

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN  
Y DE LA SALUD ANIMAL

INTERACCIÓN DE LA ADHESINA DE  
MANNHEIMIA HAEMOLYTICA CON  
LEUCOCITOS DE BOVINO

# TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ALFONSO DE LA MORA VALLE

TUTOR: DR. FRANCISCO SUARÈZ GÜEMES

COMITÉ TUTORAL:  
DRA. MIREYA DE LA GARZA AMAYA  
DR. FRANCISCO TRIGO TAVERA

México, D. F.

2005

0349935



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

### DEDICATORIA

A mis padres, a mi esposa e hijos por su amor y apoyo incondicional.

### AGRADECIMIENTOS

A los doctores Concepción Agundis, Edgar Zenteno, Ricardo Lascurain, Ali Pereira, Mireya de la Garza, Francisco Trigo y Francisco Suárez por sus sabios consejos, su amistad y profesionalismo.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo ~~recepional~~.

NOMBRE: De la Mora Valle Alfonso

FECHA: 15 - Nov - 2005

FIRMA: D. de la M.

## INDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Factores de riesgo en la enfermedad respiratoria bovina.....	5
El genero <i>Mannheimia</i> .....	5
Factores de virulencia de <i>M. haemolytica</i> .....	6
Inmunidad.....	8
Patogenicidad por <i>Mannheimia</i> .....	9
Estallido respiratorio en neutrófilos.....	13
Antecedentes.....	15
Hipótesis.....	15
Objetivos.....	15
Material y métodos.....	16
Lugar de estudio.....	16
Cultivo de <i>M. haemolytica</i> .....	16
Obtención de extractos salinos.....	16
Conservación de medio de cultivo.....	17
Análisis electroforético en geles de poliacrilamida-SDS.....	17
Determinación de la actividad hemaglutinante.....	18
Estudios de la especificidad de la actividad hemaglutinante.....	18
Purificación de la adhesina por cromatografía de afinidad.....	18
Obtención de sangre y separación de leucocitos.....	19
Inmunocitoquímica.....	19
Citometria de flujo.....	20
Estallido respiratorio en neutrófilos.....	20
Preparación de proteínas de membrana de neutrófilos.....	21
Purificación del receptor MhA en neutrófilos.....	21
Determinación de la secuencia primaria del receptor de MhA.....	22
Resultados.....	23

Cultivo de <i>M. haemolytica</i> y purificación de la adhesina.....	23
Reconocimiento de leucocitos por MhA.....	23
Citometria de flujo.....	23
Especificidad de la interacción de MhA.....	24
Estallido respiratorio.....	24
Composición de aminoácidos.....	24
Caracterización parcial del receptor de WGA en neutrófilos de bovino.....	24
Conclusiones y discusión.....	26
Revisión de literatura.....	29
Lista de Tablas.....	30
Lista de figuras.....	44

## Resumen

*M. haemolytica* (*Mh*) posee una adhesina (*MhA*) con especificidad por N-Acetil Glucosamina (GlcNAc) y otras estructuras N-Acetiladas que le permite el reconocimiento necesario para la colonización bacteriana al hospedero. El objetivo de este trabajo fue determinar si *MhA* reconoce leucocitos de bovino, analizar su especificidad y medir el estallido respiratorio en neutrófilos como un efecto biológico resultado del reconocimiento. *MhA* se purificó a partir del medio de cultivo líquido y extractos salinos de biomasa bacteriana mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de estroma de eritrocitos de conejo tratados con glutaraldehído, utilizando ácido acético al 3% como agente eluyente. *MhA* es una proteína homogénea de 70 kDa. La actividad aglutinante en presencia de eritrocitos de diversas especies animales confirmó que *MhA* aglutina específicamente eritrocitos de conejo. La adhesina conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) incubada en presencia de leucocitos bovinos nos permitió identificar, mediante citometría de flujo, que *MhA* reconoce preferentemente neutrófilos (Intensidad Media de Fluorescencia, IMF 77.19). Las células mononucleadas fueron pobremente reconocidas (IMF 5.7). La especificidad del reconocimiento entre la adhesina y los leucocitos se analizó utilizando inhibidores específicos como GlcNAc, N'N'N' acetilquitotriosa y fetuina. La inhibición del reconocimiento fue del 43% para fetuina y de baja intensidad con GlcNAc y acetilquitotriosa. *MhA* fue capaz de inducir el estallido respiratorio en neutrófilos mediante la reducción de nitro-azul de tetrazolio, esta reacción fue inhibida previa incubación con GlcNAc y en menor intensidad por ácido neuramínico y otros azúcares. *MhA* reconoce preferentemente neutrófilos, la presencia de residuos GlcNAc en la membrana de este grupo celular explica en parte esta especificidad. El estallido respiratorio inducido por *MhA* pudiera estar contribuyendo de manera importante al daño tisular que se observa en la neumonía por *M. haemolytica*.

Palabras clave: *Mannheimia haemolytica*, Mannheimiosis, Adhesina, Estallido respiratorio, GlcNAc.

## Abstract

*M. haemolytica* (Mh) possesses an adhesin (MhA) with specificity for N-Acetylglucosamine (GlcNAc) and other N-acetylated structures that allows it to recognize the host, a process that is essential for any bacteria to establish a colony. The objectives of this work were to determine if MhA recognizes bovine leukocytes, to analyze such interaction, and in neutrophils to measure the oxidative burst as a biological effect. MhA was purified from culture medium and from saline extracts of bacteria pellets by affinity chromatography using glutaraldehyde-treated erythrocytes and acetic acid as eluent. MhA is a homogeneous protein of 70 kDa. The hemagglutination activity in the presence of several species of erythrocytes confirmed that MhA is specific for rabbit erythrocytes. Bovine leukocytes were incubated with MhA-FITC and analyzed by flow cytometry. MhA recognized mainly neutrophils (MFI 77.19) and mononuclear cells were poorly recognized (MFI 5.7). The specificity of this interaction was evaluated using GlcNAc, N' N' N' chitotriose and fetuin among others. Fetuin and GlcNAc were powerful inhibitors of the interaction. MhA was also capable of inducing the oxidative burst in neutrophils; this was demonstrated by using tetrazolium blue as a substrate for reduction. Such reduction was abolished in part by previous incubation with GlcNAc and to a lesser extent with Neuraminic acid and other sugars. MhA recognizes specifically bovine neutrophil membranes; the high GlcNAc density on this cell could explain such interaction. The oxidative burst induced by the adhesin could be an *in vivo* factor contributing to tissue damage during Mannheimiosis.

Keywords: *Mannheimia haemolytica*, mannheimiosis, adhesin, oxidative burst, GlcNAc.

## I. Introducción

*Mannheimia haemolytica* (*Mh*) es una bacteria gram negativa, con actividad hemolítica, que afecta al ganado bovino, al ovino y a otros rumiantes. *Mh* es miembro de la familia *Pasteurellaceae*, la cual incluye los géneros de *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Pasteurella*, *Mannheimia* y *Lonepinella*. *M. haemolytica* comprende los biotipos 1, 2, 5-9, 12-14, 16 y 17 (Angen et al., 1999). El biotipo 1 es el más comúnmente aislado en casos de Mannheimiosis Neumónica Bovina. Los factores de virulencia descritos en *Mh* incluyen cápsula, lipopolisacárido, polisacárido capsular, adhesinas, proteínas de membrana externa, neuraminidasa y una toxina específica de leucocitos (Lkt A) (Lillie 1974., Wikse 1985 y Ames 1997).

En bovinos, *M. haemolytica* ST1 es el agente principal de la Fiebre de Embarque o Mannheimiosis (antes Pasteurellosis) Bovina la cual se caracteriza por una neumonía fibrinosa aguda que puede manifestarse también como septicemia en animales jóvenes. Clínicamente la enfermedad se caracteriza por depresión, fiebre, aumento de la frecuencia respiratoria y en casos severos muerte. Se considera que el aumento de la temperatura esta correlacionado con el grado y la severidad de los signos clínicos y más aún con la consolidación pulmonar observada a la necropsia (Jonson 2001). La Fiebre de Embarque es la enfermedad de más impacto económico en la producción de ganado de carne y cría. En los Estados Unidos las pérdidas anuales se estiman en 3 billones de dólares por concepto de tratamientos, medicina preventiva, baja conversión alimenticia, pobre desempeño de animales crónicos y muerte (Lillie 1974 y Wikse 1985). El proceso inflamatorio pulmonar se caracteriza por una intensa infiltración de neutrófilos que contribuyen en gran medida a la destrucción del tejido y la severidad del cuadro clínico, al participar activamente mediante la fagocitosis y destrucción del agente debido a la producción de metabolitos de oxígeno y la liberación de enzimas entre otras. Las respuestas de activación de estos leucocitos se dan por medio de receptores de membrana los cuales responden a una variedad de estímulos tanto endógenos como exógenos (Ackerman et al., 1999).

La adherencia bacteriana es un proceso crítico para la invasión y colonización de tejidos. Dicho proceso requiere de interacciones fisicoquímicas específicas y no específicas con las células del hospedero (Jaques y Paradis, 1998). Los mecanismos por los cuales *M. haemolytica* logra colonizar y eventualmente provocar neumonía han sido pobremente entendidos. Se cree que *Mh* posee una adhesina que le permite colonizar el epitelio respiratorio, aunque un locus genético que codifique para tal adhesina no ha sido identificado, sin embargo se ha demostrado la presencia de fimbrias. Algunos trabajos sugieren que el lipopolisacárido también pudiera tener un papel relevante en la adherencia, esto dada su presencia en las superficies epiteliales y en combinación con sustancia surfactante (Ackerman et al., 2000 y Highlander, 2001).

Las adhesinas son estructuras bacterianas generalmente externas que son consideradas como un mecanismo de colonización e invasión de tejidos. En algunos casos estas adhesinas pueden ser liberadas al medio en ciertas etapas de su metabolismo, dado que participan activamente en la evasión de la respuesta inmune del huésped y en la patogénesis de varias enfermedades. YadA una adhesina de *Yersinia spp.*, se une a colágena, laminina, fibronectina, submucosa intestinal y moco, además de ser considerada un potente factor sérico que inhibe la vía clásica de la cascada del complemento (Tayir et al., 2001). *Plasmodium falciparum* también posee una adhesina que interactúa con varios receptores en células endoteliales, además tiene a CR1 como receptor específico en eritrocitos (Krych-Goldberg et al., 2001). En *Bordetella pertussis*, una de sus principales adhesinas (hemaglutinina filamentosa FHA) es importante para la invasión del tracto respiratorio cuando está en forma libre, lo cual fue probado recientemente utilizando una cepa mutante que carece de dicha adhesina y esto favorece que la cepa pierda patogenicidad (Coutte et al., 2003). Los mecanismos moleculares de estas interacciones adhesina-receptor sin duda aportan nuevas ideas en alternativas de prevención y tratamiento.

## **Factores de riesgo en la enfermedad respiratoria bovina**

La neumonía en bovinos y sobre todo en ganado de engorda es un problema multifactorial que involucra en primera instancia situaciones de estrés tales como el transporte y destete. Existen agentes virales y bacterianos asociados a este complejo. Una de las consecuencias de más impacto en el transporte es la inmunosupresión (linfopenia por depresión en la linfogénesis) y el gasto oxidativo celular. Factores como la mezcla de animales de diferentes lugares, la dieta de recepción, y el clima son cruciales en el desarrollo de brotes. Los agentes etiológicos que han sido implicados en la enfermedad respiratoria bovina incluyen el Virus Sincicial Respiratorio Bovino (VSRB), Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB), virus del Parainfluenza 3 (PI3), Herpesvirus Bovino 1 (HVB1) y el virus de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RTIB), la infección por estos virus compromete en varios grados la inmunidad adquirida y la innata. El efecto de la participación de estos virus con la infección por *Mh* ha sido estudiado a varios niveles (Cusack 2003).

Las bacterias que mas han sido reportadas en el complejo respiratorio bovino incluyen *M. haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus somnus*. La nutrición tiene un impacto directo en la inmunidad y en la recuperación del paciente, en este sentido se pueden presentar deficiencias en el destete de becerros y en el manejo de la dieta a la recepción de ganado que viene del transporte al lote de engorda. Algunos de los componentes que han sido evaluados incluyen la concentración de proteína, suplementación con vitaminas del complejo B, vitamina E y D, así como minerales traza como el cobre. Una concentración de proteína de 40% en ganado de recepción enfermo tiene un impacto positivo en su recuperación (Galyean et al., 1999).

## **El Genero *Mannheimia***

El agente causal de la Fiebre de Embarque fue inicialmente llamado *Bacterium bipolare multocidum* por Theodore Kilt en 1885 (Highlander, 2001). En 1896, Flugge lo renombró a *Bacillus bovisepitica*, el cual fue posteriormente subdividido en dos grupos separados que causaban neumonía fibrinosa bovina

(*Pasteurella bovisseptica*) o septicemia hemorrágica (ahora conocida como *Pasteurella multocida*). En 1932, Newson y Cross propusieron el nombre de *Pasteurella haemolytica* para la cepa que causaba neumonía en becerros. *Pasteurella haemolytica* después fue subdividida en dos biotipos, A y T, basados en su capacidad para fermentar L-arabinosa y trealosa, respectivamente. En 1962 se estableció la serotipificación capsular y el número de serotipos llegó a 17. Para 1985 *P. haemolytica* fue excluida del género *Pasteurella* con base en estudios de hibridación de DNA-DNA (Highlander 2001). También fue claro que el grupo trealosa positivo representaba un grupo separado ahora conocido como *P. trealosi*. Investigaciones hechas por Angen y colaboradores (1999) llevaron a una nueva reclasificación para algunas bacterias del grupo *Pasteurella* entre ellas *P. haemolytica*. Ellos propusieron el nuevo género *Mannheimia* en base a estudios fenotípicos, de ribotipificación, electroforesis enzimática de sitios o locus múltiples, secuenciación de 16s rDNA e hibridación de DNA-DNA. *Mannheimia haemolytica* representa sólo organismos negativos a la fermentación de L-arabinosa y comprende los serotipos 1, 2, 5-9, 12-14 y 16 del antiguo grupo *Pasteurella*. Sólo las cepas aisladas de rumiantes han mostrado ser genéticamente afiliadas a *M. haemolytica*.

*Mannheimia* representa un grupo de cocobacilos gram negativos débilmente hemolíticos que pertenecen al grupo HAP (*Mannheimia*, *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Lonepinella* y *Pasteurella*). La mayoría son organismos no móviles, no formadores de esporas, anaerobios facultativos, oxidasa positivos y catalasa positivos. Aunque un medio no enriquecido es suficiente para su crecimiento, crecen mejor en medios suplementados con suero o sangre, algunos como *A. pleuroneumoniae* requieren NAD (Quinn 1994).

### **Factores de virulencia de *M. haemolytica***

La colonización por *Mh* del tracto respiratorio superior en el huésped es mediada a través de una estrecha unión con el epitelio ciliado. A la fecha poco se sabe sobre los mecanismos y moléculas que *Mh* utiliza para colonizar e invadir el tracto respiratorio de rumiantes (Jaques y Paradis 1998).

Varios factores de virulencia han sido documentados aunque se desconocen varios aspectos sobre su papel en la patogénesis de la enfermedad.

La cápsula, el LPS, las fimbrias, la enzima neuraminidasa y algunas adhesinas han sido propuestas como mecanismos para la adherencia de *Mannheimia*. Otras moléculas descritas incluyen la leucotoxina, la sialoglicoproteasa y algunas proteínas de membrana externa (Samitamby et al., 2002 y Lo, 2001). En algunos casos se sabe en que etapa del crecimiento de *Mannheimia* se producen estos factores de patogenicidad (Fig. 1).

*Mannheimia* secreta una leucotoxina (LktA) calcio dependiente que pertenece a la familia de toxinas RTX. Los genes y la proteína han sido identificados en todos los serotipos y casi la mayoría de ellos producen la toxina. Como otras toxinas del tipo RTX, la Lkt de *Mh* posee un operon policistronico de 4 genes (LktC, Lata, LktB y LktD) en el cromosoma bacteriano (LktCABD) codifica para la síntesis, activación y secreción de LktA. El gen de LktA codifica para la proteína activa de LktA. Los polipéptidos predecibles codificados por LktC, LktA, LktB y LktD son 165, 953, 708 y 478 amino ácidos en longitud, los cuales corresponden con los pesos moleculares de 20, 102, 80 y 55 kDa. Leukotoxina A es una citolisina formadora de poros específica de leucocitos de rumiantes. Al igual que LktA, otras toxinas del tipo RTX han sido reconocidas en bacterias gram negativas que afectan tanto al humano como a animales domésticos. Algunos ejemplos incluyen a *A. pleuroneumoniae* (ApxIA, ApxIIA, Apx IIIA), hemolisina adenil ciclasa de *Bordetella pertusis*, y alfa hemolisina de *E. coli*. Estas toxinas están relacionadas por su secuencia genética y su mecanismo de activación y secreción. La mayoría de las toxinas tipo RTX causa lisis en una gran variedad de células de vertebrados y muestra poca o ninguna especificidad por alguna célula o especie animal. Por otro lado LktA de *Mh* muestra solo especificidad por leucocitos y plaquetas de rumiantes. Hoy se sabe que esta especificidad por leucocitos esta mediada por las  $\beta$  integrinas y que la interacción de estas dos moléculas es necesaria y suficiente para inducir los efectos biológicos conocidos. LkxA induce la formación de poros en las células blanco, este evento trae consigo una descompensación de líquidos intracelular con la salida de  $K^+$  y entrada de  $Ca^+$ .

Este aumento del calcio intracelular también induce la translocación de factor  $\text{NF}\kappa\beta$  al núcleo y con ello la activación de citosinas pro-inflamatorias. Otro efecto de la LktA es la inducción de apoptosis, esto ha sido demostrado en varios leucocitos. Teyaseelan y colaboradores (2000) demostraron mediante estudios con Lkt A que los macrófagos alveolares de bovino expresan altos niveles de CD11a/CD18 y que la unión LktA-LFA1 induce una señalización especie-específica mediante moléculas PI3 cinasa y SRC cinasa y que esta cascada de señalización es requerida para que LktA induzca sus efectos biológicos. La subunidad  $\beta$  de la integrina CD18 es suficiente para mediar la citolisis por LktA, esto fue demostrado utilizando células de ratón transfectadas con cDNA de CD18 bovino (Deshpande et al., 2002).

Los antimicrobianos han sido ampliamente utilizados en el tratamiento y control de la enfermedad respiratoria bovina. El éxito de esta terapia depende en gran medida de la detección temprana de los animales enfermos, cuando es así la reducción de fatalidades puede ser considerable. La efectividad de los antibióticos también puede ser alterada por la sensibilidad de los organismos. Los genes de resistencia a los antibióticos en *Mannheimia* están asociados con elementos genéticos dinámicos. Dicha resistencia varía entre especie animal, tiempo, situación geográfica y tratamiento previo del huésped. Algunos países como Estados Unidos, Alemania, Australia y Canadá hay realizado estudios para determinar los antibióticos de menor efectividad contra los padecimientos neumónicos. Dentro de los antibióticos a los cuales *Mh* ha desarrollado mayor resistencia se encuentran la penicilina, tetraciclinas, aminoglicósidos, cloranfenicol, y sulfonamidas. La mayoría de los plásmidos responsables de dicha resistencia han sido bien identificados (Kehrenberg et al, 2001 y Cusack et al, 2003).

## **Inmunidad**

Las vacunas actualmente disponibles contra *Mh* varían en su composición. Estas incluyen bacterinas, bacterinas con LktA, extractos bacterianos, sobrenadante de cultivo con LktA o bacteria viva mutante dependiente de

estreptomicina. La vacunación en ganado con vacunas comerciales o experimentales estimula la producción de anticuerpos séricos a varios antígenos y usualmente mejoran la protección ante un reto experimental. Sin embargo la respuesta en campo contra la enfermedad es un evento variable y difícil de demostrar, como lo demuestran los ensayos de campo que han sido publicados. Las respuestas celular y humoral han sido demostradas experimentalmente a las pocas semanas post-vacunación (PV). Los anticuerpos contra *Mh* pueden ser detectados a los 7 días PV. La transferencia pasiva de anticuerpos ocurre en becerros y usualmente estos se mantienen a un nivel óptimo hasta los 95 días cuando se compara con el de animales vacunados en sus primeras semanas de vida (Fulton et al., 2003, Frank et al, 2002 y Confer et al., 2003)

En un estudio donde se compararon varias vacunas comerciales, Confer y cols. (1998) demostraron que existía una gran variación en los títulos de anticuerpos y el tiempo que estos mantenían en sangre., pero observaron poca o nula diferencia cuando compararon los títulos contra la LktA. Los animales vacunados con Honesto tuvieron respuestas elevadas contra la bacteria completa entre los 21 y 84 días PV. La revacunación con Predispone y OneShot a los 140 días mostraron la respuesta de anticuerpos más alta.

### **Patogenicidad por *Mannheimia***

*Mannheimia haemolytica* es un habitante de la nasofaringe y amígdalas en rumiantes clínicamente sanos. Como dato interesante *Mh* serotipo 2 es el más comúnmente aislado en ovejas y bovinos. *Mh* serotipo 2 puede ser aislado en corderos a pocas horas de su nacimiento [Shreeve y Thompson, 1970 (citado por Rowe 2001)] y su crecimiento es fluctuante a lo largo de la vida del huésped. Sin embargo, no hay evidencia que indique si esta colonización provoque enfermedad o si la enfermedad extiende la colonización en el rebaño (Biberstein, 1970 por Rowe et al., 2001). Los mecanismos moleculares que *Mh* posee para colonizar el epitelio respiratorio son relativamente desconocidos (Rowe et al., 2001). En general se sabe que las bacterias se adhieren a las superficies epiteliales vía receptores específicos y no específicos. Algunas de las moléculas hasta ahora

implicadas en la colonización por *Mh* incluyen fimbrias, adhesinas no fimbriales, capsula, proteínas de membrana externa, la producción de neuraminidasa, glicocalix y lipopolisacárido (LPS) (Jaramillo et al., 1999). Aunque poco se sabe sobre la participación de estos mecanismos se cree que *Mh* codifica una adhesina que le permite fijarse en el epitelio respiratorio. Aunque el locus genético que codifica para dicha adhesina no ha sido identificado, se ha observado la presencia de fimbrias. Jaramillo y colaboradores lograron purificar una adhesina-hemaglutinina *MhA* de 68 kDa con especificidad por eritrocitos de conejo. Dicha especificidad fue inhibida por N-acetil-glucosmina (GlcNac), ácido neuramínico (NeuAc), y por previo tratamiento de los eritrocitos con sialidasa o proteasa, indicando que su receptor es una glicoproteína. La adhesión in vitro de *Mh* a epitelio traqueal fue inhibida mediante la previa incubación con el azúcar específico o la adhesina pura, sugiriendo así su participación en la colonización del epitelio respiratorio (2000).

La producción de neuraminidasa ha sido demostrada in vitro e in vivo, así como la producción de anticuerpos. Los anticuerpos en animales vacunados han reducido la producción de esta enzima en animales infectados experimentalmente. Se cree que esta enzima permite la colonización por *Mh* mediante la eliminación de residuos de ácido sialico en moco y epitelios (Straus et al, 1998). Una proteína llamada serotipo 1 antígeno específico (Ssal) ha sido implicada en la colonización de la nasofaringe. La adherencia de *Mh* fue inhibida con el uso de anticuerpos dirigidos a Ssal (Highlander, 2001).

La participación del LPS, los polisacáridos capsulares y las proteínas de membrana externa podría darse en la ausencia de fimbrias. La presencia de LPS en la superficie de células epiteliales ha sido observada experimentalmente. El LPS de *Mh* ha sido observado formando complejos con la sustancia surfactante. En la Tabla 1 se presenta una lista de las diferentes adhesinas y algunos de sus receptores descritos en bacterias del grupo HAP y otros géneros o relacionados.

La cápsula ha sido implicada en la patogénesis mediante diferentes mecanismos. El polisacárido capsular (PC) de *Mh* ST1 esta involucrado en la

adherencia del epitelio respiratorio bajo, facilitando la colonización bacteriana (Morck et al., 1988). Algunas otras características descritas para el PC incluyen resistencia a la fagocitosis por neutrófilos y resistencia a la lisis mediada por el sistema de complemento (Confer et al., 1990). Y aun más, la preincubación de neutrófilos con el PC, disminuye la capacidad fagocítica en presencia de *Mh* ST1 (Czuprynski et al., 1987). Aunque algunos de estos estudios sugieren un papel importante del PC en la patogénesis de la enfermedad, la inmunización de animales con este factor o en combinación con otros resulta en un incremento en la severidad de las lesiones. Adicionalmente la presencia de altos títulos no correlaciona con una mejor protección contra Mannheimiosis (Conlon y Shewen 1993., Srinand, 1996).

Dentro de los antígenos de superficie se han descrito proteínas de membrana externa (PsME) en *Mh*. Se dice que estas proteínas permiten evadir la respuesta inmune del huésped. La presencia de anticuerpos se correlaciona con la protección ante la infección experimental (Morton et al., 1995). *Mh* produce PsME durante su crecimiento *in vitro* y durante la infección natural en tejido pulmonar, estas incluyen a POMA (32kDa), POMB (35kDa), una lipoproteína de superficie Lpp38 y PsME reguladoras de hierro (Pandher y Murphy, 1996; Sreevatsan et al., 1996; Mahasreshti et al., 1997). Tres PsME reguladoras de hierro han sido identificadas y caracterizadas en el crecimiento *in Vitro* de *Mh* bajo condiciones restringidas de hierro. Estas proteínas son quimiotácticos potentes para neutrófilos y alteran sus funciones mediante la inhibición de la fagocitosis y la lisis intracelular. La importancia de las PsME en la patogénesis de la enfermedad puede ser confirmada por la importancia de los anticuerpos contra la infección (Iovane et al., 1998).

Poco o nada se sabe sobre los receptores que intervienen en la adherencia de las moléculas por parte de *Mh*. Es posible que varios mecanismos estén implicados en la colonización del tracto respiratorio superior (TRS) y posteriormente en la invasión del tejido bronco-alveolar, así como varias de estas

moléculas participen activamente en el desarrollo de la patogénesis. *Mh* es capaz de sobre pasar mecanismos inespecíficos de defensa de TRS tales como la carpeta mucociliar, IgA, IgE, IgG, Interferón, Lisozima y lactoferrina (Jubb et al., 1993). La expresión del péptido antimicrobiano traqueal (TAP) en becerros inoculados con *Mh* es 25 veces mas alta que la de animales no inoculados, el pico de esta expresión parece ser a las 6 hr post-inoculación y aunque los autores encontraron una gran variación de la expresión entre individuos los datos sugieren que este péptido es relevante en el control de la infección (Caverly et al., 2003). Una vez en los espacios bronqueo-alveolares, *M. haemolytica* incita una gama de respuestas por células locales tales como macrófago alveolar, neumocitos tipoll, fibroblastos y mastocitos. Se sabe que la presencia de LPS, leucotoxina y PME tienen una gran influencia en la liberación de mediadores químicos de los cuales la IL-1, el FNT- $\alpha$ , y la IL-8 tienen el mayor impacto en el desarrollo del proceso inflamatorio observado en Mannheimiosis.

Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado los efectos que estos factores de virulencia inducen en leucocitos, en proteínas séricas, en proteínas de matriz y en tejido pulmonar (Leite et al., 2002; Coomber et al., 2001 y Mitchell et al., 2003).

La participación de los mastocitos en procesos inflamatorios e inmunes en el tejido pulmonar ha sido documentado. Estas células producen una serie de aminas vasoactivas y citocinas implicadas directamente en la respuesta inflamatoria aguda. Durante la neumonía aguda, los mastocitos, al igual que los macrófagos alveolares, producen IL-1, FNT- $\alpha$  e IL-8, las cuales inducen la infiltración de neutrófilos en pulmón mediante la expresión de moléculas de adhesión y agentes quimiotácticos. En dos trabajos recientemente realizados se determino que la infección experimental de becerros con *Mh* la cantidad de mastocitos en tejido pulmonar afectado, disminuían significativamente, sugiriendo que estas células se desgranulan y mueren cuando interactúan con los componentes bacterianos. En el segundo estudio ellos determinaron la relación entre la producción de la sustancia P y la densidad de mastocitos en tejido pulmonar ovino afectado por *Mh*, como un indicador de la activación de mastocitos

por el tejido nervioso (Ramirez-Ramiro et al., 2000 y 2001).

Mannheimiosis se caracteriza por una intensa infiltración de neutrófilos en el tejido broncoalveolar, esta infiltración es inducida por la producción local de mediadores químicos proinflamatorios después del contacto con *Mh* y sus derivados principalmente con los macrófagos alveolares. Este evento es crucial para la eliminación de *Mh*, aunque también se sabe que la presencia de neutrófilos contribuye en forma significativa al daño celular observado. La migración endotelial de estas células en el tejido pulmonar, a diferencia de otros tejidos ocurre en los capilares y en menor grado en las vénulas. Debido a que el tamaño de los neutrófilos no les permite rodar por los capilares, estos adquieren una forma alargada para atravesar los capilares. Experimentos utilizando ratones deficientes en la expresión de L-selectina revelaron que esta molécula de adhesión no es requerida para la migración transendotelial de neutrófilos en pulmón (Doyle et al., 1997). La integrina  $\beta 2$  MAC1 es una de las más importantes mas no indispensables para este evento.

### **Estallido respiratorio en neutrófilos**

Los receptores en neutrófilos y plaquetas de bovino incluyen moléculas acopladas a la proteína G y receptores de proteína tirosina cinasa. Estos receptores activan vías de señalización que involucran fosfolipasas (PLA<sub>2</sub>, PLC), proteínas tirosina cinasas y fosfatasas. A su vez estas enzimas activan moléculas adicionales con efectos descendentes de señalización. Como sucede en neutrófilos humanos, las partículas de zymosan opsonizadas inducen estallido respiratorio en neutrófilos de bovino por vías dependientes de la tirosina cinasa y proteína cinasa C (Clark, 1999).

La patogenicidad de los radicales libres del oxígeno producidos por neutrófilos activados ha sido ampliamente descrita, pero las rutas específicas involucradas en la formación de estos radicales permanecen inciertas. El sistema NADPH oxidasa es el más estudiado al respecto, la inhibición de este sistema por apocinina ha demostrado la reducción del daño pulmonar en casos de neumonía

aguda y en casos de septicemia en cerdos de guinea. Respondiendo a una gran variedad de eventos que transmiten señales originadas desde la membrana, la activación de la NADPH oxidasa parece ser iniciada por una reacción de fosforilación de la subunidad  $p47^{Phox}$ . Diferentes proteínas cinasas implicadas en el proceso aparentemente fosforilan varios grupos de serinas, donde cada fosforilación corresponde a una conformación tridimensional de la proteína. Este proceso altera el complejo formado por  $p47^{Phox}/p67^{Phox}/p40^{Phox}$  en la célula en reposo, esto resulta en la exposición de la fracción SH3 y de los dominios ricos en prolina, así como dominios PX. Este cambio resulta en la translocación de estas proteínas a la membrana, donde se asocian con el citocromo  $b_{558}$ . Las interacciones de los componentes citosólicos entre cada uno y con el citocromo están mediadas por los dominios SH3, los cuales se unen específicamente a ciertas regiones ricas en prolina, mientras que las interacciones de los componentes de la oxidasa citosólica con la membrana están mediadas por dominios PX. En el complejo asociado de la membrana,  $p47^{Phox}$ , parece estabilizar la interacción de  $p67^{Phox}$  con el citocromo. La fracción  $p47^{Phox}$  por su parte, con su región de alta afinidad por NADPH, puede unirse a  $gp91^{Phox}$  la cual contiene un sitio de baja afinidad para NADPH para formar una unión eficientemente catalítica de la enzima activa. El asa de 20 aminoácidos que cubre el sitio de unión de NADPH en  $gp91^{Phox}$ , en su estado pasivo, se cree que es desplazado. NADPH entonces se une para completar el complejo, la transferencia de los electrones se inicia y por lo tanto la generación del radical superóxido. El superóxido por sí solo posee bajo efecto bactericida, una vez dentro del fagosoma, el superóxido es convertido enzimáticamente a  $H_2O_2$ , que a su vez reacciona nuevamente con el superóxido restante para generar radicales hidroxilo, oxígeno simple, ambos muy reactivos y muy tóxicos. El superóxido también puede reaccionar con óxido nítrico y generar peroxinitrito, un nitrógeno intermedio muy reactivo. El superóxido puede unirse al cloruro y generar ácido hipocloroso, un compuesto muy tóxico para casi todos los microbios. El ácido hipoclorito es de vida corta pero puede reaccionar con aminas secundarias para formar cloraminas las cuales son iguales de nocivas para los microbios pero poseen más estabilidad (Ross et al., 2003).

## **Antecedentes**

Se ha identificado una adhesina a partir de una cepa de *Mh* A1. La adhesina es una proteína de 68 kDa que aglutina eritrocitos de conejo y al parecer permite a *Mannheimia* adherirse a células de tráquea, esta interacción está mediada específicamente con residuos de ácido siálico en la célula blanco, la aglutinación de eritrocitos y la unión a células de tráquea fue inhibida previo tratamiento con N-acetyl-D-glucosamina (GlcNAc) o tratando los eritrocitos con neuraminidasa, indicando que el receptor es una sialoglicoproteína. Los efectos que esta adhesina pueda inducir en células de bovino no han sido determinados, pero su afinidad por azúcares sugiere cierta capacidad para unirse y reaccionar con varias células (Jaramillo et al., 2000).

Estudios en otro tipo de proteínas, específicamente lectinas que al igual que esta adhesina comparten especificidad por GlcNAc, han demostrado que pueden inducir cambios importantes cuando se exponen a algunos tipos de leucocitos. Un trabajo reciente demostró que la heveína (una lectina derivada del látex) activa los neutrófilos humanos provocando explosión oxidativa (Rojas et al., 2001). De igual forma la adhesina de *Helicobacter pylori*, que posee especificidad por ácido siálico, se ha reportado que posee afinidad por neutrófilos, como determinantes de la patogenia de esta bacteria (Miller-Podraza et al., 1999).

## **Objetivo general**

Determinar si *MhA* reconoce leucocitos de bovino, analizar su especificidad y medir el estallido respiratorio en neutrófilos como un efecto biológico resultado del reconocimiento.

## **Objetivos específicos**

- 1.- Purificar la adhesina a partir de extractos salinos
- 2.- Evaluar el reconocimiento de *MhA* con leucocitos de bovino
- 3.- Inducir el estallido respiratorio en neutrófilos utilizando la adhesina.
- 4.- Purificar y caracterizar parcialmente el receptor de *MhA* en neutrófilos de bovino.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Lugar de estudio**

Los estudios fueron realizados en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina y en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM. El cultivo de *Mannheimia haemolytica* se realizó en la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE). La sangre utilizada en este estudio fue obtenida de bovinos sanos del Centro de Enseñanza, Práctica en Investigación en Producción y Salud Animal de la FMVZ de la UNAM.

### **Cultivo de *Mannheimia haemolytica***

*M. haemolytica* ST1 (Proporcionada por Dr. Glynn H. Frank, National Animal Disease Center, Ames Iowa, USA) se cultivó en placas de agar sangre y se le hicieron las pruebas bioquímicas correspondientes. Posteriormente la bacteria fue inoculada en 4 matraces con 250 ml de medio líquido (PRONABIVE) por 8 horas a 37° C como inóculo para fermentador. Después dicho inóculo fue depositado en un fermentador marca BRAAUNN con 80 L de medio de cultivo y se cultivó nuevamente 8 h a 37° C. El crecimiento fue mantenido hasta la fase logarítmica mediante el control de variables como presión, temperatura y pH. Por último el material fue centrifugado a 400 x g por 60 min para separar la biomasa del medio de cultivo.

### **Obtención de extractos salinos**

Se obtuvieron extractos solubles por el método de extracción salina desarrollado por Gentry (1982), con el fin de obtener una fracción proteínica de la adhesina teniendo como indicador la actividad hemaglutinante de eritrocitos de conejo. La biomasa bacteriana fue fraccionada en lotes de 20 g, resuspendida en 50 ml de PBS 0.2 M de pH 7.2 y congelada a -70°C hasta su uso. Las suspensiones bacterianas fueron calentadas a 41° C por una hora en agitación constante, posteriormente se centrifugaron a 6000 x g durante 30 min y finalmente

se colectó el sobrenadante. El sobrenadante representó el material salino extraíble y contiene principalmente polisacáridos capsulares, proteínas solubles de la superficie bacteriana y bajas concentraciones de lipopolisacárido. Los sobrenadantes se precipitaron con sulfato de amonio a una saturación del 66% con el objeto de eliminar polisacáridos capsulares y recuperar las proteínas presentes, la precipitación se realizó por 48 h a 4° C. Las fracciones fueron precipitadas a 900 x g por 60 min., se eliminaron los sobrenadantes y el material precipitado fue solubilizado en PBS, extensamente dializado contra agua destilada y posteriormente contra SSI (NaCl 0.15 M). Se determinó la actividad hemaglutinante de los extractos antes y después de haber efectuado el proceso de la precipitación. Por último, se determinó la concentración de proteína de dichas fracciones por el método de Bradford (1976).

### **Conservación del medio de cultivo**

El sobrenadante de cultivo restante de la biomasa fue preservado con 0.1% de azida de sodio y almacenado a 4°C hasta su uso. Este material también fue utilizado para purificar adhesina que pudiera esta libre.

### **Análisis Electroforético en Geles de Poliacrilamida-SDS**

Las proteínas presentes en los extractos salinos así como las fracciones posteriormente descritas fueron separadas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS al 0.1 % de acuerdo al método descrito por Laemmli, 1976. Se utilizó en presencia de un gel concentrador al 5% y un gel separador al 12.5 % de acrilamida. Se colocaron 10 µg de cada fracción proteica en los carriles correspondientes y proteínas con peso molecular conocido (SIGMA ALDRICH), los corrimientos se hicieron a 200 mA usando una solución amortiguadora de Tris-glicina pH 8.3 con SDS al 0.1 %. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie al 0.2 % y se destiñeron con una mezcla de ácido acético/metanol, algunos geles también fueron teñidos por el método de nitrato de plata mediante un producto comercial.

### **Determinación de la actividad hemaglutinante**

La actividad hemaglutinante de los extractos salinos y del medio de cultivo, así como de sus fracciones no retenidas y retenidas de la cromatografía posteriormente descrita, se determinaron en eritrocitos de conejo al 2%. Se obtuvo sangre de conejos clínicamente sanos por medio de sangrado de la vena auricular, la sangre fue mezclada con citrato de sodio al 2 % en proporción 9:1. Los eritrocitos se lavaron 4 veces con solución salina isotónica y centrifugados a 2500 x g por 10 min, finalmente se ajustó a una dilución del 2%. La actividad hemaglutinante de las fracciones proteicas se determinó en placas de micro-aglutinación de fondo en U, efectuando diluciones dobles seriadas utilizando 25 ml de cada una de las fracciones en SSI y agregando el mismo volumen de eritrocitos. Los eritrocitos fueron utilizados en condiciones naturales y también se probaron después del tratamiento con tripsina (0.1 mg/ml del paquete de eritrocitos a 37 ° C/30 min.).

### **Estudios de la especificidad de la actividad aglutinante**

Se determinó la especificidad de la interacción hemaglutinina-eritrocito por ensayos de inhibición competitiva con azúcares simples y con glicoproteínas. Los azúcares fueron utilizados a una concentración de 0.2 M y se usaron: N-Acetil-glucosamina, N-Acetil-neuramínico y polímeros de GlcNAc como tri-acetil-quitotriosa y di-acetil-quitobiosa. Las glicoproteínas utilizadas fueron fetuina, mucina estomacal porcina y mucina submaxilar bovina.

### **Purificación de la adhesina por cromatografía de afinidad**

Con el fin de purificar la adhesina de 70 kDa se montó una columna de afinidad con estroma de eritrocitos de conejo tratados con glutaraldehído al 2% y atrapados físicamente en sefarosa. Se colectaron 50 ml de sangre utilizando citrato de sodio al 5% como anticoagulante (10:1). El estroma de eritrocitos fue obtenido por choque hipo-osmótico, las membranas fueron lavadas por centrifugación a 12000 x g con SSI y posteriormente tratadas con glutaraldehído al 1%. El estroma fue mezclado con Sephadex G-25 y montado en una columna, de

acuerdo con Vázquez y cols. La columna de afinidad (155 cm<sup>3</sup>) se equilibró con PBS pH 7.2 y se aplicaron los extractos salinos a una velocidad de 10 ml/h. Las fracciones no retenidas fueron eliminadas con PBS hasta que estas mostraron una densidad óptica de cero, finalmente para la elución de la fracción retenida se utilizó ácido acético al 3%, por último las fracciones fueron concentradas y dializadas contra PBS por centrifugación utilizando una membrana de exclusión de 12000 Da.

### **Obtención de sangre y separación de leucocitos**

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de bovinos Holstein clínicamente sanos. La sangre fue mezclada con citrato de sodio al 5% en una proporción 9:1. La separación de mononucleares se logró mediante gradientes de Percoll. La separación de neutrófilos se realizó por el método de lisis hipotónica (Weiss 1989) centrifugando la sangre a 900 g por 15 min separando aproximadamente el 60 % de la fracción roja inferior, esta fracción contiene el 90-95% de neutrófilos. Los eritrocitos fueron eliminados utilizando una solución de lisis de cloruro de amonio (8.26 g NH<sub>4</sub>Cl, 1.19 g NaHCO<sub>3</sub>, 0.0378 g EDTA<sub>2</sub>Na, pH 7.3, y 1,000 ml de agua destilada). La fracción de leucocitos restante fue lavada tres veces con PBS. Mediante microscopía de luz se hicieron conteos totales, diferenciales y de viabilidad celular usando la cámara de Neubauer, la tinción de Giemsa y azul de tripano al 2%, respectivamente. Por último las células fueron resuspendidas en medio RPMI, PBS, o paraformaldehído al 4%, según fue necesario.

### **Inmunocitoquímica**

Un microgramo de adhesina fue acoplada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) utilizando amortiguador de carbonatos. Suspensiones de leucocitos (5 x 10<sup>5</sup>) fueron lavadas con una solución salina amortiguada complementada con albúmina serica bovina (BSA) e incubadas por 30 min a 37° C con *MhA* y otras lectinas, finalmente se realizaron incubaciones competitivas utilizando varios azúcares y glicoproteínas. Las células fueron analizadas por microscopía de

fluorescencia y por citometría de flujo.

### **Citometría de flujo**

Los leucocitos positivos al reconocimiento por *MhA* fueron determinados por citometría de flujo utilizando un FACS Excalibur, Becton Dickinson Co. (Mountain View, CA, USA). Los leucocitos fueron suspendidos ( $1 \times 10^6$  in PBS) e incubados por separado en FITC-*MhA* en concentraciones de 0.1  $\mu\text{g}$  a 10  $\mu\text{g}$ , por 15 min. a 4°C. Después de la incubación las células fueron lavadas en PBS-BSA-A y fueron suspendidas en 1 ml de solución FACS y analizadas en el citómetro citado. Los análisis fueron en base a 10,000 células. El número de leucocitos positivos a *MhA* fue determinado en ensayos por triplicado usando FITC-*MhA*. La especificidad de *MhA* fue demostrada por la inhibición adhesina-célula agregando 200  $\mu\text{l}$  de 200 mM GlcNAc diluidos en la suspensión de leucocitos-PBS y analizados por citometría de flujo.

### **Estallido respiratorio en neutrófilos**

El estallido respiratorio fue analizado en neutrófilos de sangre periférica utilizando una solución de nitro-azul de tetrazolio (NBT) con zymosan. El NBT al 0.2% se diluyó en solución salina isotónica, se filtró utilizando una membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y fue incubado con 0.1% de zymosan en baño María a 37° C por 2 h en agitación suave. El ensayo fue realizado con una suspensión de  $1 \times 10^5$  células en 50  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo RPMI utilizando una microplaca de 96 pozos. Las células fueron incubadas por 30 min a 37° C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> para formar una monocapa de neutrófilos adheridos. *MhA*, WGA y PMA (0.5 mg) fueron agregados a cada pozo. Cien microlitros de NBT-Zymosan fueron agregados y la placa fue incubada bajo las mismas condiciones antes descritas por 60 min. El sobrenadante fue eliminado y los pozos fueron lavados suavemente con metanol al 70% y secados a temperatura ambiente hasta su evaporación total. Después se adicionaron 120  $\mu\text{l}$  de KOH 2M a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente por 60 min con agitación suave, finalmente se adicionaron 140  $\mu\text{l}$  de dimetil sulfóxido y se homogenizo el contenido con una micropipeta hasta obtener el

cambio de coloración. La reducción del NBT fue medida en un lector de ELISA usando como blanco tres pozos sin células con solución NBT-Zymosan. La especificidad del efecto inducido por *MhA* y WGA fue confirmado mediante la previa incubación de las lectinas con carbohidratos específicos (200 mM).

### **Preparación de proteínas de membrana de neutrófilos**

Una vez separadas las células fueron lavadas tres veces con PBS pH 7.2 y posterior a la cuantificación se llevó a cabo la preparación de proteínas de membrana por lisis celular bajo condiciones de preservación de la integridad y función del receptor. El tritón X-100 tiene un extenso uso como agente lítico y presenta una ventaja particular al no lisar la membrana nuclear y por lo tanto no genera una solución viscosa de ácidos nucleicos. Se utilizó 1 ml de solución de lisis por cada  $100 \times 10^6$  células, utilizando tritón al 1% en PBS, inhibidores de proteasas (Sigma) y PMSF con especificidad por proteasas contra cisteína, serina y ácido aspártico, así como aminopeptidasas. Las soluciones fueron mezcladas con el botón de células y la mezcla puesta en agitación por 30 min a 4° C. Por último la muestra fue centrifugada a 12000 x g por 30 min. El sobrenadante representa principalmente proteínas de membrana.

### **Purificación del receptor de *MhA* en neutrófilos**

Se preparó una columna de afinidad de sefarosa activada con bromuro de cianógeno (4 cm<sup>3</sup>) acoplada a *MhA*. Se prepararon lisados de neutrófilos utilizando tritón X-100 al 0.1%, e inhibidores de proteasas (Sulfonil fluoruro fenil metano-PMSF) y PBS como diluyente. Diez millones de neutrófilos fueron tratados con las soluciones mencionadas incubando a 4° C por 30m en agitación, posteriormente la muestra fue centrifugada a 12000 x g por 30 min, el sobrenadante representa el lisado de membranas. Se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford y el lisado fue transferido a la columna de afinidad, después la columna fue lavada con PBS hasta obtener una DO (280nm) negativa. La fracción retenida fue eluida con una solución de PBS-GlcNAc 200 mM. La fracción retenida fue concentrada utilizando tubo de diálisis y dializada contra agua destilada por 48h.

### **Determinación de la secuencia primaria del receptor de MhA**

La secuencia de aminoácidos del receptor de MhA se determinó por espectrometría de masas mediante ionización deserción asistida con laser (MALDI-TOF) en péptidos obtenidos por digestión con tripsina: Después de la electroforesis, las banda que contenía las fracción de proteína de 83 kDa, fue cortada del gel y digerida con 0.05 mg de tripsina en 500 µl de bicarbonato de amonio, pH 8.0 a 37°C durante 24 h. El efecto de la tripsina fue inhibido dejando la mezcla a 2°C por 4 horas. La fracción digerida se secó por evaporación usando un Gyrovap (Howe, Londres). La muestra se preparo mezclando directamente 1 µl de los productos de la reacción (conteniendo 50 pM) con 1 µl de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (12 mg/ml en CHO, 70:30), dejando cristalizar la mezcla a temperatura ambiente. Los iones positivos de los péptidos se analizaron por MALDI-TOF, en un espectrofotómetro de masas Vision 2000 (Finnigan MAT Bremen, Germany) equipado con un lector UV a 337 nm. Los espectros de masa se midieron en modo reflectrón bajo voltaje de aceleración y detección positiva. Como control se utilizó Tripsina para identificar los péptidos libres y Angiotensina como estandar (Mr 296.7) (Helman et al., 1995). Las masas de los iones de cada péptido fueron comparadas en una base de datos obtenida de NCBI (Profound 2004/01/26).

## RESULTADOS

### **Cultivo de *M. haemolytica* y purificación de la adhesina**

*Mannheimia haemolytica* fue cultivada en medio líquido utilizando peptona de carne, peptona de caseína y levadura como componentes principales. La bacteria fue cultivada por 8 h a 37° C. Se obtuvieron 250 g de biomasa y aproximadamente 80 litros de sobrenadante de medio de cultivo. El perfil de purificación de la adhesina se muestra en la Tabla 2. La adhesina fue capaz de aglutinar eritrocitos de conejo al 2% pero no aglutino eritrocitos de otras especies, tal como se había descrito por Jaramillo y cols. La concentración mínima para aglutinar eritrocitos al 2% fue de 1 µg. El perfil electroforético en un gel de poliacrilamida al 10 % mostró una banda de aproximadamente 68 kDa en ambas fracciones (Fig. 3).

De las fracciones obtenidas podemos observar que la fracción purificada a partir de biomasa mostró una actividad específica cinco veces mayor que la adhesina purificada de medio de cultivo. La elusión del material retenido se realizó con ácido acético glacial al 3% o 200 mM de GlcNAc (Fig. 2). El perfil de elución con GlcNAc fue similar al obtenido con ácido acético (Tabla 2).

### **Reconocimiento de leucocitos por MhA (Inmunocitoquímica)**

Como podemos observar en la figura 4 de microscopia de fluorescencia el  $45 \pm 5$  % de los leucocitos marcados con *MhA*-FITC fue reconocido por la adhesina de 69 kDa. La incubación de *MhA*-FITC con neutrófilos resultó en  $90 \pm 5$  % de reconocimiento de estas células. La incubación posterior con GlcNAc disminuyó en aproximadamente un 30% este reconocimiento.

### **Citometría de flujo**

Los resultados de citometría de flujo en leucocitos incubados con *MhA*-FITC fueron analizados mediante plantillas de tamaño contra granularidad, mostrando tres poblaciones diferentes bien definidas. *MhA*-FITC reconoció preferentemente neutrófilos y en menor grado monocitos, mientras la especificidad de la interacción

fue demostrada con el uso de GlcNAc. El análisis de reconocimiento se hizo en plantillas de intensidad de fluorescencia contra número de células (Figs. 5-8).

### **Especificidad de la interacción de *MhA***

La especificidad de la interacción *MhA*-neutrófilos fue analizada mediante competencia con carbohidratos y glicoproteínas. Con el propósito de evaluar la participación de los residuos de ácido sálico de membrana en el reconocimiento, se realizaron tratamientos a diferentes tiempos y concentraciones con sialidasa de *Vibrio cholerae*. La inhibición con azúcares simples no fue significativa, los polímeros de GlcNAc tampoco mostraron un efecto competitivo cuando se incubaron con *MhA*. De las glicoproteínas utilizadas, fetuina fue el mejor inhibidor del reconocimiento (26%). El tratamiento con sialidasa aumentó el reconocimiento de *MhA* a 45 min utilizando 0.2U de la enzima. La Tabla 3 resume estos ensayos, la intensidad del reconocimiento se expresa en IMF (intensidad media de fluorescencia).

### **Estallido respiratorio en neutrófilos**

Los neutrófilos fueron estimulados con 25 µg de *MhA* por  $1 \times 10^5$  células como dosis óptima. *MhA* logro estimular el estallido con una intensidad similar a PMA y a WGA (Fig. 9). El efecto fue inhibido significativamente con GlcNAc y NeuAc aunque este último con menor intensidad (Tabla 4).

### **Composición de aminoácidos**

El análisis mostró que los aminoácidos más abundantes son glicina, ácido aspártico, alanita, ácido glutámico y serina, con una cantidad moderada de lisina, valina y ácido glutámico, así como un contenido bajo de arginina, metilalanina, e isoleucina (Tabla 5).

### **Caracterización parcial del receptor de *MhA* en neutrófilos de bovino**

La cromatografía de afinidad nos permitió purificar una fracción proteica que fue eluida con GlcNAc. La fracción concentrada fue capaz de inhibir la actividad

aglutinante de *MhA*. El perfil electroforético de esta fracción fue la presencia de dos proteínas de 80 y 83 kDa respectivamente (Figura 11). Estas proteínas fueron analizadas por el secuenciación de masas (MALDI). El análisis preliminar de estas masas con secuencias homólogas revela un 29% de homología con la metavinculina, proteína de membrana asociada con procesos de señalización celular y activación de la actina.

## Conclusiones y discusión

*Mannheimia haemolytica* es el principal agente del complejo respiratorio bovino (Whiteley et al, 1992; Confer et al, 1995; Jaques y Paradis, 1998). En un trabajo previo (Jaramillo et al., 2001), se demostró que *Mh* posee una adhesina (*MhA*) que es liberada al medio de cultivo y su concentración aumenta cuando la bacteria se incuba a 41<sup>o</sup>C. Aunque *MhA* participa en la colonización de superficies mucosas del bovino, su papel en la patogénesis de Mannheimiosis es desconocido.

En este trabajo nosotros encontramos que *MhA* reconoce específicamente neutrófilos polimorfonucleares (CD16<sup>+</sup>) y en menor frecuencia monocitos (CD14<sup>+</sup>) pero es incapaz de interactuar con linfocitos. Esta propiedad de reconocimiento fue dependiente del reconocimiento específico de los receptores con residuos de GlcNAc, como pudo demostrarse con los ensayos por competencia con dicho azúcar en forma pura.

*MhA* reconoció neutrófilos en forma pura, pero también activó su estallido respiratorio. El efecto de zymosan fue utilizado como control para evaluar el proceso de fagocitosis. La activación del estallido respiratorio por fagocitosis a través de mecanismos dependientes de la enzima NADPH ha sido anteriormente descrita (Rossi, 1986)., sin embargo *MhA* mostró mas capacidad ( $P < 0.01$ ) que zymosan para inducir estallido respiratorio.

El efecto inducido por *MhA* en neutrófilos es probablemente debido a la alta densidad de residuos terminales no reductores de GlcNAc (de la Fuente et al., 2003; Kneass y Marchase, 2005) los cuales pudieran jugar un papel relevante en la activación de neutrófilos, estos resultados fueron confirmados por el hecho de que el efecto de *MhA* en estas células fue inhibido mas por oligómeros (GlcNAc)<sub>3</sub> que por GlcNAc. El grupo axial OH en C4 de GlcNAc es esencial para la interacción con *Mh* (Jaramillo et al., 2001). La adhesina mostró afinidad por glicoproteínas que característicamente poseen glicanos sialilados en posiciones antenarias bi y tri N-glicosiladas del tipo N-acetil lactosamínico y N,N'diacetil quitobiosa tales como fetuina (Spiro y Bhoyroo, 1974; Takasaki y Kobata, 1986), glicoproteína ácido  $\alpha_1$  (Fournet et al, 1978) y en menor proporción con transferian

(Montreuil, 1975). El ácido neuramínico inhibió la interacción, sin embargo, este azúcar parece participar en la interacción de *MhA* con glicoproteínas. Puede ser posible que el hidroxilo en posición 4 y 5-NHAc en el anillo de Neu5Ac estén alineados con el mismo grupo de GlcNac (3-OH y 2-NHAc) en la secuencia del oligosacárido (Ichikawa et al., 1990), sin embargo el núcleo de N,N'-diacetilquitotriosa en inhibidores desialilados pudiera explicar porque estas glicoproteínas inhiben el efecto de *MhA*.

En la primera parte de nuestra investigación determinamos la capacidad de *MhA* para interactuar específicamente con neutrófilos de bovino y activar su estallido respiratorio. La adhesina de 68 kDa aglutina específicamente eritrocitos de conejo y participa en la interacción de *Mh* con epitelio traqueal. El tratamiento de neutrófilos con sialidasa aumento el reconocimiento de *MhA*, la disposición de los residuos de ácidos sialico en la membrana de estas células podría estar interfiriendo con la interacción de *MhA* y su (s) receptor (es).

En este trabajo nosotros purificamos un receptor para *MhA* en neutrófilos de bovino (*MhAr*) mediante cromatografía de afinidad utilizando sefarosa como matriz de soporte. El *MhAr* corresponde al 0.43% del lisado total y es una proteína de 83 kDa compuesta principalmente por Glx, Asx, Ser y Gly. La porción de glicina, que corresponde al 20% esta compuesta principalmente por NeuAc, GlcNac, manosa y galactosa. La huella peptídica fue determinada con péptidos tratados con tripsina mediante la técnica de MALDI-TOF, indicando una homología con vinculina (34%) y con una proteína similar a MALT (Asociada a mucosa linfoide), una isoforma de la proteína de translocación de tejido linfoide de *Gallus gallus* (17%). Metavinculina es una porción variante que forma un complejo con vinculina y es expresada en músculo cardíaco y músculo liso. Metavinculina es caracterizada por un inserto de 60 aminoácidos dentro de su dominio carboxilo-terminal (anclaje microfilamentoso), esta proteína es modulada en sitios de adhesión muscular a través de la organización de la formación del heterodímero de vinculina-metavinculina, el cual induce una supra-organización con f-actina (Rudiger et al, 1998; Witt et al., 2004).

*MhA* interactúa con receptores que contienen GlcNAc en neutrófilos, dichos receptores podrían ser expresados en la superficie de estas células en un estado de activación o de maduración (Terr, 1997). La modificación de proteínas por GlcNAc sugiere un papel en la regulación de una variedad de rutas en la transducción de señales en neutrófilos, tales como motilidad y migración direccional dirigida por quimioatrayentes del tipo formyl-metionina-leucina-fenilalanina (fMLP) en neutrófilos, reportes previos sugieren que el estallido respiratorio inducido por la estimulación con receptores con GlcNAc por lectinas vegetales con especificidad similar tales como heveina pueden ser dependientes de la reorganización de microfilamentos y funciones de serina proteasa (Rojas et al, 2001). GlcNAc parece modular las actividades de señalización intermedia conocidas por regular el movimiento de los neutrófilos. Varios autores sugieren que la acilación de GlcNAc en proteínas de membrana es un elemento importante en la señalización en neutrófilos, mas aún, nuestros estudios indican que este residuo es utilizado específicamente por *M. haemolytica* a través de su adhesina para inducir procesos proinflamatorios y esta característica podría ser común dentro de las bacterias del grupo HAP (Jaques y Paradis, 1998., Kneas et al., 2005, Millar-Podraza et al., 1999).

## Revisión de literatura

- Ackermann MR, Brogden KA, Florance AF, Kehrli ME. Induction of CD18-mediated passage of neutrophils by *Pasteurella haemolytica* in pulmonary bronchi and bronchioles. *Infect. Immun.* 1999; 67: 659-663.
- Al-Haddawi MH, Jasni S, Zamri-Saad M, Mutalib AR, Zulkifli I, Son R, Sheikh-Omar AR. In vitro study of *Pasteurella multocida* adhesion to trachea, lungs and aorta of rabbits. *J. Vet.* 2000; 159: 274-281.
- Angen O, Mutters R, Caugant DA, Olsen JE, Bisgaard M. Taxonomic relationship of the (*Pasteurella*) *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridization and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen.nov., comb. nov., and *Mannheimia glucosida* sp. nov. and *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1999; 49: 67-86.
- Aubry P, Warnick LD, Guard CL, Hill BW, Witt MF. Health and performance of young dairy calves vaccinated with a modified-live *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* vaccine. *JAVMA.* 2001; 219: 1739-1742.
- Azghani AO, Idell S, Bains M, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. *Micro. Patho.* 2002; 33: 109-114.
- Bassinat L, Gueirard P, Maitre B, Housset B, Gounon P, Guiso N. Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 2000; 68: 1934-1941.
- Becker DJ, Lowe JB. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology.* 2003; 13: 41R-53R.
- Bhattacharjee MK, Kachlany SC, Fine DH, Figuriski DH. Nonspecific adherence and fibril biogenesis by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* : TadA protein is an ATPase. *J. Bacteriology.* 2001; 183: 5927- 5936.
- Blackall PJ, Bisgaard M, Stephens CP. Phenotypic characterization of australian sheep and cattle isolates of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia granulomatis* and *Mannheimia varigena*. *Aus. J. Vet.* 2002; 80: 87-91.
- Boekema BKHL, Stockhofe-Zurwieden N, Smith HE, Kamp EM, Van Putten JP, Verheijden JH. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to primary cultures of porcine lung epithelial cells. *Vet. Microb.* 2003; 93: 133- 144.

- Bresser P, Virkola R, Jonsson-Vihanne M, Jansen HM, Korhonen TK, Van Alphen L. Interaction of clinical isolates of nonencapsulated *Haemophilus influenzae* with mammalian extracellular matrix proteins. *FEMS Immun. And Med. Microbiol.* 2000; 28: 129- 132.
- Bulai T, Bratosin D, Pons A, Montrevil J, Zanetta JP. Diversity of the human erythrocyte membrane sialic acid in relation with blood groups. *FEBS.Lett.* 2003; 534: 185-189.
- Caverly JM, Diamond G, Gallup JM, Brodgen KA, Dixon RA, Ackermann MR. Coordinated expression of tracheal antimicrobial peptide and inflammatory-response elements in the lungs of neonatal calves with acute bacterial pneumonia. *Infect. Immun.* 2003; 71: 2950-2955.
- Caverly JM, Radi ZA, Andreasen CB, Dixon RA, Brodgen KA, Ackermann MR. Comparasion of bronchoalveolar lavage fluid obtained from *Mannheimia haemolytica*-inoculated calves with and without prior treatment with the selectin inhibitor TBC 1269. *AJVR.* 2001; 62: 665.672.
- Cheng LW, Schneewind O. Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods. *Trends in Microbiol.* 2000; 8: 214-220.
- Chin AC, Lee WD, Murrin KA, Morck DW, Merrill JK, Dick P, Buret AG. Tilmicosin induces apoptosis in bovine peripheral neutrophils in the presence or in the absence of *Pasteurella haemolytica* and promotes neutrophil phagocytosis by macrofages. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002; 44: 2465-2470.
- Clark RA. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J. Infect. Dis.* 1999; 179: S309-17.
- Clemans DL, Marrs CF, Bauer RI, Patel M. Analysis of Pilus Adhesins from *Haemophilus influenzae* Biotype IV Strains. *Infect. Immun.*2001; 69 : 7010-7019.
- Confer AW, Ayalew S, Panciera RJ, Montelongo M, Whitworth L, Hammer JD. Immunogenicity of recombinant *Mannheimia haemolytica* serotype 1 outer membrane protein P1pE and augmentation of a commercial vaccine. *Vaccine.* 2003; 21: 2821-2829.
- Confer AW, Fulton RW, Clinkenbeard KD, Driskel BA. Duration of serum antibody responses following vaccination and revaccination of cattle with non-living commercial *Pasteuerella haemolytica* vaccines. *Vaccine.* 1998; 16: 1962-1970.

- Davies RL, Lee I. Sequence diversity and molecular evolution of the heat-modifiable outer membrane protein gene ( *ompA* ) of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, and *Pasteurella trehalosi*. *J. Bact.* 2004; 186: 5741- 5752.
- Davies RL, Whittam TS, Selander RK. Sequence diversity and molecular evolution of the leukotoxin (lkt A) gene in bovine and ovine strains of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *J. of Bact.* 2001;183:1394-1404.
- Dawid S, Grass S, St Geme III JW. Mapping of binding domains of nontypeable *Haemophilus influenzae* HMW2 Adhesins. *Infect. Immun.* 2001 ; 69: 307-314.
- Denis M, Palatty M, Bai NR, Suriya SJ. Purification and characterization of a sialic acid specific lectin from the hemolymph of the freshwater crab *Paratelphusa jacquemontii*. *Eur. J. Biochem.* 2003; 270: 4348-4355.
- Desphande MS, Ambagala TC, Ambagala AP, Kehrl ME, Srikumaran S. Bovine CD18 is necessary and sufficient to mediate *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin induced cytolysis. *Infect. Immun.* 2002; 70: 5058-5064.
- Dowling A, Hodgson JC, Dagleish MP, Eckersall PD, Sales J. Pathophysiological and immune cell responses in calves prior to and following lung challenge with formalin-killed *Pasteurella multocida* biotype A:3 and protection studies involving subsequent homologous live challenge. *Vet. Immun. Immunopath.* 2004; 100: 197-207.
- Enriquez-Verdugo I, Guerrero AL, Serrano JJ, Godínez D, Rosales JL, Tenorio V, De la Garza M. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine-lung collagen. *Microbiology.* 2004; 150: 2391- 2400.
- Frank GH, Briggs RE, Duff GC, Loan RW, Purdy CW. Effects on vaccination prior to transit and administration of florfenicol at time of arrival in a feed lot on the health of transported calves and detection of *Mannheimia haemolytica* in nasal secretions. *AJVR.* 2002; 63: 251-256.
- Fulton RW, Briggs RE, Payton ME, Confer AW, Saliki JT, Ridpath JF, Burge LJ, Duff GC. Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1a, BVDV 1b, BVDV 2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. *Vaccine.* 2004; 22: 643-649.

- Galyean ML, Perino LJ, Duff GC. Interaction of cattle health/ immunity and nutrition. *J. Animal. Sci.* 1999: 77: 1120-1134.
- Ganheim C, Hulten C, Carlsson U, Kindahl H, Niskanen R, Waller KP. The acute phase response in calves experimentally infected with bovine viral diarrhoea virus and/or *Mannheimia haemolytica*. *J. Vet. Med.* 2003: 50: 183-190.
- Gorter AD, Oostrik J, Van der Ley P, Hiemstra PS, Dankert J, Van Alphen L. Involvement of lipooligosaccharides of *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis* in defensin-enhanced bacterial adherence to epithelial cells. *Microb Pathog.* 2003 : 34(3):121-30.
- Hajishengalis G, Martin G, Sojar HT, Sharma A, Schifferle RE, DeNardin E, Rusell MW, Genco RJ. Dependence of bacterial protein adhesins on toll-like receptors for proinflammatory cytokine induction. *Clin. Diag. Lab. Immun.* 2002: 9: 403-411.
- Hamer-Barrera R, Godínez D, Enríquez VI, Vaca-Pacheco S, Martínez-Zuñiga R, Talamás-Rohana O, Suárez-Güemez F, De la Garza M. Adherence of *actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 to swine buccal epithelial cells involves fibronectin. *Can. J. Vet. Res.* 2004: 68: 33-41.
- Harvey HA, Swords WE, Apicella MA. The Mimicry of human glycolipids and glycosphingolipids by the lipooligosaccharides of pathogenic *Neisseria* and *Haemophilus*. *Journal of Autoimmunity.* 2001: 16: 257-262.
- Highlander SK, Fedorova ND, Dusek DM, Panciera R, Alvarez LE, Rinehart C. Inactivation of *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin causes partial attenuation of virulence in a calf challenge model. *Infect. Immun.* 2000: 68: 3916-3922.
- Higlander SK. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Frontiers in Bioscience.* 2001: 6:1128-1150.
- Hills AE, Lainson FA. Survey of restriction-modification systems and transformation in *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella trehalosi*. *Vet. Microbiol.* 2003: 92: 103-109.
- Hsuan SL, Kannan MS, Jeyaseelan S, Prakash YS, Sieck GC, Maheswaran SK. *Pasteurella haemolytica* A1-derived leukotoxin and endotoxin induce intracellular calcium elevation in bovine alveolar macrophages by different signaling pathways. *Infect. Immun.* 1998: 66: 2836-2844.
- Hunt ML, Adler B, Townsend KM. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* 2000: 72: 3-25.

- Jacques M, Mikael LG. Virulence factors of *Pasteurellaceae*, formidable animal pathogens. ASM. News. 2002: 68: 174-179.
- Jacques M, Paradis SE. Adhesin-receptor interactions in *Pasteurellaceae*. FEMS Microbiol. Lett. 1998 : 22 : 45-59.
- Jaramillo L, Díaz F, Hernández P, Debray H, Trigo F, Mendoza G, Zenteno E. Purification and characterization of an adhesin from *Pasteurella haemolytica*. Glycobiology. 2000: 10: 31-37.
- Jeyaseelan S, Hsuan SL, Kannan MS, Walchek B, Wang JF, Kehrl ME, Lally ET, Sieck GC, Maheswaran SK. Lymphocyte function-associated antigen 1 is a receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin in bovine leukocytes. Infect. Immun. 2000: 68: 72-79.
- Jeyaseelan S, Kannan MS, Briggs RE, Thumbikat P, Maheswaran SK. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin activates a nonreceptor tyrosine kinase signaling cascade in bovine leukocytes, which induces biological effects. Infect. Immun. 2001: 69: 6131-6139.
- Karlsson A. Wheat germ agglutinin induces NADPH-oxidase activity in human neutrophils by interaction with mobilizable receptors. Infect. Immun. 1999: 67: 3461-3468.
- Kehrenberg C, Schulze-Tanzil G, Martel JL, Chalus-Dancla E, Schwarz S. Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. Vet. Res. 2001: 32: 323-339.
- Klemm P, Schembri MA. Bacterial adhesins: function and structure. Int. J. Med. Microbiol. 2000: 290: 27-35.
- Kubiet M, Ramphal R, Weber A, Smith A. Pilus-mediated adherence of *Haemophilus influenzae* to human respiratory mucins. Infect. Immun. 2000: 68: 3362-3367.
- LaFleur RL, Abrahamsen MS, Maheswaran SK. The biphasic mRNA expression pattern of bovine interleukin-8 in *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-stimulated alveolar macrophages is primarily due to tumor necrosis factor alpha. Infect. Immun. 1998: 66: 4087-4092.
- LaFleur RL, Malazdrewich C, Jeyaseelan S, Bleifield E, Abrahamsen MS, Maheswaran SK. Lipopolysaccharide enhances cytosol and inflammatory cytokine induction in bovine alveolar macrophages exposed to *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin. Microb. Pathog. 2001: 30: 347-357.

- Lee RW, Strommer J, Hodgins D, Shewen PE, Niu Y, Lo RY. Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a *Mannheimia* A1 leukotoxin 50 fusion protein. *Infect. Immun.* 2001; 69: 5786-5793.
- Leite F, Brown JF, Sylte MJ, Briggs RE, Czuprynski CJ. Recombinant bovine interleukin-1 $\beta$  amplifies the effects of partially purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxin on bovine neutrophils in a  $\beta$ 2-integrin-dependent manner. *Infect. Immun.* 2000; 68: 5581-5586.
- Leite F, O'Brien S, Sylte MJ, Page T, Atapattu D, Czuprynski CJ. Inflammatory cytokines enhance the interaction of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin with bovine peripheral blood neutrophils In vitro. *Infect. Immun.* 2002; 70: 4336-4343.
- Lo RY, McKerral LJ, Hills TL, Koztrzyńska M. Analysis of the capsule biosynthetic locus of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1 and proposal of a nomenclature system. *Infect. Immun.* 2001; 69:4458-4464.
- Lo RY. Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Vet. Microbiol.* 2001; 83: 23-35.
- Lovane G, Galdiero M, Vitiello M, De Martino L. Effect of *Pasteurella haemolytica* outer membrane proteins on bovine neutrophils. *FEMS. Immun. Med. Microbiol.* 1998; 20: 29-36.
- Malazdrewich C, Thumbikat P, Maheswaran SK. Protective effect of dexamethasone in experimental bovine pneumonic manheimiosis. *Microb. Pathog.* 2004; 36: 227-236.
- Marchart J, Rehagen M, Dropmann G, Szotak MP, Alldinger S, Lechleitner S, Schlappt, Resch S, Lubitz W. Protective immunity against pasteurellosis in cattle, induced by *Pasteurella haemolytica* ghost. *Vaccine.* 2003; 21: 1415-1422.
- Marikovsky Y, Marikovsky M. Clearance of senescent erythrocytes: wheat germ agglutinin distribution on young and old human erythrocytes. *J. Glycoconjugate.* 2002; 19: 1-4.
- McKerral LJ, Lo RY. Construction and characterization of an acapsular mutant of *Mannheimia haemolytica* A1. *Infect. Immun.* 2002; 70: 2622-2629.
- McNeil HJ, Shewen PE, Lo RY, Conlon JA, Miller MW. *Mannheimia haemolytica* serotype 1 and *Pasteurella trehalosi* serotype 10 culture supernatants contain fibrinogen-binding proteins. *Vet. Immun. Immunopathol.* 2002; 90: 107-110.

- Mitchell GB, Albright BN, Cswell Jf. Effect of interleukin-8 and granulocyte colony-stimulating factor on priming and activation of bovine neutrophils. *Infect. Immun.* 2003; 71: 1643-1649.
- Monello RJ, Murray DL, Cassier EF. Ecological correlates of pneumonia epizootic in bighorn sheep herds. *Can. J. Zool.* 2001; 79: 1423-1432.
- Nagahata H, Higuchi H, Yamashikin N, Yamaguchi M. Analysis of the functional characteristics of L-selectin and its expression on normal and CD18-deficient bovine neutrophils. *Immun. Cell. Biol.* 2000; 78: 264-271.
- Narita M, Kimura K, Tanimura N, Arai S, Tsuboi T, Katsuda K. Immunohistochemical characterization of calf pneumonia produced by the combined endobronchial administration of bovine Herpesvirus 1 and *Pasteurella haemolytica*. *J. Comp. Path.* 2000; 123: 126-134.
- Oostveldt KV, Paape MJ, Dosogne H, Burvenich C. Effect of apoptosis and phagocytosis, respiratory burst and CD18 adhesion receptor expression of bovine neutrophils. *Dom. Animal. Endocrinol.* 2002; 22: 37-50.
- Overbeke IV, Chiers K, Charlier G, Vandenberghe I, Beeumen JV, Ducatelle R, Haesebrouk F. Characterization of the in vitro adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 2002; 88: 59-74.
- Papageorgiou AC, Acharya KR. Microbial superantigens: from structure to function. *Trends in Microbiol.* 2000; 8: 369-375.
- Paradis SE, Dubreuil JD, Gottschalk M, Archambault M, Jacques M. Inhibition of adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells by monoclonal antibodies directed against LPS and partial characterization of the LPS receptors. *Current Microbiol.* 1999; 39: 313-320.
- Pruimboom IM, Rimler RB, Ackermann MR. Enhanced adhesion of *Pasteurella multocida* to cultured turkey peripheral blood monocytes. *Infect. Immun.* 1999; 67: 1292-1296.
- Purdy CW, Straus DC, Chirase N, Ayers JR, Hoover MD. Effects of aerolized dust in goats on lung clearance of *Pasteurella* and *Mannheimia* species. *Current. Microbiol.* 2003; 46: 174-179.
- Radi ZA, Brodgen KA, Dixon RA, Gallup JM, AcKermann MR. A selectin inhibitor decrease neutrophil infiltration during acute *Mannheimia haemolytica* pneumonia. *Vet. Pathol.* 2002; 39: 697-705.

- Sala A, Folco G. Breakthroughs and views. Neutrophils, endothelial cell, and cysteinyl leukotrienes: a new approach to neutrophil-dependent inflammation. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 2001; 283: 1003-1006.
- Schaver R. Achievements and challenges of sialic acid research. *J. Glycoconjugate.* 2000; 17: 485-499.
- Smith DGE. Adherence and pathogenesis of *Pasteurella multocida* a sticky problem. *J. Vet.* 2000; 159: 215-216.
- Soethout EC, Müller KE, Rutten VP. Neutrophil migration in the lung, general and bovine-specific aspects. *Vet. Immun. Immunopath.* 2002; 87: 277-285.
- Soethout EC, Müller KE, Rutten VP. Neutrophil migration in the lung, general and bovine-specific aspects. *Vet. Immun. Immunopath.* 2002; 87: 277-285.
- Soto GE, Hultgren SJ. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bact. (Minireview).* 1999; 181: 1059-1071.
- Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology.* 2002; 12: 43R-56R.
- St Geme III JW, Cutter D. The *Haemophilus influenzae* hia adhesin is an autotransporter protein that remains uncleaved at the C terminus and fully cell associated. *J. Bacteriology.* 2000; 182: 6005-6013.
- Stathopoulos C, Hendrixon DR, Thanassi DG, Hultgren SJ, Josep W, Geme III St., Curtis III R. Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in Gram-negative pathogens: an evolving story. *Micro. Infect.* 2000; 2: 1061-1072.
- Straus DC, Unbehagen PJ, Purdy CW. Neuramidase production by a *Pasteurella haemolytica* A1 strain associated with bovine pneumonia. *Infect. Immun.* 1993; 61: 253-259.
- Sun Y, Clinkenbeard KD, Ownby CL, Clarke CR, Highlander SK. Ultrastructural characterization of apoptosis in bovine lymphocytes exposed to *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *AJVR.* 2000; 61: 51-56.
- Taylor RK. Bacterial adhesion to mucosal surfaces. *J. Chemother.* 1991; 3: 190-195.

- Radi ZA, Caverly JM, Dixon RA, Brodgen KA, AcKermann MR. Effects of the synthetic selectin inhibitor TBC 1269 on tissue damage during acute *Mannheimia haemolytica* induced pneumonia in neonatal calves. *AJVR*. 2001; 62: 17-22.
- Raj PA, Dentino AR. Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS. Microbiol. Lett.* 2002; 206: 9-18.
- Ramírez-Romero R, Brodgen KA, Gallup JM, Sonea IM, AcKermann MR. Mast cell density and substance P-like immunoreactivity during the initiation and progression of lung lesions in ovine *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* pneumonia. *Micro. Patho.* 2001; 30: 325-335.
- Ramírez-Romero R, Brodgen KA, Gallup JM, Dixon RA, AcKermann MR. Reduction of pulmonary mast cells in areas of acute inflammation in calves with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* pneumonia. *J. Comp. Path.* 2000; 123: 29-35.
- Reeve-Johnson L. Relationships between clinical and pathological signs of disease in calves infected with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* type A1. *Vet. Rec.* 2001; 149: 549-552.
- Rojas E, Llinas P, Rodríguez-Romero A, Hernández C, Linares M, Zenteno E, Lascurain R. Hevein, an allergenic lectin from rubber latex, activates human neutrophils' oxidative burst. *J. Glycoconjugate.* 2001; 18: 339-345.
- Roos D, Van Bruggen R, Meischl C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes and Infection* . 2003; 5: 1307- 1315.
- Rowe HA, Poxton IR, Donachie W. Survival of *Manheimia (Pasteurella) haemolytica* in tracheobronchial washings of sheep and cattle. *Vet. Microbiol.* 2001; 81: 305-314.
- Rudney JD, Staikov RK. Simultaneous measurement of the viability, aggregation, and live and dead adherence of *Streptococcus crista*, *Streptococcus mutans* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human saliva in relation to indices of caries, dental plaque and periodontal disease. *Archives of Oral Biology.* 2002; 47: 347-359.
- Ruhls S, Cisar JO, Sandberg AL. Identification of polymorphonuclear leukocyte and HL-60 cell receptors for adhesins of *Streptococcus gordinii* and *Actinomyces naeslundii* . *Infect. Immun.* 2000; 68: 6346-6354.
- Sakarya S, Öncü S. Bacterial adhesins and the role of sialic acid in bacterial adhesion. *Med. Sci. Monit.* 2003; 9: 76-82.

- Tefera G, Smola J. *Pasteurella haemolytica* complex of *Pasteurella sensu stricto* as new genus *Mannheimia*: changes in taxonomy. Czech. Vet. Med. 2001; 4: 119-124.
- Theoharides TC, Cochrane DE. Critical role of mast cell in inflammatory disease and the effect of acute stress. J. Neuroimmun. 2004; 146: 1-12.
- Thumbikat P, Briggs RE, Kannan MS, Maheswaran SK. Biological effects of two genetically defined leukotoxin mutants of *Mannheimia haemolytica*. Microb. Pathog. 2003; 34: 217-226.
- Van Schilfgaarde M, Van Ulsen P, Eijk P, Brand M, Stam M, Kouame J, Van Alphen L, Dankert J. Characterization of adherence of nontypeable *Haemophilus influenzae* to human epithelial cells. Infect. Immun. 2000; 68: 4658- 4665.
- Virkola R, Brummer M, Rauvala H, Van Alphen L, Korhonen TK. Interaction of fimbriae of *Haemophilus influenzae* type B with heparin-binding extracellular matrix proteins. 2000; 68: 5696- 5701.
- Wang X, Zhao H, Andersson R. Proteomics and leukocytes: An approach to understanding potential molecular mechanisms of inflammatory responses. J. Proteome Res. 2004; 3: 921- 929.
- Wang Z, Clarke CR, Clinkenbeard KD. Role of phospholipase D in *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced increase in phospholipase A2 activity in bovine neutrophils. Infect. Immun. 1999; 67: 3768-3772.
- Winters KR, Meyer E, Van Merris VM, Van Den Broek WL, Duchateau L, Buruenich C. Sex steroid hormones do not influence the oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes from avariectomized cows In vitro. Steroids. 2003; 68: 397-406.
- Wright JR. Pulmonary surfactant: a front line of lung host defense. J. Clin. Invest. 2003; 111: 1453-1455.
- Young TA, Cunningham CC, Bailey SM. Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol. Arch. Biochem. Biophys. 2002; 405: 65-72.
- Confer A. W., Clinkenbeard K.D., and Murphy G.L. 1995. Pathogenesis and virulence of *Pasteurella haemolytica* in cattle: an analysis of current knowledge and future approaches. In: *Haemophilus, Actinobacillus, and Pasteurella* (Donachie W., Lainson F.A., and Hodgson, J. C. eds.) p 51-62. Plenum Press, N. York.

- de la Fuente, J., J. C. Garcia-Garcia, E. F. Blouin, and K. M. Kocan. 2003. Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. *Vet. Microbiol.* 91:265-283
- Kneass ZT, Marchase RB Protein O-GlcNAc modulates motility-associated signaling intermediates in neutrophils. *J Biol Chem.* 2005., 280:14579-14585.
- Miller-Podraza H, Bergstrom J, Teneberg S, Milh MA, Longard M, Olsson BM, Uggla L, Karlsson KA. *Helicobacter pylori* and neutrophils: sialic acid-dependent binding to various isolated glycoconjugates.
- Rossi F. The O<sub>2</sub>-forming NADPH oxidase of the phagocytes nature, mechanisms of activation and function. *Biochem Biophys Acta* 1986., 853: 65-89.
- Rudiger M, Korneeva N, Schwienbacher C, Weiss EE, Jockusch BM. Differential actin organization by vinculin isoforms: implications for cell type-specific microfilament anchorage. *FEBS Lett.* 1998 .,431:49-54
- Terr AI. Atopic diseases. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG, editors *Medical Immunology*. 9<sup>th</sup> ed. USA: Appleton & Lange Press., pp. 480-2 (1997)
- Gentry, M. J., Corstvet, R. E. and Panciera, R. J. 1982 Extraction of capsular material from *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.* 43: 2070-2073.
- Bradford, M. M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Weiss, J. W., R. Kraemer, and K. Schmit. 1989. Isolation of granulocytes and mononuclear cells from the blood of dogs, cats, and cattle. *Vet. Clin. Pathol.* 18:33-36.

- Bresser P, Virkola R, Jonsson-Vihanne M, Jansen HM, Korhonen TK, Van Alphen L. Interaction of clinical isolates of nonencapsulated *Haemophilus influenzae* with mammalian extracellular matrix proteins. *FEMS Immun. And Med. Microbiol.* 2000; 28: 129- 132.
- Bulai T, Bratosin D, Pons A, Montrevil J, Zanetta JP. Diversity of the human erythrocyte membrane sialic acid in relation with blood groups. *FEBS.Lett.* 2003; 534: 185-189.
- Caverly JM, Diamond G, Gallup JM, Brodgen KA, Dixon RA, AcKermann MR. Coordinated expression of tracheal antimicrobial peptide and inflammatory-response elements in the lungs of neonatal calves with acute bacterial pneumonia. *Infect. Immun.* 2003; 71: 2950-2955.
- Caverly JM, Radi ZA, Andreasen CB, Dixon RA, Brodgen KA, AcKermann MR. Comparasion of bronchoalveolar lavage fluid obtained from *Mannheimia haemolytica*-inoculated calves with and without prior treatment with the selectin inhibitor TBC 1269. *AJVR.* 2001; 62: 665.672.
- Cheng LW, Schneewind O. Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods. *Trends in Microbiol.* 2000; 8: 214-220.
- Chin AC, Lee WD, Murrin KA, Morck DW, Merrill JK, Dick P, Buret AG. Tilmicosin induces apoptosis in bovine peripheral neutrophils in the presence or in the absence of *Pasteurella haemolytica* and promotes neutrophil phagocytosis by macrofages. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002; 44: 2465-2470.
- Clark RA. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J. Infect. Dis.* 1999; 179: S309-17.
- Clemans DL, Marrs CF, Bauer RI, Patel M. Analysis of Pilus Adhesins from *Haemophilus influenzae* Biotype IV Strains. *Infect. Immun.* 2001; 69 : 7010-7019.
- Confer AW, Ayalew S, Panciera RJ, Montelongo M, Whitworth L, Hammer JD. Immunogenicity of recombinant *Mannheimia haemolytica* serotype 1 outer membrane protein P1pE and augmentation of a commercial vaccine. *Vaccine.* 2003; 21: 2821-2829.
- Confer AW, Fulton RW, Clinkenbeard KD, Driskel BA. Duration of serum antibody responses following vaccination and revaccination of cattle with non-living commercial *Pasteuerella haemolytica* vaccines. *Vaccine.* 1998; 16: 1962-1970.

- Davies RL, Lee I. Sequence diversity and molecular evolution of the heat-modifiable outer membrane protein gene ( *ompA* ) of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, and *Pasteurella trehalosi*. J. Bact. 2004; 186: 5741- 5752.
- Davies RL, Whittam TS, Selander RK. Sequence diversity and molecular evolution of the leukotoxin (lkt A) gene in bovine and ovine strains of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. J. of Bact. 2001;183:1394-1404.
- Dawid S, Grass S, St Geme III JW. Mapping of binding domains of nontypeable *Haemophilus influenzae* HMW2 Adhesins. Infect. Immun. 2001 : 69: 307-314.
- Denis M, Palatty M, Bai NR, Suriya SJ. Purification and characterization of a sialic acid specific lectin from the hemolymph of the freshwater crab *Paratelphusa jacquemontii*. Eur. J. Biochem. 2003; 270: 4348-4355.
- Desphande MS, Ambagala TC, Ambagala AP, Kehrl ME, Srikumaran S. Bovine CD18 is necessary and sufficient to mediate *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* leukotoxin induced cytolysis. Infect. Immun. 2002; 70: 5058-5064.
- Dowling A, Hodgson JC, Dagleish MP, Eckersall PD, Sales J. Pathophysiological and immune cell responses in calves prior to and following lung challenge with formalin-killed *Pasteurella multocida* biotype A:3 and protection studies involving subsequent homologous live challenge. Vet. Immun. Immunopath. 2004; 100: 197-207.
- Enriquez-Verdugo I, Guerrero AL, Serrano JJ, Godínez D, Rosales JL, Tenorio V, De la Garza M. Adherent of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine-lung collagen. Microbiology.2004; 150: 2391- 2400.
- Frank GH, Briggs RE, Duff GC, Loan RW, Purdy CW. Effects on vaccination prior to transit and administration of florfenicol at time of arrival in a feed lot on the health of transported calves and detection of *Mannheimia haemolytica* in nasal secretions. AJVR. 2002; 63: 251-256.
- Fulton RW, Briggs RE, Payton ME, Confer AW, Saliki JT, Ridpath JF, Burge LJ, Duff GC. Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1a, BVDB 1b, BVDV 2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. Vaccine. 2004; 22: 643-649.

- Galyean ML, Perino LJ, Duff GC. Interaction of cattle health/ immunity and nutrition. *J. Animal. Sci.* 1999; 77: 1120-1134.
- Ganheim C, Hulten C, Carlsson U, Kindahl H, Niskanen R, Waller KP. The acute phase response in calves experimentally infected with bovine viral diarrhoea virus and/or *Mannheimia haemolytica*. *J. Vet. Med.* 2003; 50: 183-190.
- Gorter AD, Oostrik J, Van der Ley P, Hiemstra PS, Dankert J, Van Alphen L. Involvement of lipooligosaccharides of *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis* in defensin-enhanced bacterial adherence to epithelial cells. *Microb Pathog.* 2003 : 34(3):121-30.
- Hajishengalis G, Martin G, Sojar HT, Sharma A, Schifferle RE, DeNardin E, Rusell MW, Genco RJ. Dependence of bacterial protein adhesins on toll-like receptors for proinflammatory cytokine induction. *Clin. Diag. Lab. Immun.* 2002; 9: 403-411.
- Hamer-Barrera R, Godínez D, Enríquez VI, Vaca-Pacheco S, Martínez-Zuñiga R, Talamás-Rohana O, Suárez-Güemez F, De la Garza M. Adherence of *actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 to swine buccal epithelial cells involves fibronectin. *Can. J. Vet. Res.* 2004; 68: 33-41.
- Harvey HA, Swords WE, Apicella MA. The Mimicry of human glycolipids and glycosphingolipids by the lipooligosaccharides of pathogenic *Neisseria* and *Haemophilus*. *Journal of Autoimmunity.* 2001; 16: 257-262.
- Highlander SK, Fedorova ND, Dusek DM, Panciera R, Alvarez LE, Rinehart C. Inactivation of *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin causes partial attenuation of virulence in a calf challenge model. *Infect. Immun.* 2000; 68: 3916-3922.
- Higlander SK. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Frontiers in Bioscience.* 2001; 6:1128-1150.
- Hills AE, Lainson FA. Survey of restriction-modification systems and transformation in *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella trehalosi*. *Vet. Microbiol.* 2003; 92: 103-109.
- Hsuan SL, Kannan MS, Jeyaseelan S, Prakash YS, Sieck GC, Maheswaran SK. *Pasteurella haemolytica* A1-derived leukotoxin and endotoxin induce intracellular calcium elevation in bovine alveolar macrophages by different signaling pathways. *Infect. Immun.* 1998; 66: 2836-2844.
- Hunt ML, Adler B, Townsend KM. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* 2000; 72: 3-25.

- Jacques M, Mikael LG. Virulence factors of *Pasteurellaceae*, formidable animal pathogens. ASM. News. 2002: 68: 174-179.
- Jacques M, Paradis SE. Adhesin-receptor interactions in *Pasteurellaceae*. FEMS Microbiol. Lett. 1998 : 22 : 45-59.
- Jaramillo L, Díaz F, Hernández P, Debray H, Trigo F, Mendoza G, Zenteno E. Purification and characterization of an adhesin from *Pasteurella haemolytica*. Glycobiology. 2000: 10: 31-37.
- Jeyaseelan S, Hsuan SL, Kannan MS, Walchek B, Wang JF, Kehrl ME, Lally ET, Sieck GC, Maheswaran SK. Lymphocyte function-associated antigen 1 is a receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin in bovine leukocytes. Infect. Immun. 2000: 68: 72-79.
- Jeyaseelan S, Kannan MS, Briggs RE, Thumbikat P, Maheswaran SK. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin activates a nonreceptor tyrosine kinase signaling cascade in bovine leukocytes, which induces biological effects. Infect. Immun. 2001: 69: 6131-6139.
- Karlsson A. Wheat germ agglutinin induces NADPH-oxidase activity in human neutrophils by interaction with mobilizable receptors. Infect. Immun. 1999: 67: 3461-3468.
- Kehrenberg C, Schulze-Tanzil G, Martel JL, Chalus-Dancla E, Schwarz S. Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. Vet. Res. 2001: 32: 323-339.
- Klemm P, Schembri MA. Bacterial adhesins: function and structure. Int. J. Med. Microbiol. 2000: 290: 27-35.
- Kubiet M, Ramphal R, Weber A, Smith A. Pilus-mediated adherence of *Haemophilus influenzae* to human respiratory mucins. Infect. Immun. 2000: 68: 3362- 3367.
- LaFleur RL, Abrahamsen MS, Maheswaran SK. The biphasic mRNA expression pattern of bovine interleukin-8 in *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-stimulated alveolar macrophages is primarily due to tumor necrosis factor alpha. Infect. Immun. 1998: 66: 4087-4092.
- Lafleur RL, Malazdrewich C, Jeyaseelan S, Bleifield E, Abrahamsen MS, Maheswaran SK. Lipopolysaccharide enhances cytokine and inflammatory cytokine induction in bovine alveolar macrophages exposed to *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin. Microb. Pathog. 2001: 30: 347-357.

- Lee RW, Strommer J, Hodgins D, Shewen PE, Niu Y, Lo RY. Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a *Mannheimia* A1 leukotoxin 50 fusion protein. *Infect. Immun.* 2001; 69: 5786-5793.
- Leite F, Brown JF, Sylte MJ, Briggs RE, Czuprynski CJ. Recombinant bovine interleukin-1 $\beta$  amplifies the effects of partially purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxin on bovine neutrophils in a  $\beta$ 2-integrin-dependent manner. *Infect. Immun.* 2000; 68: 5581-5586.
- Leite F, O'Brien S, Sylte MJ, Page T, Atapattu D, Czuprynski CJ. Inflammatory cytokines enhance the interaction of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin with bovine peripheral blood neutrophils In vitro. *Infect. Immun.* 2002; 70: 4336-4343.
- Lo RY, McKerral LJ, Hills TL, Koztrzyńska M. Analysis of the capsule biosynthetic locus of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1 and proposal of a nomenclature system. *Infect. Immun.* 2001; 69:4458-4464.
- Lo RY. Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Vet. Microbiol.* 2001; 83: 23-35.
- Lovane G, Galdiero M, Vitiello M, De Martino L. Effect of *Pasteurella haemolytica* outer membrane proteins on bovine neutrophils. *FEMS. Immun. Med. Microbiol.* 1998; 20: 29-36.
- Malazdrewich C, Thumbikat P, Maheswaran SK. Protective effect of dexamethasone in experimental bovine pneumonic mannheimiosis. *Microb. Pathog.* 2004; 36: 227-236.
- Marchart J, Rehagen M, Dropmann G, Szotak MP, Aldinger S, Lechleitner S, Schlappt, Resch S, Lubitz W. Protective immunity against pasteurellosis in cattle, induced by *Pasteurella haemolytica* ghost. *Vaccine.* 2003; 21: 1415-1422.
- Marikovsky Y, Marikovsky M. Clearance of senescent erythrocytes: wheat germ agglutinin distribution on young and old human erythrocytes. *J. Glycoconjugate.* 2002; 19: 1-4.
- McKerral LJ, Lo RY. Construction and characterization of an acapsular mutant of *Mannheimia haemolytica* A1. *Infect. Immun.* 2002; 70: 2622-2629.
- McNeil HJ, Shewen PE, Lo RY, Conlon JA, Miller MW. *Mannheimia haemolytica* serotype 1 and *Pasteurella trehalosi* serotype 10 culture supernatants contain fibrinogen-binding proteins. *Vet. Immun. Immunopathol.* 2002; 90: 107-110.

- Mitchell GB, Albright BN, Cswell Jf. Effect of interleukin-8 and granulocyte colony-stimulating factor on priming and activation of bovine neutrophils. *Infect. Immun.* 2003; 71: 1643-1649.
- Monello RJ, Murray DL, Cassier EF. Ecological correlates of pneumonia epizootic in bighorn sheep herds. *Can. J. Zool.* 2001; 79: 1423-1432.
- Nagahata H, Higuchi H, Yamashikin N, Yamaguchi M. Analysis of the functional characteristics of L-selectin and its expression on normal and CD18-deficient bovine neutrophils. *Immun. Cell. Biol.* 2000; 78: 264-271.
- Narita M, Kimura K, Tanimura N, Arai S, Tsuboi T, Katsuda K. Immunohistochemical characterization of calf pneumonia produced by the combined endobronchial administration of bovine Herpesvirus 1 and *Pasteurella haemolytica*. *J. Comp. Path.* 2000; 123: 126-134.
- Oostveldt KV, Paape MJ, Dosogne H, Burvenich C. Effect of apoptosis and phagocytosis, respiratory burst and CD18 adhesion receptor expression of bovine neutrophils. *Dom. Animal. Endocrinol.* 2002; 22: 37-50.
- Overbeke IV, Chiers K, Charlier G, Vandenberghe I, Beeumen JV, Ducatelle R, Haesebrouk F. Characterization of the in vitro adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 2002; 88: 59-74.
- Papageorgiou AC, Acharya KR. Microbial superantigens: from structure to function. *Trends in Microbiol.* 2000; 8: 369-375.
- Paradis SE, Dubreuil JD, Gottschalk M, Archambault M, Jacques M. Inhibition of adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells by monoclonal antibodies directed against LPS and partial characterization of the LPS receptors. *Current Microbiol.* 1999; 39: 313-320.
- Pruimboom IM, Rimler RB, Ackermann MR. Enhanced adhesion of *Pasteurella multocida* to cultured turkey peripheral blood monocytes. *Infect. Immun.* 1999; 67: 1292-1296.
- Purdy CW, Straus DC, Chirase N, Ayers JR, Hoover MD. Effects of aerolized dust in goats on lung clearance of *Pasteurella* and *Mannheimia* species. *Current. Microbiol.* 2003; 46: 174-179.
- Radi ZA, Brodgen KA, Dixon RA, Gallup JM, Ackermann MR. A selectin inhibitor decrease neutrophil infiltration during acute *Mannheimia haemolytica* pneumonia. *Vet. Pathol.* 2002; 39: 697-705.

- Radi ZA, Caverly JM, Dixon RA, Brodgen KA, AcKermann MR. Effects of the synthetic selectin inhibitor TBC 1269 on tissue damage during acute *Mannheimia haemolytica* induced pneumonia in neonatal calves. *AJVR*. 2001; 62: 17-22.
- Raj PA, Dentino AR. Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS. Microbiol. Lett.* 2002; 206: 9-18.
- Ramírez-Romero R, Brodgen KA, Gallup JM, Sonea IM, AcKermann MR. Mast cell density and substance P-like immunoreactivity during the initiation and progression of lung lesions in ovine *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* pneumonia. *Micro. Patho.* 2001; 30: 325-335.
- Ramírez-Romero R, Brodgen KA, Gallup JM, Dixon RA, AcKermann MR. Reduction of pulmonary mast cells in areas of acute inflammation in calves with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* pneumonia. *J. Comp. Path.* 2000; 123: 29-35.
- Reeve-Johnson L. Relationships between clinical and pathological signs of disease in calves infected with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* type A1. *Vet. Rec.* 2001; 149: 549-552.
- Rojas E, Llinas P, Rodríguez-Romero A, Hernández C, Linares M, Zenteno E, Lascurain R. Hevein, an allergenic lectin from rubber latex, activates human neutrophils' oxidative burst. *J. Glycoconjugate.* 2001; 18: 339-345.
- Roos D, Van Bruggen R, Meischl C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes and Infection* . 2003; 5: 1307- 1315.
- Rowe HA, Poxton IR, Donachie W. Survival of *Manheimia (Pasteurella) haemolytica* in tracheobronchial washings of sheep and cattle. *Vet. Microbiol.* 2001; 81: 305-314.
- Rudney JD, Staikov RK. Simultaneous measurement of the viability, aggregation, and live and dead adherence of *Streptococcus crista*, *Streptococcus mutans* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human saliva in relation to indices of caries, dental plaque and periodontal disease. *Archives of Oral Biology.* 2002; 47: 347-359.
- Ruhls S, Cisar JO, Sandberg AL. Identification of polymorphonuclear leukocyte and HL-60 cell receptors for adhesins of *Streptococcus gordinii* and *Actinomyces naeslundii* . *Infect. Immun.* 2000; 68: 6346-6354.
- Sakarya S, Öncü S. Bacterial adhesins and the role of sialic acid in bacterial adhesion. *Med. Sci. Monit.* 2003; 9: 76-82.

- Sala A, Folco G. Breakthroughs and views. Neutrophils, endothelial cell, and cysteinyl leukotrienes: a new approach to neutrophil-dependent inflammation. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 2001; 283: 1003-1006.
- Schaver R. Achievements and challenges of sialic acid research. *J. Glycoconjugate.* 2000; 17: 485-499.
- Smith DGE. Adherence and pathogenesis of *Pasteurella multocida* a sticky problem. *J. Vet.* 2000; 159: 215-216.
- Soethout EC, Müller KE, Rutten VP. Neutrophil migration in the lung, general and bovine-specific aspects. *Vet. Immun. Immunopath.* 2002; 87: 277-285.
- Soethout EC, Müller KE, Rutten VP. Neutrophil migration in the lung, general and bovine-specific aspects. *Vet. Immun. Immunopath.* 2002; 87: 277-285.
- Soto GE, Hultgren SJ. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bact. (Minireview).* 1999; 181: 1059-1071.
- Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology.* 2002; 12: 43R-56R.
- St Geme III JW, Cutter D. The *Haemophilus influenzae* hia adhesin is an autotransporter protein that remains uncleaved at the C terminus and fully cell associated. *J. Bacteriology.* 2000; 182: 6005- 6013.
- Stathopoulos C, Hendrixon DR, Thanassi DG, Hultgren SJ, Josep W. Geme III St., Curtis III R. Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in Gram-negative pathogens: an evolving story. *Micro. Infect.* 2000; 2: 1061-1072.
- Straus DC, Unbehagen PJ, Purdy CW. Neuramidase production by a *Pasteurella haemolytica* A1 strain associated with bovine pneumonia. *Infect. Immun.* 1993; 61: 253-259.
- Sun Y, Clinkenbeard KD, Ownby CL, Clarke CR, Highlander SK. Ultrastructural characterization of apoptosis in bovine lymphocytes exposed to *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *AJVR.* 2000; 61: 51-56.
- Taylor RK. Bacterial adhesion to mucosal surfaces. *J. Chemother.* 1991; 3: 190-195.

- Tefera G, Smola J. *Pasteurella haemolytica* complex of *Pasteurella sensu stricto* as new genus *Mannheimia*: changes in taxonomy. Czech. Vet. Med. 2001; 4: 119-124.
- Theoharides TC, Cochrane DE. Critical role of mast cell in inflammatory disease and the effect of acute stress. J. Neuroimmun. 2004; 146: 1-12.
- Thumbikat P, Briggs RE, Kannan MS, Maheswaran SK. Biological effects of two genetically defined leukotoxin mutants of *Mannheimia haemolytica*. Microb. Pathog. 2003; 34: 217-226.
- Van Schilfgaarde M, Van Ulsen P, Eijk P, Brand M, Stam M, Kouame J, Van Alphen L, Dankert J. Characterization of adherence of nontypeable *Haemophilus influenzae* to human epithelial cells. Infect. Immun. 2000; 68: 4658- 4665.
- Virkola R, Brummer M, Rauvala H, Van Alphen L, Korhonen TK. Interaction of fimbriae of *Haemophilus influenzae* type B with heparin-binding extracellular matrix proteins. 2000; 68: 5696- 5701.
- Wang X, Zhao H, Andersson R. Proteomics and leukocytes: An approach to understanding potential molecular mechanisms of inflammatory responses. J. Proteome Res. 2004; 3: 921- 929.
- Wang Z, Clarke CR, Clinkenbeard KD. Role of phospholipase D in *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced increase in phospholipase A2 activity in bovine neutrophils. Infect. Immun. 1999; 67: 3768-3772.
- Winters KR, Meyer E, Van Merris VM, Van Den Broek WL, Duchateau L, Buruenich C. Sex steroid hormones do not influence the oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes from ovarietomized cows In vitro. Steroids. 2003; 68: 397-406.
- Wright JR. Pulmonary surfactant: a front line of lung host defense. J. Clin. Invest. 2003; 111: 1453-1455.
- Young TA, Cunningham CC, Bailey SM. Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol. Arch. Biochem. Biophys. 2002; 405: 65-72.
- Confer A. W., Clinkenbeard K.D., and Murphy G.L. 1995. Pathogenesis and virulence of *Pasteurella haemolytica* in cattle: an analysis of current knowledge and future approaches. In: *Haemophilus, Actinobacillus, and Pasteurella* (Donachie W., Lainson F.A., and Hodgson, J. C. eds.) p 51-62. Plenum Press, N. York.

- de la Fuente, J., J. C. Garcia-Garcia, E. F. Blouin, and K. M. Kocan. 2003. Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia *Anaplasma marginale* to host cells. *Vet. Microbiol.* 91:265-283
- Kneass ZT, Marchase RB Protein O-GlcNAc modulates motility-associated signaling intermediates in neutrophils. *J Biol Chem.* 2005., 280:14579-14585.
- Miller-Podraza H, Bergstrom J, Teneberg S, Milh MA, Longard M, Olsson BM, Uggla L, Karlsson KA. *Helicobacter pylori* and neutrophils: sialic acid-dependent binding to various isolated glycoconjugates.
- Rossi F. The O<sub>2</sub>-forming NADPH oxidase of the phagocytes nature, mechanisms of activation and function. *Biochem Biophys Acta* 1986., 853: 65-89.
- Rudiger M, Korneeva N, Schwienbacher C, Weiss EE, Jockusch BM. Differential actin organization by vinculin isoforms: implications for cell type-specific microfilament anchorage. *FEBS Lett.* 1998 .,431:49-54
- Terr AI. Atopic diseases. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG, editors *Medical Immunology*. 9<sup>th</sup> ed. USA: Appleton & Lange Press., pp. 480-2 (1997)
- Gentry, M. J., Corstvet, R. E. and Panciera, R. J. 1982 Extraction of capsular material from *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.* 43: 2070-2073.
- Bradford, M. M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Weiss, J. W., R. Kraemer, and K. Schmit. 1989. Isolation of granulocytes and mononuclear cells from the blood of dogs, cats, and cattle. *Vet. Clin. Pathol.* 18:33-36.

Tabla 1 Sistemas de adhesina-receptor encontrados en bacterias del grupo HAP y otras bacterias

BACTERIA	ADHESINA	RECEPTOR (ES)
<i>H. ducrei</i>	LOS Fimbriae --	-- Componentes de ME
<i>H. influenzae</i>	fimbriae (Hib) fimbriae (NTHI) fibrils HMW1/HMW2 Hia proteína de adhesión Hap (IgA protease-like protein) OapA OMP 46 kDa Hsp-70 -- -- -- OMP P2 y P5 OMP P5 Pili(a)	Grupo sanguíneo AnW/ Ag, sialil-lactosilceramida (GM1, GM2, GM3) -- Glicoproteína; glicosaminoglicanos sulfatados -- Lípidos, incluyendo PE Sulfoglicolípidos Gangliosidos menores Componentes ECM Mocos y mucinas Oligosacáridos de mucina con residuos de Ac. Siálico Moco Mucina respiratoria de humano
<i>A. actinomycetocomitans</i>	fimbriae proteínas encontradas en vesículas de membrana externa OMP principal (29/34) kDa	-- Laminina (ECM)
<i>A. pleuronemioniae</i>	Fimbria LPS LPS región central --(b) --(c) --(d)	-- Proteínas de epitelio traqueal de porcino (39 y 15 kDa) -- Manosa Epitelio pulmonar porcino Colágena
<i>M. haemolytica</i>	fimbriae CPS, LPS, OMPs Adhesina (aglutinina) 68 kDa (e) --(f)	-- Glicoproteína, polisacáridos Fibrinógeno
<i>P. multocida</i>	fimbrias hemaglutininas OMP (p35) Ácido hialurónico capsular -- LPS	-- -- CD44 -- --
<b>OTROS BACTERIAS (g)</b>		
<i>E. coli</i>	FimH PapG FocH FanC	Manósidos, laminina, fibronectina y plasminógeno Residuos Gal $\alpha$ (1,4)Gal- de glicolípidos N-acetylgalactosamina, galactosa, glicoforina NeuGc-GM3, NeuGc-SPG, sialoglicoproteínas
<i>K. pneumoniae</i>	MrkD	Colágeno tipo V

(Jaques y Paradis, 1998), a (Hamer-Barrera et al; 2004), b (Kubiet 2000), c (Boekema et al; 2003), d (Enriquez-Verdugo et al; 2004 y Van Overbeke et al; 2002), e (Jaramillo et al; 2000) , f (McNail et al; 2002), g (Klemm y Shembri, 1999).

Tabla 2. Hemaglutinación por MhA en presencia de eritrocitos de conejo al 2%.

Fracción	Concentración. de Proteína	UHA <sup>1</sup>	Actividad específica
<b>Extracto salino</b>	18	123776	6876
No retenido	15.2	1066	68
Retenido	0.29	60802	208227
<b>Medio de cultivo</b>	580	18402	15.5
No retenido	312.5	165	0.264
Retenido	0.24	18493.5	38528

<sup>1</sup> Unidades de hemaglutinación en la presencia de eritrocitos de conejo

Tabla 3. Intensidad de la interacción de MhA en presencia de carbohidratos, glicoproteínas y tratamiento con sialidasa.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (mM/U)	IMF
<i>MhA</i>	1µg	77.19
<i>GlcNAc</i>	200	30.24
<i>Fetaina</i>	200	26.32
<i>N´N´-triacetyl quitotriosa</i>	200	76.4
<i>Sialidasa 15 min</i>	0.2	81.54
<i>Sialidasa 30 min</i>	0.2	97.37
<i>Sialidasa 45 min</i>	0.2	130.27

Tabla 4. Reducción de azul de tetrazolium (NBT) por neutrófilos de bovino ( $\mu\text{g}/4 \times 10^5$  cells)

Estimulación	Concentración	nmoles NBT
NBT (control)	18	$1.7 \pm 0.7$
PMA	25	$5.9 \pm 0.8^*$
MhA	9	$4.7 \pm 1.1^*$
MhA+ GlcNAc	9	$2.4 \pm 0.4^{**}$
MhA+MhANr	6	$2.1 \pm 0.3^{**}$
Zymozan NBT	7	$2.8 \pm 0.7^{**}$

Valores numéricos representados en media  $\pm$  SD de cuatro experimentos. \* Se observó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) determinada por Mann-Whitney prueba de U, cuando el efecto fue comparado con las células tratadas con NBT y  $^{**}(p < 0.05)$  cuando el efecto fue comparado con el inducido con MhA. PMA fue utilizado como estimulante control positivo. Una concentración 200 mM de GlcNAc y 10  $\mu\text{g}$  de MhAr.

Tabla 5. Composición de aminoácidos para el receptor de MhA en neutrófilos de bovino.

Amino acido	Residuos por molécula*	%
Ácido aspártico	50	10.03
Ácido glutámico	54.4	11.72
Prolina	0.0	0.00
Serina	57.7	9.13
Glicina	100	11.30
Histidina	8.56	2.00
Arginina	11.75	3.08
Treonina	29	5.37
Alanita	83.1	11.15
Prolina	25.5	4.42
Tirosina	3.85	1.05
Valina	39.7	7.00
Metionina	7.3	1.64
Cisterna	1.92	0.35
Isoleucina	21.7	4.29
Leucina	41.9	8.27
Fenilalanina	14.3	3.57
Lisina	25.5	5.63
Total	526.18	100.00

\*Considerando un peso de 83 kDa y que el receptor contiene 20% de peso en azúcar.

Tabla 6. Composición de carbohidratos en el receptor de MhA en neutrófilos de bovino.

Carbohidrato	Residuos %	Residuos por molécula*
Gal	21	16.3
Man	15	11.3
GalNAc	49	31.0
GlcNAc	11	7.3
NeuAc	4	1.8

\*Considerando 83 kDa y que el receptor contiene 20% de su peso en azúcar.

Tabla 7. Mapa peptídico del receptor de neutrófilos para la adhesina de *Mannheimia haemolytica*.

m/z	a.a.Position		Peptide sequence	RelatedProtein
841.502	32	39	AAPGKGWR	MALT
943.432	816	823	SFLDSGYR	VIN
1174.577	721	731	SLLDASEEAIK	VIN
1174.577	237	246	MSAEINEIIR	VIN
1229.565	503	512	WIDNPTVDDR	VIN
1348.631	770	780	EVENSEDPKFR	VIN
1476.715	327	339	MLGQMTDQVADLR	VIN
1528.833	571	584	ALASQLQDSLKDLK	VIN
1548.819	489	502	AAVHLEGKIEQAQR	VIN
1637.843	429	442	ETGLNVFLLDLCR	MALT
1700.860	429	444	DDILRSLGEIAALTSK	VIN
1706.769	593	607	AYVTFPLDLVDVDPK	MALT
1717.873	480	496	AVANSRPAKAAVHLEGK	VIN
1818.943	529	544	LANVMMGPYRQDLLAK	VIN
1949.001	174	188	MIDERQQELTHQHR	VIN
1973.003	88	105	LVQAAQMLQSDPYVSPAR	VIN
1982.035	503	520	WIDNPTVDDRGGVQAIR	VIN
2008.960	282	300	GWLRDPNASPGDAGEQAIR	VIN
2035.032	114	132	GILSGTSDLLLTDFDEAEVR	VIN
2041.069	739	758	VAMANIQPQMLVAGATSIAR	VIN
2075.158	36	56	AIPDLTAPVAAVQAASNLVR	VIN
2083.994	562	581	GEGESPARALASQLQDSLK	VIN
2097.080	353	372	AQQVSQGLDVLTAKVENAAR	VIN
2149.041	593	611	AYVTFPLDLVDVDPKEANK	MALT
2163.116	114	133	1 GILSGTSDLLLTDFDEAEVRK	VIN
2231.100	681	699	1 ILLRNPGNQAAAYEHFETMK	VIN
2295.111	190	210	LEVCDLQDTAHGSLISLPEKK	MALT
2398.095	166	186	VNDAGFYICRVNSESSTFSR	MALT
2580.259	187	209	WARLEVCDLQDTAHGSLISLPEK	MALT
2380.202	608	629	1 LLAVAATAPPDAPNREEVFDER	VIN
2446.198	1	23	MSEPPCSPPGSLPLSRLAEPLLR	MALT
2701.371	831	853	1 VREAFQPQEPDFPPPPDLEQLR	VIN
3100.652	8	35	0 TIESILEPVAQQISHLVIMHEEVEVDGK	VIN

\*Análisis peptídico de MhAr en neutrófilos, obtenido por digestión con tripsina mediante MALDI-TOF. Los peptidos fueron comparados con los valores relativos obtenidos de la base de datos NCBI (ProFound 2004/06/01). Las principales homologías encontradas fueron: VIN, Vinculina (34%) de *Mus musculus* y MALT-lymphoma associated translocation protein de *Gallus gallus*.

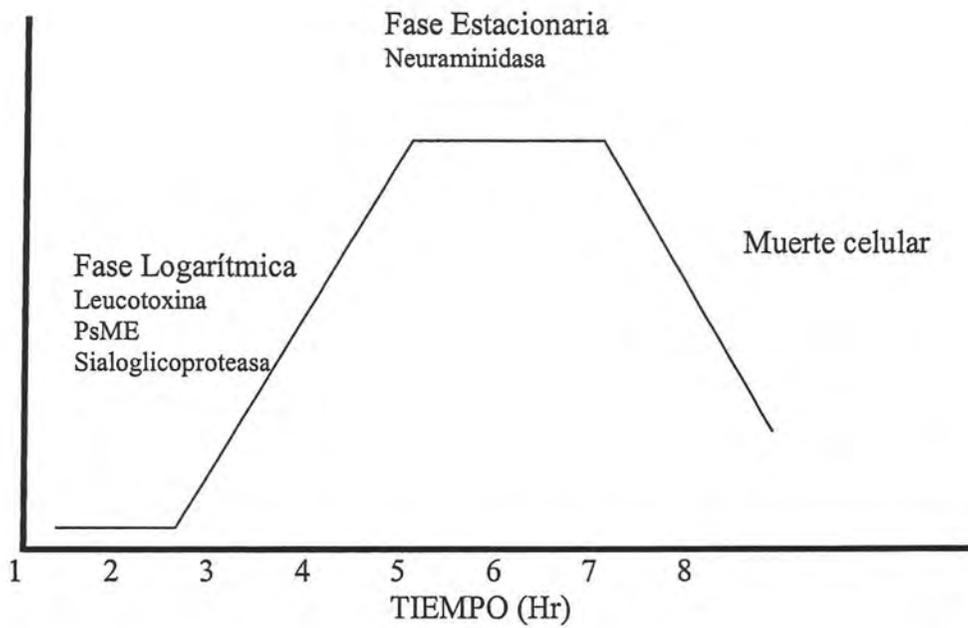


Fig 1.- Producción de los diferentes factores de virulencia durante el crecimiento de *Mannheimia haemolytica* ST1.

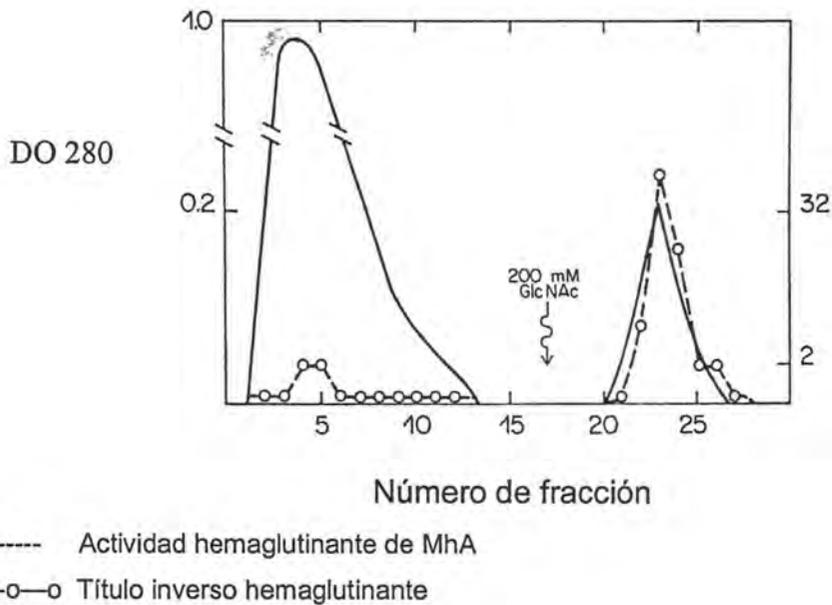


Figura 2. Purificación de la adhesina de *M. haemolytica* por cromatografía de afinidad. Los extractos salidos bacterianos fueron vertidos en una columna conteniendo estroma de eritrocitos de conejos atrapados en Sephadex G-25 amortiguada con PBS. El material no retenido fue eliminado con PBS y la adhesina fue eluida con 200 mM de GlcNAc diluidos en PBS.



Figura 3. Electroforesis en gel SDS del extracto total y fracción pura de MhA. A: 10 µg de fracción retenida con actividad aglutinante, B: 25 µg de extracto total bacteriano

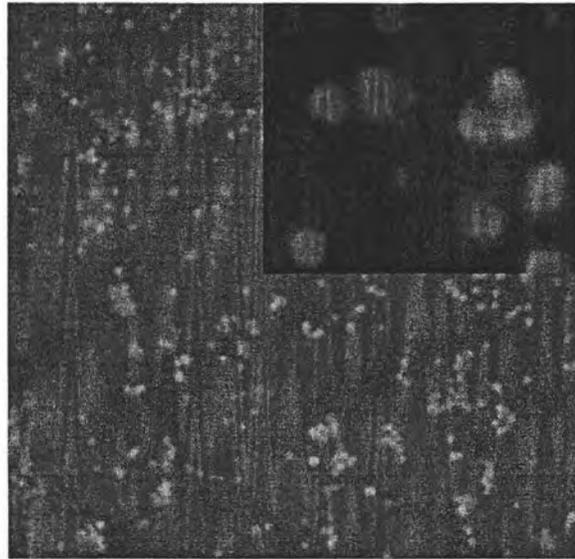
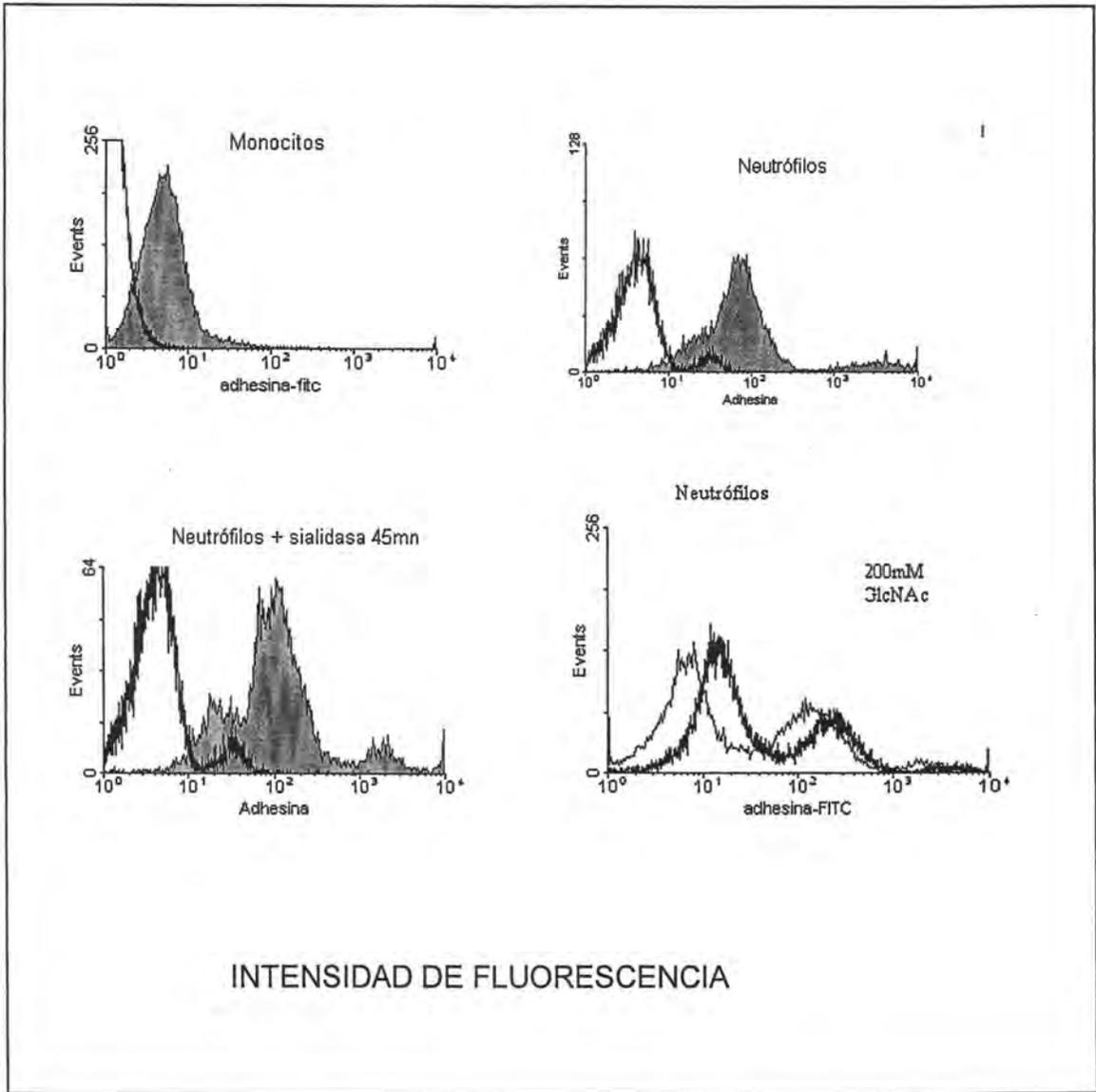


Fig. 4 Especificidad de MhA por leucocitos totales. Una suspensión de leucocitos fue fijada en un porta objetos con metanol al 70% e incubada por 30 min a 37° C. Las células fueron observadas con un microscopio de fluorescencia convencional.

Fig  
ura  
5,  
6,  
7 y  
8  
de  
izq  
ue  
rda  
a  
der  
ec  
ha.  
-  
Mh  
A



reconoció débilmente células mononucleadas, Fig. 5 (\*IMF 5.7). Los neutrófilos fueron reconocidos en su totalidad observándose tres grupos con diferente intensidad Fig. 6. El tratamiento con sialidasa contribuyó a un mejor reconocimiento Fig 7 De los carbohidratos y las glicoproteínas utilizadas para la inhibición, GlcNAc fue el inhibidor más potente Fig 8.

\*Intensidad Media de Fluorescencia

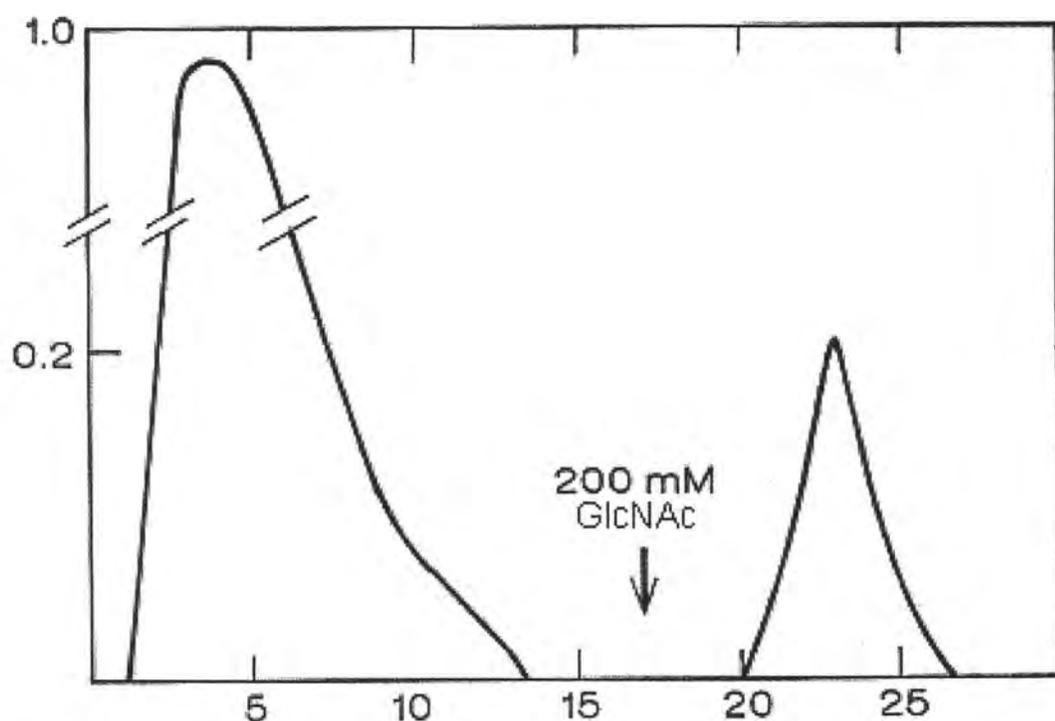


Figura 9.- Perfil de elución del receptor de MhAr por cromatografía de afinidad en una columna de Sepharosa-MhA. Se aplicaron  $2.4 \times 10^7$  equivalentes celulares a la columna de 5 ml previamente equilibrada con PBS de pH 7.2. La columna se lavó con PBS para eliminar la fracción no retenida. La fracción retenida se eluyó con GlcNAc 200 mM. A cada fracción de 1 ml se le determinó absorbancia a 280 nm.

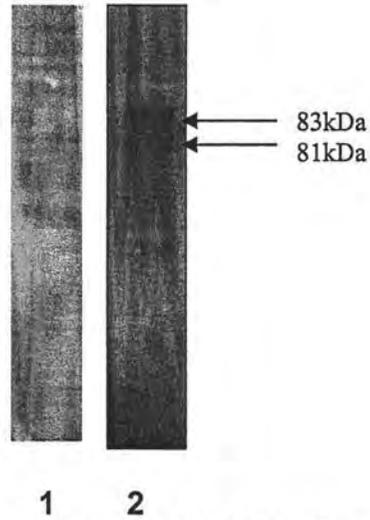


Figura 10. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras (SDS-PAGE) de la fracción total (1) y la retenida del lisado celular (2) de neutrófilos de bovino teñidos con azul de Coomassie y plata respectivamente. En el carril 2 se muestra dos bandas de 83 kDa y de 81 kDa correspondientes a la fracción retenida.