in Mice against *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *Microbiol.* 145: 2595-2603 (1999)
- Savoie, C.; Lobert, J.L.; Berthelot-Hérault, F.; Keribin, A.M.; Cariolet, R.; Morvan, H.; Madec, F. & Kobisch, M. <<A PCR Assay Used to Study Aerosol Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from Samples of Live Pigs under Experimental Conditions>>. *Vet. Microbiol.* 73: 337-347 (2000)
- Schaller, A.; Kuhn, R.; Kuhnert, P.; Nicolet, J.; Anderson, T.J.; MacInnes, J.I.; Segers, R.P.A.M. & Frey, J. <<Characterization of *apxIVA*, a new RTX Determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *Microbiol.* 145: 2105-2116 (1999)
- Schaller, A.; Kuhnert, P.; Puente-Redondo, V.A.; Nicolet, J. & Frey, J. <<Apx Toxins in *Pasteurellaceae* Species from Animals>>. *Vet. Microbiol.* 74: 365-376 (2000)
- Schaller, A.; Djordjevic, S.P.; Eamens, G.J.; Forbes, W.A.; Kuhn, R.; Kuhnert, P.; Gottschalk, M.; Nicolet, J. & Frey, J. <<Identification and Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR Based on the Gene *apxIVA*>>. *Vet. Microbiol.* 79: 47-62 (2001)
- Schryvers, A.B. & Morris, L.J. <<Identification and Characterization of the Transferrin Receptor from *Neisseria meningitidis*>>. *Mol. Microbiol.* 2:(2) 281-288 (1988)
- Smits, M.A.; Briaire, J.; Jansen, R.; Smith, H.E.; Kamp, E.M. & Gielkens, A.L.J. <<Cytolins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 9>>. *Infect. Immun.* 59:(12) 4497-4504 (1991)
- Smits, M.; Kamp, E.; Briaire, J.; Jansen, R.; Van Leengoed, L. & van Dijk, J. <<Induction of Pneumonic Lesions by Recombinant Cytolins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *Proceedings IPVS* (1992)
- Soltes, G.A. & MacInnes, J.I. <<Regulation of Gene Expression by the HlyX Protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *Microbiol.* 140: 839-845 (1994)
- Stenbaek, E. I. & Schirmer, A. L. <<Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 2 Antibodies in Pig Sera by an Inhibition Enzyme Immuno Assay (EIA)>>. *Vet. Microbiol.* 39: 231-244 (1994)
- Stine, D.L.; Fedorka-Cray, P.J.; Huether, M.J.; Gentry, M.J. & Anderson, G.A. <<Comparison of Serum Responses in Swine after Vaccination and Challenge Exposure with *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1>>. *Am. J. Vet. Res.* 55:(9) 1238-1243 (1994)
- Stockhofe-Zurwieden, N.; Kamp, E.; van Leengoed, L. & Smits M. <<Pathogenicity of RTX Mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Results of *In Vivo* Studies>>. *Proc. 14th IPVS Congress* (1996)
- Strathdee, C.A. & Lo, R.Y.C. <<Cloning, Nucleotide Sequence, and Characterization of Genes Encoding the Secretion Function of the *Pasteurella haemolytica* Determinant>>. *J. Bacteriol.* 171:(2) 916-928 (1989)
- Straw, B.E.; Shin, S.; Callihan, D. & Petersen, M. <<Antibody Production and Tissue Irritation in Swine Vaccinated with *Actinobacillus* Bacterins containing various Adjuvants>>. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196:(4) 600-604 (1990)
- Straw, B.E.; Tuovinen, V.K. & Bigras-Poulin, M. <<Estimation of the Cost of Pneumonia in Swine Herds>>. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 195:(12) 1702-6 (1989)
- Struyve, M; Moons, M. & Tommassen, J. <<Carboxy-Terminal Phenylalanine is Essential for the Correct Assembly of the Bacterial Outer Membrane Proteins>>. *J. Mol. Biol.* 218: 141-148 (1991)

- Studier, F.W.; Rosenberg, A.H.; Dunn, J.J. & Dubendorff, J.W. <<Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes>>. *Meth. Enzymol.* 185: 60-89 (1990)
- Stutzberg, K.; von Olleschick, L.; Franz, B.; Pyne, C.; Schmidt, M.A. & Gerlach, G.F. <<Mapping of Functional Regions on the Transferrin-Binding Protein (TfbA) of *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *Infect. Immun.* 63:(10) 3846-3850 (1995)
- Tascón, R.I.; Vázquez-Boland, A.; Gutiérrez-Martín, C.B.; Rodríguez-Barbosa, I. & Rodríguez-Ferri, E.F. <<The RTX Haemolysins ApxI and ApxII Are Major Virulence Factors of the Swine Pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: Evidence from Mutational Analysis>>. *Mol. Microbiol.* 14:(2) 207-216 (1994)
- Tarasuik, K.; Hogg, A. & Pejsak, Z. <<Evaluation of Hemolysin Neutralization Titers in Pigs Vaccinated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* whole Cell Subunit Vaccine>>. *Proc. 14th IPVS Congress* (1996)
- Tarigan, S.; Slocombe, R.F.; Browning, G. F. & Kimpton, W. <<Functional and Structural Changes of Porcine Alveolar Macrophages Induced by Sublytic Doses of a Heat Labile, Hemolytic, Cytotoxic Substances Produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *Am. J. Vet. Res.* 55:(11) 1548-1557 (1994)
- Thwaites, R.N. & Solomon, K. <<Immunogenicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Outer Membrane Proteins and Enhancement of Phagocytosis by Antibodies to the Proteins>>. *Infect. Immun.* 59:(2) 544-549 (1991)
- Thwaites, R. N. & Soloman, K. <<Purification of Surface-Exposed Integral Outer Membrane Proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and their Role in Opsonophagocytosis>>. *Am. J. Res.* 54:(9) 1462-1470 (1993)
- Tonpitak, W.; Thiede, S.; Oswald, W.; Baltes, N. & Gerlach, G.F. <<*Actinobacillus pleuropneumoniae* Iron Transport: a Set of *exbBD* Genes Is Transcriptionally Linked to the *tbpB* Gene and Required for Utilization of Transferrin-Bound Iron>>. *Infect. Immun.* 68:(3) 1164-1170 (2000)
- Torremorell, M.; Pijoan, C.; Janni, K.; Walker, R. & Joo, H.S. <<Airbone Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Nursery Pigs>>. *Am. J. Vet. Res.* 58:(8) 828-832 (1997)
- Udeze, F-A. & Kadish, S. <<Effects of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Hemolysin on Porcine Neutrophil Function>>. *Infect. Immun.* 60:(4): 1558-1567 (1992)
- Utrera, V. & Pijoan, C. <<Fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae* Strains Insolated from Pig Respiratory Tracts>>. *Vet. Rec.* 128: 357-358 (1991)
- Van den Bosch, J.F.; Pennings, A.M.M.A.; Cuijpers, M.E.C.M.; Pubben, A.N.B.; van Vugt, F.G.A. & van der Linden, M.F.I.<<Heterologous Protection Induced by an *A.pleuropneumoniae* Subunit Vaccine>>. *Proceedings IPVS.* p.11 (1992)
- Van Leengoed, L.A.M.G. & Dickerson H.W. <<Influence of Calcium on Secretion and Activity of the Cytolysins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*>>. *Infect. Immun.* 60: 353-359 (1992)
- Vigre, H; Angen, O; Barfod, K; Lavritsen, D.T. & Sorensen, V. <<Transmisión of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Pigs under Field-like Conditions: Emphasis on Tonsillar Colonisation and Passively Acquired Colostel Antibodies>>. *Vet. Microbiol.* 89:(2-3) 151-159 (2002)
- Vonder Haar, R.A.; Legrain, M.; Kolbe, H. V. & Jacobs, E. <<Characterization of a highly Structured Domain in Tbp2 from *Neisseria meningitidis* Involved in Binding to Human Transferrin>>. *J. Bacteriol.* 176:(20) 6207-6213 (1994)

Ward, C.K. & Inzana, T.J. <<Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to Bactericidal Antibody and Complement is Mediated by Capsular Polysaccharides and Blocking Antibody Specific for Lipopolysaccharide>>. *J. Immunol.* 153:(5) 2110-2121 (1994)

Ward, C.K. & Inzana, T.J. <<Identification and Characterization of a DNA Region Involved in Export of the Capsular Polysaccharide of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5>>. *Proc. 14th Int. Pig. Vet. Soc. Con.* 187 (1996)

Ward, C. K.; Lawrence, M. L.; Veit, H. P. & Inzana, T. J. <<Cloning and Mutagenesis of a Serotype-specific DNA Region Involved in Encapsulation and Virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 5a: Concomitant Expression of Serotype 5a and 1 Capsular Polysaccharides in Recombinant *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1>>. *Infect. Immun.* 66:(7) 3326-3336 (1998)

Weinberg, E.D. <<Iron and Infection>>. *Microbiol. Rev.* 42:(1) 45-66 (1978)

Welch, R.A. <<Pore-Forming Cytolysins of Gram-Negative Bacteria>>. *Mol. Microbiol.* 5: 521-528 (1991)

Willson, P.J.; Rossi-Campos, A. & Potter, A.A. <<Tissue Reaction and Immunity in Swine Immunized with *Actinobacillus pleuropneumoniae* Vaccines>>. *Can. J. Vet. Res.* 59:(4) 299-305 (1995)

Yu, R. & Schryvers, A.B. <<Transferrin Receptors on Ruminant Pathogens Vary in their Interaction with the C-lobe and N-lobe of Ruminant Transferrins>>. *Can. J. Microbiol.* 40: 532-540 (1994)