

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

OBTENCION DE UNA PROTEINA RECOMBINANTE PsaA DE
Streptococcus pneumoniae, HOMOLOGA A UNA DE *Streptococcus equi*

JOSE LUIS ELIAS BECERRA MARTINEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUIA: MARIA LUISA SANCHEZ CHONG

PROFESOR COLABORADOR: ABEL VASQUEZ VELOSO

SANTIAGO, CHILE
2005

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

OBTENCION DE UNA PROTEINA RECOMBINANTE PsaA DE
Streptococcus pneumoniae, HOMOLOGA A UNA DE *Streptococcus equi*

JOSE LUIS ELIAS BECERRA MARTINEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA : MARIA LUISA SANCHEZ C.
PROFESOR CONSEJERO : ADOLFO GODOY P.
PROFESOR CONSEJERO : CLAUDIO ZUÑIGA M.

SANTIAGO, CHILE
2005

AGRADECIMIENTOS

No puedo cerrar este ciclo de mi vida sin dejar plasmados mis sentimientos, al menos, en un par de líneas. Es que la realización de esta memoria marcó mi vida para siempre, nunca pensé en lo trascendental que se convertiría haber tomado la decisión de buscar una memoria de título en un lugar alejado de mi casa de estudio. Han sido dos años en los que he vivido intensamente y mirar hacia atrás, ahora con el sol a mi espalda, me da una gran emoción. Esta memoria de título no habría podido realizarse sin la ayuda de todas las personas que conforman el Centro de Investigación y Desarrollo del Instituto de Salud Pública de Chile. Gracias Abel por tu paciencia en mis momentos difíciles y por haber confiado en mi, gracias Patricia por tu dedicación, gracias Bárbara por tu apoyo, gracias Sra. Isabel por su buena disposición, muchas gracias América por tu sonrisa. También quiero agradecer a Sra. Mariana, Sra. María Elena y Don Manuel por el apoyo brindado. Un agradecimiento especial a Isolée, Silvia, Pabla, Claudia Mancilla, Fernando y pancho, mis compañeros de laboratorio que siempre me ayudaron y con quienes compartí momentos imborrables.

Debo agradecer también a todas las personas de la Pontificia Universidad Católica de Chile que siempre tuvieron la mejor disposición para ayudar, en especial Susan Bueno y Elsa.

A mis padres Teresa y Jorge, mis abuelos Pepe y Alda, mi amada esposa Isolée y mi bebé. Son las personas que le dan sentido a mi vida.

RESUMEN

Los estreptococos patógenos para los equinos incluyen *S. equi* subsp. *equi* (*S. equi*), *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* y *S. pneumoniae* cápsula Tipo III. *S. equi* causa gurma, una linfadenitis purulenta altamente contagiosa que afecta a los miembros de la familia Equidae. Rápidos progresos se han realizado para la identificación de factores de virulencia y proteínas de *S. equi*. La mayoría de éstas son expresadas en la superficie bacteriana o son secretadas. Se ha demostrado la presencia de una proteína homóloga a la pneumococcal surface adhesin A (PsaA) de *S. pneumoniae*, en *S. zooepidemicus* y *S. equi*. La PsaA de *S. pneumoniae*, como otras proteínas, es inmunogénica y protege animales de laboratorio ante un desafío con neumococos.

El objetivo de esta memoria fue obtener desde un aislado clínico de *S. pneumoniae*, una PsaA recombinante purificada desde *E. coli* BL21DE3. La metodología consistió en amplificar el gen *PsaA* por PCR y ligarlo al plasmidio de clonamiento (pETBlue-1), luego con la mezcla de ligación *PsaA*/pSTBlue-1 se transformó la cepa *E. coli* DH5 α ; de las colonias transformadas, se purificó el plasmidio (*PsaA*/pSTBlue-1) por lisis alcalina, el cual fue sometido a digestión doble y, el fragmento liberado, fue ligado finalmente a un vector de expresión (pET-15b). Con la mezcla de ligación *PsaA*/pET-15b, se transformó la cepa *E. coli* BL21DE3, que expresó una proteína fusionada a una cola de histidina; la proteína fusionada, a su vez, se purificó en una columna con afinidad por histidina (Ni-Nta). La presencia de rPsaA fue analizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y por Western blot, observándose la presencia de una proteína de 37 kDa., con la que reaccionó específicamente el anticuerpo policlonal de conejo anti *His-tag*.

La secuencia nucleotídica del fragmento fue comparada en la base de datos BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov), encontrándose un 98% de identidad con la cepa *S. pneumoniae* R6. Además se identificaron cuatro regiones, con identidades superiores al 80%, similares a las del gen parcial *mba* de la proteína ligadora de metal/adhesina de *S. equi*, homóloga a PsaA de *S. pneumoniae*.

El producto obtenido permitirá realizar estudios de formulación y evaluación, en modelo animal, de un prototipo de vacuna contra el gurma, basado en la proteína PsaA de *S. pneumoniae*.

SUMMARY

Streptococci pathogenic for the horse include *S. equi* subsp. *equi*, *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* and *S. pneumoniae* capsule Type III.

S. equi causes strangles, a highly contagious purulent lymphadenitis of members of the family Equidae. Rapid progress has been made in identification of virulence factors and proteins expressed by *S. equi*. Most of these are expressed either on the bacterial surface or are secreted. Has be demonstrate the presence of a homologue of the *S. pneumoniae* pneumococcal surface adhesin A (PsaA) protein in both *S. zooepidemicus* and *S. equi*.

S. pneumoniae PsaA, like other proteins are immunogenic and protective against pneumococcal challenge in laboratory animals.

The objective of this memory was to obtain PsaA from a clinical isolated to *S. pneumoniae* and purify the recombinant PsaA obtained from *E. coli* BL21DE3. The protocol to consist of amplification to *PsaA* gene by PCR and bind into cloning plasmid (pETBlue-1), then the strain *E.coli* DH5 α was transformed with the mix of binding *PsaA*/pETBlue-1; the plasmid (*PsaA*/pETBlue-1) was purify by lysis alkaline from colony transform, the *PsaA* amplicon was double digesting and, the gene fragment was ligated into expression plasmid (pET-15b). The strain *E.coli* BL21DE3 was transformed with the mix of binding *PsaA*/pET-15b that expressed a histidina tagged fusion protein; the fusion protein was purified by column with histidine (Ni-Nta). The presence of rPsaA was analyzed by polyacrilamide gel and Western blot análisis, it appeared a 37 kDa. protein, that reacted with the rabbit polyclonal anti-His-tag.

The nucleotide sequence of gene fragment was compared in BLAST data base (www.ncbi.nlm.nih.gov), finding a 98% identical with the strain *S. pneumoniae* R6. Moreover were identify four region, with identity up 80%, with the partial *mba* gene for putative metal/adhesin protein of *S. equi*, homologous to *S. pneumoniae* PsaA.

This product will allow to realize studies to formulation and evaluation, in animal model, of a vaccine prototype again strangle, based in *S. pneumoniae* PsaA protein.

INDICE

	Pag.
Introducción	1
Revisión bibliográfica.....	2
1. Mecanismos de patogenicidad bacteriana.....	2
1.1. Estructura.....	2
1.2. Estrategia.....	3
2. Género.....	4
3. <i>Streptococcus equi</i>	5
4. Base molecular de la virulencia de <i>Streptococcus equi</i>	5
4.1. Adherencia.....	6
4.2. Evasión a las defensas del hospedero.....	7
4.3. Adquisición de nutrientes.....	8
5. Gurma o papera equina.....	9
5.1. Control del gurma.....	10
5.2. Inmunidad y vacunas.....	10
6. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	13
6.1. Vacunas.....	13
7. Pneumococcal surface adhesin A (PsaA).....	14
7.1. Funciones de la proteína PsaA.....	15
7.1.1. Adhesina.....	15
7.1.2. Transportador ABC.....	15
7.2. Inmunidad de la proteína PsaA.....	16

Objetivos.....	18
Material y Métodos.....	19
Resultados.....	28
Discusión.....	35
Conclusión.....	40
Bibliografía.....	41
Anexo 1.....	50
Anexo 2.....	51
Anexo 3.....	53

INTRODUCCIÓN

El uso de vacunas, tanto en seres humanos como animales, es uno de los métodos más eficaces para controlar las enfermedades infecciosas bacterianas y virales. En la búsqueda de nuevos métodos que brinden protección a las poblaciones y en forma más segura y económica, la tecnología se ha desarrollado a tal punto que ya no es necesario utilizar un patógeno completo para estimular el sistema inmune de un hospedero. Hoy en día, mediante ingeniería genética se obtienen fracciones o sub-unidades de un microorganismo que estimulan una respuesta inmune protectora; estas vacunas están compuestas, en su mayoría de fracciones proteicas, extraídas directamente del patógeno o bien de una bacteria que ha incorporado el gen que codifica ese antígeno y sintetiza una proteína llamada recombinante muy similar a la nativa; otras vacunas incorporan ese gen a un plásmido que, así inoculado como vacuna en células eucariontes, sintetizará la proteína antigénica.

El gurma en equinos es una enfermedad infecciosa, producida por *Streptococcus equi*, y que afecta principalmente a los potrillos. Se caracteriza por ser una infección supurativa de las vías aéreas superiores, con formación de abscesos en la faringe y región sub-maxilar, los que después drenan. El cuadro se acompaña de fiebre, descargas nasales, anorexia, etc, con morbilidad hasta 100% y mortalidad del 10%. Las pérdidas económicas que se generan hacen necesario utilizar, además de antibióticos, una vacuna que proteja eficientemente.

Los inmunógenos utilizados en Chile son principalmente bacterinas; sin el éxito esperado porque en su elaboración pierden características antigénicas y, por lo tanto, disminuye su efectividad protectora.

En la literatura se han citado varias proteínas candidatas para realizar estudios de protección como vacunas de sub-unidad contra el gurma; una es la proteína PsaA de *S. pneumoniae*, que presenta homología con proteínas encontradas en *S. equi* y en otras bacterias del Género *Streptococcus*.

La proteína PsaA de *S. pneumoniae* es inmunogénica, está presente en los 90 serotipos de dicha especie y está relacionada con la virulencia de la cepa. Se ha considerado interesante la obtención de una proteína PsaA de esa especie, en forma recombinante, que podría tener aplicación inmunológica contra el gurma equino.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Para establecer y mantener una infección exitosa, los patógenos microbianos han desarrollado varias estrategias para invadir y evadir o resistir la respuesta inmune innata del hospedero, dañando así las células y multiplicándose en regiones específicas normalmente estériles (Cossart y Sansonetti, 2004). Las bacterias patógenas constantemente entrecruzan señales con sus hospederos, modulando la expresión de diversos genes tanto en las bacterias como en las células del hospedero. Señales fisiológicas como la concentración de calcio, el pH ácido, temperaturas altas y baja concentración de fierro, entre otros, gatillan la expresión de diversos genes de virulencia (Martínez y Baquero, 2002). Las nuevas enfermedades infecciosas, las re-emergentes y el aumento en la prevalencia de cepas resistentes a antibióticos son una amenaza para la salud pública. Hay evidencia que bacterias patógenas marcadamente diferentes usan estrategias comunes para causar infección y enfermedad. Esto se relacionaría con la adquisición de grandes bloques de genes de virulencia desde un ancestro microbiano común, diseminándose por transferencia horizontal. Las estrategias moleculares usadas por las bacterias para interactuar con el hospedero pueden ser únicas para patógenos específicos o conservadas en diferentes especies (Wilson *et al.*, 2002).

1. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD BACTERIANA

1.1. ESTRUCTURA

- Cápsula: la presencia de ésta es uno de los mayores factores de virulencia de las bacterias, dado que las protege de antibióticos y de la respuesta inmune del hospedero por ser antifagocítica (Wilson *et al.*, 2002).

- Pared celular: las bacterias según su estructura de pared se dividen en Gram positivas y Gram negativas. Ambas paredes contienen componentes tóxicos que son potentes factores de virulencia y tienen un rol central en la patogénesis del shock séptico. Estos tóxicos estimulan monocitos y macrófagos con la posterior liberación de citoquinas pro inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleuquina-1. El lipopolisacárido (LPS) o endotoxina, de las bacterias Gram negativas es el principal

responsable de la inducción del shock séptico. La pared de las Gram positivas no tienen endotoxinas, pero el péptidoglicano y ácido teicoico, constitutivos de su pared, potencian el shock séptico (Wilson *et al.*, 2002).

- Adhesinas: la primera interacción entre patógenos y células hospederas, durante la colonización de tejidos, es mediada por adhesinas de la superficie del microorganismo, que reconocen y ligan a receptores específicos de las células hospederas. El receptor ligado puede desencadenar complejas cascadas que activan la defensa innata del hospedero o la afectan, facilitando la colonización o invasión bacteriana. Esta interacción induce la expresión de genes en el microorganismo, importantes en la patogénesis (Soto y Hultgren, 1999).

Las adhesinas pueden ser polipéptidos o polisacáridos; las primeras pueden ser fimbrial o pili y, no fimbrial. Las fimbrias son apéndices que protruyen desde la superficie bacteriana. Las no fimbriales generalmente tienen un contacto más íntimo con las células del hospedero que las fimbrias. Las adhesinas polisacáridas son usualmente componentes de la membrana, de la pared o de la cápsula bacteriana. El ácido teicoico sirve como adhesina para *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp. (Wilson *et al.*, 2002).

1.2. ESTRATEGIA

- Invasión: la invasión puede ser extracelular o intracelular; la primera ocurre cuando un microorganismo rompe las barreras de un tejido y se disemina en el hospedero permaneciendo fuera de las células, por ejemplo *Streptococcus* β hemolíticos y *Staphylococcus aureus*. Estas especies secretan enzimas que degradan moléculas de las células del hospedero (Wilson *et al.*, 2002). La invasión intracelular comienza con la interacción adhesina-receptor. Algunos patógenos ligan una proteína que puede ser puente entre la bacteria y un receptor de transmembrana, que media la entrada de la bacteria. Finalmente, otros patógenos pueden eludir el primer paso de adhesión e interactuar directamente con la célula (Cossart y Sansonetti, 2004).

- Vida intracelular: luego de la internalización, la bacteria permanece en una vacuola o escapa al citosol. La que replica en la vacuola sobrevive en un ambiente hostil. En macrófagos, estas condiciones son más drásticas. Existen dos grandes estrategias para la sobrevivencia: (1) la bacteria se adapta y resiste a las condiciones hostiles; (2) alternativamente,

la bacteria puede alterar la biogénesis y dinámica de su vacuola, creando para ella un nicho menos hostil (Cossart y Sansonetti, 2004).

- Toxinas: son moléculas proteicas o no proteicas que destruyen o dañan las células del hospedero. El LPS y el ácido teicoico son ejemplos de no proteicas; las proteicas son, generalmente, enzimas secretadas a las células eucariontes o inyectadas directamente en el citoplasma de ellas (Wilson *et al.*, 2002).

- Resistencia a los antibióticos: el uso extenso de antibióticos ha hecho emerger cepas resistentes a ellos y representan un serio problema actual (Wilson *et al.*, 2002). La aparición de cepas multidroga resistentes se relaciona claramente con la cantidad de antibióticos y como ellos son utilizados (Levy, 2002).

2. GÉNERO *Streptococcus*

Son bacterias cocáceas Gram positivas que se encuentran en seres humanos y animales; algunas especies son patógenas y otras comensales. Se aíslan de la flora normal de piel y mucosas de los tractos respiratorio, digestivo y genital. Los del grupo viridans forman parte de la flora normal de la placa bacteriana dental (Ruoff *et al.*, 2003). El Género se divide en dos grupos: los β hemolíticos y los no β hemolíticos; en el primero se encuentran los del grupo C de Lancefield conformado por *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*), *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (*S. dysgalactiae*), *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (*S. equisimilis*) y *Streptococcus equi* subsp. *equi* (*S. equi*). Estos streptococos del grupo C son comensales o patógenos de animales, incluyendo equinos, bovinos, ovinos, cerdos y cobayos. Además, en seres humanos, se pueden encontrar como parte de la flora normal de piel, vagina y nasofaringe y, en ocasiones se asocian a faringitis, neumonitis, peritonitis, artritis séptica, endocarditis, y meningitis, entre otras. Las meningitis causadas por el grupo C son muy raras y se relacionan con consumo de leche no pasteurizada o por contacto con animales de granja (Elsayed *et al.*, 2003). Generalmente estos microorganismos son sensibles a penicilina; sin embargo, se han reportado casos de resistencia a penicilina y eritromicina (Gómez *et al.*, 1998). Los streptococos patógenos para equinos incluyen *S. equi*, *S. zooepidemicus* y *S. equisimilis*; los streptococos α hemolíticos se han aislado desde abortos equinos en

Kentucky en 1981 y 2001 y, *S. pneumoniae* con cápsula tipo III se han asociado con insuficiencias respiratorias en equinos jóvenes en entrenamiento (Timoney, 2004).

3. *Streptococcus equi*

S. equi es el agente etiológico de gurma o papera equina, enfermedad altamente contagiosa del tracto respiratorio superior que afecta a la familia *Equidae* y una de las más frecuentemente reportadas en los equinos a nivel mundial (Meehan *et al.*, 2001). Es responsable de cerca del 30% de infecciones en equinos (Harrington *et al.*, 2000). Se ha aislado una cepa de *S. equi* desde un camello en Etiopía, que por técnicas moleculares fue diferente a cepas de la “Pasteur Collection” (Sechi *et al.*, 1999). Por otra parte, en 2002, se describió el primer caso de meningitis en seres humanos por este microorganismo (Elsayed *et al.*, 2003).

Tanto *S. equi* como *S. zooepidemicus* pueden causar keratitis aguda, supurativa y ulcerativa en equinos adultos y uveitis en potrillos (Brooks *et al.*, 2000). La inmunidad protectora es especie-específica, así la inmunización con *S. zooepidemicus* no protege frente a un desafío con *S. equi*, aunque aislados clínicos de estos dos streptococos pueden mostrar una homología de DNA superior al 92% (Timoney *et al.*, 1997).

Se ha observado homogeneidad antigénica en diferentes aislados de *S. equi* (Galán y Timoney, 1988); sin embargo, por PCR repetitivos se han evidenciado verdaderas variaciones genéticas. En el año 2000 se demostró, mediante electroforesis de campo pulsado, que existían diferencias en las secuencias genómicas (Spoormakers *et al.*, 2003).

4. Base molecular de la virulencia de *Streptococcus equi*

Se agrupan en tres grandes categorías según su función: las que promueven la adherencia al hospedero; las que contribuyen a evadir la inmunidad y, las involucradas en la adquisición de nutrientes (Harrington *et al.*, 2002).

4.1. Adherencia

En su adherencia a tejidos del hospedero, se involucran varios de sus componentes de superficie (Harrington *et al.*, 2002). En equinos se ha reportado adherencia de la bacteria *in vitro* en células epiteliales de mejilla, como también *in vivo* en paladar blando, tonsilas y linfonódulos retrofaríngeos (Canfield *et al.*, 2000).

Varios tejidos y proteínas de fluidos corporales han mostrado ser ligandos de adhesinas de streptococos. Las adhesinas más estudiadas son los “componentes de superficie microbiana reconocedores de moléculas adhesivas en la matriz” (MSCRAMMs). Entre los ligandos de los hospederos para los MSCRAMMs están las proteínas fibronectina y fibrinógeno (Harrington *et al.*, 2002). Los siguientes componentes de la superficie de *S. equi* están involucrados en la adherencia:

- Proteínas ligadoras de fibronectina: la fibronectina es una glicoproteína en el plasma y de forma fibrilar en la matriz extracelular que media la adhesión de sustratos de células eucariontes (Lindmark y Guss, 1999). Las proteínas de streptococos ligadoras de fibronectina aumentan el potencial para causar enfermedad (Lindmark *et al.*, 2001). En *S. equi* se han identificado dos proteínas ligadoras de fibronectina (Lindmark y Guss, 1999).

- Proteínas ligadoras de fibrinógeno: el fibrinógeno, abundante proteína plasmática, puede servir como sustrato para los MSCRAMMs. Los coágulos sanguíneos y trombos de plaqueta-fibrina son ricos en fibrinógeno y pueden actuar como sitio de enlace para estas proteínas (Harrington *et al.*, 2002). *S. equi* puede expresar dos proteínas ligadoras de fibrinógeno llamadas FgBP o M-Like y SzPse (Meehan *et al.*, 2001) que presentan una muy baja homología entre ellas (Meehan *et al.*, 1998); la primera, es la proteína más dominante asociada a la pared expresada por cepas virulentas (Meehan *et al.*, 2001) y, la más importante para ligar fibrinógeno (Timoney *et al.*, 1997). La adherencia *in vitro* de *S. equi* S-240 a células de lengua y mejilla, se inhibe al preincubar las células con la proteína M-Like (Harrington *et al.*, 2002).

- Proteínas ligadoras de colágeno: los colágenos son proteínas conservadas presentes en la matriz extracelular de mamíferos. *S. equi* posee una proteína denominada CNE que liga colágeno, sin embargo su importancia en la patogénesis debe estudiarse; su gran similitud con la proteína ligadora presente en *Staphylococcus aureus*, indica probablemente función similar (Lannergard *et al.*, 2003). Otra proteína, llamada “colágeno-like” (ScIC) se

identificó en todas las cepas de *S. equi* y *S. zooepidemicus*, lo que explicaría la presencia de anticuerpos anti-SclC en el suero de equinos sin historia de gurma. La función de esta proteína no se conoce, pero se podría asimilar con las colágeno-like de *S. pyogenes* (Karlström *et al.*, 2004).

- Cápsula: la mayoría de las cepas de *S. equi* recién aisladas producen una cápsula de ácido hialurónico; este componente es importante en la adherencia de *S. zooepidemicus* a las células HeLa en laboratorio (Harrington *et al.*, 2002).

- Ácido lipoteicoico: son polímeros insertos en la membrana citoplasmática que cruzan la pared hasta la superficie en bacterias Gram positivas (Navarre y Schneewind, 1999); con rol en interacciones iniciales inespecíficas en streptococos. La preincubación de *S. equi* con anticuerpo anti ácido lipoteicoico reduce la adherencia de las bacterias (Harrington *et al.*, 2002).

4.2. Evasión a las defensas del hospedero

- Cápsula: esta estructura permite la resistencia de *S. equi* a la fagocitosis; los cultivos jóvenes de *S. equi* son altamente capsulados, más virulentos y más resistentes a la fagocitosis que los cultivos viejos (Boschwitz y Timoney, 1994; Harrington *et al.*, 2002).

Aislados de *S. equi*, a pesar de ser serológica y genéticamente homogéneos, presentan variaciones de colonias; *S. equi* NCTC 9682 mutante acapsulada, forman colonias brillantes y pequeñas; la cepa mate Hidaka/95/2 con cápsula de tamaño medio, se asocia a cuadros de gurma leves atípicos; la cepa mucoide CF32 con cápsula de gran tamaño, se asocia con cuadros de gurma clásicos (Anzai, *et al.*, 1999b).

- Proteína asociada al ácido hialurónico (HAP): en *S. equisimilis*, HAP regula la síntesis y liberación del ácido hialurónico de la cápsula (Chanter *et al.*, 1999). *S. equi* produce una proteína casi idéntica a esa HAP (Harrington *et al.*, 2002).

- Proteínas “M-like”: estas moléculas ligan proteínas del hospedero incluyendo fibrinógeno, albúmina e IgG (Meehan *et al.*, 1998). Son importantes constituyentes de pared de *S. equi* en procesos antifagocíticos (Wallace *et al.*, 1995). La aparición de equinos portadores con variantes de *S. equi* sin la región N-terminal de la proteína M y la ausencia de éstas desde casos de gurma activos, demuestran que hay dominios de la proteína involucrados en la virulencia de las cepas. La inmunidad del equino forzaría una mutación en la proteína como

medida de escape, dado que una gran proporción de la respuesta de los anticuerpos esta dirigida a la región N-terminal (Chanter *et al.*, 2000).

- Factores mitogénicos: las proteínas mitogénicas incluyen exotoxinas pirógenas (Spes) y un “súper antígeno” (SSA); que aumentan la susceptibilidad del hospedero a un shock endotóxico (Anzai *et al.*, 1999a). Sus efectos biológicos dependen de cual citoquina aumenta (Artiushin *et al.*, 2002). La liberación de mitógenos, combinados con proteína M-Like en *S. equi* contribuyen a las manifestaciones clínicas de la enfermedad, como fiebre, malestar, neutrofilia y aumento del fibrinógeno (Anzai *et al.*, 1999a).

- Superóxido dismutasa (SOD): dado que los productos intermedios del oxígeno originados en la fagocitosis son tóxicos, algunas bacterias poseen enzimas que metabolizan estos residuos. *S. equi* posee una SOD dependiente de magnesio que convierte los aniones superóxido en agua (Harrington *et al.*, 2002).

- Proteínas ligadoras de Inmunoglobulinas: la proteína FgBP de *S. equi* liga tanto IgG como fibrinógeno por un mecanismo no inmune (Meehan *et al.*, 2001). La ligación de IgG interferiría con la fagocitosis mediada por anticuerpos y con la activación del complemento (Harrington *et al.*, 2002).

4.3. Adquisición de nutrientes

- Transportadores ABC: varios nutrientes se incorporan a la bacteria por ligadores de ATP, como son los sistemas “cassettes ABC”. Estas proteínas ligadoras de sustratos generalmente son lipoproteínas. Aislados clínicos de *S. equi* poseen una lipoproteína homóloga a la proteína PsaA de *Streptococcus pneumoniae* (Harrington *et al.*, 2002).

- Enzimas degradativas: actúan en péptidos y carbohidratos del hospedero y están involucradas, además, en evasión inmune e invasión a tejidos. Aislados de *S. equi* presentan actividad de hialuronidasa, por lo que penetran mucosas y tejidos, y utilizan el ácido hialurónico del hospedero como fuente de carbono (Harrington *et al.*, 2002).

- Streptolisina S o toxina “SLS-like”: sólo cultivos jóvenes de *S. equi* presentan una toxina SLS-like, que además de adquirir nutrientes en el hospedero, causan edema, hemólisis β y dañan a PMN incapacitándolos de fagocitar bacterias opsonizadas (Flanagan *et al.*, 1998; Harrington *et al.*, 2002).

5. Gurma o papera equina

Enfermedad altamente contagiosa del tracto respiratorio superior de solípedos (Timoney, 2004), los brotes pueden durar semanas e incluso años en grandes poblaciones equinas (May *et al.*, 2004), generando pérdidas económicas en costos de tratamiento, medidas de cuarentena, y ocasionalmente pérdida de animales (Wallace *et al.*, 1995). La morbilidad y mortalidad alcanzan tasas de hasta 100% y 10% respectivamente (Canfield *et al.*, 2000; Meehan *et al.*, 2001). La transmisión es por contacto directo con animales enfermos o portadores y por fomites (Flanagan *et al.*, 1998). La bacteria ingresa por boca o nariz, atacando tonsilas y linfonódulos adyacentes (Timoney, 2004), provocando linfadenitis con absceso capsulado, que luego drena pus por piel o tracto respiratorio superior. Este proceso dura dos a tres semanas, acompañado de depresión, fiebre, anorexia, descarga nasal mucopurulenta y disnea inspiratoria (Chanter, 2002). Afecta principalmente a equinos de un año, seguido de potrillos y hembras con crías (Sweeney *et al.*, 1989).

Se describe metástasis de abscesos por vía sanguínea o linfática a diversos órganos, condición llamada gurma bastardos (Canfield *et al.*, 2000; Spoormakers *et al.*, 2003).

El diagnóstico de laboratorio de *S. equi* utiliza torundas nasales, lavados o pus de abscesos; se requieren mínimo tres cultivos nasofaríngeos negativos durante tres semanas, para dar como libre de infección. (Chanter, 2002; Timoney, 2004). Sin embargo, más del 50% de los equinos en un brote son portadores por más de seis semanas. El cultivo es inútil durante la incubación y fases tempranas de la enfermedad pues *S. equi* normalmente no está presente en la mucosa hasta 2 días después de iniciada la fiebre. Estos cultivos tampoco detectan animales portadores en las bolsas guturales. La combinación de PCR más cultivo incrementa la detección de ellos. Sin embargo, en convalecientes, las torundas y lavados nasales después de un corto tiempo son negativos al PCR debido a la rápida limpieza mucociliar. Por otra parte, la serología no es muy útil en detectar infección, excepto en “gurma bastardos” (Timoney, 2004). Como modelo animal experimental para *S. equi*, se utiliza el ratón (Chanter *et al.*, 1995).

5.1. Control del gurma

La naturaleza contagiosa del gurma requiere medidas de control rigurosas. Los casos pueden aparecer después de un periodo de incubación de 4 a 14 días, bajo condiciones climáticas estresantes o de mucha densidad animal. Esta variación depende del número y virulencia de *S. equi* a la que los animales son expuestos y, también, de la susceptibilidad de ellos (Timoney, 2004). Para prevenir futuros brotes se requiere una efectiva detección de portadores, más desinfección y manejo de pasturas (Chanter, 2002). Los portadores son muy importantes en la mantención inter-epizoótica de *S. equi*, en el inicio de un nuevo brote e introducción de la bacteria a zonas libres de la enfermedad. La mayoría de las nuevas epizootias se inicia con equinos en período de incubación o en fase convaleciente tardía de la enfermedad. Las medidas preventivas incluyen segregación y observación periódica de nuevos animales (Timoney, 2004).

El tratamiento con antibióticos usualmente es poco efectivo; disminuyen los signos clínicos e incidencia de nuevos casos. Sin embargo, cuando el tratamiento finaliza, los signos clínicos a menudo retornan y surgen nuevos casos, tal vez, porque los abscesos o la cápsula circundante carecen de vascularidad y/o porque el tratamiento quizás no elimina la colonización de la mucosa. El uso de antibióticos sistémicos sería efectivo sólo para tratar portadores crónicos en las bolsas guturales que no presenten empiema. Para eliminar *S. equi* se requiere remover pus, condroides e instilar localmente grandes dosis de penicilina (Chanter, 2002). Para combatir la enfermedad y mitigar las serias complicaciones clínicas, las investigaciones principalmente apuntan al desarrollo de vacunas que protejan eficientemente (Flock *et al.*, 2004).

5.2. Inmunidad y vacunas

Debido a la conformación anatómica de la placenta en los equinos, los potrillos nacen sin inmunoglobulinas y las reciben a través del calostro. A 24 horas de nacido disminuye la absorción intestinal de inmunoglobulinas acompañado por la disminución de ellas en el calostro. Durante la lactancia, la leche continúa con una concentración moderada de inmunoglobulinas, principalmente sintetizadas en la glándula mamaria. Después de la ingesta de calostro, en el suero y secreciones nasales de potrillos se observan anticuerpos IgA e IgG anti *S. equi*; las IgA adquiridas a través del calostro, son transportadas desde la

sangre a la mucosa nasal de los recién nacidos. La síntesis de anticuerpos en el potrillo comienza a los 16 días después de nacer cuando existe una apropiada estimulación antigénica (Galan *et al.*, 1986).

La leche proveniente de yeguas, recuperadas de gurma, contiene IgG e IgA con especificidad similar a la del mucus nasofaríngeo de equinos convalecientes. Por lo tanto, sus potrillos lactantes se protegen con estos anticuerpos hasta el destete. La mayoría de los equinos desarrolla una sólida inmunidad durante su recuperación de gurma, persistiendo por más de cinco años en el 75% de los animales. La resistencia parece ser primariamente humoral, mediada por anticuerpos anti-SeM (Timoney, 2004).

Las vacunas tipo bacterinas, producidas por termoinactivación, fueron introducidas en los años 40'. Debido a que producían reacciones adversas fueron reemplazadas, creándose en la década del 70', vacunas ricas en proteínas de pared celular que estimulan la actividad opsonizadora del suero, pero no la mucosal (Timoney, 2004). Sin embargo, estas vacunas en algunas zonas, no han influido en el curso de un brote. La ineficiencia de las vacunas corrientes se debería a una baja estimulación de anticuerpos de la mucosa faríngea, siendo estos los más importantes en la protección (Wallace *et al.*, 1995).

La superficie de las mucosas constituyen un gran "órgano" de los vertebrados y son una barrera primaria para la entrada de microorganismos patógenos. Junto con los efectivos mecanismos de limpieza mecánicos y fisicoquímicos, estas superficies mucosales son protegidas por el sistema inmune local (Sheoran *et al.*, 2002). El tejido tonsilar nasal y orofaríngeo es una barrera custodia de la inmunidad mucosal debido a su estratégica localización a la entrada de los tractos respiratorio y digestivo (Kumar *et al.*, 2001).

La estimulación de anticuerpos en la mucosa local requiere la presentación de un antígeno idóneo, durante un tiempo suficiente, que estimule una respuesta mucosal más completa (Nally *et al.*, 2001). La actividad de los anticuerpos es dependiente del isotipo y la respuesta de estos, contra los organismos infecciosos no son distribuidos aleatoriamente (Sheoran *et al.*, 1997). El isotipo IgG es el más abundante en suero y calostro de yeguas, mientras que IgA lo es en leche. El mayor isotipo en secreciones nasales de equinos adultos es IgA, y en potrillos menores a 14 días de edad es IgG (Sheoran *et al.*, 2000).

Las IgG e IgA, específicas para *S. equi*, en presencia de complemento muestran buena actividad bactericida, indicando que son los isotipos involucrados en la opsonización (Sheoran *et al.*, 1997).

Para examinar el nivel de protección contra *S. equi*, por administración de antígenos a través de mucosas en equinos libres de gurma, se utilizaron vacunas de administración oral de *S. equi* muertas por paraformaldheido y, administración intraperitoneal del mismo producto más un adyuvante no inflamatorio. Al desafío, la inmunización intraperitoneal indujo anticuerpos sistémicos y mucosales, proporcionando un grado de protección; sin embargo, en aquellos con inmunización oral, desarrollaron abscesos submandibulares y, aunque se aliviaron los síntomas de la enfermedad, no produjo anticuerpos cuantificables en el suero o secreciones. La disminución en la severidad de los signos clínicos posiblemente se deba a un efecto celular por respuesta de células T, que está asociada a la recuperación posterior a una infección por *S. equi* (Wallace *et al.*, 1995).

Basado en la hipótesis de que la inyección parenteral de vacunas contra el gurma genera una baja respuesta de la mucosa, se desarrolló una vacuna viva, atenuada y acapsulada. Esta vacuna estimuló respuesta de anticuerpos tanto sistémicos como mucosales, similar a la que se produce durante el período de convalecencia. Ponis vacunados con esta cepa fueron resistentes al desafío intranasal. Sin embargo, se describió descarga nasal, linfadenopatía faríngea o submandibular, edema de los miembros y “gurmas bastardos” posterior a la administración de la vacuna, además que al cultivo no siempre fue diferenciable de cepas silvestres de *S. equi* (Timoney, 2004).

Existen pocos reportes exitosos de manipulación génica en *S. equi*, por ejemplo la introducción de un gen de síntesis de hialuronidasa e inhibición por mutagénesis de la síntesis de streptolisina. Los obstáculos para estas transformaciones son la cápsula de ácido hialurónico y la densa pared celular, entre otras (Walker y Timoney, 2002).

Debido al éxito relativo de bacterinas y de vacunas atenuadas, actualmente se estudian las vacunas de sub-unidades, que utilizan antígenos extraídos del patógeno. Varias sub-unidades de *S. equi* se estudian como eventuales vacunas; dentro de ellas, se mencionan la proteína M (SeM) y, hemolisina de *S. equi* y, una adhesina homóloga a la “Pneumococcal surface adhesin A” o PsaA de *S. pneumoniae*, entre otras (Chanter, 2002).

6. *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae es un patógeno respiratorio humano (Catterall, 1999; Sethi y Murphy, 2001) que causa enfermedades invasivas como neumonía, bacteremia y meningitis con alta morbilidad y mortalidad en todo el mundo (Paton *et al.*, 1993; Romero-Steiner *et al.*, 2003). El máximo riesgo de la enfermedad neumocócica invasiva se observa en niños de hasta dos años y en mayores de 65 años (Laine *et al.*, 2004). En Chile esta bacteria es la segunda causa de meningitis bacteriana aguda después de *Neisseria meningitidis* (Prado, 2001). *S. pneumoniae* también es altamente prevalente en infecciones menos serias como otitis media y sinusitis (Ogunniyi *et al.*, 2000, Jedrzejcas, 2001). La adquisición de resistencia a múltiples antibióticos debido al mal uso de ellos, ha exacerbado la morbilidad y mortalidad por esta bacteria (Briles *et al.*, 1998; Briles *et al.*, 2001; Ogunniyi *et al.*, 2002). La Organización Mundial de la Salud señala que el impacto de la enfermedad neumocócica en seres humanos, a nivel mundial, es similar a la de tuberculosis. Se ha enfatizado que el desarrollo de una vacuna contra *S. pneumoniae* está entre las tres vacunas prioritarias de los países industrializados (Jado *et al.*, 2001).

6.1. Vacunas

La primera estrategia preventiva contra *S. pneumoniae*, en seres humanos, fue la inoculación de bacterinas. Luego fueron polivalentes con polisacáridos de variados serotipos (Jedrzejcas, 2001; Swiatlo y Ware, 2003; Bogaert *et al.*, 2004). Sin embargo, debido a su inefectividad en niños menores de dos años, ancianos e inmunosuprimidos, se estudian vacunas proteicas, que a diferencia de las polisacáridas, estimulan la respuesta inmune T dependiente. Nuevas vacunas, de polisacáridos de diferentes serotipos, conjugados con un toxoide bacteriano, han resultado eficientes para los grupos susceptibles antes mencionados (Arêas *et al.*, 2004); este tipo, la primera autorizada por la Food and Drugs Administration (F.D.A.) ha sido introducida al mercado chileno y latinoamericano. Las deficiencias que se le atribuyen son alto costo que dificultan su implementación a gran escala en países en desarrollo y, que no posean los serotipos actuantes o prevalentes en diferentes poblaciones, haciendo necesaria su reformulación según las diferentes áreas geográficas (Ogunniyi *et al.*, 2000; Rapola *et al.*, 2001; Ogunniyi *et al.*, 2002; Swiatlo y Ware, 2003; Arêas *et al.*, 2004).

7. Pneumococcal surface adhesin A (PsaA)

La neumonía en seres humanos causada por *S. pneumoniae* es de difícil diagnóstico. (Russell *et al.*, 1990). En la búsqueda de antígenos diagnóstico comunes de *S. pneumoniae*, se produjeron anticuerpos monoclonales encontrándose una proteína especie-específica de 37 kDa en 24 cepas capsuladas. Estudios iniciales sugirieron que la proteína estaba expuesta en la superficie de la pared celular, de allí su denominación PsaA (Russell *et al.*, 1990, Sampson *et al.*, 1994; Tharpe y Russell, 1996). Sin embargo, los posteriores análisis han mostrado que por su tamaño no puede estar expuesta en la superficie. Los anticuerpos que genera podrían difundir a través de cápsula y pared celular, para interactuar con ella y bloquear su función biológica (Ogunniyi *et al.*, 2000). Además, mediante microscopía de inmunofluorescencia se observó que la PsaA estaba oculta debajo de la pared celular y de la cápsula polisacárida y sólo expuesta a los anticuerpos cuando se remueve la pared (Johnston *et al.*, 2004). El gen de la proteína PsaA se clonó desde *S. pneumoniae* a *E. coli*, determinándose su completa secuencia nucleotídica (Sampson *et al.*, 1994; Tharpe y Russell, 1996). El análisis del fragmento clonado identificó tres "marcos abiertos de lectura", siendo el "marco abierto de lectura 2" el que codifica la PsaA. Este gen, formado por 933 nucleótidos codifica para una proteína hidrofílica (Sampson *et al.*, 1994). La PsaA exhibe secuencias de aminoácidos similares a varias lipoproteínas de *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus parasanguis*, donde todas parecen tener directo o indirecto rol en promover la adhesión bacteriana a las células del hospedero (Sampson *et al.*, 1994; Berry y Paton, 1996; Tseng *et al.*, 2002). Se ha confirmado mediante PCR, la presencia del gen *PsaA* en los 90 serotipos existentes de *S. pneumoniae* (Morrison *et al.*, 2000; Jado *et al.*, 2001; Gor *et al.*, 2002; Palaniappan *et al.*, 2005), y se ha identificado y secuenciado en streptococos del grupo viridans (Jado *et al.*, 2001). Por otra parte al genoma de *Listeria monocytogenes*, bacteria intracelular facultativa, se le identificó un gen que codifica la proteína "PsaA-Like" la cual promueve el ingreso y facilita la supervivencia intracelular en macrófagos infectados (Réglier-Poupet *et al.*, 2003). Es importante señalar que se han encontrado proteínas homólogas a la PsaA, en las especies *S. equi* y *S. zooepidemicus*, ambos patógenos del equino (Harrington *et al.*, 2000; Chanter, 2002).

7.1. Funciones de la proteína PsaA

7.1.1. Adhesina

Dado que *S. pneumoniae* es capaz de colonizar y causar enfermedad del tracto respiratorio bajo, la PsaA podría estar involucrada en la adherencia a esta superficie y así tener algún rol en la patogénesis (Sampson *et al.*, 1994; Arêas *et al.*, 2004; Baril *et al.*, 2004). El rol de la PsaA en la adhesión a mucosa u otras células fue sugerido por su alta homología con adhesinas de otros streptococos. Se observó que una mutación en el gen *PsaA* de *S. pneumoniae* cepa D39 tipo 2, disminuye su virulencia en ratones (Berry y Paton, 1996; Briles *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2002; Tseng *et al.*, 2002; Arêas *et al.*, 2004). Además, la adherencia de estas cepas mutantes en células A549 (neumocitos tipo II) fue sólo el 9% de lo observado en la cepa D39 tipo 2 (Berry y Paton, 1996; Pilling *et al.*, 1998; Claverys *et al.*, 1999; Sethi y Murphy, 2001).

7.1.2. Transportador ABC

La PsaA de *S. pneumoniae* junto con ScaA de *S. gordonii*, SsaB de *S. sanguis*, y FimA de *S. parasanguis*, comparten secuencias aminoacídicas similares y recibieron atención cuando se les identificó como potenciales adhesinas y factores de virulencia (Obaro *et al.*, 2001; Simell *et al.*, 2001; Johnston *et al.*, 2004). Sin embargo estudios recientes han puesto esta característica en debate. Además, la estructura de la PsaA no es consistente con una función de adhesina (Johnston *et al.*, 2004). El análisis de la secuencia de la PsaA y las otras proteínas relacionadas, han demostrado que son una nueva clase de proteínas ligadoras de solutos. Estas proteínas son componentes de un tipo ABC permeasas, que transportan cationes bivalentes como son Zn^{2+} , Fe^{2+} y Mn^{2+} , a través de la membrana citoplasmática (Tseng *et al.*, 2002). Estas proteínas se han denominado “Lipoproteínas ligadoras de metales” (MBLs) y tendrían gran importancia en la fisiología y patogenia de los streptococos, pues mutantes deficientes en MBLs han mostrado ser menos virulentas que las formas silvestres en modelos animales (Harrington *et al.*, 2000).

El complejo transportador “Psa” esta formado por el producto de tres genes: *PsaB* (una proteína ligadora de ATP), *PsaC* (proteína integral de membrana) y *PsaA* (proteína ligadora de soluto) (Novak *et al.*, 1998; Marra *et al.*, 2002; Johnston *et al.*, 2004). La PsaA

está involucrada en el transporte de Mn^{2+} , dado que una mutación en ella conduce a un requerimiento absoluto de Mn^{2+} para poder crecer (Dintilhac *et al.*, 1997; Ogunniyi *et al.*, 2002; Tseng *et al.*, 2002; Bogaert *et al.*, 2004; Johnston *et al.*, 2004). Además, su mutación altera la expresión de las enzimas SOD y NADH oxidasa, sugiriendo que juega un rol importante en la expresión de estas enzimas y en la homeostasis “redox” intracelular (Tseng *et al.*, 2002; Johnston *et al.*, 2004). Los estudios cristalográficos han revelado que la PsaA podría ligar también Zn^{2+} (Pilling *et al.*, 1998; De *et al.*, 2000; Ogunniyi *et al.*, 2002). La inactivación del operón *psa* causa defectos en el crecimiento, competencia, adherencia, virulencia y defensas contra un estrés oxidativo (Johnston *et al.*, 2004).

7.2. Inmunidad de la proteína PsaA

Cuando se descubrió que la PsaA era conservada y común para todos los serotipos de *S. pneumoniae* se consideró una proteína candidata para ser utilizada en vacunas, sola o en combinación con otras proteínas propias de la especie como neumolisina o la pneumococcal surface protein A (PspA) (Sampson *et al.*, 1997). La producción masiva de PsaA nativa ha sido impedida por su baja expresión en todas las cepas de neumococos y por ser difícil de purificar (Tharpe y Russell, 1996; De *et al.*, 2000), es por esto que se desarrolló un sistema simple de expresión procarionte que provee proteína PsaA recombinante (rPsaA) purificada de alta calidad (De *et al.*, 2000). El rendimiento (mg/l de proteína PsaA) obtenido en *E. coli* es mucho mayor al obtenido en *S. pneumoniae*, siendo inmunológicamente indistinguible la rPsaA de la PsaA nativa y exhibiendo las mismas propiedades al formular vacunas (De *et al.*, 2003).

Los linfocitos B de adenoides de niños han mostrado secretar IgA, IgG e IgM contra la PsaA y otros tres antígenos proteicos. Diferentes estudios sugieren que personas portadoras, infectadas, o expuestas a neumococos generan respuesta inmune local y sistémica contra PsaA y otros antígenos proteicos (Zhang *et al.*, 2002). Además se demostró que los anti-PsaA desarrollados naturalmente en humanos o estimulados por rPsaA en animales, previenen la adherencia del neumococo a las células epiteliales nasofaríngeas (Romero-Steiner *et al.*, 2003; Arêas *et al.*, 2004). En diferentes estudios se ha aplicado el modelo ratón, así la inmunización con PsaA purificada los protegió contra un desafío de 45 veces la dosis letal 50 (Talkington *et al.*, 1996; Sampson *et al.*, 1997; Crook *et al.*, 1998; Miyaji

et al., 2002). Otros autores empleando anticuerpos anti-PsaA redujeron la colonización y portación del neumococo. Su unión a PspA otorga un nivel más alto de protección (Briles *et al.*, 2000; Ogunniyi *et al.*, 2000; Briles *et al.*, 2001; Simell *et al.*, 2001; Miyaji *et al.*, 2002; Romero-Steiner *et al.*, 2003). Otros ratones inmunizados fueron protegidos de la colonización pulmonar y septicemia (Romero-Steiner *et al.*, 2003). La inoculación intranasal de una rPsaA ha sido altamente inmunogénica, protegiendo de la colonización sin necesidad de adyuvante (Scott *et al.*, 2002). La unión de rPsaA con un potente adyuvante mucosal como es la subunidad β de la toxina colérica denominada CTB, genera gran producción de IgG en suero e IgA en saliva (Arêas *et al.*, 2004) y, si esta rPsaA-CTB es transportada por microesferas de alginato, inhibe la colonización pulmonar y septicemia por *S. pneumoniae* (Seo *et al.*, 2002; Bogaert *et al.*, 2004).

Una vacuna más reciente de DNA, con un plasmidio que expresa la PsaA, induce tanto respuesta humoral como celular, observándose aumento de IFN- γ en células del bazo (Miyaji *et al.*, 2002). Estas vacunas activan linfocitos T citotóxicos que reconocen antígenos presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) (Gurunathan *et al.*, 2000; Srivastava y Liu, 2003). Las ventajas de las vacunas DNA incluyen una eficiente respuesta inmune primaria tanto celular como humoral y bajo costo de producción debido a la fácil manipulación del DNA recombinante (Gurunathan *et al.*, 2000; Miyaji *et al.*, 2002).

El uso de proteínas para el desarrollo de vacunas podría tener limitaciones dada su conformación tridimensional, pues los potenciales epítopes pueden ser escondidos o bloqueados. Además las proteínas pueden dar origen a efectos no deseados. Una forma para evitar estas desventajas al usar proteínas para vacunas es identificar, aislar y sintetizar péptidos inmunoreactivos (epítopes) de la proteína. Así los epítopes son pequeñas unidades de aminoácidos de la proteína que pueden ser lineales, más fáciles de sintetizar y de menor costo (Johnson *et al.*, 2002). Se han identificado, aislado, secuenciado y descrito tres epítopes de la PsaA mediante el uso de anticuerpos monoclonales de ratón anti-PsaA. Estos epítopes, de 15 aminoácidos cada uno, demostraron estimular una respuesta inmune que inhibe la colonización de un neumococo (Srivastava *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2002).

OBJETIVO GENERAL

- Obtener una proteína recombinante a partir de *Streptococcus pneumoniae*, con posible aplicación inmunológica contra gurma equino.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Amplificar el gen de la proteína PsaA de *Streptococcus pneumoniae*, mediante la técnica de PCR.
- Transformar la cepa *Escherichia coli* DH5 α (Novagen[®]), con el gen PsaA ligado al plasmidio pET15b (Novagen[®]) como vector de expresión.
- Expresar y purificar la proteína PsaA, en la cepa de *Escherichia coli* BL21DE3 (Novagen[®]).
- Evaluar, mediante dos técnicas bioquímicas y una inmunológica, la expresión de la proteína PsaA.

MATERIAL Y METODOS

El trabajo experimental se desarrolló en el Centro de Investigación y Desarrollo (C.I.D.) del Instituto de Salud Pública de Chile (I.S.P).

MATERIAL

- **Cepas bacterianas:** *Streptococcus pneumoniae* serotipo 14 (aislado clínico, 2000), *Escherichia coli* DH5 α (para clonamiento) y, *Escherichia coli* BL21DE3 (para expresión) (Novagen[®]).
- **Plasmidios:** pETBlue-1 y pET-15b (Novagen[®]). Ambos con gen resistencia a ampicilina.
- **Insumos de biología molecular:** enzima *Pfu* DNA polimerasa para PCR y reactivos necesarios (Novagen[®]), enzimas de restricción *BamH I*, *Xho I* y, reactivos necesarios (Promega[®]), enzima ligasa y reactivos necesarios (Promega[®]), reactivos para extensión con poli adeninas (Invitrogen[®]), anticuerpo policlonal de conejo anti His-Tag (6 Histidine) (USBiological[®]), anticuerpo anti IgG de conejo (Sigma[®]).
- **Partidores para el gen *PsaA*:** se utilizaron los partidores diseñados en el C.I.D. del I.S.P. de Chile. Subrayado se muestran los sitios de corte para las enzimas *BamH I* y *Xho I*, respectivamente.
 - Directa : 5´-CTCGAGATGAAAAATTAGGTACATTAC-3´
 - Reversa: 5´-GGATCCTTATTTTGCCAATCCTTCAGC-3´

- **Medios de cultivo:**

- Caldo Luria-Bertani (LB): triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L.
- Caldo LB/g: caldo LB, glucosa 4 g/L.
- Caldo LB/a/g: caldo LB, ampicilina 0,1 g/L, glucosa 4 g/L.
- Agar LB/a: caldo LB, agar 15 g/L, ampicilina 0,1 g/L.
- Agar LAXI: caldo LB, agar 15 g/L, ampicilina 0,1 g/L, isopropiltiogalactósido (IPTG) 5×10^{-7} mM, 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosido (X-Gal) 0,05 g/L.

- **Soluciones para lisis alcalina:** preparadas según Sambrook *et al.* (1989).

- **Soluciones para geles de acrilamida:** preparadas según Abelson y Simon (1990).

- **Solución Tampón de lisis 2x:** tris-HCl 0,5 M pH 6,8, dodecyl sulfato de sodio (SDS) 10%, glicerol 5%, azul de bromo fenol 0,5%, 2-mercaptoetanol 2,5%.

- **Soluciones para purificación de proteínas desde resina Ni-Nta (Novagen[®]):**

- Tampón de lisis: tris-HCl 50 mM pH 8,5, phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) 1mM diluido en 500 μ l de dimetil sulfóxido (DMSO), 2-mercaptoetanol 5 mM.
- Solución A: tris-HCl 20 mM pH 8,5, KCl 100 mM, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5 mM, imidazol 20 mM.
- Solución B: tris-HCl 20 mM pH 8,5, KCl 1 M, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5 mM.
- Solución C: tris-HCl 20 mM pH 8,5, KCl 100 mM, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5 mM, imidazol 500 mM.

- **Soluciones para western blot:**

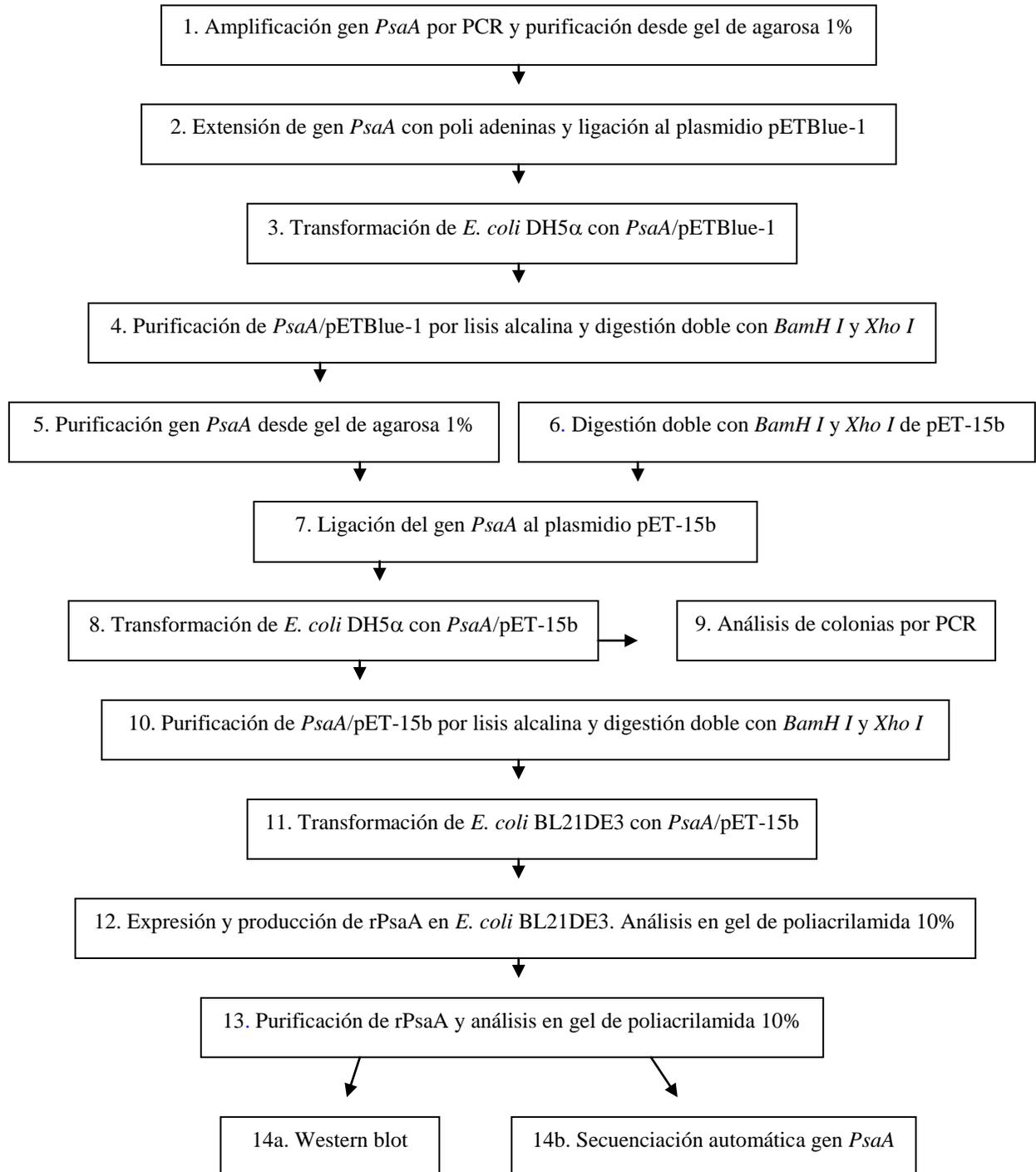
- Tampón fosfato salino (PBS) pH 6,8: NaCl 8 gr/L, KH₂PO₄ 0,2 gr/L, Na₂HPO₄ 1,145 gr/L, KCl 0,2 gr/L.
- PBS Tween: tween 20 0,05 M, PBS.
- Solución de dilución: BSA 10 gr/L, PBS.
- Leche descremada: leche descremada 5%, PBS.
- Solución de revelado (BCIP/NBT): 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-fosfato-nitroblue tetrazolium (*Calbiochem*[®]).

- **Equipos:** agitador *Thomas 3623*, agitador magnético *Nova II*, balanza *Precisión JK 180*, baño termostático *Memmert*, vortex o mezclador *Thermolyne 37600*, cámara de electroforesis, centrifuga *Sorvall*[®] *RC 26 PLUS*, equipo de cromatografía, espectrofotómetro *Genesis 10 UV*, estufa de cultivo, fuente de poder *Apparatus Corporation EC 135*, microcentrífuga *ALC 4214*, pH metro *Hanna Instrument 9321*, refrigerador, agitador chico *Lab. Companion SI-600*, agitador grande *Innova*[™] 4300, sonicador *Fisher Scientific 100*, termociclador *MJ Research, Inc PTC-100*[™].

- **Otros:** geles de agarosa 1%, geles de poliacrilamida 10% según Abelson y Simon (1990), estándar de peso molecular para proteína: Bench mark prestained protein ladder (*Invitrogen*[®]), estándar preteñido para proteína (*Fermenta*[®]), micropipetas *Eppendorf* de 10 a 5000 µl, puntas desechables para micropipetas, microtubos *Eppendorf* de 200 a 2000 µl, “Kit” de purificación de DNA “Gel Extraction” (D2501-01) *E.Z.N.A.*[®], columna de afinidad Ni-Nta (*Novagen*[®]), guantes desechables, programa computacional *Primer-Premier*.

METODOS

Para la obtención de proteína rPsaA, el laboratorio C.I.D. emplea el siguiente diagrama de flujo (DF):



- **Amplificación del gen de la proteína PsaA (*PsaA*), por técnica PCR (DF: 1 y 9).**

La técnica PCR se utiliza tanto para amplificar el gen *PsaA* desde *S. pneumoniae*, como para identificar clones de *E. coli* DH5 α con el plasmidio *PsaA/pET-15b*. En cada caso, se utiliza una muestra bacteriana diferente llamada templado (*S. pneumoniae* o *E. coli* DH5 α respectivamente). Se utiliza el siguiente protocolo:

Templado	2 μ l
Tampón 10x (<i>Novagen</i> [®])	5 μ l
MgCl ₂ (<i>Novagen</i> [®])	1 μ l
dNTP mix	1 μ l
Partidor Directo PsaA	2 μ l
Partidor Reverso PsaA	2 μ l
Taq DNA <i>Pfu</i> (<i>Novagen</i> [®])	0,5 μ l
Agua dd.	36,5 μ l
Volumen final	50 μ l
Aceite mineral	20 μ l

Programa PCR
95°C x 3 min.
95°C x 1 min.
30 ciclos 72°C x 1 min.
72°C x 1 min.
72°C x 10 min.
4°C x ∞

- **Purificación del gen *PsaA* desde gel de agarosa (DF: 1 y 5).**

Se utiliza el “Kit” comercial “Gel extraction” (D2501-01) *E.Z.N.A.*[®], según instrucciones del fabricante.

- **Extensión del gen *PsaA* con poli adeninas (DF: 2).**

Dado que durante el PCR la enzima Taq DNA *Pfu* no adiciona adeninas en los extremos del gen amplificado, ellas deben ser adicionadas previo al proceso de ligación del gen *PsaA* al plasmidio de clonamiento pETBlue-1. Se utiliza el siguiente protocolo:

Tampón 10x (<i>Invitrogen</i> [®])	1 μ l
MgCl ₂ (<i>Invitrogen</i> [®])	2 μ l
dATP (<i>Invitrogen</i> [®])	2 μ l
Gen <i>PsaA</i> purificado	4 μ l
Taq Polimerasa (<i>Invitrogen</i> [®])	1 μ l
Volumen final	10 μ l

La reacción se lleva a cabo en termociclador a 70°C por 30 min.

- **Ligación del gen *PsaA* a plasmidios pETBlue-1 o pET-15b** (DF: 2 y 7).

La técnica se utiliza para ligar el gen *PsaA* tanto al plasmidio pETBlue-1 como al pET-15b. El plasmidio de clonamiento pETBlue-1 se encuentra abierto y en sus extremos posee timinas que se complementan con las adeninas adicionadas al gen *PsaA* (DF: 2). El plasmidio pET-15b debe ser digerido con las enzimas de restricción *BamH I* y *Xho I* (DF: 6), previo a la ligación con el gen *PsaA*. Se utiliza el siguiente protocolo:

Gen <i>PsaA</i> purificado (+ poli A)	2 µl
Plasmidio pETBlue-1/pET-15b	1 µl
Tampón de ligación 5x (<i>Promega</i> [®])	2 µl
T4 DNA Ligasa (<i>Promega</i> [®])	4 µl
Agua dd.	1 µl
Volumen final	10 µl

Se incuba en baño termostático a 16°C por una noche. Luego para inactivar la enzima, se incuba en termociclador a 65°C por 10 min.

- **Transformación de *E. coli* DH5α o *E. coli* BL21DE3 con mezclas de ligación *PsaA*/pETBlue-1 o *PsaA*/pET-15b** (DF: 3, 8 y 11).

La transformación define a la bacteria cuando incorpora DNA desde el medio extracelular (conjugación); en este caso para originar clones de la cepa transformada. Se utiliza el protocolo de Sambrook *et al.* (1989): en un tubo *Eppendorf* de 200 µl se mezclan 20 µl de la cepa *E. coli*, previamente tratada con CaCl₂ 100mM que permeabiliza la membrana celular para el ingreso del plasmidio al momento de la transformación y, 5 µl de la mezcla de ligación. Se incuba en hielo por 45 min.; luego un pulso de calor en termociclador a 42°C por 1 min. La mezcla se lleva a un tubo con 1 ml. de caldo LB e incuba a 37°C en agitación (220 rpm) por 1 hora. Luego se siembran 100 µl en agar LAXI (transformación de *E. coli* DH5α con *PsaA*/pETBlue-1) o en agar LB/a (transformación de *E. coli* DH5α o BL21DE3 con *PsaA*/pET-15b). Las placas se incuban a 37°C por una noche y, se conservan a 4°C. Se realiza en paralelo una transformación de estas cepas con el plasmidio pET-15b como control positivo (presencia de colonias en agar LAXI o LB/a a las 24 horas de incubación a 37°C).

- **Purificación de plasmidios *PsaA/pETBlue-1* o *PsaA/pET-15b* (DF: 4 y 10).**

Los plasmidios *PsaA/pETBlue-1* o *PsaA/pET-15b* se purifican desde colonias de *E. coli* DH5 α o BL21DE3 mediante lisis alcalina según Sambrook *et al.* (1989).

- **Digestión doble con *BamH I* y *Xho I* de plasmidios *pET-15b*, *PsaA/pETBlue-1* y *PsaA/pET-15b* (DF: 4, 6 y 10).**

Esta técnica, necesaria para cortar el plasmidio *pET-15b*, se utiliza en a) la ligación del gen *PsaA*, b) la liberación del gen *PsaA* desde el plasmidio *pETBlue-1* y c) para asegurar la presencia del gen en el plasmidio *pET-15b*. La liberación del gen es posible dado que posee un sitio de corte para la enzima de restricción *BamH I* en uno de sus extremos y un sitio de corte para *Xho I* en el otro. Estos sitios de corte son diseñados en los partidores después de analizar una secuencia descrita en la literatura para el gen, en donde no se observa sitios de corte internos para estas dos enzimas. El protocolo es el siguiente:

DNA plasmidial	5 μ l
Tampón D 10x	2 μ l
BSA	0,2 μ l
<i>BamH I</i>	2 μ l
<i>Xho I</i>	2 μ l
Agua dd.	8,8 μ l
Volumen final	20 μ l

Se incuba en baño termostático a 37°C por 4 horas.

- **Expresión y producción de proteína recombinante *PsaA* (r*PsaA*) en *E. coli* BL21DE3 (DF: 12). Análisis en gel de poliacrilamida (DF: 12 y 13).**

Para determinar la mejor expresión (calidad) de la proteína r*PsaA*, antes de su producción, se realiza un ensayo en un pequeño volumen con el siguiente protocolo: Se replica una colonia en 3 ml de caldo LB/a/g e incuba a 37°C en agitación a 220 rpm. durante una noche. Se traspasan 30 μ l del cultivo a dos tubos con 3 ml de caldo LB/g que se incuban a 37°C en agitación a 220 rpm. hasta alcanzar una densidad óptica OD₆₀₀ entre 0,4 – 0,5. Luego sólo un tubo se induce con 5 μ l de IPTG 0.1 M; la temperatura de ambos tubos se baja a 30°C, incubándose los cultivos por tres horas. De cada tubo se muestrean 500 μ l cada 1 hora, comparándose las densidades ópticas entre inducido y no inducido. Se

considera tiempo cero al previo a la inducción. Cada muestra se centrifuga a 12.000 rpm por 5 minutos y el sedimento se resuspende en 50 μ l de agua dd. más 50 μ l de tampón de lisis 2x para su posterior análisis en gel de poliacrilamida. El tubo sin IPTG es el control negativo. Como control positivo de expresión, se utiliza el plasmidio pET-15b que tiene inserto el gen *N* del virus respiratorio sincicial; la expresión del gen *N* se ha estandarizado para 30°C, temperatura aquí utilizada.

En el gel se busca la presencia de una proteína de peso aproximado a 37 kDa., que caracteriza a la rPsaA, frente a un estándar de migración para ese peso molecular. La proteína se incrementa en el tiempo sólo en los tubos inducidos. Las muestras se conservan a -20°C. De los muestreos, se selecciona el clon con presencia de la proteína en estudio y con mayor diferencial en densidad óptica OD₆₀₀ (tubo con y sin inducción), el que se expresará en 10 litros de caldo. El sedimento o producto luego de la inducción, incubación y centrifugación, se conserva a -20°C.

- **Purificación de rPsaA y análisis en gel de poliacrilamida (DF: 13).**

Para purificar la rPsaA se utiliza una columna de níquel que posee afinidad por histidina (columna de afinidad Ni-Nta, *Novagen*[®]). La secuencia nucleotídica presente en un extremo del plasmidio pET-15b, adyacente al gen *PsaA*, codifica seis histidinas, las que son adicionadas a un extremo de la proteína rPsaA y de esta forma se puede unir a la resina de la columna.

La purificación del sedimento bacteriano utiliza el siguiente protocolo: el sedimento se resuspende en 15 ml de tampón de lisis y se agrega una punta de espátula de lizozima; la mezcla se sonica y luego se incuba en hielo por 30 min.; se resonica y centrifuga a 20.000 rpm por una hora. Se extrae el sobrenadante y se filtra por Millipore de 0,45 μ m.

La columna de afinidad, con 5 ml de resina, se ambienta con 15 – 20 ml de solución A y después se cargan 20 ml de la muestra filtrada. Posteriormente la columna se lava con: solución A (5 veces el volumen de la muestra); solución B (2 veces el volumen de la resina); solución A (20 ml) y finalmente eluída con solución C. Se recolectan fracciones de 1 ml. La solución C posee una gran concentración de imidazol que compite por el níquel con la proteína recombinante; cuando la concentración de imidazol supera a la de proteína, ésta se despega y es eluída.

La purificación de la proteína recombinante se analiza en gel de poliacrilamida, determinándose su presencia.

- **Western blot (DF: 14a).**

Esta técnica inmunológica se utiliza para evaluar la purificación de rPsaA luego de su paso por la columna de afinidad Ni-Nta. Las proteínas se transfieren desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (*GibcoBRL*®) durante 1 hora a 100 volts. Posteriormente la membrana se bloquea con leche descremada 5% durante una noche a 4°C. Luego se lava tres veces con PBS tween durante 5 minutos en agitación. Se incuba con el primer anticuerpo policlonal anti His-Tag (*6 Histidine*) diluido 1:2500 en PBS durante dos horas a temperatura ambiente. Luego se lava tres veces con PBS tween durante 5 minutos en agitación. Se incuba con el segundo anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (*Sigma* ®) diluido 1:3000 en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Se repite el lavado y se incuba con la solución de revelado (BCIP/NBT) hasta observar reacción en la membrana. Finalmente la membrana es lavada tres veces con agua destilada durante cinco minutos.

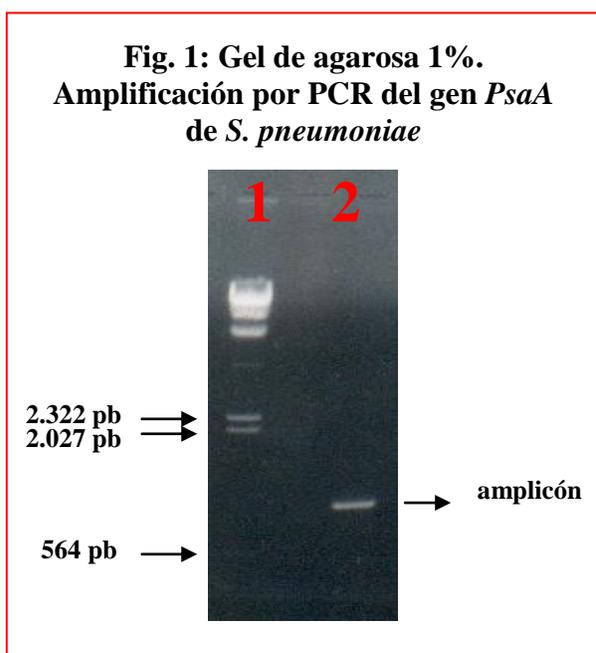
- **Secuenciación automática del DNA plasmidial (DF: 14b).**

La secuenciación automática del plasmidio *PsaA/pET-15b* es realizada por la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

RESULTADOS

- **Amplificación del gen de la proteína PsaA (*PsaA*), por PCR desde un aislado clínico (año 2000) de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 14.**

En gel de agarosa al 1% se observó un amplicón, o fragmento amplificado, de un tamaño entre 2.027 y 564 pares de bases. En Fig. 1 se observa, en el carril 1: estándar *Hind* III; carril 2: fragmento amplificado por PCR.

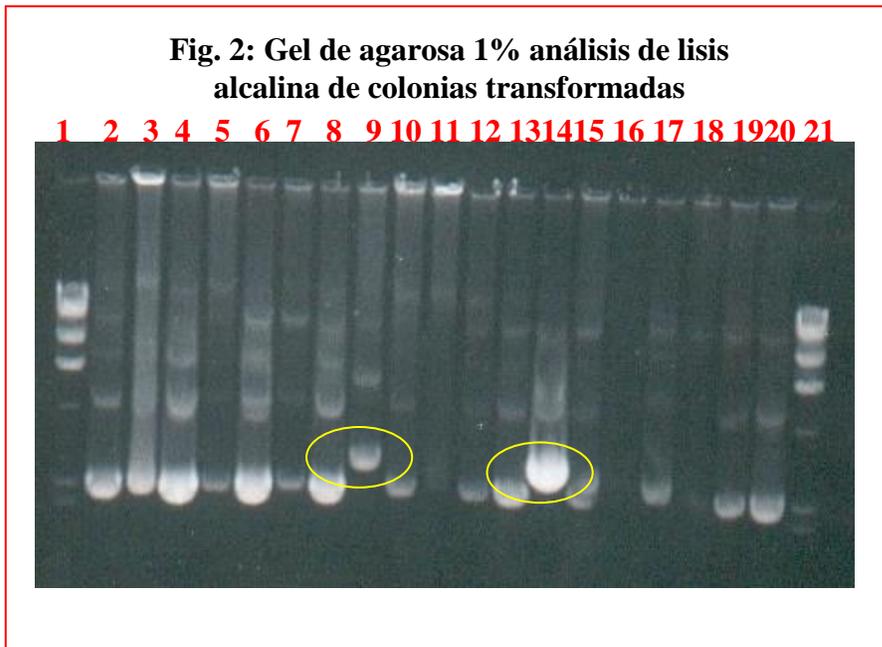


- **Análisis de colonias obtenidas de la transformación de *E. coli* DH5 α con mezcla de ligación *PsaA*/pETBlue-1**

Macroscópicamente las colonias de *E. coli* DH5 α transformadas con la mezcla de ligación y sembradas en agar LAXI, originaron colonias blancas y azules. Siendo las blancas las sospechosas de poseer el gen *PsaA* ligado en el plasmidio pETBlue-1, se seleccionaron 18 de ellas; además se tomó una azul como control negativo. Los cultivos de todas ellas fueron sometidos a la purificación de sus plasmidios por lisis alcalina.

- **Purificación del plasmidio *PsaA*/pETBlue-1 por lisis alcalina**

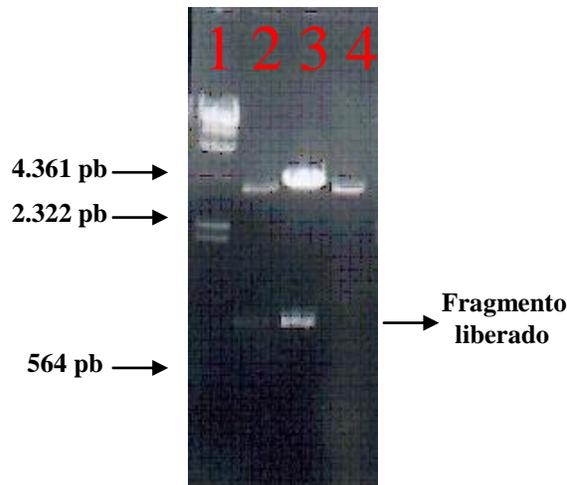
En gel de agarosa se observó que en la purificación de los plasmidios, de los 18 cultivos de colonias sospechosas, sólo los clones 8 y 13 presentaron un patrón de migración menor comparado con el control negativo (colonia azul: A1). En la Fig. 2 se observa, en los carriles 1 y 21: estándar *Hind III*; carriles 2 al 19: colonias sospechosas 1 a 18; carril 20: control negativo A1. Ambos clones sospechosos, junto con el control negativo, fueron los seleccionados para realizarles una digestión doble con las enzimas *BamH I* y *Xho I*.



- **Digestión doble del plasmidio *PsaA*/pETBlue-1 con *BamH I* y *Xho I***

En gel de agarosa 1% se observaron las digestiones dobles de los plasmidios de los clones 8, 13 y control negativo. Tanto el 8 como el 13 liberaron un fragmento muy similar entre ellos y de un tamaño parecido al amplicón previamente obtenido de *S. pneumoniae*. El control negativo no liberó fragmento, pero al ser digerido quedó lineal. El fragmento liberado por el clon 13, por ser el más visible, fue el seleccionado para ser purificado desde la agarosa. En la Fig. 3 se observa, en el carril 1 el estándar *Hind III*; carril 2: clon 8; carril 3: clon 13; carril 4: control negativo A1.

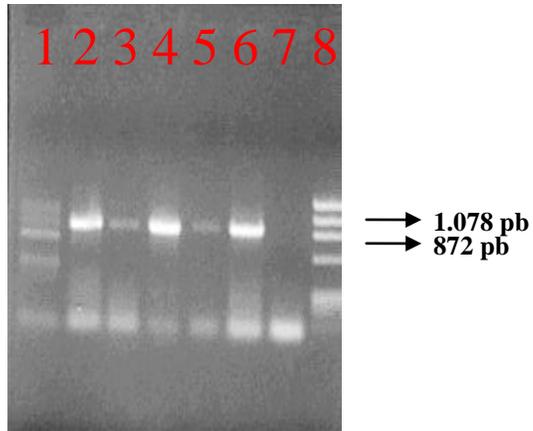
Fig. 3: Gel de agarosa 1%. Digestión doble de clones 8, 13 y A1.



- **Análisis por PCR de las colonias obtenidas en la transformación de *E. coli* DH5 α con mezcla de ligación *PsaA*/pET-15b**

De la transformación de *E. coli* DH5 α con la mezcla de ligación *PsaA*/pET-15b, se obtuvieron 7 colonias homogéneas en el medio de agar con ampicilina, las que fueron analizadas mediante PCR para detectarles el gen *PsaA*. En gel de agarosa se observó, desde las colonias 2, 3, 4, 5 y 6, la amplificación de un fragmento de tamaño aproximado a 930 pares de bases. Este fragmento no se observó nítidamente en la colonia 1 y en la colonia 7 no hubo evidencia de amplificación. En la Fig. 4 se observa, en los carriles 1 al 7 los clones 1 al 7; carril 8: estándar Φ X 174.

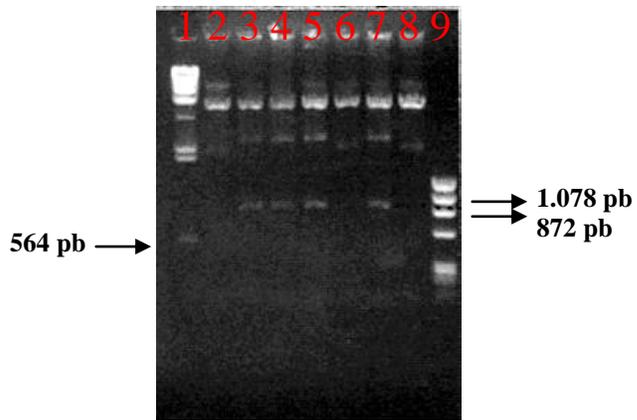
Fig. 4: Gel de agarosa 1%. Análisis mediante PCR de colonias transformadas.



- **Digestión doble del plasmidio *PsaA/pET-15b* con enzimas *BamH I* y *Xho I***

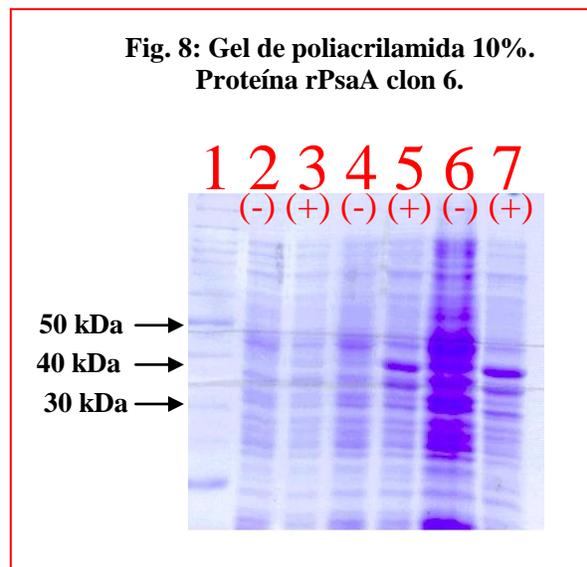
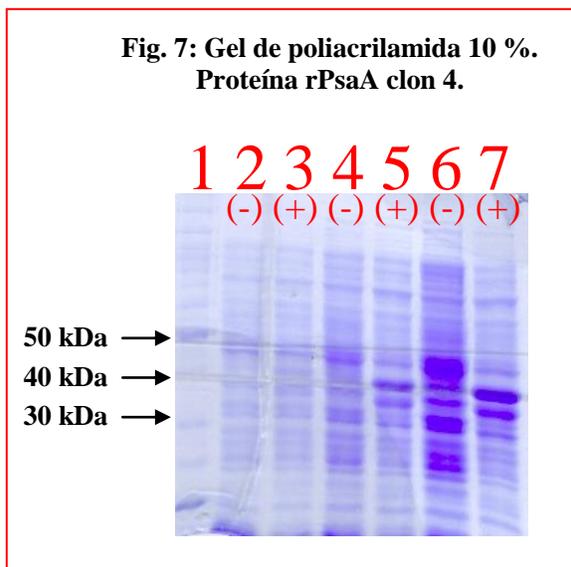
La digestión doble se realizó a las 7 colonias. En gel de agarosa se observó que sólo de los clones 2, 3, 4 y 6 se liberó un fragmento del tamaño esperado. Se determinó seleccionar los clones 4 y 6 para los estudios de expresión. En la figura 6 se observa en el carril 1: estándar *Hind III*; carriles 2 al 8: clones 1 al 7; carril 9: estándar $\Phi X 174$.

Fig. 6: Gel de agarosa 1%. Análisis mediante digestión doble.



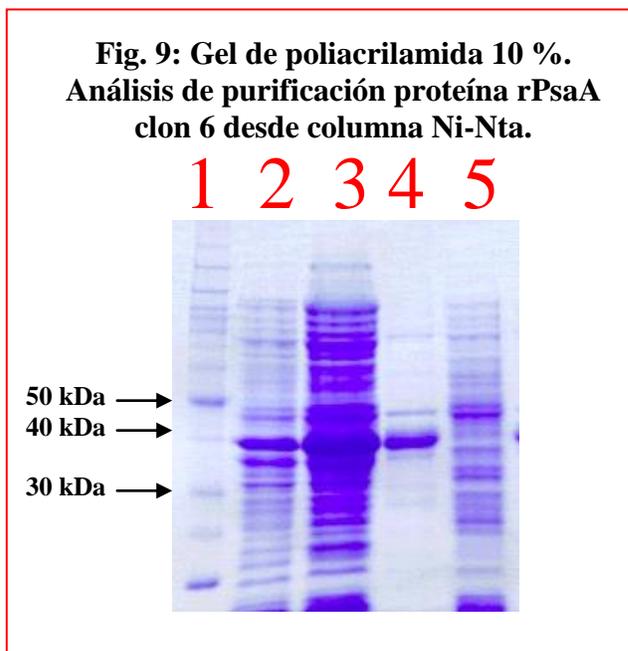
- **Análisis de la expresión de la rPsaA en la cepa *E. coli* BL21DE3**

Una vez obtenida exitosamente la transformación de la cepa *E. coli* BL21DE3 con la mezcla de ligación *PsaA*/pET-15b, se seleccionaron las colonias 4 y 6 cuyos análisis de PCR y digestión doble evidenciaron la presencia de un gen, presumiblemente *PsaA*, en el plasmidio pET-15b. Estas colonias sometidas a un estudio de expresión con análisis en gel de poliacrilamida revelaron una proteína de aproximadamente 37 kDa. sólo en los tubos inducidos con IPTG. Cabe señalar, que no existiendo diferencias entre las figuras 7 y 8, como resultado del estudio de expresión, se observó una mayor diferencia en densidades ópticas en el clon 6, entre tubos positivo y negativo. Debido a esto, el clon 6 fue seleccionado para la producción de la rPsaA y posterior purificación en columna Ni-Nta, análisis mediante Western blot y secuenciación automática. En las Figs. 7 y 8 se observa la expresión de los clones 4 y 6 respectivamente. Carril 1: estándar Bench mark prestained protein ladder; carriles 2 y 3: 1 hora post inducción; carriles 4 y 5: 2 horas post inducción; carriles 6 y 7: 3 horas post inducción. El signo (+) representa los tubos inducidos con IPTG, el signo (-) representa los tubos no inducidos.



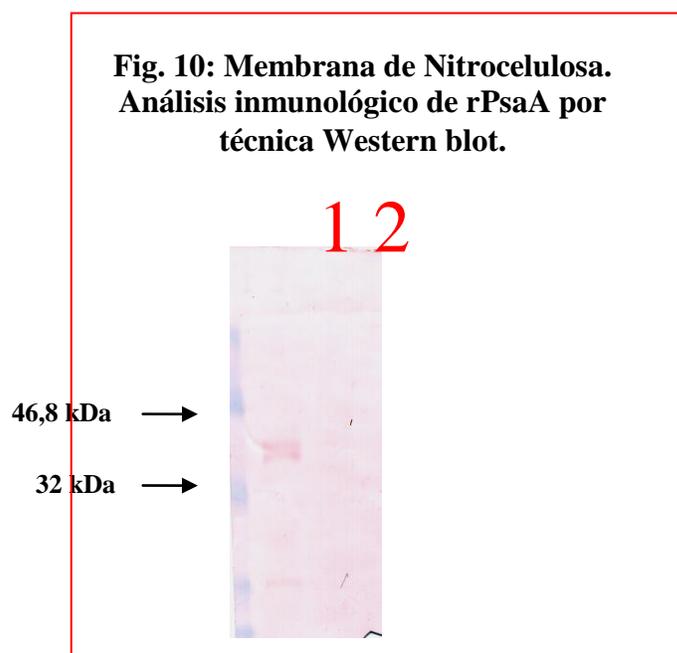
- **Análisis de la purificación de la rPsaA desde columna de afinidad Ni-Nta**

En gel de poliacrilamida se observó la obtención de una proteína con un peso cercano a 37 kDa., con característica de soluble en el sobrenadante del extracto bacteriano cargado en la columna de afinidad Ni-Nta. Se logró obtener la proteína relativamente purificada con algunos contaminantes proteicos; además, se evidencia que una gran proporción de la proteína en búsqueda, se pierde en la fracción 1. Fracción 1 corresponde al producto del extracto total proteico filtrado por la columna de afinidad Ni-Nta. En la Fig. 9 se observa, en el carril 1: estándar Bench mark prestained protein ladder; carril 2: cultivo de 3 horas post inducción; carril 3: fracción 1 ; carril 4: rPsaA eluída con solución C; carril 5: cultivo de 3 horas sin inducción.



- **Western blot**

Por este método se observó que el anticuerpo policlonal anti His-Tag (6 *Histidine*) de conejo, utilizado para identificar los residuos de histidina adicionados a la proteína purificada, reaccionó positivamente con ésta en una unión específica. En la Fig. 10 se observa, en el carril 1: estándar preteñido para proteína (*Fermenta*[®]); carril 2: reacción del anticuerpo policlonal anti His-Tag (6 *Histidine*) con la proteína rPsaA purificada.



- **Secuenciación automática del DNA plasmidial**

La secuencia obtenida por la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, presentó un marco abierto de lectura de 929 pares de bases. Para obtener la secuencia peptídica se utilizó el programa *Primer-Premier*. La secuencia nucleotídica fue comparada en una base de datos, con otras secuencias descritas en la literatura mediante el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). El resultado de las secuencias nucleotídica y peptídica se observan en el anexo 1. El resultado de la comparación entre esta secuencia y otras descritas en literatura se observan en los anexos 2 y 3.

DISCUSIÓN

El desarrollo de vacunas ha podido proteger a las poblaciones humana y animal, disminuyendo la morbilidad y la mortalidad por infecciones bacterianas y virales, incluso con su uso algunas enfermedades han sido erradicadas del mundo, como es el caso de la viruela en el ser humano (Ogra *et al.*, 2001). Existen distintos tipos de vacunas, por microorganismos vivos atenuados, con el riesgo de que pierdan la atenuación y produzcan la enfermedad; otras utilizan microorganismos enteros muertos por calor o por algún método químico. En los últimos años, mediante el uso de ingeniería genética, se han desarrollado vacunas que utilizan fracciones o sub-unidades del microorganismo (polisacáridos, proteínas, conjugados de polisacáridos y de proteínas). Las sub-unidades proteicas de un agente pueden producirse en otras especies bacterianas, como *E. coli*, las que producen una proteína recombinante (rProt) muy similar a la nativa. Por otra parte, otras reemplazan la sub-unidad proteica por el DNA del patógeno que contiene el gen para el antígeno de interés.

Para prevenir la papera equina o gurma, se han formulado distintos tipos de vacunas; sin embargo, aún no se ha encontrado una que proteja eficientemente. En el estudio de distintas proteínas de la bacteria para formular vacunas de sub-unidad, se ha estimado interesante, como en este trabajo, utilizar una proteína homóloga a la Pneumococcal surface adhesin A (PsaA) de *Streptococcus pneumoniae* (Chanter, 2002). Esta proteína, importante factor de virulencia, es conservada en los 90 serotipos descritos en *S. pneumoniae*, presenta homología con proteínas de otros streptococos (Morrison *et al.*, 2000; Jado *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2002), y puede ser un inmunógeno de utilidad contra *S. equi*, causal de gurma (Chanter, 2002). Debido a estudios que señalan dificultades en la producción y purificación de grandes cantidades de esta proteína desde *S. pneumoniae* (Tharpe y Russell, 1996; De et al., 2000), en este trabajo se obtuvo en una forma recombinante desde *E. coli*.

La cepa de *Streptococcus pneumoniae* aquí utilizada, mantenida en alícuotas a -20°C y desde la cual se amplificó el gen, permitió obtener siempre un fragmento del mismo tamaño, asegurando una reserva estable en el tiempo del gen PsaA, situación que fue esencial para la realización de este trabajo.

Para amplificar el gen *PsaA* desde la cepa *S. pneumoniae* utilizada y al no existir una técnica de PCR estandarizada, se empleó partidores diseñados por el laboratorio y se experimentaron cambios en la concentración de MgCl₂ y en la temperatura de annealing en

el programa de PCR, hasta que se logró una reacción más específica, es decir, una banda única, bien definida y de un tamaño aproximado a 930 pb que es el descrito para este gen (Sampson *et al.*, 1994).

Los partidores diseñados en el laboratorio del Centro de Investigación y Desarrollo son diferentes a los descritos en la literatura; estas diferencias son en relación a sus tamaños, algunas secuencias nucleotídicas y, en las enzimas de restricción. También hubo diferencias con los programas de PCR señaladas en otras publicaciones; sin embargo, con los cambios aquí incorporados, se obtuvo un fragmento amplificado muy similar a los obtenidos por otros autores, lo que demuestra que el gen *PsaA* no presenta grandes cambios en su secuencia entre las diferentes cepas de *S. pneumoniae* que han sido utilizadas, incluyendo la de este trabajo (Sampson *et al.*, 1997; De *et al.*, 2000; Morrison *et al.*, 2000; Miyaji *et al.*, 2002).

Una vez amplificado el gen, debió purificarse y para esto último, el empleo del “Kit” comercial “Gel extraction” (D2501-01) *E.Z.N.A.*® fue eficiente en este propósito.

Para realizar la ligación del gen al plasmidio de clonamiento, previamente debió extenderse el gen con poliadeninas a objeto de complementarlo con los extremos del plasmidio. Este producto ligado, *PsaA/pETBlue-1*, fue el introducido en la cepa de clonamiento *E. coli* DH5 α , es decir en aquella que al originar colonias diferentes, permite seleccionarlas macroscópicamente según su color. Las colonias blancas son las sospechosas de incorporar un *PsaA/pETBlue-1*, no así las azules que son indicativas de incorporar un plasmidio pero sin el gen insertado, como fue el resultado obtenido aquí al analizar ambos tipos de colonias. La presencia en agar LAXI de colonias azules y blancas, obtenidas en la transformación de *E. coli* DH5 α con mezcla de ligación *PsaA/pETBlue-1*, se debe a que el plasmidio pETBlue-1 posee el gen *lacZ*; este gen es funcional cuando el plasmidio se cierra solo (durante la ligación con el gen *PsaA*). El gen *lacZ* sintetiza la enzima β -galactosidasa, la cual es inducida en este caso por el IPTG, que degrada el X-Gal presente en agar LAXI, originando una coloración azul a colonias transformadas con este plasmidio. Sin embargo, si el gen *PsaA* se inserta en el plasmidio, el gen *lacZ* queda interrumpido y la enzima no se sintetiza, originando colonias blancas (Sambrook *et al* 1989).

La lisis alcalina, metodología utilizada para purificar plasmidios desde cepas bacterianas, es una técnica económica, fácil de implementar (Sambrook *et al* 1989), pero

tiene las desventajas de tener una menor eficiencia en la pureza de los plasmidios y de ser un proceso más lento comparado con “kits” comerciales.

La liberación del gen *PsaA* desde el plasmidio pETBlue-1 fue realizada con las enzimas de restricción *BamH I* y *Xho I*; la elección específica de estas enzimas se debió a que al analizar la secuencia del gen, no se observaron sitios de corte para ellas, siendo incluidas por tanto, en el diseño de los partidores. En esta etapa, se encontraron dificultades en la digestión del plasmidio *PsaA*/pETBlue-1, que se pensó producto del tiempo de incubación; para esto se probaron diferentes tiempos sin lograr el resultado esperado. Durante el proceso de digestión, en gel de agarosa el plasmidio se observó lineal, sin liberar el fragmento o gen. Un plasmidio sin digestión normalmente puede presentar tres formas (circular, sobre enrollado y lineal), cada uno con patrón de migración diferente en gel de agarosa; sin embargo, aquel plasmidio digerido, al menos con una enzima, sólo presenta la forma lineal. Un plasmidio que posea un gen bien insertado, digerido con las dos enzimas específicas liberará el gen, quedando el plasmidio lineal y, se observará en gel de agarosa dos bandas de distinto tamaño correspondientes al plasmidio y al gen. Debido a que el empleo simultáneo de ambas enzimas de restricción no liberó el gen, se procedió a la digestión del plasmidio con cada enzima en forma separada. Resultado de esto último se evidenció que *BamH I* no digería y, de esta forma, se concluyó que esta enzima estaba degradada debido a un problema de temperatura en su almacenamiento (-20°C); un cambio en la serie de esta enzima, permitió el corte esperado con la liberación del fragmento en los clones 8 y 13. El control negativo, como se esperaba, no liberó fragmento.

En cuanto a la ligación del gen con el plasmidio de expresión pET-15b, ésta se logró exitosamente al analizar los plasmidios incorporados en las colonias de *E. coli* DH5 α obtenidas luego de su transformación.

El utilizar plasmidios comerciales como son el pETBlue-1 y pET-15b que portan un gen de resistencia a ampicilina y, medios de cultivo suplementados con este antibiótico, se puede discriminar entre cepas bacterianas transformadas que crecen en estos medios de cultivo, de aquellas bacterias que, al no incorporar el plasmidio son incapaces de crecer. Además el plasmidio pETBlue-1 permite diferenciar macroscópicamente colonias según su color, y así seleccionar en forma rápida y segura aquellos clones que presentan un gen inserto en el plasmidio.

Las colonias obtenidas de la transformación de *E. coli* DH5 α con *PsaA*/pET-15b no presentaron diferencias de color debido a que este plasmidio no posee la secuencia del gen *lacZ*, necesario para la síntesis de la enzima β -galactosidasa, que utiliza los componentes del agar LAXI; por lo mismo en esta etapa sólo se empleó agar LB/a. El caldo LB/a y la cepa de clonamiento *E. coli* DH5 α son las mismas que utilizó Miyaji *et al.* (2002) para clonar plasmidios, en la elaboración de una vacuna DNA para uso humano.

Una vez obtenido y amplificado el gen *PsaA* ligado al plasmidio pET-15b (*PsaA*/pET-15b), desde *E. coli* DH5 α , y luego del largo proceso hasta aquí detallado, correspondió estudiar si el *PsaA*/pET-15b, obtenido desde dos clones seleccionados, eran capaces de inducir la síntesis de la proteína recombinante rPsaA, objetivo final de esta memoria de título. Para ello, se insertaron ambos plasmidios en la bacteria *E. coli* BL21DE3 que cumple con todos los requerimientos para expresar la proteína recombinante. Esta bacteria se caracteriza por poseer el gen de la RNA polimerasa del fago T7, que transcribe la información del gen *PsaA* inserto. El represor *Lac*, presente en el plasmidio pET-15b, impide la expresión del gen *PsaA*. Este represor se inhibe en presencia de lactosa o algún análogo como el IPTG; así la T7 RNA polimerasa, puede transcribir la información del gen *PsaA* y sintetizar la proteína (Sambroock, *et al.*, 1989).

La expresión final obtenida en la bacteria *E. coli* BL21DE3 correspondió a una proteína de peso aproximado a los 37 kDa. que es el descrito para la PsaA (Russell *et al.*, 1990; Jado *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2002); esta proteína fue obtenida tanto con el clon 4 como con el 6. Los productos de ambos clones se pueden asimilar a los obtenidos por Pilling *et al.* (1998), De *et al.* (2000), Gor *et al.* (2002), Seo *et al.* (2002), De *et al.* (2003), quienes utilizaron otros serotipos de *S. pneumoniae* y metodologías diferentes para el mismo fin.

La purificación de la proteína expresada tuvo dificultades, debido a una saturación de la columna que permitió que gran proporción de la proteína no se pegara a la columna, incluyéndose en la fracción 1; así el paso sucesivo de esta fracción a través de la columna luego de cada elusión, mejoró la captación de la proteína. La saturación se debió seguramente al poco volumen de resina utilizada para purificar una gran cantidad de sedimento obtenido en la producción de 10 L de cultivo.

El mismo método de purificación, utilizando columna de afinidad de níquel y con algunas modificaciones, fue utilizado por Pilling *et al.* (1998), Ogunniyi *et al.* (2000) y

Rapola *et al.* (2000); estos autores quienes también lograron la purificación de rPsaA, tuvieron como objetivo su aplicación para método diagnóstico de infecciones por *S. pneumoniae*; como también como inmunógeno para prevenir la colonización e infecciones respiratorias por la misma bacteria.

La aplicación de la técnica de Western blot permitió verificar que la proteína purificada fue realmente la proveniente del gen inserto en el plasmidio pET-15b, debido a que presentó los residuos de histidina que son reconocidos por el anticuerpo policlonal de conejo anti His-Tag (6 Histidine).

La secuenciación automática del gen *PsaA* clonado en el plasmidio pET-15b, presentó un marco de lectura abierto de 930 pb., que es lo que se describe para este gen, junto a un 98% de identidad con otras secuencias descritas para este mismo gen, se puede afirmar que la proteína, resultado de esta memoria es una rPsaA. Además hay que destacar que esta secuencia presentó cuatro regiones con identidades del 87%, 83%, 81% y 80% con el gen de la proteína de *S. equi* homóloga con PsaA.

El resultado de este producto, por el antecedente de su naturaleza proteica, permite inferir que su incorporación en un hospedero, es capaz de generar anticuerpos contra ella y posiblemente algún nivel protectorio contra el desafío con *S. equi*. Esta proyección, a la fecha, no ha sido señalada en la literatura.

Aunque se demostró que una rPsaA era indistinguible inmunológicamente de una PsaA nativa (De *et al.*, 2003), es necesario realizar estudios de inmunidad, con la proteína aquí obtenida, en distintos modelos animales tanto de laboratorio como en la especie equina.

CONCLUSIÓN

- El gen PsaA de una cepa de *Streptococcus pneumoniae* de un caso clínico, amplificado por técnica de PCR, resultó muy conservado, al compararlo con genes PsaA de otras cepas de la misma especie descritos en la literatura.
- El método de transformación mediante shock térmico, es un procedimiento de bajo costo, simple y que permite obtener eficientemente colonias transformadas.
- El empleo de isopropiltiogalactósido (IPTG) induce específicamente la expresión de la proteína PsaA en la cepa *E. Coli* BL21DE3.
- La columna de afinidad de níquel permite purificar parcialmente proteínas con residuos de histidina.
- Mediante la metodología utilizada en esta memoria de título, es posible obtener una proteína PsaA recombinante casi idéntica a la nativa. Además esta metodología puede ser utilizada para obtener otras proteínas de microorganismos.
- La proteína recombinante obtenida en experiencia experimental, puede ser producida a un mayor volumen, permitiendo proyectar futuros estudios inmunológicos en formulación de vacunas o en métodos diagnósticos.

BIBLIOGRAFIA

- **ABELSON, J. N., SIMON, M. I.** 1990. Guide to Protein Purification: Methods in Enzymology. Editorial Academic Press, INC. San Diego, EUA. 1-880 p.

- **ANZAI, T., SHEORAN, A. S., KUWAMOTO, Y., KONDO, T., WADA, R., INOUE, T., TIMONEY, J. F.** 1999a. *Streptococcus equi* but not *Streptococcus zooepidemicus* produces potent mitogenic responses from equine peripheral blood mononuclear cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 67: 235-246
- **ANZAI, T., TIMONEY, J. F., KUWAMOTO, Y., FUJITA, Y., WADA, R., INOUE, T.** 1999b. In vivo pathogenicity and resistance to phagocytosis of *Streptococcus equi* strains with different levels of capsule expression. *Vet. Microbiol.* 67: 277-286
- **ARÊAS, A. P., OLIVEIRA, M. L., MIYAJI, E. N., LEITE, L. C., AIRES, K. A., DIAS, W. O., HO, P. L.** 2004. Expression and characterization of cholera toxin B-pneumococcal surface adhesin A fusion protein in *Escherichia coli*: ability of CTB-PsaA to induce humoral immune response in mice. *B.B.R.C.* 321: 192-196
- **ARTIUSHIN, S. C., TIMONEY, J. F., SHEORAN, A. S., MUTHUPALANI, S. K.** 2002. Characterization and immunogenicity of pyrogenic mitogens SePE-H and SePE-I of *Streptococcus equi*. *Microb. Pathog.* 32: 71-85
- **BARIL, L., BRILES, D. E., CROIZER, P., KING, J., PUNAR, M., HOLLINGSHEAD, S. K., McCORMICK, J. B.** 2004. Characterization of antibodies to PspA and PsaA in adults over 50 years with invasive pneumococcal disease. *Vaccine* 23: 789-793
- **BERRY, A. M., PATON, J. C.** 1996. Sequence Heterogeneity of PsaA, a 37-Kilodalton Putative Adhesin Essential for Virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 64(12): 5255-5262
- **BOGAERT, D., HERMANS, P. W. M., ADRIAN, P. V., RÛMKE, H. C., de GROOT, R.** 2004. Pneumococcal vaccines: an update on current strategies. *Vaccine* 22: 2209-2220
- **BOSCHWITZ, J., TIMONEY, J.** 1994. Characterization of the antiphagocytic activity of equine fibrinogen for *Streptococcus equi* subspecies *equi*. *Microb. Pathog.* 17: 121-129
- **BRILES, D. E., TART, R. C., SWIATLO, E., DILLARD, J. P., SMITH, P., BENTON, K. A., RALPH, B. A., BROOKS-WALTER, A., CRAIN, M. J., HOLLINGSHEAD, S. K., McDANIEL, L. S.** 1998. Pneumococcal Diversity: Considerations for New Vaccine Strategies with Emphasis on Pneumococcal Surface Protein A (PspA). *Clin. Microbiol. Rev.* 11(4): 645-657

- **BRILES, D. E., ADES, E., PATON, J. C., SAMPSON, J. S., CARLONE, G. M., HUEBNER, R. C., VIROLAINEN, A., SWIATLO, E., HOLLINGSHEAD, S. K.** 2000. Intranasal Immunization of Mice with a Mixture of the Pneumococcal Proteins PsaA and PspA Is Highly Protective against Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 68(2): 796-800
- **BRILES, D. E., HAKANSSON, A., ROCHE, H., HOLLINGSHEAD, S. S.** 2001. New Vaccines for Non-Serotype-Dependent Protection Against Pneumococcal Disease. *Grand Ballroom A.* 327-334
- **BROOKS, D. E., ANDREW, S. E., BIROS, D. J., DENIS, H. M., CUTLER, T. J., STRUBBE, D. T., GELATT, K. N.** 2000. Ulcerative Keratitis caused by beta-hemolytic *Streptococcus equi* in horses. *Vet. Ophthalmol.* 3: 121-125
- **CANFIELD, P. J., LOVE, D. N., RAINGER, J., BAILEY, G. D.** 2000. Strangles in Horses: A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Editorial Canprint. Sydney, Australia. 55 p.
- **CATTERALL, J. R.** 1999. Lung infection: *Streptococcus pneumoniae*. *Thorax* 54: 929-937
- **CHANTER, N., SMITH, K. C., MUMFORD, J. A.** 1995. Equine strangles modelled in mice. *Vet. Microbiol.* 43: 209-218
- **CHANTER, N., WARD, CH. L., TALBOT, N. C., FLANAGAN, J. A., BINNS, M., HOUGHTON, S. B., SMITH, K. C., MUMFORD, J. A.** 1999. Recombinant hyaluronate associated protein as a protective immunogen against *Streptococcus equi* and *Streptococcus zooepidemicus* challenge in mice. *Microb. Pathog.* 27: 133-143
- **CHANTER, N., TALBOT, N. C., NEWTON, J. R., HEWSON, D., VERHEYEN, K.** 2000. *Streptococcus equi* with truncated M-proteins isolated from outwardly healthy horses. *Microbiology* 146: 1361-1369
- **CHANTER, N.** 2002. Bacterial Infections Including Mycoplasmas. *In: Equine Respiratory Diseases.* Tomado de <www.ivis.org> [consulta: 17-11-2003]
- **CLAVERYS, J., GRANADEL, C., BERRY, A. M., PATON, J. C.** 1999. MicroCorrespondence: Penicillin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*, autolysis and the Psa ATP-binding cassette (ABC) manganese permease. *Mol. Microbiol.* 32(4):881-891
- **COSSART, P., SANSONETTI, P. J.** 2004. Bacterial Invasion: The Paradigms of Enteroinvasive Pathogens. *Science* 304: 242-248
- **CROOK, J., THARPE, J. A., JOHNSON, S. E., WILLIAMS, D. B., STINSON, A. R., FACKLAM, R. R., ADES, E. W., CARLONE, G. M., SAMPSON, J. S.** 1998. Immunoreactivity of Five Monoclonal Antibodies against the 37-Kilodalton Common

Cell Wall Protein (PsaA) of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5(2): 205-210

- **DE, B. K., SAMPSON, J. S., ADES, E. W., HUEBNER, R. C., JUE, D. L., JOHNSON, S. E., ESPINA, M., STINSON, A. R., BRILES, D. E., CARLONE, G. M.** 2000. Purification and characterization of *Streptococcus pneumoniae* palmitoylated pneumococcal surface adhesin A expressed in *Escherichia coli*. *Vaccine* 18: 1811-1821
- **DE, B. K., WOOLFITT, A. R., BARR, J. R., DANESHVAR, M. I., SAMPSON, J. S., ADES, E. W., CARLONE, G. M.** 2003. Analysis of recombinant acylated pneumococcal surface adhesin A of *Streptococcus pneumoniae* by mass spectrometry. *A.B.B.* 419: 147-157
- **DINTILHAC, A., ALLOING, G., GRANADEL, C., CLAVERYYS, J.** 1997. Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol. Microbiol.* 25(4): 727-739
- **ELSAYED, S., HAMMERBERG, O., MASSEY, V., HUSSAIN, Z.** 2003. *Streptococcus equi* subspecies *equi* (Lancefield group C) meningitis in a child. *Clin. Microbiol. Infect.* 9: 869-872
- **FLANAGAN, J., COLLIN, N., TIMONEY, J., MITCHELL, T., MUMFORD, J. A., CHANTER, N.** 1998. Characterization of the haemolytic activity of *Streptococcus equi*. *Microb. Pathog.* 24: 211-221
- **FLOCK, M., JACOBSSON, K., FRYKBERG, L., HIRST, T. R., FRANKLIN, A., GUSS, B., FLOCK, J.** 2004. Recombinant *Streptococcus equi* Proteins Protect Mice in Challenge Experiments and Induce Immune Response in Horses. *Infect. Immun.* 72(6): 3228-3236
- **GALAN, J. E., TIMONEY, J. F., LENGEMANN, F. W.** 1986. Passive Transfer of Mucosal Antibody to *Streptococcus equi* in the Foal. *Infect. Immun.* 54(1): 202-206
- **GALAN, J. E., TIMONEY, J. F.** 1988. Immunologic and Genetic Comparison of *Streptococcus equi* Isolates from the United States and Europe. *J. Clin. Microbiol.* 26(6): 1142-1146
- **GOMEZ, N., FERREIRO, J. L., IBAÑEZ, J., SEVILLANO, J.** 1998. Spondylodiscitis Caused by *Streptococcus equisimilis*. *Br. J. Rheumatol.* 37(9): 1030-1032
- **GOR, D. O., DING, X., LI, Q., SCHREIBER, J. R., DUBINSKY, M., GREENSPAN, N. S.** 2002. Enhanced Immunogenicity of Pneumococcal Surface

Adhesin A by Genetic Fusion to Cytokines and Evaluation of Protective Immunity in Mice. *Infect. Immun.* 70(10): 5589-5595

- **GURUNATHAN, S., KLINMAN, D. M., SEDER, R. A.** 2000. DNA Vaccines: Immunology, Application, and Optimization. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 927- 974
- **HARRINGTON, D. J., GREATER, J. S., CHANTER, N., SUTCLIFFE, I. C.** 2000. Identification of Lipoprotein Homologues of Pneumococcal PsaA in the Equine Pathogens *Streptococcus equi* and *Streptococcus zooepidemicus*. *Infect. Immun.* 68(10): 6048-6051
- **HARRINGTON, D. J., SUTCLIFFE, I. C., CHANTER, N.** 2002. The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease. *Microbes and Infection* 4: 501-510
- **JADO, I., FENOLL, A., CASAL, J., PEREZ, A.** 2001. Identification of the *psaA* Gene, Coding for Pneumococcal Surface Adhesin A, in Viridans Group Streptococci other than *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8(5): 895-898
- **JEDRZEJAS, M.** 2001. Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65(2): 187-207
- **JOHNSON, S. E., DYKES, J. K., JUE, D. L., SAMPSON, J. S., CARLONE, G. M., ADES, E.W.** 2002. Inhibition of Pneumococcal Carriage in Mice by Subcutaneous Immunization with Peptides from the Common Surface Protein Pneumococcal Surface adhesin A. *JID* 185: 489-496
- **JOHNSTON, J. W., MYERS, L. E., OCHS, M. M., BENJAMIN, W. H., BRILES, D. E., HOLLINGSHEAD, S. K.** 2004. Lipoprotein PsaA in Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Surface Accessibility and Role in Protection from Superoxide. *Infect. Immun.* 72(10): 5858-5867
- **KARLSTRÖM, A., JACOBSSON, K., FLOCK, M., FLOCK, J., GUSS, B.** 2004. Identification of a novel collagen-like protein, ScIC, in *Streptococcus equi* using signal sequence phage display. *Vet. Microbiol.* 104: 179-188
- **KUMAR, P., TIMONEY, J. F., SHEORAN, A. S.** 2001. M cells and associated lymphoid tissue of the equine nasopharyngeal tonsil. *Equine Vet. J.* 33(3): 218-220
- **LAINE, C., MWANGI, T., THOMPSON, C. M., OBIERO, J., LIPSITCH, M., SCOTT, A. G.** 2004. Age-Specific Immunoglobulin G (IgG) and IgA Pneumococcal Protein Antigens in a Population in Coastal Kenya. *Infect. Immun.* 72(6): 3331-3335
- **LANNERGARD, J., FRYKBERG, L., GUSS, B.** 2003. CNE, a collagen-binding protein of *Streptococcus equi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 222: 69-74
- **LEVY, S. B.** 2002. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J.A.C.* 49: 25-30

- **LINDMARK, H., GUSS, B.** 1999. SFS, a Novel Fibronectin-Binding Protein from *Streptococcus equi*, Inhibits the Binding between Fibronectin and Collagen. *Infect. Immun.* 67(5): 2383-2388
- **LINDMARK, H., NILSSON, M., GUSS, B.** 2001. Comparison of the Fibronectin-Binding Protein FNE from *Streptococcus equi* subsp. *equi* with FNZ from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* Reveals a Major and Conserved Difference. *Infect. Immun.* 69(5): 3159-3163
- **MARRA, A., LAWSON, S., ASUNDI, J. S., BRIGHAM, D., HROMOCKYJ.** 2002. In vivo characterization of the *psa* genes from *Streptococcus pneumoniae* in multiple models of infection. *Microbiology* 148: 1483-1491
- **MARTINEZ, J., BAQUERO, F.** 2002. Interactions among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity, Epidemicity, and Antibiotic Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(4): 647-679
- **MAY, J. P., WALKER, C. A., MASKELL, D. J., SLATER, J. D.** 2004. Development of an in vivo *Himar 1* transposon mutagenesis system for use in *Streptococcus equi* subsp. *equi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 238: 401-409
- **MEEHAN, M., NOWLAN, P., OWEN, P.** 1998. Affinity purification and characterization of a fibrinogen-binding protein complex which protects mice against lethal challenge with *Streptococcus equi* subsp. *equi*. *Microbiology* 144: 993-1003
- **MEEHAN, M., LYNAGH, Y., WOODS, C., OWEN, P.** 2001. The fibrinogen-binding protein (FgBP) of *Streptococcus equi* subsp. *equi* additionally binds IgG and contributes to virulence in a mouse model. *Microbiology* 147: 3311-3322
- **MIYAJI, E. N., WALDELY, O. D., GAMBERINI, M., GEBARA, V. C., SCHENKMAN, R. P., WILD, J., RIEDL, P., REIMANN, J., SCHIRMBECK, R., LEITE, L, C.** 2002. PsaA (pneumococcal surface adhesin A) and PspA (pneumococcal surface protein A) DNA vaccine induce humoral and cellular immune responses against *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* 20: 805-812
- **MORRISON, K. E., LAKE, D., CROOK, J., CARLONE, G. M., ADES, E., FACKLAM, R., SAMPSON, J. S.** 2000. Confirmation of *psaA* in All 90 Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and Potential of This Assay for Identification and Diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 38(1): 434-437
- **NALLY, J. E., ARTIUSHIN, S., SHEORAN, A. S., BURNS, P. J., SIMON, B., GILLEY, R. M., GIBSON, J., SULLIVAN, S., TIMONEY, J. F.** 2001. Induction of mucosal and systemic antibody specific for SeMF3 of *Streptococcus equi* by intranasal vaccination using a sucrose acetate isobutyrate based delivery system. *Vaccine* 19: 492-497

- **NAVARRE, W. W., SCHNEEWIND, O.** 1999. Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63 (1): 174-229
- **NOVAK, R., BRAUN, J. S., CHARPENTIER, E., TUOMANEN, E.** 1998. Penicillin tolerance genes of *Streptococcus pneumoniae*: the ABC-type manganese permease complex. *Mol. Microbiol.* 29(5): 1285-1296
- **OBARO, S. K., ADEGBOLA, R. A., THARPE, J. A., ADES, E. W., McADAM, K. P., CARLONE, G., SAMPSON, J. S.** 2001. Pneumococcal surface adhesin A antibody concentration in serum and nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in young African infants. *Vaccine* 19: 411-412
- **OGRA, P. L., FADEN, H., WELLIVER, R. C.** 2001. Vaccination Strategies for Mucosal Immune Responses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(2): 430-445
- **OGUNNIYI, A. D., FOLLAND, R. L., BRILES, D. E., HOLLINGSHEAD, S. K., PATON, J. C.** 2000. Immunization of mice with combinations of Pneumococcal Virulence Proteins Elicits Enhanced Protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 68(5): 3028-3033
- **OGUNNIYI, A. D., GIAMMARINARO, P., PATON, J. C.** 2002. The genes encoding virulence-associated proteins and the capsule of *Streptococcus pneumoniae* are upregulated and differentially expressed in vivo. *Microbiology* 148: 2045-2053
- **PALANIAPPAN, R., SINGH, S., SINGH, U. P., SAKTHIVEL, S. K., ADES, E. W., BRILES, D. E., HOLLINGSHEAD, S. K., PATON, J. C., SAMPSON, J. S., LILLARD Jr, J. W.** 2005. Differential PsaA-, PspA-, PspC-, and PdB-Specific Immune Responses in a Mouse Model of Pneumococcal Carriage. *Infect. Immun.* 73(2): 1006-1013
- **PATON, J. C., ANDREW, P. W., BOULNOIS, G., MITCHELL, T. J.** 1993. Molecular Analysis of the Pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: The Role of Pneumococcal Proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 89-115
- **PILLING, P. A., LAWRENCE, M. C., BERRY, A. M., OGUNNIYI, A. D., LOCK, R. A., PATON, J. C.** 1998. Expression, purification and preliminary X-ray crystallographic analysis of PsaA, a putative metal-transporter protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Acta Cryst. D*54: 1464-1466
- **PRADO, V.** 2001. Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*. *Rev. Chil. Infect.* 18(1): 6-9
- **RAPOLA, S., KILPI, T., LAHDENKARI, M., MAKELA, P. H., KAYHTY, H.,** 2001. Antibody response to the pneumococcal proteins pneumococcal surface adhesin A and pneumolysin in children with acute otitis media. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 20: 482-487

- **REGLIER-POUPET, H., PELLEGRINI, E., CHARBIT, A., BERCHE, P.** 2003. Identification of LpeA, a PsaA-Like Membrane Protein That Promotes Cell Entry by *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 71(1): 474-482
- **ROMERO-STEINER, S., PILISHVILI, T., SAMPSON, J. S., JOHNSON, S. E., STINSON, A., CARLONE, G. M., ADES, E. W.** 2003. Inhibition of Pneumococcal Adherence to Human Nasopharyngeal Epithelial Cells by Anti-PsaA Antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10(2): 246-251
- **RUOFF, K. L., WHILEY, R. A., BEIGHTON, D.** 2003. Manual of Clinical Microbiology. Octava ed. Editorial Board. Washington DC, USA. 283-296 p.
- **RUSSELL, H., THARPE, J. A., WELLS, D. E., WHITE, E. H., JOHNSON, J. E.** 1990. Monoclonal Antibody Recognizing a Species-Specific Protein from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 28(10): 2191-2195
- **SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T.** 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. Segunda edición. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A. Vol. 1. 176 p
- **SAMPSON, J. S., O'CONNOR, S. P., STINSON, A. R., THARPE, J. A., RUSSELL, H.** 1994. Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of *psaA*, the *Streptococcus pneumoniae* Gene Encoding a 37-Kilodalton Protein Homologous to Previously Reported *Streptococcus* sp. Adhesins. *Infect. Immun.* 62(1): 319-324
- **SAMPSON, J. S., FURLOW, Z., WHITNEY, A. M., WILLIAMS, D., FACKLAM, R., CARLONE, G. M.** 1997. Limited Diversity of *Streptococcus pneumoniae PsaA* among Pneumococcal Vaccine Serotypes. *Infect. Immun.* 65(5): 1967-1971
- **SCOTT, J. A., OBIERO, J., HALL, A. J., MARSH, K.** 2002. Validation of Immunoglobulin G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Antibodies to Pneumococcal Surface Adhesin A in the Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia among Adults in Kenya. *J.I.D.* 186:220-226
- **SECHI, L. A., ROGER, F., DIALLO, A., YIGEZU, L. M., ZANETTI, S., FADDA, G.** 1999. Molecular characterization of *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolated from an Ethiopian camel by ribotyping and PCR-ribotyping. *New Microbiol.* 22(4): 383-387
- **SEO, J., SEONG, S. Y., AHN, B., KWON, I. C., CHUNG, H., JEONG, S. Y.** 2002. Cross-Protective Immunity of Mice Induced by Oral Immunization with Pneumococcal Surface Adhesin A Encapsulated in Microspheres. *Infect. Immun.* 70(3): 1143-1149
- **SETHI, S., MURPHY, T.** 2001. Bacterial Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease in 2000: a State-of-the-Art Review. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(2): 336-363
- **SHEORAN, A. S., SPONSELLER, B. T., HOLMES, M. A., TIMONEY, J. F.** 1997. Serum and mucosal antibody isotype responses to M-like protein (SeM) of

- Streptococcus equi* in convalescent and vaccinated horses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 59: 239-251
- **SHEORAN, A. S., TIMONEY, J. F., HOLMES, M. A., KARZENSKI, S. S., CRISMAN, M. V.** 2000. Immunoglobulin isotypes in sera and nasal mucosal secretions and their neonatal transfer and distribution in horses. *Am. J. Vet. Res.* 61(9): 1099-1105
 - **SHEORAN, A. S., ARTIUSHIN, S., TIMONEY, J. F.** 2002. Nasal mucosal immunogenicity for the horse of a SeM peptide of *Streptococcus equi* genetically coupled to cholera toxin. *Vaccine* 20: 1653-1659
 - **SIMELL, B., KORKEILLA, M., PURSIAINEN, H., KILPI, T., KAYHTY, H.** 2001. Pneumococcal Carriage and Otitis Media Induce Salivary Antibodies to Pneumococcal Surface Adhesin A, Pneumolysin, and Pneumococcal Surface Protein A in Children. *J. I. D.* 183: 887-896
 - **SOTO, G. E., HULTGREN, S. J.** 1999. Bacterial adhesins: Common Themes and Variations in Architecture and Assembly. *J. Bacteriol.* 181(4): 1059-1071
 - **SPOORMAKERS, T. J. P., ENSINK, J. M., GOEHRING, L. S., KOEMAN, J. P., TER BRAAKE, F., VAN DER VLUGT-MEIJER, R. H., VAN DEL BELT, J. M.** 2003. Brain abscesses as a metastatic manifestation of strangles: symptomatology and the use of magnetic resonance imaging as a diagnostic aid. *Equine Vet. J.* 35(2): 146-151
 - **SRIVASTAVA, I. K., ZEILER, J. L., SMITHSON, S. L., CARLONE, G. M., ADES, E. W., SAMPSON, J. S., JOHNSON, S. E., KIEBER-EMMONS, T., WESTERINK, M. A.** 2000. Selection of an Immunogenic and Protective Epitope of the PsaA Protein of *Streptococcus pneumoniae* Using a phage Display Library. *Hybridoma* 19(1): 23-31
 - **SRIVASTAVA, I. K., LIU, M. A.** 2003. Gene Vaccines. *Ann. Intern. Med.* 138: 550-559
 - **SWEENEY, C. R., BENSON, C. E., WHITLOCK, R. H., MEIRS, D. A., BARNINGHAM, S. O., WHITEHEAD, S. C., COHEN, D.** 1989. Description of an epizootic and persistence of *Streptococcus equi* infections in horse. *J. A. V. M. A.* 194(9): 1281-1286
 - **SWIATLO, E., WARE, D.** 2003. Novel vaccine strategies with protein antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38: 1-7

- **TALKINGTON, D. F., BROWN, B. G., THARPE, J. A., KOENIG, A., RUSSELL, H.** 1996. Protection of mice against fatal pneumococcal challenge by immunization with pneumococcal surface adhesin A (PsaA). *Microb. Path.* 21: 17-22
- **THARPE, J. A., RUSSELL, H.** 1996. Purification and Seroreactivity of Pneumococcal Surface Adhesin A (PsaA). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3(2): 227-229
- **TIMONEY, J. F., ARTIUSHIN, S. C., BOSCHWITZ, J. S.** 1997. Comparison of the Sequences and Functions of *Streptococcus equi* M-Like Proteins SeM and SzPSe. *Infect. Immun.* 65(9): 3600-3605
- **TIMONEY, J. F.** 2004. The pathogenic equine streptococci. *Vet. Res.* 35: 397- 409
- **TSENG, H., McEWAN, A. G., PATON, J. C., JENNINGS, M. P.** 2002. Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: PsaA Mutants Are Hypersensitive to Oxidative Stress. *Infect. Immun.* 70(3): 1635-1639
- **WALKER, J. A., TIMONEY, J. F.** 2002. Construction of a stable non-mucoid deletion mutant of the *Streptococcus equi* Pinnacle vaccine strain. *Vet. Microbiol.* 89: 311-321
- **WALLACE, F. J., EMERY, J. D., CRIPPS, A. W., HUSBAND, A. J.** 1995. An assessment of mucosal immunization in protection against *Streptococcus equi* (“strangles”) infections in horses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 48:139-154
- **WILSON, J. W., SCHURR, M. J., LEBLANC, C. L., RAMAMURTHY, R., BUCHANA, K. L., NICKERSON, C. A.** 2002. Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgrad. Med. J.* 78: 216-224
- **ZHANG, Q., CHOO, S., FINN, A.** 2002. Immune Responses to Novel Pneumococcal Proteins Pneumolysin, PspA, PsaA, and CbpA in Adenoidal B Cells from Children. *Infect. Immun.* 70(10): 5363-5369

ANEXO 1: Secuencia rPsaA

Secuencia nucleotídica

1 atgaaaaaattaggtacattactcgttctctttctttctgcaatcattcttgtagcatgt
61 gctagcggaaaaaaagatacaacttctggtcaaaaactaaaagttggtgctacaaactca
121 atcatcgctgatattactaaaaatattgctggtgacaaaattgaccttcatagtatcggt
181 ccgattgggcaagaccacacgaatacgaaccacttctgaagacgtaagaaaacttct
241 gaggtgatttgattttctataacggtatcaaccttgaacaggtggcaatgcttggtt
301 acaaaattggtagaaaatgccaaagaaaactgaaaacaaagactacttcgcagtcagcgac
361 ggcgttgatgttatctaccttgaaggtcaaaatgaaaaggaaaagaagaccacacgct
421 tggcttaaccttgaaaacggtattatTTTTGCTAAAAATATCGCCAACAATTGAGCGCC
481 aaagaccctaacaataaagaattctatgaaaaaatctcaagaatatactgataagtta
541 gacaaacttgataaagaaagtaaggataaatttaataagatccctgctgaaagaaactc
601 attgtaaccagcgaaggagcattcaataacttctctaaagcctatgggtgttccaagtgcc
661 tacatctgggaaatcaatactgaagaagagggaactcctgaacaaatcaagaccttggt
721 gaaaaacttcgccaacaaaagttccatcactctttgtagaatcaagtgtggatgaccgt
781 ccaatgaaaactgtttctcaagacacaaacatcccaatctacgcacaaatctttactgat
841 tctatcgcagaacaaggtaaagaaggcgacagctactacagcatgatgaaatacaacctt
901 gacaaattgctgaaggattggcaaaaataa

Secuencia Peptídica

MKKLGTLLVLFLSAIIILVACASGKKDTSQGKLVVATNSIIADITKNIAGDKIDLHSIVPIGQ
DPHEYEPDPEDVKKTSEADLIFYNGINLETGGNAWFTKLVENAKKTENKDYFAVSDGVDVIYLE
GQNEKGKEDPHAWLNLENGIIFAKNIAKQLSAKDPNNKEFYEKNLKEYTDKLDKLDKESKDKFN
KIPAEEKLIVTSEGAFKYFSKAYGVPSAYIWEINTEEEGTPEQIKTLVEKLRQTKVPSLFVSS
VDDRPMKTVSQDTNIPYIAQIFTDZIAEQGKEGDSYYSMMKYNLDKLLKDWQN

ANEXO 2: BLAST *rPsaA/R6*

```
rPsaA: 1 atgaaaaaattaggtacattactcgttctctttctttctgcaatcattctttagcatgt
|
R6 : 1 atgaaaaaattaggtacattactcgttctctttctttctgcaatcattctttagcatgt

rPsaA: 61 gctagcggnnnnnngatacaacttctgggtcaaaaactaaaagttggtgctacaaactca
|
R6 : 61 gctagcggaaaaaaagatacaacttctgggtcaaaaactaaaagttggtgctacaaactca

rPsaA: 121 atcatcgctgatattactaaaaatattgctggtgacaaaattgaccttcatagtatcgtt
|
R6 : 121 atcatcgctgatattactaaaaatattgctggtgacaaaattgaccttcatagtatcgtt

rPsaA: 181 ccgattgggcaagaccacacgaatacgaaccacttctgaagacgtaagaaaacttct
|
R6 : 181 ccgattgggcaagaccacacgaatacgaaccacttctgaagacgtaagaaaacttct

rPsaA: 241 gaggctgatttgattttctataacggtatcaaccttgaaacaggtggcaatgcttggtt
|
R6 : 241 gaggctgatttgattttctataacggtatcaaccttgaaacaggtggcaatgcttggtt

rPsaA: 301 acaaaattggtagaaaatgccaagaaaactgaaaacaaagactacttcgcagtcagcgac
|
R6 : 301 acaaaattggtagaaaatgccaagaaaactgaaaacaaagactacttcgcagtcagcgac

rPsaA: 361 ggcgttgatggttatctaccttgaaggtcaaatgaaaaaggaaaagaagaccacacgct
|
R6 : 361 ggcgttgatggttatctaccttgaaggtcaaatgaaaaaggaaaagaagaccacacgct

rPsaA: 421 tggcttaaccttgaaaacggtattatTTTTGCTAAAAATATCGCAAACAATTGAGCGCC
|
R6 : 421 tggcttaaccttgaaaacggtattatTTTTGCTAAAAATATCGCAAACAATTGAGCGCC

rPsaA: 481 aaagaccctaacaataaagaattctatgnnnnnntctcaagaatatactgataagtta
|
R6 : 481 aaagaccctaacaataaagaattctatgaaaaaatctcaagaatatactgataagtta
```

```

rPsaA: 541  gacaaacttgataaagaaagtaaggataaatttaataagatccctgctgaaaagaaactc
          |
R6      : 541  gacaaacttgataaagaaagtaaggataaatttaataagatccctgctgaaaagaaactc

rPsaA: 601  attgtaaccagcgaaggagcattcaaatacttctctaaagcctatggtggtccaagtgcc
          |
R6      : 601  attgtaaccagcgaaggagcattcaaatacttctctaaagcctatggtggtccaagtgcc

rPsaA: 661  tacatctgggaaatcaatactgaagaagagggaactcctgaacaaatcaagaccttggtt
          |
R6      : 661  tacatctgggaaatcaatactgaagaagagggaactcctgaacaaatcaagaccttggtt

rPsaA: 721  gaaaaacttcgccaacaaaagttccatcactctttgtagaatcaagtgtggatgaccgt
          |
R6      : 721  gaaaaacttcgccaacaaaagttccatcactctttgtagaatcaagtgtggatgaccgt

rPsaA: 781  ccaatgaaaactgtttctcaagacacaaacatcccaatctacgcacaaatctttactgat
          |
R6      : 781  ccaatgaaaactgtttctcaagacacaaacatcccaatctacgcacaaatctttactgac

rPsaA: 841  tctatcgcagaacaaggtaaagaaggcgacagctactacagcatgatgaaatacaacctt
          |
R6      : 841  tctatcgcagaacaaggtaaagaaggcgacagctactacagcatgatgaaatacaacctt

rPsaA: 901  gacaa-attgctgaaggattggcaaaaataa
          ||||| |
R6      : 901  gacaagattgctgaaggattggcaaaaataa

```

Identidad entre *rPsaA/R6*= 98% (913/930)

R6: *S. pneumoniae* R6. Secuencia obtenida por Hoskins *et al.*, 2001. Publicado en la revista J. Bacteriol. 183(19): 5709-5717 bajo el título: Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6.


```

rPsaA:817 atctacgcacaaatctttactgattctatcgcagaacaaggtaaagaaggcgacagctac 876
          ||||| ||| ||||||||||||||| ||| | || || |||| |||| | |||||||||
equi :776 atctatgcagaaatctttactgactctgtagccaaaaaaggccaagatggagacagctac 835

```

```

rPsaA:877 tacagcatgatgaaatacaaccttga-caaattgctgaaggattggcaaaataa 929
          || ||||||||||| ||||||||| ||||| ||||||| || |||||||||
equi :836 tatgccatgatgaaatggaccttgaataaattctgaaggcttagcaaaataa 889

```

Identidad entre *rPsaA/equi*= 80% (92/114)

equi: *S. equi*. Secuencia obtenida por Harrington *et al.*, 2000. publicado en la revista *Infect. Immun.* 68(10): 6048-6051 bajo el título: Identification of lipoprotein homologues of pneumococcal PsaA in the equine pathogens *Streptococcus equi* and *Streptococcus zooepidemicus*.