

Evaluación de la inmunogenicidad de una proteína recombinante de *Pasteurella multocida* para la prevención de la neumonía aguda en alpacas (*Vicugna pacos*)

Evaluation of the immunogenicity of one recombinant protein for the prevention of acute pneumonia in alpacas (*Vicugna pacos*)

Gerald Moreno-Morales¹, Jorge Maximiliano G.¹, Juan Siuce M.¹, Ana Chero O.¹, Guido Medina S.², Luis Luna E.¹, Raúl Rosadio A.¹, Lenin Maturrano H.¹

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad inmunogénica *in vivo* de una proteína recombinante de membrana externa de *Pasteurella multocida* denominada P6-like (rP6-like). El ensayo de campo se realizó en una unidad de producción alpaquera en Puno, Perú, y el procesamiento de las muestras en la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM. Se formaron 4 grupos de 5 animales, y se inoculó, según el grupo a) solución salina normal, b) bacterina, c) rP6-like, d) combinación de bacterina + rP6-like. Se tomaron muestras de sangre en el día 0, 5, 7, 9, 12 y 15 pos-inoculación. Se diseñaron pruebas de ELISA indirecto de punto único para la cuantificación relativa de anticuerpos específicos anti rP6-like y para anticuerpos anti-proteína total de *P. multocida*. El grupo inoculado con rP6-like mostró elevación significativa de anticuerpos desde el día 7 ($p < 0.05$) hasta el día 15 pos-inoculación. Los demás productos biológicos no presentaron elevación significativa durante el periodo del estudio. El estudio permitió evidenciar la capacidad inmunogénica de la rP6-like, lo cual permite continuar con futuros estudios de eficacia.

Palabras clave: *Pasteurella multocida*; vacuna; P6-like; Omp16; alpaca; ELISA indirecta

¹ Unidad de Biología y Genética Molecular, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² Centro de Investigación y Producción La Raya, Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú

³ Email: amaturranoh@unmsm.edu.pe

Recibido: 2 de abril de 2019

Aceptado para publicación: 8 de junio de 2021

Publicado: 24 de agosto de 2021

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the *in vivo* immunogenic capacity of a recombinant outer membrane protein of *Pasteurella multocida* called P6-like (rP6-like). The field trial was carried out in an alpaca production unit in Puno, Peru, and the processing of the samples was done in the Faculty of Veterinary Medicine of San Marcos University in Lima. Four groups of 5 animals were formed, and they were inoculated according to group with a) normal saline solution, b) bacterin, c) rP6-like, d) combination of bacterin + rP6-like. Blood samples were collected on days 0, 5, 7, 9, 12 and 15 post-inoculation. Single-point indirect ELISA tests were designed for the relative quantification of specific anti-rP6-like antibodies and for total anti-total *P. multocida* protein antibodies. The group inoculated with rP6-like showed significant elevation of antibodies from day 7 ($p < 0.05$) until day 15 post-inoculation. The other biological products did not show significant elevation during the studied period. The study showed the immunogenic capacity of rP6-like, which allows to continue with future efficacy studies.

Key words: *Pasteurella multocida*; vaccine; P6-like; Omp16; alpaca; indirect ELISA

INTRODUCCIÓN

La neumonía aguda de las crías destaca como una de las principales causas de mortalidad en alpacas neonatas y tuis del altiplano en el Perú (FAO, 2005), pudiendo ocasionar mortalidades hasta del 27% (Ramírez, 1989), lo que se traduce en enormes pérdidas económicas por disminución de individuos logrados al destete, menor proporción de hembras y machos de reemplazo, y reducción de la producción de fibra (FAO, 2005).

Pasteurella multocida (PM) es un coccobacilo Gram negativo causante de graves enfermedades en un gran número de especies animales (Hunt *et al.*, 2000). Estas infecciones son causadas por específicos tipos capsulares (A, B, C y D) y serotipos (1-16) (Carter, 1952; Heddleston *et al.*, 1972). Además, es el principal agente bacteriano aislado de casos de neumonía aguda en alpacas. Esta bacteria invade el tejido pulmonar luego de un evento de estrés, como exposición al frío extremo, mala nutrición, o por previa infección viral (Cirilo, 2012; Rosadio *et al.*, 2011). En el Perú ha sido reportado el tipo capsular A y genotipo L6

(Rímac *et al.*, 2017), correspondiente a los serotipos 10, 11, 12 y 15 de PM en alpacas fallecidas por neumonía aguda (Harper *et al.*, 2015).

La pasteurelisis neumónica, nombre que reciben todas las infecciones del parénquima pulmonar provocadas por *P. multocida* es altamente contagiosa y su tratamiento puede ser largo, costoso e inefectivo (Kehrenberg *et al.*, 2001). La prevención mediante medidas de manejo y uso de vacunas son las mejores herramientas para su control (Hurtado *et al.*, 2017). El desarrollo de vacunas implica ensayos *in vitro*, cuyos resultados deben ser evaluados en la especie de destino para medir su inmunogenicidad y eficacia protectora (OIE, 2008). Diversos autores describen a las proteínas de membrana externa (OMPs) como blancos vacunales promisoros en diversas bacterias de importancia en medicina veterinaria, como *Bacillus anthracis*, *Brachispira hyodysenteriae* y *Haemophilus parasuis* (Ariel *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2016). Para la evaluación de la inmunogenicidad de una vacuna usualmente se emplea la prueba de ELISA indirecta, la cual mide el nivel relativo de anticuerpos séricos (Subhash, 2015).

El uso de herramientas bioinformáticas y el conocimiento del genoma de una cepa de *P. multocida* aislado de un brote de neumonía en alpacas (Hurtado *et al.*, 2017) permitió la determinación *in silico* de proteínas fuertemente inmunogénicas de PM, dentro de los cuales la proteína P6-like, una OMP asociada al peptidoglicano, tuvo características ideales para su expresión (Juscamayta *et al.*, 2014). Posteriormente, la inmunogenicidad de la rP6-like fue evaluada *in vitro*, en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de alpaca, donde se corroboró un patrón de expresión celular principalmente de tipo Th2, el cual se relaciona fuertemente con la producción de anticuerpos IgG (Maximiliano *et al.*, 2018). Sin embargo, todavía no se cuenta con estudios que describan el efecto de la rP6-like sobre la inmunidad mediada por anticuerpos en alpacas. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la capacidad inmunogénica *in vivo* de tipo IgG, que puede generar la rP6-like en alpacas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Ejecución

El ensayo de campo se ejecutó en enero de 2017, en el Centro de Investigación y Producción C.I.P. La Raya, de la Universidad del Altiplano. El centro se encuentra en el distrito de Santa Rosa, provincia de Melgar, región Puno, Perú, a 4200 msnm. El procesamiento de las muestras se hizo en la Unidad de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, Perú.

Animales y Material Biológico

Se formaron cuatro grupos de 20 alpacas tuis Huacaya hembras, seleccionadas al azar dentro de un rebaño de aproximadamente 300

tuis hembra. Los animales tenían aproximadamente 12 meses de edad y se encontraban clínicamente sanos. De cada grupo se tomaron cinco animales al azar para el seguimiento. Se inoculó una dosis única de 2 ml a cada animal de cada grupo: G₁ (n=5) 2 x 10⁸ UFC/animal de la bacterina; G₂ (n=5) 10 µg/animal de la proteína recombinante rP6-like; G₃ (n=5) 10 µg de rP6-like + 1 x 10⁸ UFC/animal de ambos productos; G₄ (n=5, grupo control) Solución salina normal. La inoculación se realizó por vía subcutánea, en la región axilar derecha.

Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular los días 0 (tiempo control), 5, 7, 9, 12 y 15. Se centrifugó la sangre a 1600 g durante 10 min. Las muestras de suero recuperadas se mantuvieron a -20 °C hasta su procesamiento en el laboratorio.

Preparación de la bacterina

Se utilizó el protocolo empleado por Hsuan *et al.* (2009). La bacterina está compuesta por una suspensión en Caldo BHI (Brain-Heart Infusion) de *P. multocida* (cepa nativa), aislada de un caso en alpacas de la región de Puno, a una concentración de 1 x 10⁸ UFC/ml. Fue inactivada con formaldehído al 0.25% y como adyuvante fue añadido hidróxido de aluminio al 0.25% (v/v). La bacterina se almacenó a 4 °C y se mantuvo con geles refrigerantes durante el procedimiento de inoculación.

Preparación de la proteína recombinante para inoculación

Se utilizó una vacuna de tipo subunidad compuesta por la proteína denominada rP6-like obtenida en la Unidad de Biología y Genética Molecular (FMV-UNMSM). Luego del procedimiento de purificación, la proteína fue diluida en PBS y mezclada con hidróxido de aluminio. La mezcla se almacenó a 4 °C y se mantuvo con geles refrigerantes durante el procedimiento de inoculación.

Preparación de antígeno total de PM para iELISA

Los antígenos para el inmunoensayo fueron preparados usando el protocolo modificado de Ledesma *et al.* (2016). Para ello, la cepa de *P. multocida* (cepa nativa) fue cultivada en caldo BHI a 37 °C por 24 h, con agitación continua. El medio de cultivo fue centrifugado en tubos Falcon de 50 ml a 7000 g por 15 min y el pellet fue lavado tres veces con buffer fosfato salino PBS. La lisis de las bacterias fue obtenida suspendiendo el pellet en 10 ml de PBS frío y se realizaron tres ciclos de congelación y descongelación en nitrógeno líquido. Se sonicaron las células bacterianas en siete pulsos de 10 s cada uno, y fueron centrifugadas a 12 000 g por 30 min a 4 °C. El sobrenadante fue separado para su uso posterior. La proteína total de PM fue cuantificada mediante fluorimetría usando Qubit™ Thermo Scientific y el lisado fue distribuido en alícuotas y almacenado a -4 °C hasta su uso en iELISA.

Preparación de proteína recombinante para ELISA

Los procedimientos de clonación, expresión y purificación son los mismos que se detallan en «Preparación de la proteína recombinante para inoculación». El producto de esta purificación se cuantificó mediante Qubit™ Thermo Scientific para diluirla con PBS 0.1M y obtener una dilución final de 100 µg/ml. Esta se almacenó en refrigeración a 4 °C hasta su evaluación mediante la prueba de iELISA.

Estandarización de iELISAs

En la estandarización de la primera prueba de ELISA para detección de anticuerpos anti-rP6-like, los pocillos se tapizaron con rP6-like a concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.1 µg/ml y el suero se diluyó a concentraciones de 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, encontrándose concentraciones óptimas de rP6-like de 3.5 µg/ml y en el sue-

ro de 1/200. Para la estandarización de la segunda prueba de ELISA con la proteína total de *P. multocida* se usaron las concentraciones de antígeno de 140, 70, 35, 16.5, 8.25 y 4.1 µg/ml y el suero se diluyó a concentraciones de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 y 1:800, encontrándose concentraciones óptimas de proteína total de 35 µg/ml y en el suero de 1:200. Luego de obtener las concentraciones óptimas de antígeno y suero se probaron concentraciones de agente bloqueante (BSA) de 1, 3 y 5% (m/v), donde se eligió la concentración de 3%. El conjugado y cromógeno fueron usados a las concentraciones recomendadas por los fabricantes.

Materiales para iELISA

Se preparó buffer fosfato salino (PBS) a concentración de 0.1 M, el cual sirvió para dilución de todos los reactivos. El buffer de lavado (PBS-T) consistió en una solución de Tween 20 KPL® diluida en PBS a concentración de 0.05%. El suero problema se diluyó a razón de 1:200 en buffer de dilución, el cual está compuesto de albúmina sérica bovina (BSA) al 3% en PBS 0.1M. El anticuerpo conjugado fue un anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-IgG de llama enlazado a la peroxidasa de rábano picante (HRP) Abcam® a concentración final de 1/20 000. El sustrato cromógeno 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidina (TMB) Sureblue™ se usó a la concentración recomendada por el fabricante (listo para usar). Para todos los procedimientos se usaron placas de poliestireno de alta afinidad de 96 pocillos Corning®.

iELISAs de punto único

Las muestras de suero fueron analizadas por la prueba de ELISA indirecta (iELISA) de punto único siguiendo los protocolos descritos por Ledesma *et al.* (2016) y Shivachandra *et al.* (2017) para tapizado con proteína total de PM y rP6-like, respectivamente. Se utilizaron dos tipos de antígenos para recubrir las placas de poliestireno. La

placa de ELISA fue tapizada con la proteína P6-like diluida en buffer fosfato salino 0.1M (PBS), pH 7.4, a una concentración de 3.5 µg/ml para la evaluación de inmunidad contra la proteína rP6-like. Para la evaluación de la inmunidad contra la bacterina y contra rP6-like + bacterina, se tapizó la placa con 100 µl de proteína total de PM a una concentración de 35 µg/ml mediante incubación a 37 °C durante 1 h. Posteriormente se hicieron tres lavados con 200 µl de PBS-T. Luego se bloquearon los pocillos con 200 µl de BSA 3% a 4 °C durante 16 h. Seguidamente se efectuaron tres lavados con PBS-T y se añadió por duplicado, 100 µl/pocillo de los sueros problema a dilución de 1/200 en solución de dilución, incubándose a 37 °C por 1 h. Se volvieron a realizar tres lavados para luego añadir 100 µl del anticuerpo conjugado con HRP a dilución 1/20 000. Se incubó una vez más a 37 °C por 1 h, se realizaron tres lavados más y se añadió 100 µl sustrato cromógeno (TMB). Finalmente se incubó a temperatura ambiente durante 10 min en la oscuridad. La placa fue leída a una longitud de onda de 650 nm en un espectrofotómetro multicanal Biorad®.

Análisis Estadístico

Se compararon las medianas de OD₆₅₀ del día cero y demás días dentro de los grupos G₁, G₃ y G₄ mediante la prueba de Wilcoxon. Se hizo un segundo análisis comparando las medianas de los OD₆₅₀ del G₄ y del G₂ en cada día de seguimiento mediante la prueba U de Mann-Whitney con un nivel de significancia de 0.05. El software para el análisis estadístico y los gráficos fueron STATA® 15.0 y GraphPadPrism 7®, respectivamente.

Consideraciones Éticas

El manejo de los animales se realizó causando el menor estrés posible. Los muestreos tuvieron una duración promedio de

2 h por día, desde las 07:00 hasta las 09:00 para no interrumpir el horario de alimentación de los animales. El protocolo de toma de muestra de sangre se realizó tomando en cuenta el método publicado por Morton *et al.* (1993).

RESULTADOS

La inoculación de la bacterina (en G₁) produjo un pico de elevación de anticuerpos significativamente superior al del día cero ($p < 0.05$); sin embargo, los niveles de IgG en los días 12 y 15 pos-inoculación no fueron significativamente diferentes al día cero (Figura 1, Cuadro 1). En el Cuadro 2 se observa que 4/5 de animales del G₁ aumentaron los niveles de IgG en el día 15 en comparación con sus niveles basales (día 0).

En el grupo inoculado con P6-like (G₂), desde el séptimo día en adelante se evidenció una elevación significativa de los niveles de IgG con respecto al grupo control ($p < 0.05$), siendo el pico máximo de IgG el día 15 (Figura 2, Cuadro 1). En el Cuadro 3 se visualiza que 5/5 animales del G₂ elevaron los niveles de IgG en el día 15 con respecto al grupo control.

En el G₃, la inoculación de rP6-like + bacterina no estimuló un aumento significativo en los días de seguimiento con respecto al día cero ($p > 0.05$) (Figura 3, Cuadro 1). En el Cuadro 4 se observa que 3/5 animales disminuyeron sus niveles de IgG en el séptimo día, y 5/5 animales disminuyeron sus niveles de IgG en el día 15 con respecto al día cero.

El grupo control no mostró variaciones significativas en los niveles de IgG durante los periodos de evaluación. Además, la desviación estándar fue pequeña en cada día de seguimiento ($SD \leq 0.10$) (Cuadro 1). Individualmente, los niveles de IgG disminuyeron hasta el día 15 (Cuadro 5).

Cuadro 1. Medidas de tendencia central y de dispersión de los cuatro grupos experimentales: (G₁) inoculado con bacterina, (G₂) inoculado con proteína rP6-like, (G₃) inoculado con bacterina + rP6-like, (G₄) control

Día	Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4		
	Media ¹	DE	EE	Media ²	DE	EE	Media ¹	DE	EE	Media ¹	DE	EE
0	0.440 ^a	0.097	0.043	0.572 ^a	0.187	0.840	0.575 ^a	0.182	0.082	0.480 ^a	0.097	0.043
5	0.401 ^a	0.031	0.037	0.528 ^a	0.148	0.066	0.500 ^a	0.130	0.058	0.430 ^a	0.093	0.042
7	0.441 ^a	0.111	0.050	0.847 ^b	0.121	0.054	0.443 ^a	0.067	0.030	0.446 ^a	0.083	0.037
9	0.581 ^b	0.060	0.027	0.894 ^c	0.241	0.130	0.553 ^a	0.063	0.028	0.412 ^a	0.100	0.045
12	0.554 ^a	0.133	0.060	1.090 ^d	0.549	0.160	0.565 ^a	0.070	0.031	0.412 ^a	0.064	0.028
15	0.577 ^a	0.088	0.040	1.092 ^e	0.281	0.169	0.609 ^a	0.052	0.023	0.433 ^a	0.081	0.037

¹ Promedios en la misma columna con letras diferentes son estadísticamente diferentes con respecto al día 0 de su mismo grupo ($p < 0.05$)

² Promedios en la columna del grupo inoculado con la rP6-like (G₂) con letras diferentes son significativamente diferentes con el grupo control (G₄)

DE: Desviación estándar; EE: Error estándar

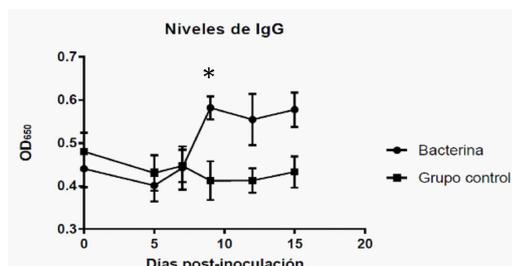


Figura 1. Resultados del ELISA para los niveles promedio de IgG (OD₆₅₀) anti-proteína total de *Pasteurella multocida* en el grupo inoculado con una bacteria (G₁). Las barras de error son los errores estándar. *: Valor diferente al día cero ($p < 0.05$)

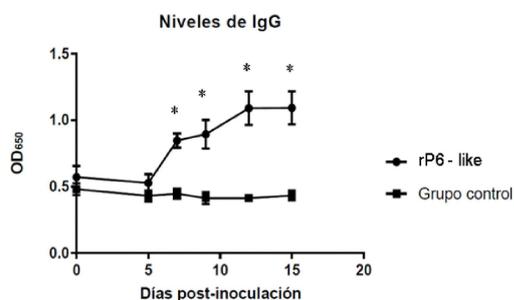


Figura 2. Resultados del ELISA para los niveles de IgG (OD₆₅₀) anti-rP6-like en el grupo inoculado con P6-like (G₂). Las barras de error son los errores estándar. *: Valor diferente al día cero del grupo control ($p < 0.05$)

La zona de inoculación de no presentó alteraciones inflamatorias ni signos de enfermedad en ninguno de los animales.

DISCUSIÓN

El producto biológico que generó la mayor cantidad de anticuerpos con relación al día cero fue la rP6-like. Estos resultados complementan los hallazgos de Maximiliano *et al.* (2018), quienes encontraron que la rP6-like estimula una respuesta de tipo Th2 (IgG). Sumado a esto, los resultados concuerdan con Sivachandra *et al.* (2017), quienes obtuvieron una elevación significativa de la IgG en el día 21 en ratones. No obstante, la elevación de IgG no fue tan marcada como los llevados a cabo en estudios en ratones (Okay *et al.*, 2012; Shivachandra *et al.*, 2014) debido, probablemente, a que las alpacas ya estaban expuestas a la proteína P6-like. Los resultados de la proteína son más alentadores a corto plazo que los demás productos biológicos, probablemente, debido a que la naturaleza proteica de la P6-like produjo un mayor estímulo sobre las células CD4⁺ Th2, con la consecuente formación de centros

Cuadro 2. Densidades ópticas para los niveles de IgG (OD₆₅₀) anti-proteína total de *Pasteurella multocida* en cada animal inoculados con la bacterina (G₁)

Animal	Días pos-inoculación					
	0	5	7	9	12	15
1	0.438	0.355	0.425	0.606	0.566	0.636
2	0.501	0.442	0.507	0.541	0.492	0.494
3	0.539	0.525	0.512	0.561	0.546	0.696
4	0.437	0.316	0.511	0.675	0.765	0.566
5	0.285	0.367	0.252	0.526	0.403	0.495

Cuadro 3. Densidades ópticas para los niveles de IgG (OD₆₅₀) anti-rP6-like en cada uno de los animales inoculados con la rP6-like (G₂)

Animal	Días pos-inoculación					
	0	5	7	9	12	15
1	0.687	0.609	0.866	1.019	1.285	1.327
2	0.581	0.435	0.639	0.665	0.747	0.812
3	0.803	0.748	0.940	1.050	1.284	1.416
4	0.470	0.465	0.924	0.603	0.819	0.825
5	0.320	0.384	0.865	1.132	1.316	1.081

Cuadro 4. Densidades ópticas para los niveles de IgG (OD₆₅₀) anti-proteína total de *Pasteurella multocida* en cada animal inoculado con la bacterina + rP6-like (G₃)

Animal	Días pos-inoculación					
	0	5	7	9	12	15
1	0.865	0.634	0.354	0.620	0.656	0.638
2	0.401	0.354	0.479	0.541	0.504	0.533
3	0.620	0.479	0.506	0.461	0.486	0.583
4	0.539	0.398	0.388	0.539	0.598	0.625
5	0.450	0.634	0.490	0.605	0.583	0.666

Cuadro 5. Densidades ópticas para los niveles de IgG (OD₆₅₀) anti rP6-like en cada animal inoculado con solución salina normal (G₄)

Animal	Días pos-inoculación					
	0	5	7	9	12	15
1	0.546	0.415	0.479	0.456	0.433	0.487
2	0.467	0.446	0.477	0.377	0.410	0.396
3	0.428	0.450	0.366	0.346	0.389	0.425
4	0.356	0.290	0.357	0.317	0.327	0.322
5	0.603	0.549	0.554	0.566	0.503	0.534

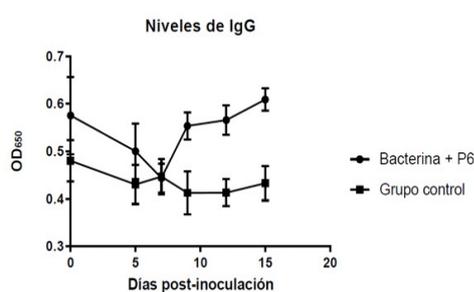


Figura 3. Resultados del ELISA para los niveles promedio de IgG (OD₆₅₀) anti-proteína total de *Pasteurella multocida* en el grupo inoculado con rP6-like + bacterina (G₃). Las barras de error son los errores estándar

germinativos y generación de células B de memoria, ya que ha sido una exposición secundaria al antígeno, lo cual es compatible con lo formulado por Vinuesa *et al.* (2005) y Siegrist (2008).

La bacterina produjo una elevación de anticuerpos a partir del noveno día, pero decayeron al día 15. Estos resultados son compatibles con los hallazgos de Sun (2009), quien reportó una pobre inmunogenicidad estimulada por una bacterina de *P. multocida* inoculada en ovejas. Esta ineficacia de las bacterinas también se ha observado en estudios con *Mycoplasma hyopneumoniae* (Fisch *et al.*, 2016), *Actinobacillus pleuropneu-*

moniae (Shao *et al.*, 2010) y *Streptococcus suis* (Hsueh *et al.*, 2017). Este suceso podría deberse a la composición múltiple de la bacterina que conlleva a una pobre estimulación de los centros germinativos (Siegrist, 2008). Esto también ha podido ocurrir debido a la disminución en la concentración de las proteínas P6-like expresadas por la cepa de *P. multocida* por la «domesticación» de la cepa laboratorial (Fisch *et al.*, 2016).

Los dos productos combinados no resultaron en una elevación de los niveles de anticuerpos, a diferencia del trabajo de Hsuan *et al.* (2009), quienes comprobaron que los anticuerpos aumentan considerablemente al inmunizar cerdos con rPMT junto con una bacterina. El resultado del presente estudio pudo deberse a que la bacterina posee un efecto deletéreo o anérgico, tal como los expuestos en el estudio de Dabo *et al.* (2007). Si este fuera el caso, la bacterina junto con la rP6-like podría ser una mala combinación para continuar con ensayos de validación.

El grupo control presentó ligeras desviaciones con respecto a la media del día 0 (Figuras 1-3), posiblemente debido a factores no controlados, como la temperatura ambiental, la cual es un factor influyente sobre la reactividad de los monocitos (Arias *et al.*, 2016). El tiempo control de todos los grupos (día 0) presentó también niveles muy altos de

anticuerpos a diferencia de otros estudios (Okay *et al.*, 2012; Shivachandra *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2017) debido a que, probablemente, *P. multocida* presente en la microbiota estimuló la producción de anticuerpos anti rP6-like y anti-proteína total de *P. multocida* (De Steenhuijsen *et al.*, 2015). Esto representa una limitante de las pruebas serológicas en agentes que forman parte de la microbiota; sin embargo eso no ha sido un impedimento para comprobar la eficacia vacunal, tal es el caso de la vacuna contra la enterotoxemia en alpacas (Rosadio *et al.*, 2012).

Adicionalmente se comprobó que la inoculación de los tres productos biológicos no produce efectos adversos visibles en animales jóvenes, lo cual contribuye a los estudios de inocuidad. Estos resultados son compatibles con los trabajos de Moreno *et al.* (2016) y de Shivachandra *et al.* (2017) en alpacas y ratones, respectivamente.

Dentro de las limitaciones de este estudio, los resultados de densidades ópticas de los tres productos biológicos no fueron comparables, debido a las dos pruebas de iELISA que se utilizaron para la medición de IgG (Crowther *et al.*, 2009). Así mismo, el tamaño de muestra reducido utilizado en el ensayo limitó el poder estadístico; sin embargo, las diferencias encontradas entre G_1 y el grupo control fueron suficientes para no atribuir las al error aleatorio (Triola *et al.*, 2009). Por otro lado, el uso exclusivo de hembras tuis limita la generalización de los resultados, pese a que aún no existe evidencia que la inmunidad humoral sea diferente entre alpacas macho y hembra, a diferencia de ovinos (Sun, 2009).

Estos primeros ensayos con la proteína recombinante han permitido conocer su capacidad inmunogénica, pues se ha logrado establecer que rP6-like es capaz de generar anticuerpos específicos de manera significativa y la respuesta generada en estos primeros ensayos indican que, de manera prelimi-

nar, podría actuar mejor sola que en combinación con una bacterina. Serán necesarios más estudios para conocer el nivel mínimo protector de anticuerpos y la eficacia de la vacuna elegida.

CONCLUSIÓN

La rP6-like estimula la producción de anticuerpos IgG en alpacas tui hembras.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad INNÓVATE Perú (FINCyT), Proyecto Contrato N.º 133-FINCyT-IB-2013 «Vacunología reversa: Desarrollo de una vacuna de nueva generación para el control y/o prevención de la neumonía pasteurelósica en alpacas», y al Programa de Promoción de Tesis de Pregrado del Vicerrectorado de Investigación y Postgrado - UNMSM, 2017, 2^{da} Etapa, por su apoyo en el financiamiento del presente trabajo. También, se agradece a todo el equipo del CIP «La Raya» UNA, por el apoyo decisivo en la logística y muestreo de campo, así como a Dennis Carhuaricra Huamán, Raquel Quino Quispe y Carla Durán Gonzales por los consejos recibidos y el apoyo sustancial en el análisis de muestras en el laboratorio.

LITERATURA CITADA

1. **Arias N, Velapatinoa B, Hunga A, Cokb J. 2016.** Cytokines expression in alpacas and llamas exposed to cold stress. *Small Ruminant Res* 141: 135-140. doi: 10.1016/j.smallrumres.2016.-07.016
2. **Ariel N, Zvi A, Grosfeld H, Gat O, Inbar Y, Velan B, Cohen S, Shafferman A. 2002.** Search for potential vaccine candidate open reading frames in the *Bacillus anthracis* virulence plasmid pXO1: *in silico* and *in vitro* screening. *Infect Immun* 70: 6817-6827. doi: 10.1128/IAI.70.12.6817-6827.2002

3. **Carter GR. 1952.** The type specific capsular antigen of *Pasteurella multocida*. *Can J Med Sci* 30: 48-53. doi: 10.1139/cjms52-008
4. **Cirilo CE, Manchego SA, Rivera HH, Rosadio AR. 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
5. **Crowther JR. 2009.** Methods in molecular biology: the ELISA guidebook. 2nd ed. Austria: Humana Press. 564 p.
6. **De Steenhuijsen PW, Sanders EA, Bogaert D. 2015.** The role of the local microbial ecosystem in respiratory health and disease. *Philos T Roy Soc B* 370: 20140294. doi: 10.1098/rstb.2014.0294
7. **Dabo SM, Taylor JD, Confer AW. 2007.** *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev* 8: 129-50. doi: 10.1017/S146625-2307001399
8. **[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2005.** Situación actual de los camélidos sudamericanos en el Perú: Proyecto de cooperación técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región andina. Roma: FAO. [Internet]. Disponible en: https://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/zootecnia_archivos/situacion%20alpcas%20peru.pdf
9. **Fisch A, Marchioro B, Klazer C, Galli V, Rodrigues N, Simionatto S, Odier Dellagostin A, et al. 2016.** Commercial bacterins did not induce detectable levels of antibodies in mice against *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens strongly recognized by swine immune system. *Trials Vaccinol* 5: 32-37. doi: 10.1016/j.trivac.2016.01.001
10. **Harper M, John M, Turni IC, Edmunds M, Michael FST, Adler B, Blackall PJ, et al. 2015.** Development of a rapid multiplex PCR to genotype *Pasteurella multocida* strains using the lipopolysaccharide outer core biosynthesis locus. *J Clin Microbiol* 53: 477-485. doi: 10.1128/JCM.02824-14
11. **Heddleston KL, Gallagher JE, Rebers PA. 1972.** Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis* 16: 925-936. doi: 10.2307/1588773
12. **Hsuan SL, Liao CM, Huang C, Winton JR, Chen ZW, Lee WC. 2009.** Efficacy of a novel *Pasteurella multocida* vaccine against progressive atrophic rhinitis of swine. *Vaccine* 27: 2923-2929. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.03.005
13. **Hsueh K, Cheng L, Lee J, Chung Y, Chung W, Chu C. 2017.** Immunization with *Streptococcus suis* bacterin plus recombinant Sao protein in sows conveys passive immunity to their piglets. *BMC Vet Res* 13: 1-9. doi: 10.1186/s12917-016-0937-8
14. **Hunt ML, Adler B, Townsend KM. 2000.** The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* 72: 3-25. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.-03.005
15. **Hurtado R, Aburjaile F, Mariano D, Canario M, Benevides L, Fernandez D, Allasi N, et al. 2017.** Draft genome sequence of a virulent strain of *Pasteurella multocida* isolated from alpaca. *J Genomics* 5: 68-70. doi: 10.7150/jgen.19297
16. **Juscamayta E, Maturrano L, Fernández D, Hurtado R, Allasi N, Rosadio R. 2014.** Whole genome analysis of *Pasteurella multocida* strain UNMSM to identify potential vaccine candidates against acute pneumonia. In: SCB-Latin American meeting on bioinformatics with BSB. Sao Paulo.
17. **Kehrenberg C, Tanzil GS, Martel JL, Dancla EC, Schwarz S. 2001.** Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. *Vet Res* 32: 323-339. doi: 10.1051/vetres:2001128
18. **Ledesma MM, Díaz AM, Barberis C, Vay C, Manghi MA, Leoni J, Castro MS, Ferrari A. 2016.** Identification of *Lama glama* as reservoirs for *Acinetobacter lwoffii*. *Front Microbiol* 8: 278. doi: 10.3389/fmicb.2017.00278

19. **Li M, Li C, Song S, Kang H, Yang D, Li G 2016.** Development and antigenic characterization of three recombinant proteins with potential for Glässer's disease prevention. *Vaccine* 34: 2251-2258. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.03.014
20. **Maximiliano J, Maturrano L, Luna L, Hurtado R, Chero A, Rosadio R. 2018.** Evaluación de la inmunogenicidad de una proteína recombinante de una *Pasteurella multocida* aislada de alpacas con neumonía. *Rev Inv Vet Perú* 29: 339-348. doi: 10.15381/rivep.v29i1.-14197
21. **Moreno-Morales G, Maximiliano GJ, Medina SG, Rosadio AR, Maturrano HL. 2016.** Evaluación de la inocuidad de una bacterina de *Pasteurella multocida* para la prevención de neumonía aguda en crías de alpaca. En: XXII Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. Huánuco, Perú.
22. **Morton DB, Abbot D, Barclay R, Close BS, Ewbank R, Gask D, Heath M, et al. 1993.** Removal of blood from laboratory mammals and birds. *Laboratory Animals* 27: 1-22.
23. **[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2008.** Principios de producción de vacunas veterinarias. Manual de la OIE sobre animales terrestres. 17 p. [Internet]. Disponible en: https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/1.01.08_Principios_produccion_vacunas_veterin.pdf
24. **Okay S, Özcengiz E, Gürsel I, Özcengiz G 2012.** Immunogenicity and protective efficacy of the recombinant *Pasteurella* lipoprotein E and outer membrane protein H from *Pasteurella multocida* A: 3 in mice. *Res Vet Sci* 93: 1261-1265. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.-05.011
25. **Ramírez A. 1989.** Enfermedades infecciosas en camélidos sudamericanos. En: XII Reunión Científica Anual APPA. Lima: Asociación Peruana de Producción Animal.
26. **Rímac R, Luna L, Hurtado R, Rosadio R, Maturrano L. 2017.** Detection and genetic characterization of *Pasteurella multocida* from alpaca (*Vicugna pacos*) pneumonia cases. *Trop Anim Health Pro* 49: 1325-1328. doi: 10.1007/s11250-017-1309-5
27. **Rosadio R, Cirilo E, Manchego A, Rivera H. 2011.** Respiratory syncytial and Parainfluenza type 3 viruses coexisting with *Pasteurella multocida* and *Mannheimia hemolytica* in acute pneumonias of neonatal alpacas. *Small Ruminant Res* 97: 110-116. doi: 10.1016/j.smallrumres.2011.02.001
28. **Siegrist C. 2008.** Correlates of vaccine-induced immunity. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA (eds). 5th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier. p 17-36.
29. **Shao M, Wang Y, Wang C, Yang Guo, Peng Y, Liu J, Li G 2010.** Evaluation of multicomponent recombinant vaccines against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice. *Acta Vet Scand* 52: 1-8. doi: 10.1186/1751-0147-52-52
30. **Shivachandra SB, Kumar A, Yogisharadhya R. 2014.** Immunogenicity of highly conserved recombinant VacJ outer membrane lipoprotein of *Pasteurella multocida*. *Vaccine* 32: 290-296. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.10.075
31. **Shivachandra SB, Kumar A, Mohanty NN and Yogisharadhya R. 2017.** Immunogenicity of recombinant Omp16 protein of *Pasteurella multocida* B: 2 in mouse model. *Indian J Anim Sci* 87: 29-34.
32. **Song Y, La T, Phillips ND, Bellgard MI, Hampson DJ. 2009.** A reverse vaccinology approach to swine dysentery vaccine development. *Vet Microbiol* 137: 111-119. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.-12.018
33. **Sun T. 2009.** Evaluation of a vaccine of vaccine against *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in sheep. PhD Thesis. USA: Cornell University. 47 p.

34. **Subhash K. 2015.** Development of ELISA techniques for haemorrhagic septicaemia. *Int J Bioassays* 4: 457-4577.
35. **Triola M. 2009.** Estadística. 10° ed. México. Pearson. 904 p.
36. **Vinuesa CG, Tangye SC, Moser B. 2005.** Follicular B helper T cells in antibody responses autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 5: 853-865. doi: 10.1038/nri1714
37. **Wei X, Wang Y, Luo R, Qian W, Sizhu S, Zhou H. 2017.** Identification and characterization of a protective antigen, PlpB of bovine *Pasteurella multocida* strain LZ-PM. *Dev Comp Immunol* 71: 1-7. doi: 10.1016/j.dci.2017.01.017