



of bovine carriers of *Moraxella bovis* by comparative cultural examinations of ocular and nasal secretions. *Am J Vet Res.* 47:2343-2345.

▪ Punch N (1985) Plasma and tear concentrations of antibiotics administered parenterally to cattle. *Res Vet Sci.* 39:179-187.

▪ Slatter DH, Edwards ME, Hawkins CD, Wilcox GE (1982) A national survey of the occurrence of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Aust Vet J* 59: 65-68.

▪ Sosa V, Zunino P (2012) Molecular and phenotypic analysis of *Moraxella* spp. associated to infectious bovine keratoconjunctivitis. *Vet J* 193: 595-597.

▪ Sosa V, Umpiérrez A, Acquistapace S, Zunino P (2015) Virulence genes in *Moraxella* spp. isolates from Infectious Bovine Keratoconjunctivitis cases. *J Infect Dev Ctries.* Aceptado.

CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS DE MANNHEIMIA HAEMOLYTICA PARA LA FORMULACIÓN DE VACUNAS ALTAMENTE EFECTIVAS CONTRA EL SÍNDROME RESPIRATORIO BOVINO

Paula Tucci, Verónica Estevez¹, Lorena Becco¹, Florencia Cabrera, Germán Grotiuz, Mónica Marin², Eduardo Reolon³

¹ División Biotecnología de Laboratorios Celsius S.A. Avenida Italia 6201, Montevideo, Uruguay. - ² Bioquímica, Facultad de Ciencias (UDELAR). Igua 4225, Montevideo, Uruguay. - ³ Santa Elena - Virbac. Avda. Millán 4175, Montevideo, Uruguay.

Este proyecto es financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) (ALI_2_2013_1_4783) y por Santa Elena - Virbac.

RESUMEN

El complejo respiratorio bovino, es una afección importante y costosa que afecta a los sistemas de producción de bovinos de carne en Uruguay. Debido a sus causas multifactoriales ha sido difícil desarrollar estrategias eficaces para su control. Las vacunas que se comercializan actualmente para esta enfermedad en nuestro país se basan en cultivos inactivados de los principales patógenos virales y bacterianos asociados con el complejo. Se identificaron los principales componentes antigénicos de *Mannheimia haemolytica*, la principal causa bacteriana de esta patología, centrándose en Leucotoxina A, su principal factor de virulencia. Se verificó la presencia de esta toxina en sobrenadantes de cultivo de *Mannheimia haemolytica* así como otras diez proteínas por espectrometría de masas, algunas de las cuales son los principales antígenos protectores.

SUMMARY

Bovine Respiratory Disease is an important and costly disease that affects beef cattle industry in Uruguay. Effective control strategies have been difficult to develop due to its multifactorial causes. The vaccines currently marketed for this disease are based on inactivated cultures of the main viral and bacterial pathogens involved

in this disease. In order to characterize these vaccines we aimed to identify the main antigenic components of *Mannheimia haemolytica*, the leading cause of Bovine Respiratory Disease, focusing on Leukotoxin A, its main virulence factor. We verified the presence of Leukotoxin A in *Mannheimia haemolytica* culture supernatants as well as we identified, by mass spectrometry, other ten proteins, some of which are major protective antigens.

INTRODUCCIÓN

El Complejo Respiratorio Bovino (CRB) constituye una de las principales patologías que afectan al ganado bovino y causa importantes pérdidas económicas en la producción en nuestro país. Se desarrolla por la existencia de factores de predisposición (estrés, transporte, cambios en la alimentación, entre otros), que desencadenan, generalmente, una infección viral primaria. Esto facilita el establecimiento de una infección bacteriana secundaria, la que es causa de las elevadas tasas de morbi-mortalidad asociadas al CRB. *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*) es reconocida como el principal agente etiológico de esta enfermedad, causante de más de un 50% de la mortalidad asociada (1).

Al tratarse de una enfermedad multifactorial ha resultado difícil el desarrollo de estrategias de control efectivas. Para mejorar la eficacia de las

vacunas disponibles es importante lograr una caracterización exhaustiva de los componentes antigénicos y demostrar la presencia de aquellos que tienen mayor importancia en la protección.

Las vacunas respiratorias que actualmente se comercializan en el país son preparadas en base a los cultivos inactivados de los patógenos virales y bacterianos más relevantes para este síndrome. Su fórmula permite reducir el impacto de las infecciones virales y neutralizar en gran medida las infecciones bacterianas asociadas. Siendo *M. haemolytica* importante en el CRB y un antígeno clave en la formulación de estas vacunas, en este trabajo se describió la caracterización de sus principales componentes antigénicos con foco en el establecimiento de una respuesta protectora. Entre ellos, se priorizó el estudio de la leucotoxina (LKT) que es su principal factor de virulencia, así como la identificación de proteínas de membrana externa que han demostrado ser importantes en el establecimiento de la inmunidad (2).

OBJETIVOS

Caracterizar los principales componentes antigénicos de *M. haemolytica* para vacunas contra el síndrome respiratorio bovino, así como identificar y determinar la concentración de la LKT presente, para lograr una caracterización a nivel molecular que facilite la estandarización lote a lote de la producción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de *M. haemolytica*

Se llevó a cabo un estudio de la cinética de cultivo de *M. haemolytica* con el fin de evaluar el perfil proteico de secreción a lo largo del cultivo. Se realizó un cultivo de en medio TSB-BHI (Tryptic Soy Broth, Brain Heart Infusion) a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, pO_2 mayor 40%. Se tomaron muestras cada hora en las que se determinó la $\text{DO}_{600\text{nm}}$, la concentración de glucosa y el pH. Cuando el cultivo llegó a la fase estacionaria se cosechó. El cultivo final y las muestras del proceso se centrifugaron obteniéndose los sobrenadantes, los que se almacenaron a -20°C .

Análisis por Western blot

Para el análisis por Western blot de los sobrenadantes de cultivo a diferentes tiempos se obtuvieron anticuerpos contra LKT en bovino y conejo empleando como inmunógeno una porción de LKT recombinante producida por nuestro grupo (3).

Análisis por espectrometría de masas

Se analizó el antígeno inactivado de *M. haemolytica* preparado según el protocolo de producción de NEUMOSAN® (Santa Elena – Virbac S.A., Uruguay). Este antígeno se procesó por centrifugación obteniéndose el sobrenadante y la fracción celular. Las muestras fueron concentradas y analizadas por SDS-PAGE, y las bandas observadas identificadas por espectrometría de masas en Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Institut Pasteur de Montevideo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cinética de cultivo de *M. haemolytica*

Se analizaron diferentes muestras de sobrenadantes de cultivo de *M. haemolytica* provenientes de una fermentación a escala piloto siguiendo el protocolo industrial de producción y se registraron los parámetros que se muestran en la figura 1. Los anticuerpos anti-LKT verificaron la presencia de la proteína en esta cinética (figura 1). Se analizó la intensidad de las bandas obtenidas y vemos que su expresión concuerda con la cinética de crecimiento del cultivo (figura 1, 2).

Tiempo de Cultivo	pH	$\text{OD}_{600\text{nm}}$	Glucosa (mg/mL)	Intensidad (LKT) (UA)
0	7,4	-	194	-
1	7,4	0,052	205	-
2	7,3	0,303	209	4.106
3	7,1	0,812	183	71.255
4	7,0	1,085	131	96.062
5	6,9	1,470	81	124.801
6	6,7	1,688	38	134.172
7	6,6	1,766	-	-
8	6,6	1,892	-	126.465
9	6,5	1,899	-	-
10	6,5	1,772	-	136.326

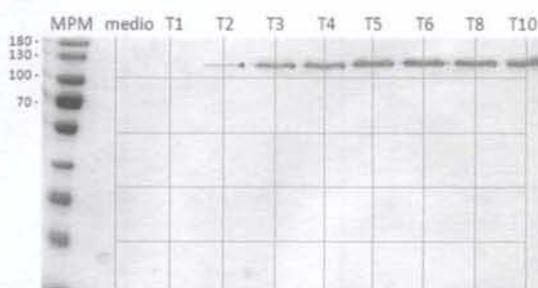


Figura 1. Cinética de cultivo de *Mannhaemia haemolytica*. Western blot anti-LKT de muestras de sobrenadantes de cultivo de *M. haemolytica* a diferentes tiempos

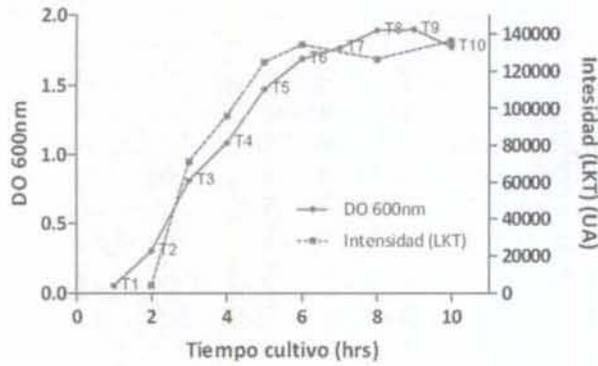


Figura 2. Curva de crecimiento del cultivo de *M. haemolytica*. Se grafica la densidad óptica a 600nm (DO) y la Intensidad de la banda de LKT en unidades arbitrarias (UA) en relación al tiempo del cultivo en horas.

Espectrometría de masas

Se utilizó esta tecnología para identificar, a partir del análisis de las bandas principales presentes en geles de SDS-PAGE, los componentes antigénicos relevantes presentes en el antígeno inactivado de *M. haemolytica* (figura 3).

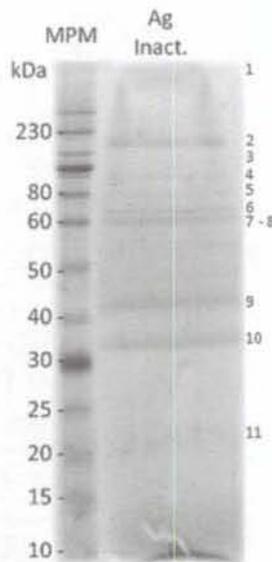
La aproximación empleada permitió identificar de forma significativa 11 proteínas de *M. haemolytica* presentes en la preparación del antígeno de la vacuna NEUMOSAN® (Santa Elena - Virbac S.A., Uruguay). Entre ellas se identificó la LKT A y varias proteínas de membrana relevantes.

CONCLUSIONES

Se verificó la presencia de LKT A en los sobrenadantes de cultivo de la cepa de *M. haemolytica*. Se confirmó que la producción de esta proteína está ligada a la fase de crecimiento exponencial.

Mediante espectrometría de masas pudimos identificar 11 proteínas de *M. haemolytica* presentes en el antígeno, varias de las cuales son proteínas de membrana que son importantes para complementar la protección contra este patógeno. En suma, el análisis muestra que la vacuna contiene los componentes esenciales para la protección contra *M. haemolytica*.

Figura 3. SDS-PAGE del antígeno. Se numeran las bandas correspondientes a las proteínas identificadas por espectrometría de masas en Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Institut Pasteur de Montevideo.



	Componentes Antigénicos identificados por MS/MS	P.M. (real)
1	Leukotoxin A	102,1 KDa
2	Serotype-specific antigen 1 (Ssa1) de <i>Mannheimia haemolytica</i>	103,6 KDa
3	Formate C-acetyltransferase de <i>Mannheimia haemolytica</i>	86,7 KDa
4	2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase /3'-nucleotidase CpdB de <i>Mannheimia haemolytica</i>	72,8 KDa
5	Oligopeptide ABC superfamily ATP binding cassette transporter, binding protein de <i>Mannheimia haemolytica</i>	58,7 KDa
6	Extracellular solute-binding protein family S de <i>Mannheimia haemolytica</i>	58,0 KDa
7	Heme-binding protein A de <i>Mannheimia haemolytica</i>	59,6 KDa
8	Iron (Fe3+)ABC superfamily ATP binding cassette transporter, binding protein YfeA de <i>Mannheimia haemolytica</i>	32,0KDa
9	TRAP transporter solute receptor de <i>Mannheimia haemolytica</i>	34,5 KDa
10	Putative amino-acid ABC transport system substrate binding protein de <i>Mannheimia haemolytica</i>	28,0 KDa
11	Outer membrane protein P6 de <i>Mannheimia haemolytica</i>	16,8KDa

BIBLIOGRAFÍA

- Narayanan SK, Nagaraja TG, Chengappa MM, Stewart GC. Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet Microbiol.* (2002) 84 (4):337-56.
- Confer AW, Ayalew S, Montelongo M, Step DL, Wray JH, Hansen RD, Panciera RJ. Immunity of cattle following vaccination with a *Mannheimia haemolytica* chimeric PlpE-LKT (SAC89) pro-

tein. *Vaccine* (2009) 27:1771-1776.

- Becco L, Cabrera F, Grotiuz G, Reolon R, Tucci P, Marin M. Estudio de componentes antigénicos de *Mannheimia haemolytica* para la mejora de vacunas contra el síndrome respiratorio bovino (Poster). XV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias, Piriápolis, 2014.