

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**“OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS
POLICLONALES QUE IDENTIFIQUEN
A LA PROTEÍNA Lkta DE
Mannheimia haemolytica”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA

CELIA GONZÁLEZ CASTILLO

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, a 20 de abril de 2010

BIBLIOTECA CUCBA

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Tecnología Biológica de México S.A. de C.V. y en el Laboratorio de Desarrollo y Regeneración Neural del Instituto de Neurobiología del Departamento de Biología Celular y Molecular del CUCBA, bajo la Dirección del Dr. Daniel Ortuño Sahagún y con la asesoría de la Dra. Beatriz Flores Samaniego y de la Q.B. Carolina Guzmán Brambila. La realización de este trabajo estuvo subsidiada por el proyecto del CONACyT con clave ECO-2007-C01-71496



BIBLIOTECA



CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

No de adquisición: 058539

Fecha: 31-Agosto-2010

Procedencia: Donación Tesis

No. de código de barras: BAC-058539

N.S. 342435

B1061
EJ 2



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias

Coordinación de carrera de Licenciado en Biología

C. Celia González Castillo

PRESENTE

Manifetamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **TESIS E INFORMES** opción **TESIS** con el título: **“OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES QUE IDENTIFIQUEN A LA PROTEÍNA Lkta DE *Mannheimia haemolytica*.”** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo al **Dr. Daniel Ortuño Sahagún** y como asesores a la **Dra. Beatriz Flores Samaniego** y al **QB. Carolina Guzmán Brambila**.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”,
“2009, Año del Bicentenario de Charles Darwin”
Las Aguas, Zapopan, Jal., 9 de octubre de 2009.

COMITE DE
TITULACION




DRA. GEORGINA ADRIANA QUIROZ ROCHA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

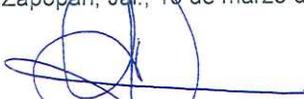

BIOL. MARGARITO MORA NÚÑEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Georgina Guzmán Quiroz.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad **Tesis e informes**, opción **tesis** con el título: "**OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES QUE IDENTIFIQUEN A LA PROTEÍNA LktA DE *Mannheimia haemolytica***" que realizó la pasante C. **CELIA GONZÁLEZ CASTILLO** con número de código **E04116216** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

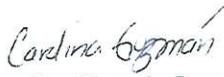
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Las Aguas, Zapopan, Jal., 10 de marzo del 2010



Dr. Daniel Ortúño Sahagún
 Director del trabajo


 Dra. Beatriz Flores Samaniego
 Asesora


 QB. Carolina Guzmán Brambila
 Asesora

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Jorge Peregrina Sandoval		19/03/10
Dr. Edgardo Flores Torales		19/03/10
M en C. Dolores Barragán Reynaga		19/03/10
Supl. Dr. Arturo Orozco Barocio		19/03/10

COMITE DE
 TITULACION



A mi familia por apoyarme
incondicionalmente en todo momento con
mucho cariño, esfuerzo y amor.

Contenido

Agradecimientos.....	vii
Resumen	ix
Abreviaturas	xi
Introducción	1
Complejo respiratorio bovino o “fiebre de embarque”	1
Antecedentes.....	3
Leucotoxina	3
Vacunas	4
Expresión heteróloga de la proteína LktA de <i>Mannheimia haemolytica</i>	6
Planteamiento del problema.....	7
Justificación.....	9
Hipótesis.....	11
Objetivos	13
Objetivo general.....	13
Objetivos particulares	13
Diseño experimental.....	15

Materiales y métodos.....	17
Inducción de la expresión de la proteína de fusión LktA con IPTG.....	17
Purificación de proteínas de fusión para la generación de anticuerpos	18
Cuantificación de proteínas por el método de Lowry	19
Electroforesis en geles desnaturizantes de acrilamida (SDS-PAGE).....	19
Formulación de antígeno.....	19
Inducción de anticuerpos específicos en conejos Nueva Zelanda.....	20
Identificación de anticuerpos por la técnica de <i>western blot</i>	21
Comparación de metodologías de revelado de <i>western blot</i>	22
Resultados	23
Inducción de la expresión de la proteína	23
Purificación de la proteína de fusión pQE-30 Xa- <i>lktA</i>	24
Elaboración del inmunógeno e inducción de anticuerpos	25
Análisis de anticuerpos a partir de sueros crudos de conejo	26
Discusión.....	31
Perspectivas	35
Conclusiones.....	37
Referencias	39
Índice de figuras	45

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por brindarme todo el apoyo y la confianza para realizarme profesionalmente.

Al Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Tecnología Biológica de México S.A. de C.V. por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo.

A mi director el Dr. Daniel Ortuño Sahagún, a mis asesores, la Dra. Beatriz Flores Samaniego y Q.B. Carolina Guzmán Brambila, por apoyarme en todo momento y brindarme su confianza para realizar este trabajo.

Muchas gracias por todo

Resumen

El Complejo Respiratorio Bovino (CRB) o fiebre de embarque es el término genérico para determinar la neumonía que se presenta en el transporte del ganado. Es causado por infecciones virales y bacterianas que, en combinación con factores como estrés por destete, descorne, hacinamiento y transporte, desencadenan un conjunto de síntomas característicos de esta enfermedad, la cual provoca grandes pérdidas económicas en el sector ganadero. Entre los agentes etiológicos relacionados al CRB destaca la bacteria *Mannheimia haemolytica*.

El CRB es la causa principal de morbilidad y mortalidad en los establos, por lo que su prevención y control mediante inmunización resulta importante. Actualmente se utilizan vacunas polivalentes para prevenir el CRB, sin embargo, existen reacciones sistémicas adversas al aplicar bacterinas formuladas con combinaciones de bacterias Gram (-). Por lo anterior, nos hemos planteado como meta el formular una vacuna polivalente que incluya protección contra *M. haemolytica*, en la que se hayan eliminado los factores que ocasionan las reacciones adversas. Para ello, nos apoyamos en un trabajo previo de nuestro laboratorio (Quintero-Fabián, 2009), en el cual se generó una cepa de bacterias recombinantes que expresa una de las principales proteínas antigénicas de este agente infeccioso: la leucotoxina (LktA).

En este trabajo se obtuvieron anticuerpos policlonales específicos que identifican a la proteína LktA de *M. haemolytica*, los cuales servirán para poder desarrollar posteriormente pruebas

de titulación de anticuerpos por ELISA como método diagnóstico. Por otra parte, se podrá también verificar la protección de una vacuna polivalente mediante un reto inmunológico contra *M. haemolytica*.

Abreviaturas

A	absorbancia
ABTS	2,2', ácido azino-di-etil-benzo-tizolin-sulfónico
°C	grados centígrados
CRB	complejo respiratorio bovino
D.O.	densidad óptica
ECL	(<i>Enhanced Chemiluminescence</i>) Quimioluminiscencia
h	hora
HRP	(<i>horse radish peroxidase</i>) peroxidasa de raíz de rábano
<i>ilk₁A</i>	inserto del gen <i>lktA</i>
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kDa	kilodaltons
LB	medio de cultivo bacteriano Luria-Bertani
LktA	leucotoxina (proteína)
LPS	lipopolisacáridos
rLktA	leucotoxina recombinante
M	molar
μ g	microgramo
μ L	microlitro
mA	mili amperes
min	minutos
mL	mililitro
rpm	revoluciones por minuto
SDS-PAGE	(<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>) electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes

TBST	(<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>) solución amortiguadora salina con detergente
V	volts
V/V	volumen-volumen
WB	<i>western blot</i> (detección con anticuerpos de proteínas inmovilizadas en una membrana)

Introducción

Complejo respiratorio bovino o “fiebre de embarque”

El complejo respiratorio bovino (CRB) o fiebre de embarque es el término genérico para designar a la neumonía que se presenta en el transporte del ganado o cuando se encuentran bajo condiciones de estrés (Hodgson y cols. 2005), entre los que se encuentran: factores ambientales que faciliten el desarrollo de la lesión pulmonar, mezcla de animales de diferentes edades y niveles inmunológicos, el calor o frío excesivo, la elevada humedad relativa, los transportes prolongados o bien cambios bruscos de alimentación, entre otros. Esta enfermedad también es conocida con el nombre de pasteurelosis pulmonar o pasteurelosis neumónica (Trigo, 1987).

El CRB es la enfermedad más común durante las dos semanas posteriores al destete, tiempo durante el cual los terneros enfrentan una etapa de estrés elevado, el cual tiene un efecto negativo sobre el sistema inmune y provoca que los terneros sean más susceptibles a infecciones causadas por diversos agentes.

Las bacterias directamente involucradas son *Mycoplasma bovis* y *Mannheimia haemolytica* serotipo A1, otros agentes implicados son *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus* y *Salmonella dubli*. Entre los virus que se involucran en el desarrollo del CRB, se encuentran incluidos el herpesvirus-1 bovino, el virus sincitial bovino, el virus de la diarrea bovina y el virus de la parainfluenza-3.

El principal agente patógeno involucrado en los casos agudos del CRB es la *Mannheimia haemolytica*, la cual suele presentarse como una infección secundaria, es un habitante común de la microbiota del ganado y se suele encontrar en la parte superior del tracto respiratorio del animal. Ante una situación de estrés desciende hasta los pulmones y provoca neumonía. Su diseminación se puede dar por contacto directo o por la ingestión de comida o agua contaminada (Dagmara, 2008).

Antecedentes

El principal agente patógeno del CRB es la bacteria Gram (-) *Mannheimia haemolytica*. Habitante normal de las vías respiratorias superiores del ganado, que posee la capacidad para vivir como serotipo A2 no patógeno en las vías respiratorias superiores, sin embargo, bajo situaciones de estrés, puede convertirse en el serotipo A1 patógeno (Lo y cols. 2006), por lo que constituye la principal causa de muerte en vacas y terneros. En México, la neumonía representa una de las causas más importantes de pérdidas económicas en las explotaciones de bovinos y ovinos (Trigo, 1987; Rebhun y cols. 1995).

Mannheimia haemolytica son bacilos Gram (-) anaerobios sin movimiento, que reducen nitratos y fermentan carbohidratos (Shanthalingam y Srikumaran, 2009). Clasificación taxonómica: Phylum: Protobacteria, Clase: Gammaproteobacteria. Orden: Pasteurellales, Familia: Pasteurellaceae, Género: *Mannheimia* (NCBI taxonomy browser, 2010).

Leucotoxina

Entre los posibles factores de la virulencia de *Mannheimia haemolytica* se encuentran las proteínas de membrana externa, fimbrias, glicoproteasas y neuraminidasas. Sin embargo, se ha identificado que el principal factor de su virulencia es la leucotoxina LktA (Lo y cols. 1987; Highlander y cols, 2000; Zecchinon y cols, 2005).

La LktA es una citotoxina dependiente de calcio, cuenta con 953 aminoácidos y su peso es de 102 kDa (Chang y cols, 1987). Presenta actividad específica contra los leucocitos, lipopolisacáridos (LPS), proteínas de membrana externa, proteínas reguladoras de hierro, fimbrias, enzimas, antígenos aglutinantes serotipo-específicos y adhesinas (Jaramillo-Arango y cols, 2009). Es una proteína que pertenece a una familia de exotoxinas, del grupo de las RTX (*repeats in toxin*). Son llamadas así porque cerca del extremo carboxilo terminal presenta regiones ricas en glicina altamente conservadas, las cuales se repiten dentro de la secuencia de la proteína (Kunhert y cols, 1997).

El gen estructural de la LktA de *Mannheimia haemolytica* presenta una historia evolutiva compleja y consiste en al menos ocho variantes alélicas principales con diferentes variantes cada uno de ellos (Davies y cols. 2001). La gran cantidad de polimorfismos y la estructura en mosaico del gen *lktA* refleja el alto grado de diversidad aminoacídica de la proteína (Davies y Baillie, 2003). La gran variabilidad que presenta en su secuencia puede explicar el porqué es capaz de evadir la respuesta adecuada del sistema inmune (Zecchinon y cols. 2005). Sin embargo, a pesar de esta gran variabilidad, las propiedades citotóxicas de la LktA no se ven afectadas (Davies y Baillie, 2003).

Por otra parte, debido a un inadecuado manejo de los tratamientos en su contra, *M. haemolytica* presenta cada vez más resistencia al tratamiento con antibióticos (Watts y cols, 1994), por lo que el mejor tratamiento es la prevención mediante la vacunación.

Vacunas

Las vacunas tienen como objetivo imitar el desarrollo natural de la inmunidad a través de la inoculación de antígenos. Las vacunas son utilizadas para prevenir los signos clínicos de una enferme-

dad y ayudar a controlarla. Las vacunas veterinarias comprenden sólo el 23% del mercado global de productos para la salud animal, el cual presenta un constante crecimiento gracias al empleo de nuevas tecnologías en el desarrollo de vacunas (Meeusen et al., 2007), como en el caso de las proteínas recombinantes desarrolladas en el proyecto global del cual forma parte el presente trabajo.

Existe en el mercado una amplia gama de vacunas, desafortunadamente no hay mucha información publicada en revistas arbitradas que sustenten su eficacia en estudios con desafíos controlados o en condiciones de campo (Bowland y Shewen, 2000; Jaramillo-Arango y cols. 2009).

Aparentemente, estas vacunas sólo aportan una protección parcial, incluso algunas, como las preparadas con base en células íntegras, pueden llegar a incrementar la morbilidad en el hato (Wilkie y cols, 1980).

El desarrollo de vacunas efectivas contra el CRB depende primordialmente del conocimiento detallado de los antígenos y factores de virulencia de *M. haemolytica*, necesarios para estimular una respuesta inmune (Highlander, 2001; Jaramillo-Arango y cols. 2009). En este sentido, el sobrenadante de cultivos mezclados con Lkt recombinante ha sido efectivo en ensayos con animales desafiados, lo que sugiere que la mejor opción como vacuna para el CRB sea la mezcla de Lkt asociada con antígenos de sobrenadante (Highlander, 2001).

Con la aplicación de vacunas polivalentes se considera que el manejo del ganado y el estrés del mismo disminuyen al aplicar diversos antígenos en una sola vacuna. Sin embargo, se ha documentando que existen reacciones sistémicas adversas al aplicar bacterinas formuladas con combinaciones de bacterias Gram (-), principalmente debido a la presencia de endotoxinas, que son lipopolisacáridos ácidos que constituyen la pared celular de la bacteria y que están involucrados en los procesos de virulen-

cia y tienen la propiedad de ejercer efectos fisiológicos adversos cuando son administradas al ganado, tales como edemas, shock séptico y abortos (Alving, 1993, Ellis et al., 1997, Henderson y Wilson, 1995, Cullor, 1992).

Expresión heteróloga de la proteína LktA de *Mannheimia haemolytica*

En un trabajo previo de nuestro laboratorio se reportó la expresión heteróloga de la fracción antigénica de la proteína LktA de *Mannheimia haemolytica*. Para lo cual se realizó la construcción de una proteína recombinante en *Escherichia coli* que expresa un fragmento antigénico de la LktA en el vector de expresión pQE-30 Xa (Quintero-Fabián, 2009). En el presente trabajo se expresó y purificó dicha proteína con el fin de inocular conejos Nueva Zelanda y así inducir la producción de anticuerpos policlonales que permitan identificar a la LktA por *western blot* (WB) en extractos de proteínas, además de desarrollar posteriormente pruebas de titulación de anticuerpos tipo ELISA y así verificar la protección de una vacuna polivalente mediante un reto inmunológico contra *M. haemolytica*.

Planteamiento del problema

El Complejo Respiratorio Bovino (CRB) es causado por infecciones virales y bacterianas que, en combinación con factores de estrés, desencadenan un conjunto de síntomas característicos de esta enfermedad, la cual provoca grandes pérdidas económicas en el sector ganadero.

El manejo de los animales se facilita con la aplicación de vacunas polivalentes por lo que la gran mayoría de las vacunas que existen en el mercado están diseñadas bajo este esquema. Sin embargo, se ha documentado que existen reacciones sistémicas adversas al aplicar las vacunas con combinaciones de bacterias Gram (-) debido a los LPS.

En el presente trabajo nos propusimos obtener anticuerpos policlonales que identifiquen de forma específica a la leucotoxina (LktA) de *M. haemolytica*, para poder desarrollar posteriormente pruebas de titulación de anticuerpos por ELISA para finalmente elaborar una vacuna polivalente que proteja y elimine las reacciones adversas de las vacunas ya existentes contra el CRB y verificar su protección mediante un reto inmunológico contra *M. haemolytica*.

Justificación

BIBLIOTECA CUOSA

La fiebre del embarque del ganado provoca graves pérdidas económicas en las explotaciones ganaderas y es la causa principal de morbilidad y mortalidad en los establos, por lo que su prevención y control mediante inmunización resulta importante. Por lo anterior, se trabajó en la obtención de anticuerpos policlonales que identifiquen a la proteína LktA de *Mannheimia haemolytica* y así posteriormente realizar pruebas de titulación de anticuerpos tipo ELISA, verificar la protección de una vacuna polivalente mediante un reto inmunológico contra *M. haemolytica* y poder formular una vacuna contra el CRB.

Hipótesis

Mediante la inoculación en conejos de la proteína de fusión pQE-30 Xa-*lktA* es posible la inducción de anticuerpos que identifiquen de manera específica a la proteína LktA de *Mannheimia haemolytica*.

Objetivos

Objetivo general

Obtener anticuerpos policlonales que identifiquen de forma específica a la proteína LktA de *Mannheimia haemolytica*.

Objetivos particulares

- Purificación de la proteína LktA de *Mannheimia haemolytica*.
- Generación de anticuerpos policlonales específicos contra la proteína LktA inoculada en conejos Nueva Zelanda.

Diseño experimental

Inducción de la expresión
de la proteína de fusión
LktA con IPTG

Purificación de la proteína

Cuantificación por el
método de Lowry

Formulación del antígeno
(LktA+PBS+Al(OH)₃)

Electroforesis en geles
desnaturalizantes
(SDS-PAGE)

Inducción de anticuerpos
específicos que identifiquen
la proteína LktA en conejos
Nueva Zelanda

Identificación de
la proteína con los
anticuerpos
mediante *Western Blot*

Materiales y métodos

Inducción de la expresión de la proteína de fusión LktA con IPTG

La inducción se realizó con IPTG, que es un análogo sintético de la lactosa altamente estable, el cual inactiva al represor Lac e induce la síntesis de beta-galactosidasa, una enzima que promueve la utilización de lactosa y que permite inducir la expresión de los genes clonados en el sistema del operón lac.

La inducción fue realizada de acuerdo a la metodología establecida previamente (Quintero-Fabián, 2009). Se realizó a partir de un cultivo de células transformadas con la construcción pQE-30 Xa-*lktA*. La inducción con IPTG nos permite que se sobre-exprese la proteína.

Procedimiento:

- a) Inocular 5 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) con una colonia transformante y otra control (vector vacío); incubar los cultivos por 16 h a 37°C.
- b) Inocular 50 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL), con 50µL de cada cultivo de 16 h.
- c) Incubar durante al menos 2 h a 37°C y en agitación constante, hasta que las células alcancen una D.O. ente 0.5 y 1.0 (A_{600})

- d) Agregar IPTG para una concentración final de 1 mM e incubar en agitación a 37°C a 250 rpm. Incubar durante 3 h
- e) Lisar las células. Centrifugar a 6000 rpm durante 20 min a 4°C, desechar el sobrenadante, obtener la pastilla y agregar 3 mL de PBS y SDS, resuspender suavemente y poner en ebullición durante 15 min. Centrifugar a 7000 rpm durante 15 min a 4°C y separar el sobrenadante.

Purificación de proteínas de fusión para la generación de anticuerpos

La purificación de la proteína se realizó por cromatografía a través de una columna de afinidad con ácido níquelnitrilo-triacético, QIAexpress Syst (Qiagen). Las soluciones tampón empleadas para la elución de proteínas se prepararon a partir de NaH_2PO_4 , tris-Cl y urea, a diferentes pH, según se indica a continuación.

Procedimiento:

- a) Equilibrar la columna con una solución tampón y eluir el tampón de la columna.
- b) Agregar 7.5 mL del tampón de desnaturalización (pH 8.0) y eluir. Repetir 2 veces.
- c) Agregar la muestra (proteína) en condiciones desnaturalizantes.
- d) Añadir a la columna 7.5 mL del tampón de desnaturalización (pH 8.0) y eluir.
- e) Adicionar 7.5 mL del tampón de lavado (pH 6.3) y desechar el eluido.
- f) Agregar 4 mL del tampón de elución (pH 5.9) y recolectar las fracciones en un volumen de 500 μL cada fracción.
- g) Adicionar 4 mL del tampón de elución (pH 4.5) y recolectar las fracciones en un volumen de 500 μL cada fracción.

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

El método de Lowry es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de proteínas. A la muestra se le añade un reactivo que reacciona con las proteínas produciendo un color. La intensidad del color es la resultante proporcional de la concentración de las proteínas. Con este método se cuantificó la proteína LktA purificada de la columna. La cuantificación espectrofotométrica se realizó a 625nm. de D.O.

Electroforesis en geles desnaturizantes de acrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis es una técnica que permite separar macromoléculas mediante una corriente eléctrica. Las proteínas se separan por su tamaño, esto implica conocer la relación existente entre el peso molecular de las moléculas y el de las subunidades de la proteína.

Se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en una cámara Mini-PROTEAN. Tetra cell (BIO-RAD). El gel de concentración fue al 4% y el gel de separación fue al 12%. La electroforesis se realizó a 120 V durante una hora. Al final de la misma, el gel preparativo se tiñó con azul de Coomasie, no así el gel de transferencia.

Formulación de antígeno

Para la preparación del inmunógeno se mezclaron 1/8 (v/v) de hidróxido de aluminio ($Al(OH)_3$), utilizado como adyuvante, en PBS con la proteína purificada, en una concentración de 60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se inocularon 30 μg por cada aplicación.

Inducción de anticuerpos específicos en conejos Nueva Zelanda

Para la obtención de los anticuerpos policlonales se utilizaron dos conejos Nueva Zelanda a los cuales se les extrajo sangre por punción intracardiaca, para obtener suero control preinmune. Posteriormente, se les inyectó la proteína rLkTA por vía subdérmica en la zona dorso-lateral (figura 1). Se aplicaron tres refuerzos con 30 μg de proteína por aplicación en un volumen de 500 μL de la formulación de antígeno cada vez. El primer refuerzo al día 14 después de la primera aplicación, el segundo a los 21 días y el tercer refuerzo a los 28 días después de la primera inmunización. Antes de cada refuerzo se tomó una muestra de sangre de 5 mL por punción cardiaca. Diez días después del último refuerzo se sangraron completamente los conejos para obtener el suero total final.

Para la inmunización de los conejos se debe rasurar un área de 10 cm de ancho por 15 cm de largo en la zona dorso lateral del animal y se debe inocular, por vía subdérmica, con aproximadamente 20 aplicaciones de 25 μL cada una con una separación de 1 cm entre una y otra.



Figura 1. Inmunización de conejos Nueva Zelanda con la proteína rLkTA por vía subdérmica en el dorso del tórax y abdomen.

Identificación de proteínas con anticuerpos por la técnica de *western blot*

Esta técnica es utilizada para identificar antígenos específicos mediante anticuerpos policlonales o monoclonales. Es un método en el que las proteínas son separadas en primer lugar mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida y posteriormente se transfieren, mediante la aplicación de un campo eléctrico (Thermo Scientific), del gel a una membrana de nitrocelulosa a 80 mA durante 1 h. Posteriormente, esta membrana se hibrida con los anticuerpos. Se utilizó como anticuerpo primario el suero obtenido de los sangrados de los conejos y como anticuerpo secundario se utilizó un suero comercial Goat anti-Rabbit IgG, (H+L) HRP conjugado (Millipore). Para revelar la membrana se utilizaron dos técnicas: la colorimétrica y la quimioluminiscencia (ECL), esto con la finalidad de comparar ambas y obtener mejores resultados.

Una vez realizada la transferencia de las proteínas, se tiñe la membrana de nitrocelulosa con rojo de Ponceau, para verificar la transferencia. Posteriormente, la membrana se coloca en leche semidescremada al 8% en TBST en agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente o a 4°C durante toda la noche, para el bloqueo de interacciones inespecíficas proteína-proteína. Una vez bloqueada la membrana para evitar o reducir interacciones inespecíficas del anticuerpo, se agrega el anticuerpo primario en 15 mL de leche semidescremada al 1% a en una dilución 1:1000. Se incuba en agitación durante 1 h. Se realizan 4 lavados con TBST de 5 min cada uno. Se agrega el anticuerpo secundario acoplado a HRP en 15 mL de leche semidescremada en dilución 1:5000. Se realizan varios lavados con TBST durante 5 min cada uno. Finalmente se revela la membrana por colorimetría (método de ABST) o con ECL.

Comparación de metodologías de revelado de *western blot*

Quimioluminiscencia (ECL) se define como la emisión de radiación electromagnética, normalmente en la región del espectro de luz visible o infrarrojo cercano, producida por una reacción química. Para que se dé la ECL es necesario que la reacción produzca un exceso de energía, son frecuentes las reacciones de oxido-reducción y el exceso de energía despide una emisión quimioluminiscente. La reacción de ECL directa parte de dos reactivos, A y B, un sustrato y un oxidante. Los reactivos A y B reaccionan produciendo un intermediario de reacción en un estado electrónicamente excitado, la intensidad de la emisión está en función de la concentración de las especies químicas implicadas (Sambrook, 2001; Meseguer-Lloret, 2004). En la reacción, el luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindiona), un reactivo quimioluminiscente comúnmente utilizado, al oxidarse se convierte en 3-aminofalato.

Por otra parte, el ABTS es un compuesto utilizado para observar las reacciones químicas de enzimas específicas. Es comúnmente empleado como sustrato del peróxido de hidrógeno de la enzima peroxidasa (HRP). La reacción de HRP forma un intermediario estable que puede disociarse en presencia de un donador de electrones, oxida al donador y genera un precipitado de color verde azulado (Hermanson, 1996; Crowther, 2001).

Resultados

A partir del análisis de la secuencia de la proteína LktA de *Mannheimia haemolytica*, fue seleccionada una fracción para ser amplificada. El análisis consistió en identificar las regiones posiblemente más antigénicas. Una vez ubicadas estas regiones se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes, se amplificó un fragmento de 846 pb y se clonó en el vector de expresión pQE-30 Xa. El fragmento amplificado contiene cinco regiones de tipo “*Hemolysin-type calcium-binding*” las cuales se repiten en tándem y no incluye las regiones de dominios transmembranales de la proteína (Quintero-Fabián, 2009).

Posteriormente, se realizó la inducción de la expresión de la proteína LktA recombinante con IPTG y se purificó la proteína para prepararla como antígeno, el cual se utilizó para la inmunización de los conejos y así poder obtener los anticuerpos policlonales que identifican específicamente a la proteína LktA de *Mannheimia haemolytica*.

Inducción de la expresión de la proteína

Se realizó la inducción de la proteína de fusión pQE-30 Xa-*lktA* con IPTG y al realizar los geles desnaturizantes (SDS- PAGE) se observó la sobreexpresión de la proteína con un peso molecular aproximado de 33.7 kDa (figura 2).

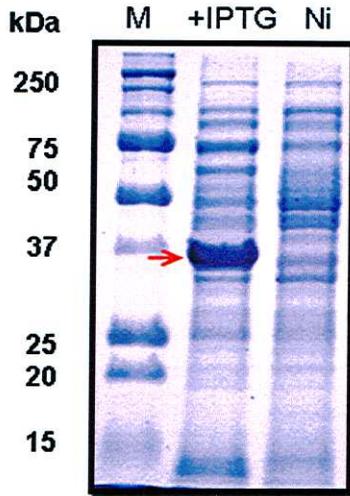


Figura 2. Inducción de la proteína LktA con IPTG. Gel SDS-PAGE de extractos proteicos. Ni-no inducido, +IPTG-inducido, M-marcador de peso molecular, flecha roja-proteína de fusión inducida.

Purificación de la proteína de fusión pQE-30 Xa-*ilktA*

Una vez realizada la inducción con IPTG, se purificó la proteína de fusión inducida mediante una columna de ácido níquelnitrilotriacético, QIAexpress Syst (Qiagen) (figura 3) y se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Lowry resultando en una concentración de 3.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

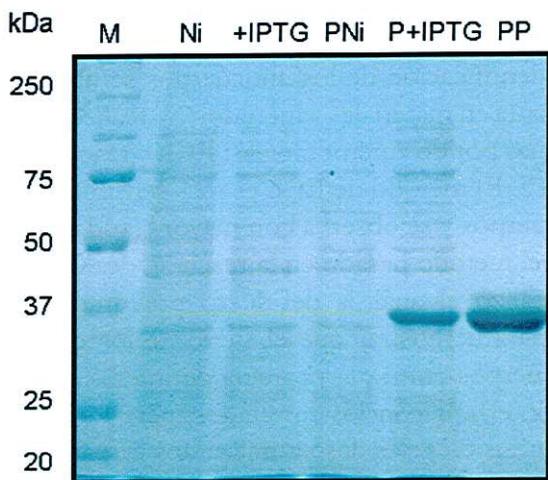


Figura 3. Electroforesis en gel de acrilamida. Gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. M - marcador de peso molecular, Ni - pQE-30 Xa no inducido, +IPTG - pQE-30 Xa inducido, PNi - pQE-30 Xa-*ilktA* no inducido, P+IPTG - pQE-30 Xa-*ilktA* inducida, PP - proteína purificada.

Elaboración del inmunógeno e inducción de anticuerpos

Una vez purificada la proteína se realizó la formulación del inmunógeno, como se indicó en material y métodos, para inmunizar conejos Nueva Zelanda. Se calcularon 30 μg de proteína total por administración. Posteriormente, se inyectó por vía subdérmica a conejos Nueva Zelanda para la inducción de anticuerpos policlonales. Se realizaron tres refuerzos después de la primera inmunización. Antes de cada refuerzo se extrajo una muestra de sangre por punción intracardiaca y diez días después del último refuerzo se sangraron completamente para analizar el suero y así poder determinar el nivel de anticuerpos que se estaban formando. No se observó ninguna reacción cutánea adversa luego de la aplicación del inmunógeno, ni se vio particularmente afectada la conducta de los conejos posteriormente a las inyecciones.

Análisis de anticuerpos a partir de sueros crudos de conejo

Para la identificación de los anticuerpos se utilizó la técnica de WB, descrita en materiales y métodos. Se realizó el revelado de las membranas por dos metodologías: ECL y reacción colorimétrica con ABTS. El método de ECL es más sensible a la detección de los anticuerpos y se observa con mayor claridad la señal positiva que con el método basado en la reacción de ABTS.

Se realizó el análisis del suero preinmune por la técnica de WB para demostrar que el suero de los conejos no contenía anticuerpos contra la proteína de interés o alguna otra que pudiera interferir con los resultados, para lo cual se realizaron electroforesis en geles desnaturizantes cargados con 5 y 15 μg de proteína total. Posteriormente, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa que se tiñeron con rojo de Ponceau (figura 4). Luego, estas membranas se hibridaron con los diferentes sueros, como se describe en material y métodos, y fueron reveladas con ABTS y con ECL (figura 5). En ambos casos se corroboró que el suero preinmune no presenta anticuerpos contra la proteína LktA ni contra ninguna otra proteína del extracto de proteínas bacterianas de *E. coli*.

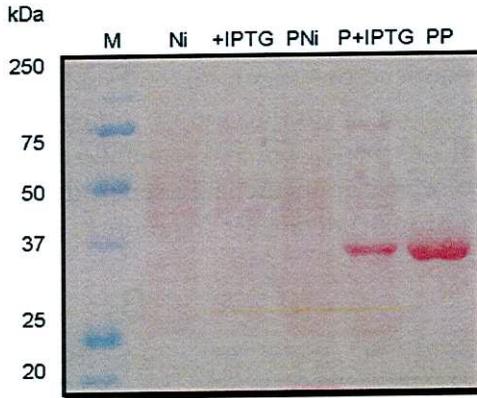


Figura 4. Transferencia de proteínas bacterianas en nitrocelulosa. Membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau. M - marcador de peso molecular, Ni - pQE-30 Xa no inducido, +IPTG - pQE-30 Xa inducido, PNi - pQE-30 Xa-*ilktA* no inducido, P+IPTG - pQE-30 Xa-*ilktA* inducida, PP - proteína purificada.

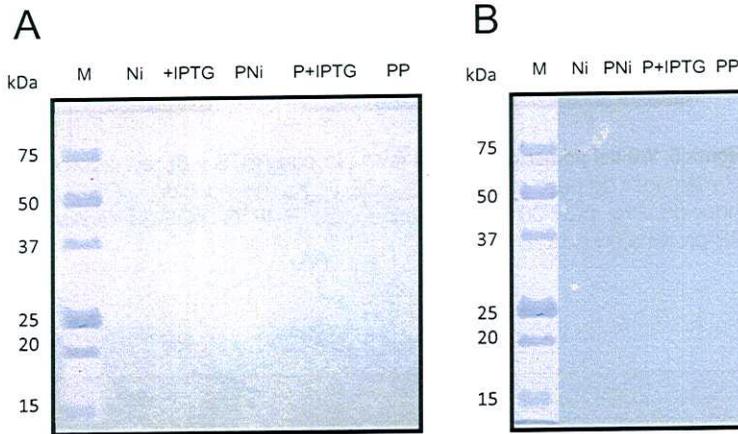


Figura 5. Membrana hibridada con el suero pre inmune. A) revelado con ABTS y B) revelado con luminol. M-marcador de peso molecular, Ni - pQE-30 Xa no inducido, +IPTG - pQE-30 Xa inducido, PNi - pQE-30 Xa-*ilktA* no inducido, P+IPTG - pQE-30 Xa-*ilktA* inducida, PP-proteína purificada.

Se analizó el suero del primer, segundo y tercer refuerzo para verificar la generación de anticuerpos. En el primer refuerzo no se observaron anticuerpos (figura 6), en el segundo refuerzo se comienza a observar la producción de anticuerpos específicos que identifican una banda del PM esperado (figura 7) y en el tercer refuerzo se ve claramente la presencia de anticuerpos que identifican a la proteína de interés (figura 8).

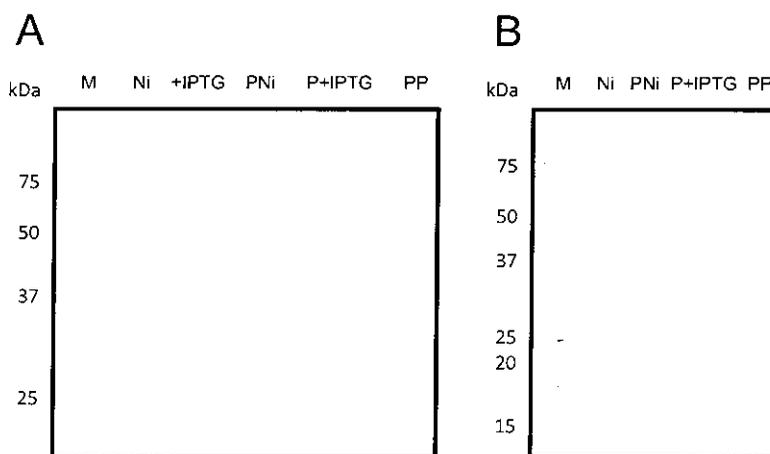


Figura 6. WB del primer refuerzo. A) revelado con ABTS y **B)** revelado con luminol. M-marcador de peso molecular, Ni-pQE-30 Xa no inducido, +IPTG- pQE-30 Xa inducido, PNi- pQE-30 Xa-*iklA* no inducido, P+IPTG- pQE-30 Xa-*iklA* inducida, PP-proteína purificada.

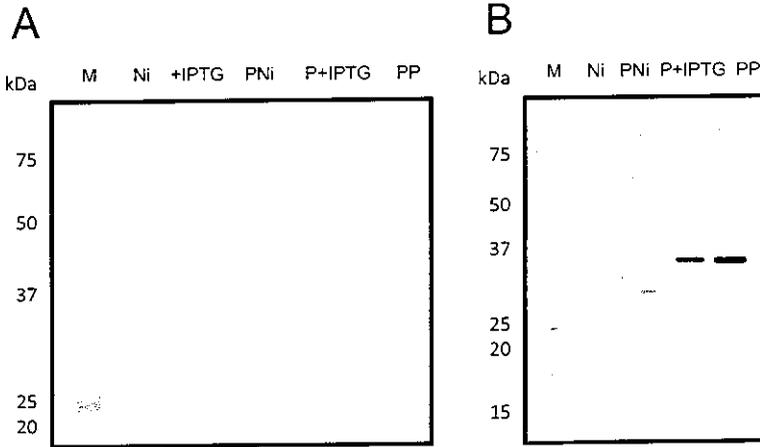


Figura 7. WB del segundo refuerzo. A) revelado con ABTS y **B)** revelado con luminol. M-marcador de peso molecular, Ni-pQE-30 Xa no inducido, +IPTG-pQE-30 Xa inducido, PNi- pQE-30 Xa-*iklA* no inducido, P+IPTG- pQE-30 Xa-*iklA* inducida, PP-proteína purificada.

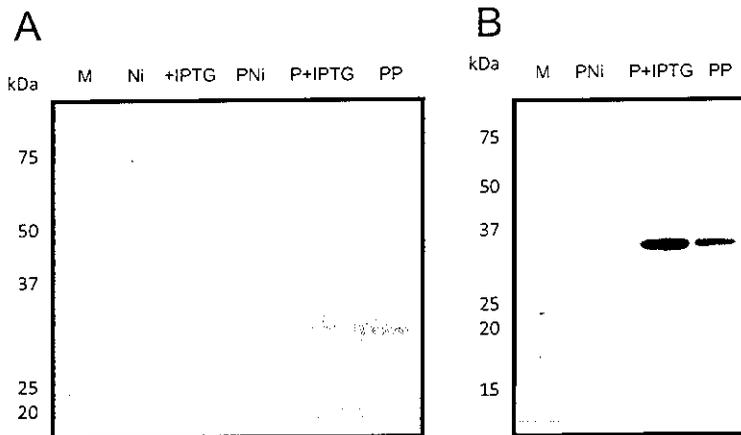


Figura 8. WB del tercer refuerzo. A) revelado con ABTS y **B)** revelado con luminol. M-marcador de peso molecular, Ni-pQE-30 Xa no inducido, +IPTG-pQE-30 Xa inducido, PNi- pQE-30 Xa-*iklA* no inducido, P+IPTG- pQE-30 Xa-*iklA* inducida, PP-proteína purificada.

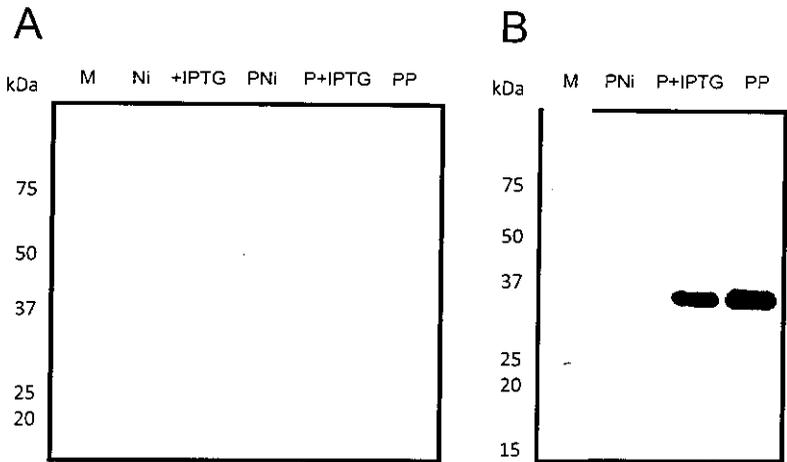


Figura 9. WB del suero total final. A) revelado con ABTS y **B)** revelado con luminol. M-marcador de peso molecular, Ni-pQE-30 Xa no inducido, +IPTG- pQE-30 Xa inducido, PNi- pQE-30 Xa-*ikta* no inducido, P+IPTG- pQE-30 Xa-*ikta* inducida, PP-proteína purificada.

De igual manera se realizó el WB para el suero total. El cual permitió corroborar la formación de anticuerpos policlonales específicos capaces de identificar a la proteína LktA (figura 9).

Discusión

Mannheimia haemolytica produce y secreta la LktA que es considerada un importante factor de virulencia y patogenicidad causante de la neumonía bovina (Robert, 2003). A partir del análisis de esta proteína fue seleccionada, en un trabajo previo, una fracción posiblemente antigénica que contiene a la región B de esta exotoxina, donde se localizan los dominios tipo hemolisina de unión a calcio (*Hemolysin-type calcium-binding*) (Quintero-Fabián, 2009) para ser expresada en el vector pQE-30 Xa. Posteriormente, se logró la inducción y purificación de dicho fragmento de la proteína y con ello la obtención, en el presente trabajo, de anticuerpos policlonales que la identificaron. Lo cual permitirá realizar pruebas de titulación de anticuerpos y retos inmunológicos con *Mannheimia haemolytica*.

Experimentos iniciales de vacunación establecieron que las preparaciones crudas de la LktA completa pueden generar cierta inmunización para la pasteurelisis bovina (Shewen y cols, 1988; Rice-Conlon y cols, 1995). Se ha propuesto además que una proteína recombinante purificada de la LktA puede incrementar significativamente esta capacidad protectora si se empleara como vacuna en conjunto con otros componentes celulares (Conlon y cols, 1991). Lo que abre la posibilidad de que ciertas regiones de la proteína con uno o varios epítopes puedan ser componentes efectivos de una vacuna.

Por una parte, Lee y cols. (2001) realizaron una construcción con un fragmento de la LktA unido a la proteína verde fluores-

cente (GFP) con el propósito de localizar la expresión de dicha fusión una vez que se transformaran células vegetales con la construcción. En su caso, al igual que en el presente trabajo, no se incluyó en la construcción la porción amino terminal de la LktA, donde se localizan los dominios transmembranales (sección A en Quintero-Fabián, 2009), los cuales se han implicado con el proceso citotóxico de la proteína al estar involucrados en la formación de poros en la membrana de la mitocondria (Welch, 1991). Por otra parte, incluirlos podría complicar en nuestro caso la purificación de una proteína soluble.

A diferencia de la construcción realizada por Lee y cols, (2001), en la realizada en el presente trabajo no se incluye la porción carboxilo terminal, que incluye la región RTX, que sí está presente en la construcción realizada por ellos. Su objetivo fue el de expresar dicha fusión en células vegetales, de forma que se pudiera incorporar a la pastura del ganado y generara cierta inmunidad. En nuestro caso el objetivo fundamental es poder generar un fragmento inmunogénico y soluble de la LktA y poder producirlo en grandes cantidades para la elaboración de una vacuna polivalente.

Por otra parte, Lainson y cols, (1996) realizaron diferentes construcciones para inducir anticuerpos y probaron aquellos capaces de bloquear o neutralizar la acción biológica de la LktA. Llegaron a establecer dos dominios (epítomos), de 32 y 33 aminoácidos respectivamente, localizados justo entre la región B y C de la LktA (Quintero-Fabián, 2009) el primero de los cuales si es capaz de generar anticuerpos que neutralizan y el segundo, inmediatamente posterior, no lo es. En el presente trabajo, utilizamos una construcción que no incluye estos dominios, localizados en la zona carboxilo terminal, pero que sí incluye los epítomos anti-génicos de la parte media de la proteína o sección B (Lainson y cols, 1996; Quintero-Fabián, 2009), lo que permitió la obtención de anticuerpos policlonales específicos y nos permite proponer

que este fragmento generará protección inmunológica frente a un reto con *M. haemolítica*.

Para la expresión de la proteína recombinante se utilizó el vector de pQE-30 Xa debido a que permite añadir una secuencia de 6 histidinas, seguida de la secuencia de corte del factor Xa, inmediatamente anterior a la secuencia de la proteína LktA, lo cual facilita su purificación. Para la purificación se utilizaron soluciones amortiguadoras de diferentes pH, ácido y alcalino, que permitieron la elución de la proteína de la columna. Una vez que el extracto proteico total se pasa por la columna, la proteína de fusión queda unida a la resina gracias a la secuencia de histidinas. Posteriormente, se somete a la acción del factor Xa (proteasa) que separa a la proteína LktA de dicha secuencia. Finalmente, al agregar soluciones amortiguadoras alcalinas (tampones de elución pH 5.9 y pH 4.5) se eluye la proteína LktA de la columna. Se obtuvieron fracciones más purificadas con el tampón de elución a pH 4.5 (figura 3).

Los anticuerpos policlonales específicos obtenidos identifican a la proteína LktA, lo que se demostró mediante la técnica de WB. Se observó una mayor sensibilidad con el método de revelado por ECL que por colorimetría. A partir de la segunda inmunización comenzó a observarse la producción de anticuerpos (figuras 8 y 9). Debido a que segmentos homólogos de diferentes leucotoxinas presentan secuencias aminoacídicas idénticas o casi idénticas (Davies y cols., 2001) los anticuerpos policlonales generados en este trabajo podrían ser útiles en la detección de leucotoxinas de otras especies bacterianas.

Perspectivas

Con los resultados obtenidos en este trabajo y el que le precedió (Quintero-Fabián, 2009), se cuenta ahora con las herramientas moleculares adecuadas para continuar el estudio de la LktA. Por una parte, se ha conseguido el clonaje de una fracción inmunogénica de esta proteína, lo que permitió en este trabajo la obtención de anticuerpos policlonales específicos que la identifican. Con los cuales, posteriormente, se realizarán pruebas de titulación de anticuerpos por el método de ELISA que sirva como método de diagnóstico para el CRB, así como retos inmunológicos en animales de laboratorio, para poder verificar la eficacia de esta proteína en la formulación de una vacuna polivalente que proteja ante una infección por *Mannheimia haemolytica*.

Conclusiones

A partir de los resultados del presente trabajo se derivan las siguientes conclusiones:

1. Se logró la purificación de la proteína rLktA de *Mannheimia haemolytica* mediante una columna de ácido níquel-nitrilo-triacético, lo que permite escalar su producción a nivel industrial y su utilización en la generación de anticuerpos.
2. Con la proteína purificada obtenida será posible verificar la capacidad de protección que pueda generar como inmunógeno mediante un reto inmunológico contra *M. haemolytica*.
3. Se obtuvieron sueros crudos que contienen anticuerpos policlonales capaces de identificar de manera específica a la proteína LktA de *Mannheimia haemolytica*, lo cual provee de una valiosa herramienta molecular para su estudio.
4. La técnica de revelado de WB mediante quimioluminiscencia (ECL-luminol) presenta una mayor sensibilidad y se utiliza menor cantidad de muestra para hacer la reacción en comparación con la técnica de revelado colorimétrico con ABTS.
5. A partir de la detección por medio de ECL se puede proceder a realizar la titulación de los anticuerpos, lo cual servirá como método diagnóstico para el CRB.

Referencias

- Alving C. (1993). Lipopolysaccharide, lipidA and liposomes containing lipid A as immunologic adjuvants. *Immunobiol*, 187: 430-446.
- Bowland SL, Shewen PE. (2000). Bovine respiratory disease: commercial vaccines currently available in Canada. *Can Vet J* 41:33-48.
- Chang Y.F., Young R., Post D. y Struck D.K. (1987) Identification and characterization of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect Immun*. 55(10):2348-54.
- Conlon J.A., Shewen P.E. y Lo R.Y. (1991). Efficacy of recombinant leukotoxin in protection against pneumonic challenge with live *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect Immunol* 59:587-591.
- Crowther R.J. (2001), *The ELISA Guidebook*. Totowa New Jersey, 395-406.
- Cullor J.S. (1992). Shock attributable to bacteremia and endotoxemia in cattle: clinical and experimental findings. *Am. Vet. Med. Assoc*, 200: 1894-902.
- Davies R.L., Whittam T.S. y Selander R.K. (2001). Sequence diversity and molecular evolution of the leukotoxin (*lktA*) gene in bovine and ovine strains of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *J Bacteriol*. 183(4):1394-404.
- Davies R.L. y Baillie S. (2003) Cytotoxic activity of *Mannheimia haemolytica* strains in relation to diversity of the leukotoxin structural gene *lktA*. *Vet Microbiol*. 92(3):263-79.

- Dagmara I.K. and Charles J.C. (2008). Identification of *Mannheimia haemolytica* adhesins involved in binding to bovine bronchial epithelial cells. American Society for Microbiology, 77: 446-455.
- Ellis J.A. y Yong Ch. (1997). Systemic adverse reactions in young Simmental calves following administration of a combination vaccine. Veterinary Pathology, 38: 40-47.
- Henderson B. y Wilson N. (1995). Modulins: a new class of cytokine-inducing, pro-inflammatory bacterial virulence factor. Inflammation Research, 44:187-197.
- Hermanson G.T. (1996). Bioconjugate techniques, Rockaford Illinois.
- Highlander S.K. (2001). Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Front Biosci 6:1128-1150.
- Highlander S.K., Fedorova N.D., Dusek D.M., Panciera R., Alvarez L.F. y Rinehart C. (2000). Inactivation of *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin causes partial attenuation of virulence in a calf challenge model. Infect Immun. 68(7):3916-22.
- Hodgson P.D., Aich P., Manuja A., Hokamp K., Roche F.M., Brinkman F.S.L., Potter A., Babiuk L.A. y Griebel P.J. (2005). Effect of stress on viral-bacterial synergy in bovine respiratory disease: novel mechanisms to regulate inflammation. Comparative and Functional Genomics. 6: 244-250.
- Jaramillo-Arango C.J., Trigo-Tavera F.J. y Suárez-Güemes F. (2009) Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. Vet. Méx. 40(3):293-314.
- Kuhnert P., Heyberger-Meyer B., Burnens A.P., Nicolet J. y Frey J. (1997). Detection of RTX toxin genes in gram-negative bacteria with a set of specific probes. Appl Environ Microbiol. 63(6):2258-2265.

- Lainson F.A., Murray J., Davies R.C., y Donachie W. (1996). Characterization of epitopes involved in the neutralization of *Pasteurella haemolytica* serotype A1 leukotoxin. *Microbiology*. 142(9):2499-2507.
- Lee R.W., Strommer J., Hodgins D., Shewen P.E., Niu Y., y Lo R.Y. (2001). Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a *Mannheimia haemolytica* A1 leukotoxin 50 fusion protein. *Infect Immun*. 69(9):5786-5793.
- Lo R.Y., Strathdee C.A. y Shewen P.E. (1987) Nucleotide sequence of the leukotoxin genes of *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect Immun*. 55(9):1987-1996.
- Lo R.Y., Sathiamoorthy S. y Shewen P.E. (2006). Analysis of in vivo expressed genes in *Mannheimia haemolytica* A1. Blackwell Publishing, 206: 18-25.
- Meseguer-Lloret S. (2004). Métodos de quimioluminiscencia en química analítica. Tesis doctoral, Universidad de Valencia.
- Meeusen E.N.T. (2007). Current status of veterinary vaccines, *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3): 489-510.
- NCBI Taxonomy browser: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>, consultado en marzo de 2010.
- Quintero-Fabián M.S. (2009). Expresión heteróloga y purificación de la fracción antigénica de la proteína LktA de *Mannheimia haemolytica*. Tesis de licenciatura en Biología. Universidad de Guadalajara. Reg. 398673474.
- Rebhun W.C., Guard C. y Richards C.M. (1995). Enfermedades del ganado vacuno lechero, España, Acribia.
- Rice-Conlon J.A., Gallo G.F., Shewen P.E. y Adlam C. (1995). The efficacy of a *Pasteurella haemolytica* A1 vaccine given as a single dose against experimental pneumonic challenge in cattle. In *Haemophilos, Actinobacilos and Pasteurellas*, pp. 10 1-1 04. Edited by VC. Donachie, F. A. Lainson & J. C. Hodgson. New York: Plenum.

- Robert D.L. y Baillie S. (2003). Citotoxic activity of *Mannheimia haemolytica* strains in relation to diversity of the leukotoxin structural gene lktA. *Veterinary Microbiology*, 92, 263-279.
- Sambrook J. y Russell D.W. (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shanthalingam S. y Srikumaran S. (2009). Intact signal peptide of CD18, the subunit of beta2-integrins, renders ruminants susceptible to *Mannheimia haemolytica* leukotoxin. *Veterinary Microbiology*. 106:15448-15453.
- Shewen P., Sharp A. y Wilkie B.N. (1988). Efficacy testing a *Pasteurella haemolytica* extract vaccine. *Vet Med* 83, 2078 1083.
- Trigo F.J. (1987). Complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. *Ciencia Veterinaria*. 4, 1-37.
- Watts J.L., Yancey R.J. Jr., Salmon S.A., Case C.A. (1994). A 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory disease in North America, *J. Clin. Microbiol.* 32 (1994) 725–731.
- Welch R.A. (1991). Pore-forming cytolysis of gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 5:521–528.
- Wilkie BN, Markham RJ, Shewen PE. (1980). Response of calves to lung challenge exposure with *Pasteurella haemolytica* after parenteral or pulmonary immunization. *Am J Vet Res* 41:1773-1778.
- Zecchinon L., Fett T. y Desmecht D. (2005). How *Mannheimia haemolytica* defeats host defense through a kiss of death mechanism. *Veterinary Research*. 36: 136-156.

Índice de figuras

Figura 1.	Inmunización de conejos Nueva Zelanda con la proteína rLkTA por vía subdérmica en el dorso del tórax y abdomen	20
Figura 2.	Inducción de la proteína LkTA con IPTG	24
Figura 3.	Electroforesis en gel de acrilamida	25
Figura 4.	Transferencia de proteínas bacterianas en nitrocelulosa	27
Figura 5.	Membrana hibridada con el suero pre inmune.....	27
Figura 6.	WB del primer refuerzo.....	28
Figura 7.	WB del segundo refuerzo.....	29
Figura 8.	WB del tercer refuerzo	29
Figura 9.	WB del suero total final.....	30