

Evaluación de la inmunogenicidad de una proteína recombinante de una *Pasteurella multocida* aislada de alpacas con neumonía

EVALUATION OF THE IMMUNOGENICITY OF A RECOMBINANT PROTEIN OF A *Pasteurella multocida* ISOLATED FROM ALPACAS WITH PNEUMONIA

Jorge Maximiliano G.¹, Lenin Maturrano H.^{1,2,4}, Luis Luna E.¹,
Raquel Hurtado C.¹, Ana Chero O.¹, Raúl Rosadio A.^{1,3}

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la actividad inmunogénica *in vitro* de una proteína P6-like recombinante procedente de un cultivo de *Pasteurella multocida* aislada de cuadros de neumonía en crías de alpacas. Se desafiaron cultivos de células mononucleares periféricas sanguíneas (PBMC) con una proteína recombinante P6-like a una concentración de 10 ng por muestra, desde las 3 hasta las 72 horas. Se extrajo ARN totales para realizar la prueba de RT-PCR en tiempo real para observar los niveles de expresión de citoquinas de la respuesta inmune Th1 (TNF- α , IFN- γ e IL-2) y Th2 (IL-10 e IL-4) en los tiempos establecidos. Se encontró que tanto las citoquinas con perfil Th1 como Th2 expresan un mayor número de veces con respecto a PBMC no expuestos a la proteína recombinante, siendo las 24 y 48 horas los momentos de mayor expresión. Asimismo, se encontró una aparente tendencia hacia el perfil Th2, pero en niveles que no influyen en la expresión de citoquinas del otro perfil.

Palabras clave: *Pasteurella multocida*; P6-like; alpaca; RT-PCR en tiempo real; cuantificación relativa

¹ Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, ² Laboratorio de Zootecnia y Producción Agropecuaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

³ CONOPA - Instituto de Investigación y Desarrollo de Camélidos Sudamericanos, Lima, Perú

⁴ E-mail: amaturranoh@unmsm.edu.pe

Recibido: 19 de junio de 2017

Aceptado para publicación: 28 de noviembre de 2017

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the *in vitro* immunogenic activity of a recombinant P6-like protein from a culture of *Pasteurella multocida* isolated from pneumonia cases in young alpacas. Blood peripheral mononuclear cells (PBMCs) were challenged with a recombinant P6-like protein at a concentration of 10 ng per sample, from 3 to 72 hours. Total RNA was extracted to perform the real-time RT-PCR test to observe cytokine expression levels of the Th1 immune response (TNF- α , IFN- γ and IL-2) and Th2 (IL-10 and IL-4) in the established times. Both Th1 and Th2 profile cytokines expressed a greater number of times than PBMC not exposed to the recombinant protein, where at 24 and 48 hours showed the greater expressions. Likewise, an apparent trend toward the Th2 profile was found, but at levels that did not influence the expression of cytokines in the other profile.

Key words: *Pasteurella multocida*; P6-like; alpaca; RT-PCR Real Time; relative quantification

INTRODUCCIÓN

La alpaca, una de las cuatro especies de camélidos sudamericanos, es sustento económico de numerosas familias en las regiones altoandinas del Perú (Ameghino y DeMartini, 1991). Los problemas de manejo en la crianza de la alpaca, especialmente las altas tasas de mortalidad neonatales que pueden superar el 50% limitan el desarrollo de esta industria pecuaria y afectan la economía de los criadores (Ameghino y DeMartini, 1991; Bustinza, 2001). Las principales causas de mortalidad neonatal son las causas infecciosas, siendo las neumonías aquellas de mayor casuística (Garmendia *et al.*, 1986; Ameghino y DeMartini, 1991; Bustinza, 2001; Cirilo *et al.*, 2012).

Las neumonías son causadas por diversos agentes patógenos, entre virales y bacterianos, que coexisten en procesos infecciosos generando cuadros de neumonías agudas. Entre ellos, *Pasteurella multocida* es la principal bacteria involucrada en las infecciones neumónicas en alpacas, seguida de *Mannheimia haemolytica* que, individualmente o en conjunto con otros agentes infecciosos, generan cuadros hiperagudos en crías

durante la época de parición, afectando también a crías más grandes en épocas de estrés como el destete y la esquila (Rosadio *et al.*, 1990; Cirilo *et al.*, 2012; Guzmán *et al.*, 2013).

P. multocida se le clasifica en serogrupos (A, B, D, E y F) basados en sus antígenos capsulares; pero además es clasificada en serotipos de acuerdo con el lipopolisacárido presente, usando el test de Heddleston (Heddleston *et al.*, 1972; Harper *et al.*, 2006, 2015). *P. multocida* cuenta con una variedad de factores de virulencia que juegan roles importantes en la patogénesis de la enfermedad como, por ejemplo, en la evasión de la respuesta inmune y la captación de hierro, entre otros (Harper *et al.*, 2006).

Las proteínas de membrana externa (OMP) son estructuras muy importantes en la patogénesis de la enfermedad. Muchos de estos compuestos están involucrados en la captación de hierro y en la adhesión, lo cual es importante para el establecimiento y supervivencia de la bacteria (Boyce *et al.*, 2012). Varias OMP son inmunógenos y los anticuerpos producidos contra estas OMP demuestran una fuerte acción protectora. Tales antígenos se pueden usar como com-

ponentes de vacunas de subunidades. La inmunogenicidad de ciertas OMP de *P. multocida* ha sido demostrada en terneros (Kedrak y Borkowska, 2003), conejos (Lu *et al.*, 1991) y gallinas (Zhang *et al.*, 1994). Otros estudios indican que una OMP similar a una proteína de adhesión P6 de *Haemophilus influenzae* (P6-like) induce a una mejor protección al inducir una respuesta significativa en producción de anticuerpos específicos, lo que lo convierte en un inmunógeno adecuado para ser usado en vacunas (Kasten *et al.*, 1995; Shivachandra *et al.*, 2017).

El presente estudio buscó determinar el perfil inmunogénico Th1 y Th2 de una proteína de membrana externa P6-like recombinante de *P. multocida* aislada de casos neumónicos fatales en alpacas obtenida mediante la metodología de la vacunología reversa, como parte de la elaboración de una vacuna de última generación para la prevención de neumonías pasteurelósicas en crías de alpacas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar del Estudio

Los ensayos *in vitro* se realizaron en el Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima, Perú).

Proteína Recombinante P6-like

En los ensayos experimentales se usó una proteína recombinante P6-like (proteína de membrana externa) producida en la FMV. La elección de esta proteína como candidato vacunal fue parte del desarrollo del Proyecto Innovate Perú (FINCyT) Contrato N.º 133-FINCyT-IB-2013, el cual busca realizar una vacuna de nueva generación para la prevención y control de las neumonías

pasteurelósicas en alpacas. Por ello, se aisló una *Pasteurella multocida* de casos neumónicos en crías de alpacas de la sierra sur del país (Puno) y se realizó la secuenciación de su genoma.

A partir de la secuenciación del genoma, se evaluó y comparó *in silico* con datos disponibles del genoma de *P. multocida* en el NCBI, VFDB (*Virulence Factors DataBase*), MvirDB (*Microbial Virulence DataBase*) y Protegen, además de usar diversos programas (Glimmer v. 3.02, CAP3, Transeq, BLAST v. 2.2.27, Psortb v. 3.02, SignalP v. 4.0, LipoP v. 1.0, TMHMM v. 2.0), identificándose 10 candidatos; entre ellos el gen que codifica la P6-like. Mediante el uso de cebadores específicos (Cuadro 1) fue amplificado mediante PCR a partir de aislados de *P. multocida* procedentes de cuadros neumónicos en alpacas. Posteriormente, mediante el uso del kit *Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit with BL21 Star™ (DE3) One Shot™ Chemically Competent E. coli* (Invitrogen) se clonó y expresó en cepas de *E. coli* BL21™, especial para este tipo de técnicas. Por último, la proteína fue purificada mediante el Kit ProBond™ Purification System y conservada en refrigeración.

Células Mononucleares Periféricas Sanguíneas (PBMC)

Para la extracción de las PBMC se usaron alpacas Huacaya hembras de 3 años, clínicamente sanas, del Laboratorio de Reproducción de la FMV. Los animales se encontraban separados de otras especies animales y eran alimentados con heno y agua *ad libitum*.

Se recolectaron 30 ml de sangre periférica de un animal en tubos Vacutainer® con anticoagulante (EDTA), mediante punción de la vena yugular. La sangre fue centrifugada en gradiente de densidad usando el reactivo Ficoll-Paque (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para los

Cuadro 1. Secuencias, tamaño, temperaturas de *annealing* y referencias de las citoquinas usadas para la evaluación inmunogénica en alpacas

	Genes	Secuencias	Productos amplificados (bp)	Tm
Th1	IFN- γ	5'-ATTGTCTCCTTCTACTTCAA-3'	258	45
		5'-AGCGGAAGAGAAGTCAGAAT -3'		
	TNF α	5'-CTACTCCCAGGTCCTCCTGA-3'	251	60
5'-GGTAGTTGGGCATGTTGATC-3'				
Th2	IL-2	5'-AAACTCTCCAGGATGCTCAC-3'	202	49
		5'-GGAAGTGAAGGGATCTGAAA-3'		
	IL-4	5'-CAAAGAACACAAGTGAAG-3'	203	46
		5'-GGCTAAAGAAGATTATGAAG-3'		
	IL-10	5'-AAGCCTTGTCGGAGATGAC-3'	246	55
5'-AGCCATGAGTGAGTTCGACA-3'				
Normalizador	GAPDH	5'-GTGAAGGTCGGAGTGAACG-3'	356	60
		5'-GAGATGATGACCCCTCTGGC-3'		

Las referencias para Th1 – IFN- γ , TNF α e IL-2 son Odbileg *et al.* (2008, 2005 y 2006), respectivamente, para Th2 es Odbileg *et al.* (2006) y para el normalizador es Patil *et al.* (2004)

lavados de las células mediante centrifugación se usó PBS 1X pH 7.8 y luego se suspendieron en medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) 1640 con L-Glutamina (Sigma), adicionando 100 IU/mL de penicilina (Sigma) y 10% de suero fetal bovino (SFB) (Sigma) inactivado por calor. Se uniformizó la muestra mediante diluciones con RPMI 1640 a una concentración de 1×10^6 células/ml. Uniformizado el cultivo, se colocó 1200 μ l de cultivo celular final por pocillo en una placa de poliestireno.

Evaluación *in vitro* de la Proteína Recombinante P6-like

Una vez preparado los cultivos celulares de PBMC se formaron dos grupos: calibrador y desafío. El grupo calibrador conformado por tres muestras (1200 μ l por muestra), no fueron expuestas a estímulos y su perfil citocínico fue evaluado a las 0 h del

experimento. El grupo desafío conformado por cultivos celulares (1200 μ l por muestra, 1×10^6 células/ml) fue inoculado con 10 ng de proteína recombinante P6-like, evaluándose a las 3, 6, 9, 12, 18, 24, 48 y 72 h por triplicado. Las muestras se mantuvieron en una incubadora a 38 °C y 5% de CO₂. Se realizaron extracciones de ARN total en cada muestra de cultivo celular en el tiempo asignado empleando el kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se procedió a guardar el tubo con la muestra a -80 °C.

Se cuantificó la concentración de ARNm en cada muestra mediante el kit de cuantificación *Quant-iT™ RNA Assay Kit, broad range* (ThermoFisher Scientific) y con un equipo de cuantificación Qubit® 2.0 Fluorometer. Las muestras fueron cuantificadas y uniformizadas mediante diluciones para llegar a una concentración aproximada

de 2 ng/μl de ARN total, lo que hizo un total de 4 ng por reacción para la síntesis de ADNc usados en las pruebas de qPCR. Luego, mediante el kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* (ThermoFisher Scientific) se sintetizó el ADNc para su uso en el qPCR.

El RT-PCR en tiempo real fue realizado en un termociclador PikoReal 96 (*Thermo Scientific*), usando como fluoróforo Maxima SYBR Green. Se utilizó el ADNc (4 ng, aproximadamente) sintetizado a partir del ARNm obtenido durante la extracción de los cultivos celulares incubados en diferentes tiempos. Para la prueba de PCR en tiempo real se utilizaron un *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)* a concentración 1X, cebadores específicos para cada citoquina y el normalizador (Cuadro 1) a concentraciones de 0.3 μM, 2 μl de ADNc y completando con agua ultra pura libre de nucleasas hasta un volumen de 20 μl.

En la qPCR se llevó a 50 °C por 2 min (T_{DG}), luego una temperatura de desnaturalización (T_D) inicial de 95 °C por 10 min, luego 40 ciclos de desnaturalización (T_D) a 95 °C por 35 s, hibridación (T_A) a la temperatura que corresponde a cada cebador por 30 s y una extensión (T_E) de 72 °C por 35 s (40 en caso de GAPDH). Finalmente, una evaluación de la temperatura de disociación (T_{MELT}), que va desde «X» - 95 °C, donde «X» corresponde a la T_A de cada gen evaluado.

Cuantificación Relativa de los Niveles de Expresión de la Citoquinas

Para la cuantificación relativa de las citoquinas fue usado el método del Ct comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001), que permite comparar las curvas de amplificación de las citoquinas de los tratamientos frente a las curvas de amplificación de las citoquinas producidas en el grupo control.

RESULTADOS

Todos los ensayos mostraron la presencia de ARNm de GAPDH por PCR en tiempo real, lo cual fue corroborado en gel de agarosa al 2%, observándose un producto único de aproximadamente 356 pb similar al descrito por Patil *et al.* (2004). Igualmente, la electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos del PCR en tiempo real para TNF- α , IL-10, IL-4, IL-2 e IFN- γ mostraron una banda única y específica de ADN amplificado.

Se observa un mayor incremento en la expresión de TNF- α e IL-10, sobre todo a las 48 horas. Una menor expresión de IFN- γ e IL-4 entre las 24 y 48 horas y finalmente poca expresión de IL-2 llegando a su pico a las 48 horas, pero cerca a niveles basales (Figura 1).

DISCUSIÓN

La P6-like recombinante muestra una tendencia a estimular las citoquinas del perfil Th2. Siendo una proteína de membrana externa es razonable que estimule un perfil inmunológico neutralizante que actúe frente a este tipo de antígeno, pero además estimula la expresión de TNF- α . Esto puede ser parte de una respuesta innata donde el TNF- α también forma parte, promoviendo la migración de macrófagos y neutrófilos al sitio de infección característicos de neumonías causadas por *P. multocida* (Guzmán, 2011; Cirilo *et al.*, 2012; Guzmán *et al.*, 2013; Tizard, 2013), aunque no se descarta que otros factores de virulencia estén implicados como es el caso del lipopolosacárido (LPS) (Harper *et al.*, 2006). Este resultado es muy distinto al presentado por More (2013) que evaluó la expresión de citoquinas frente a una combinación de antígenos clostridiales con ácido retinoico en intestino de alpacas, donde IFN- γ e IL-2 aumentaban su expresión en la pri-

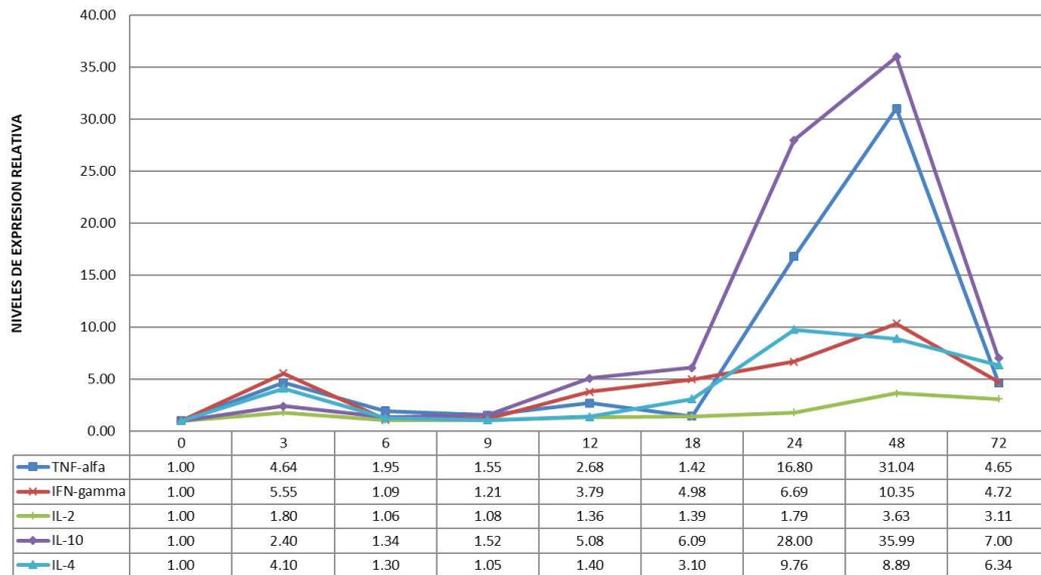


Figura 1. Niveles de expresión relativa de las cinco citoquinas evaluados con respecto al tiempo de exposición, evidenciándose una marcada expresión de IL-10 y TNF- α

mera semana, posiblemente debido al uso de todos los antígenos clostridiales por parte de dicho estudio.

En el caso del TNF- α posiblemente se deba a que esta citoquina también forma parte del perfil de respuesta innata que promueve la migración de otras células del sistema inmune (Tizard, 2013). Este incremento puede deberse a la presencia de otros tipos de células presentes en los cultivos, como son células inmunes innatas (ejemplo: *Natural Killer cells* y monocitos) que están siendo estimuladas por la P6-like. Es así, que se observa un aumento de la expresión de TNF- α , similar al estudio de Yoo *et al.* (1995) donde se estimularon macrófagos alveolares bovinos con lipopolisacárido de *P. (Manhemmia) haemolytica*, observándose un incremento de TNF- α a partir de las 4 h pos-desafío, llegando a una máxima expresión a las 24 h de la estimulación.

En el caso de IL-2 se observó un aumento de su expresión en relación al calibrador a partir de las 6 horas, llegando a su mayor

expresión a las 48 horas (3.63 veces). Este ligero aumento sería suficiente para la activación de linfocitos maduros y su migración hacia el sitio de inflamación. Se considera que IL2 es uno de los factores de crecimiento más importante de linfocitos T, sobre todo cuando son activados por antígenos, expandiendo su número significativamente (Malek *et al.*, 2002).

IFN- γ muestra un aumento a las 3 horas (5.54 veces), manteniéndose en bajos niveles a las 6 y 9 horas pos-exposición, alcanzando un pico máximo (10.35 veces) a las 48 horas del desafío. El IFN- γ tiene un rol importante en la activación de los macrófagos, respuesta inmunitaria innata y respuesta celular adaptativa, el cual asociado con el TNF- α estimula la migración de monocitos, neutrófilos y linfocitos hacia los pulmones con neumonía pasteurelósica (Schroder *et al.*, 2004, Guzmán, 2011; Cirilo *et al.*, 2012; Guzmán *et al.*, 2013), posiblemente estimulados por la P6-Like recombinante. No obstante, no se descartan otros factores de virulencia de *Pasteurella* como es el lipopolisacárido (Harper *et al.*, 2006).

El perfil Th2-IL-10 muestra un aumento en su expresión a las 3 horas de la exposición (2.4 veces), aumentando su expresión hasta las 48 h (35.99 veces) de la exposición. IL-10, también conocida como factor de inhibición de la síntesis de citoquinas, tiene propiedades antiinflamatorias que inhibe la síntesis de citoquinas proinflamatorias producidas por linfocitos T y macrófagos (IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-8 e IL-12) en monocitos/macrófagos y neutrófilos, así como la respuesta de los linfocitos Th1 (Opal y De Palo, 2000). Este aumento en su expresión implicaría una baja en la expresión de IL-2 e IFN- γ , dado su carácter inhibitorio, aunque este último tiene un aumento en su expresión, por lo que aun expresándose esas dos citoquinas, todavía están bajo influencia de la IL-10 por su carácter inmunoregulador sobre ellas (Neurath *et al.*, 2002).

IL-4 muestra un aumento de su expresión a las 3 horas (4.10 veces) para luego mantenerse constante y aumentar a las 18 horas (3.10 veces), llegando a un pico máximo a las 24 h (9.76 veces). IL-4 estimula la diferenciación de linfocitos a un perfil Th2, de manera autocrina favoreciendo su propia diferenciación. IL-4 inhibe la diferenciación de las células Th1 al regular de manera negativa la producción de IL-12 a partir de macrófagos. Se ha demostrado que es capaz de bloquear o suprimir a las citoquinas derivadas de macrófagos como IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-8 (Berin *et al.*, 1999; Opal y De Palo, 2000). Se observa una mayor expresión de IL-4 a las 24 y 48 horas de la exposición a la proteína P6-like recombinante, pero se deduce que es insuficiente para suprimir la expresión de TNF- α que a las 48 horas tiene su mayor pico de expresión.

En un estudio sobre la diferencia de expresión del perfil Th1 y Th2 en PBMC de búfalos frente al peptidoglicano del *Bacillus subtilis* se observó una tendencia al perfil Th1 con respecto a Th2, mostrándonos reducción de la expresión de IL-4 e IL-10 y un aumento notorio de TNF- α e IFN- γ (Shah *et al.*, 2012). Esta diferencia probablemente se deba

a la naturaleza de las proteínas, ya que la P6-like es una proteína de membrana externa de la *P. multocida*, mientras que el peptidoglicano es componente de la pared celular del *B. subtilis*.

En un estudio sobre estimulación citocínica de PBMC bovinas frente a un antígeno de una vacuna inactivada del virus de la fiebre aftosa se evaluó el perfil citocínico de IL-2, IL-4 e IFN- γ , observándose altos niveles de expresión a las seis horas en IL-2 e IFN- γ , en tanto que IL-4 llegó a su máxima expresión a las 24 horas de la inducción, encontrando que su perfil citocínico tiene una tendencia al perfil Th1 (Dar *et al.*, 2015). Esto difiere a los hallazgos encontrados en este estudio donde la mayoría de picos de expresión se obtienen a las 48 horas. Además, en dicho estudio se esperaba una tendencia al perfil Th2, debido a que es una proteína procedente de una vacuna inactivada, pero se observó una tendencia al perfil Th1 por el aumento de la citoquinas de este perfil, y una baja expresión de la IL-4, difiriendo con los resultados del presente estudio donde IL-2 e IFN- γ manifiestan una baja expresión.

Boeuf *et al.* (2005) evaluaron la eficiencia en una técnica de cuantificación absoluta de citoquinas en humanos mediante RT-qPCR, donde estimularon PBMC humanas con lipopolisacárido y una *Staphylococcus aureus* cepa Cowan (SAC), encontrando que la citoquina IL-10 tuvo un aumento en su expresión a partir de las 6 horas llegando a su máximo a las 9 horas (10 veces su expresión basal), en comparación con el presente estudio donde IL-10 tuvo un aumento considerable de su expresión a las 12 horas y una mayor expresión a las 48 horas. Asimismo, en dicho estudio, IL-4 muestra un pico de expresión (20 veces) a las 2 horas, tanto a estímulo de LPS como de SAC, en tanto que en el presente estudio tuvo una menor expresión relativa; por otro lado, TNF- α mostró un aumento considerable en su expresión a las 3 horas (100 veces con SAC y 50 veces con LPS), mientras que en el presente estudio llegó a su mayor expresión a las 48 horas (30 ve-

ces). La diferencia entre estas expresiones puede deberse a factores como la naturaleza antigénica del estímulo como al LPS.

En otro estudio sobre la cinética de producción de citoquinas en PBMCs humanas en respuesta al ADN de *Brucella* se observó que la producción de citoquinas de IL-10 no aumentó hasta el día 4, mientras que IL-2 e IFN- γ presentaron un aumento en su concentración con el pasar de los días, observándose una clara tendencia hacia un perfil Th1 (Lashkarbolouki *et al.*, 2005), diferente a los hallazgos encontrados en el presente estudio, donde IL-2 e IFN- γ muestran bajas expresiones e IL-10 aumenta su expresión con el tiempo.

En un estudio reciente, Shivachandra *et al.* (2017) evaluaron la inmunogenicidad de una Omp16 recombinante de *Pasteurella multocida* B:2 en modelo ratón, observando una tendencia a la producción de anticuerpos específicos por parte de los animales inoculados con el antígeno recombinante, similar enunciado que se indica en el presente estudio.

CONCLUSIONES

- La proteína P6-Like recombinante de *Pasteurella multocida* aislado de casos fatales de neumonías en crías de alpaca estimula la expresión de citoquinas de respuesta inmune Th1 (TNF- α , IFN- γ e IL-2) y Th2 (IL-10 e IL-4) en células mononucleares periféricas sanguíneas (PBMC) de alpaca, pero difiriendo en su intensidad.
- La proteína P6-Like recombinante estimula una respuesta Th2 en PBMC de alpacas.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad – Innóvate Perú, fuente financiadora del Proyecto

«Vacunología reversa: desarrollo de una vacuna de nueva generación para el control y/o prevención de la neumonía pasteurelósica en alpacas», Contrato N°133-FINCYT-IB-2013; al CIP-La Raya de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano; y al Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la FMV-UNMSM por su apoyo al trabajo desarrollado.

LITERATURA CITADA

1. **Ameghino E, DeMartini J. 1991.** Mortalidad de crías de alpacas. Boletín de Divulgación del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (IVITA). Lima, Perú: UNMSM. 128 p.
2. **Berin MC, Yang P, Ciok L, Wasserman S, Perdue MH. 1999.** Role for IL-4 in macromolecular transport across human intestinal epithelium of permeability. *Am J Physiol* 276: 1046-1052.
3. **Boeuf P, Vigan-Womas I, Jublot D, Loizon S, Barale J, Akanmori B, Mercereau-Puijalon O, Behr C. 2005.** CyProQuant-PCR: a real time RT-PCR technique for profiling human cytokines, based on external RNA standards, readily automatable for clinical use. *BMC Immunology* 6: 5. doi: 10.1186/1471-2172-6-5
4. **Boyce JD, Seemann T, Adler B, Harper M. 2012.** Pathogenomics of *Pasteurella multocida*. *Curr Top Microbiol Immunol* 361: 23-38. doi: 10.1007/82_2012_203
5. **Bustinza V. 2001.** La alpaca, conocimiento del gran potencial andino. Puno: Univ. Nacional del Altiplano. 343 p.
6. **Cirilo E, Manchego A, Rivera H, Rosadio R. 2012.** Coexistencia de virus y bacterias en neumonías agudas en alpacas neonatas. *Rev Inv Vet Perú* 23: 317-335. doi: 10.15381/rivep.v23i3.914
7. **Dar PA, Hajam IA, Suryanarayana VS, Kishore S, Kondabattula G. 2015.** Kinetics of cytokine expression in bovine PBMMCs and whole blood after *in vitro*

- stimulation with foot-and-mouth disease virus (FMDV) antigen. *Cytokine* 72: 58-62. doi: 10.1016/j.cyto.2014.12.011
8. **Garmendia A, Palmer G, DeMartini J, McGuire T. 1986.** Failure of passive immunoglobulin transfer: a major determinant of mortality in newborn alpacas (*Lama pacos*). *Am J Vet Res* 48 1472-1476.
 9. **Guzmán K, Rosadio R, Maturrano L, Manchego A. 2013.** Asociación de agentes virales y bacterianos en cuadros de neumonías agudas en alpacas tuis. *Rev Inv Vet Perú* 24: 524-536.
 10. **Guzmán KP. 2011.** Identificación de polimorfismos del gen TLR4 en crías de alpacas con cuadros de neumonías por *Pasteurella multocida*. Tesis de Médico Veterinario. Lima, Perú: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 70 p.
 11. **Harper M, Boyce JD, Adler B. 2006.** *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol Lett* 265: 1-10. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00442.x
 12. **Harper M, John M, Turni C, Edmunds M, St Michael F, Adler B, Blackall PJ, et al. 2015.** Development of a rapid multiplex PCR assay to genotype *Pasteurella multocida* strains by use of the lipopolysaccharide outer core biosynthesis locus. *J Clin Microbiol* 53: 477-85. doi: 10.1128/JCM.02824-14
 13. **Heddleston KL, Gallagher JE, Rebers PA. 1972.** Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteruella multocida* from avian species. *Avian Dis* 16: 925-936.
 14. **Kasten RW, Hansen LM, Hinojoza J, Bieber D, Ruehl WW, Hirsh DC. 1995.** *Pasteurella multocida* produces a protein with homology to the P6 outer membrane protein of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 63: 989-993.
 15. **Kedrak A, Borkowska-Opacka B. 2003.** Immunological response to outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* serotype A: 3 in calves. *Bull Vet Inst Pulawy* 47: 387-394.
 16. **Lashkarbolouki T, Ardestani S, Kariminia A, Ziaee A, Torkabadi E, Ebrahimi M. 2005.** Kinetic study of cytokines production by human peripheral blood mononuclear cells in response to Brucella DNA. *Microbiol Res* 163: 466-472. doi: 10.1016/j.micres.2006.07.012
 17. **Livak KJ, Schmittgen TD. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method. *Methods* 25: 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
 18. **Lu YS, Lai WC, Pakes SP, Nie LC. 1991.** A monoclonal antibody against a *Pasteurella multocida* outer membrane protein protects rabbits and mice against pasteurellosis. *Infect Immun* 59: 172-180.
 19. **Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L. 2002.** CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rα deficient mice: implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 17: 167-178. doi: 10.1016/S1074-7613(02)00367-9
 20. **More JA. 2013.** Efecto de antígenos clostridiales con ácido retinoico sobre la expresión de citoquinas de la respuesta inmune humoral y celular de la mucosa intestinal de crías de alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis de Magister. Lima, Perú: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 104 p.
 21. **Neurath M, Weigmann B, Finotto S, Glickman J, Nieuwenhuis R, Iijima H, Mizoguchi A, et al. 2002.** The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med* 195: 1129-1143. doi: 10.1084/jem.20011956
 22. **Odbileg R, Konnai S, Ohashi K, Onuma M. 2005.** Molecular cloning and phylogenetic analysis of inflammatory cytokines of Camelidae (llama and camel). *J Vet Med Sci* 67: 921-925.
 23. **Odbileg R, Purevtseren B, Batsukh Z, Konnai S, Ohashi K, Onuma M. 2006.** Complete cDNA sequences and phylogenetic analysis of the Th1 and Th2

- cytokines of the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *J Vet Med Sci* 68: 941-946. doi: 10.1292/jvms.68.941
24. **Odbileg R, Purevtseren B, Gantsetseg D, Boldbaatar B, Buyannemekh T, Galmandakh Z, Erdenebaatar J, et al. 2008.** Cytokine responses in camels (*Camelus bactrianus*) vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 vaccine. *J Vet Med Sci* 70: 197-201.
25. **Opal SM, De Palo VA. 2000.** Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117: 1162-1172. doi: 10.1378/chest.117.4.1162
26. **Patil A, Hughes A, Zhang G. 2004.** Rapid evolution and diversification of mammalian α -defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes. *Physiol Genomics* 20: 1-11. doi: 10.1152/physiolgenomics.00150.2004
27. **Rosadio R, Ameghino E, Ramírez A. 1990.** Diagnosis and control of diseases in sheep and alpaca in Peru. In: Improving Andean sheep and alpaca production. Mc Corkle CM (ed). USA: University of Missouri-Columbia Printing Services. p 141-220.
28. **Schroder K, Hertzog P, Ravasi T, Hume D. 2004.** Interferon: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75: 163-189. doi: 10.1189/jlb.0603252
29. **Shah SM, Kumar R, Brah GS, Santra L, Pawar H. 2012.** Differential expression of Th1- and Th2- type cytokines in peripheral blood mononuclear cells of Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*) on TLR2 induction by *B. subtilis* peptidoglycan. *Asian-Australas J Anim Sci* 25: 1021-1028. doi: 10.5713/ajas.2012.12033
30. **Shivachandra S, Kumar A, Mohanty N, Yogisharadhya R. 2017.** Immunogenicity of recombinant Omp16 protein of *Pasteurella multocida* B:2 in mouse model. *Indian J Anim Sci* 87: 29-34.
31. **Tizard IR. 2013.** Veterinary immunology. 9th ed. Philadelphia, USA: Elsevier. 568 p.
32. **Yoo H, Maheswaran SK, Lin G, Townsend EL, Ames TR. 1995.** Induction of inflammatory cytokines in bovine alveolar macrophages following stimulation with *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 63: 381-388.
33. **Zhang H, Ainsworth AJ, Montgomery RD. 1994.** Use of a 35.5 kDa cell membrane composition of *Pasteurella multocida* and an anti-idiotypic antibody to induce protective immunity in Leghorn chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 41:89-100.