



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

ADHESIÓN DE *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*
A FIBRONECTINA DE PLASMA Y CÉLULAS
DEL EPITELIO ORAL DE BOVINOS

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS

PRESENTA

JOSÉ LUIS DE LA ROSA ROMERO

TUTOR

DRA. MIREYA DE LA GARZA AMAYA

COMITÉ TUTORAL

DR. FRANCISCO J. TRIGO TAVERA
DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES

MÉXICO, D.F.

2007

DEDICATORIAS.



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.

Con todo mi amor para Dulce Aidee Gaona Valencia, por aparecer en el momento justo para darle el impulso necesario a mi vida, por los sueños hechos realidad; por lo que hemos formado y lo que ya viene con todo nuestro amor. Solo juntos, amor.

A mis padres Ovidio Arnoldo y Catalina por confiar en mi y respetar mis desiciones, lo que soy es por ustedes, gracias con todo mi corazón.

A Carlos y Ovidio por sus consejos para la escuela y fuera de ella, por ser un ejemplo de dedicación.

A Irene y Dee por aguantar a mis hermanos y de paso a mi. A Leonardo el primero de muchas alegrías.

A Pepe, por la amistad y todo lo que hemos vivido, gracias hermano, a Norma y a tu nena.

Al Dr. Everardo Gozález Padilla, a la Dra. Laura Arvizu Tovar y al Dr. Carlos Vásquez por sus consejos y amistad.

A todos los compañeros del laboratorio 52 del departamento de biología celular del CINVESTAV: Delfino, Magda y Esteban. Ruth, Cynthia, Luis Enrique y Luis Fernando.

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Mireya de la Garza, por su paciencia, conocimiento y ayuda. Por su crítica fuerte y sincera que hicieron que comprendiera la capacidad que tenemos para trabajar. Por aceptarme en su equipo de trabajo.

Al Departamento de Biología Celular del CINVESTAV por el uso de sus instalaciones.

Al Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal (CONASA) por el uso de sus instalaciones y equipos de cómputo.

Al CENID-Microbiología del INIFAP, Palo Alto; por las facilidades otorgadas para la toma y procesamiento de muestras, En especial al Dr. Francisco Aguilar Romero.

Al Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, estado de Hidalgo, al Dr. Rafael Soto Castor y al QFB. Antonio Vazquez por las facilidades otorgadas para la toma y procesamiento de muestras.

Al Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA). En especial al Dr. Javier Gutiérrez Molotla.

Al Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango, por involucrarme en la investigación.

Proyecto financiado por CONACYT

No. G38590-B

INDICE

1. Resumen	1
2. Summary	3
3. Introducción	4
3.1 Pasteurelisis neumónica	5
3.2 Bacterias asociadas a la pasteurelisis neumónica	6
3.3 Mecanismos de patogenicidad	8
3.3.1 Mecanismos de patogenicidad de <i>M. haemolytica</i>	9
3.3.2 Mecanismos de patogenicidad de <i>P. multocida</i>	13
3.4 Inmunógenos de <i>M. haemolytica</i> y <i>P. multocida</i>	17
3.5 Matriz extracelular	19
3.6 Integrinas	20
3.7 Fibronectina	20
4. Justificación	24
5. Objetivo General	24
5.1 Objetivos particulares	24
6. Material y métodos	25
6.1 Microorganismos utilizados	25
6.2 Adhesión de <i>M. haemolytica</i> y <i>P. multocida</i> a CBE de bovino	26
6.3 Obtención y purificación de FN	26
6.4 Adhesión de FN a PME de <i>M. haemolytica</i> y <i>P. multocida</i>	28
7. Resultados	32
8. Discusión	43
9. Conclusiones	48
10. Literatura	49

1. RESUMEN.

A nivel mundial las pérdidas económicas producidas por enfermedades respiratorias en bovinos son muy altas. Una de las principales enfermedades es la pasteurelisis neumónica bovina, producida por *M. haemolytica* y *P. multocida*. Estos microorganismos producen enfermedad a través de diferentes mecanismos de virulencia y de la producción de toxinas. Las adhesinas bacterianas son responsables del reconocimiento y unión a receptores específicos de las células hospederas, siendo este un proceso crucial para el inicio de la infección. La matriz extracelular contiene moléculas que son secretadas a los espacios extracelulares, una de ellas es la fibronectina (FN), que modula la adhesión de la bacteria a la célula hospedera. El objetivo del presente trabajo fue determinar la adhesión de *M. haemolytica* y *P. multocida* a las células del epitelio oral de bovino y si en dicha adhesión participa la FN, así como identificar una proteína de membrana externa que participe en la adhesión. Se emplearon aislados de *M. haemolytica* (serotipo A1 y A6) y *P. multocida* serotipo A, obtenidas a partir de procesos neumónicos de bovinos. Se recolectaron células bucoepiteliales de bovino (CBE) mediante raspado del epitelio oral. Para los ensayos de adherencia se evaluó la adhesión de las bacterias a CBE en presencia o ausencia de la FN. De lo anterior se obtuvo que el índice de adhesión con FN para *M. haemolytica* A1 fue de 140 ± 16 , mientras que para el serotipo A6 fue de 123 ± 16 ; y *P. multocida* A mostró 175 ± 16 bacterias adheridas por célula respectivamente. En ausencia de la FN la adhesión de las bacterias empleadas se redujo de forma general en un 75%. Se identificó una proteína de membrana externa que se une a FN en *M. haemolytica* y *P. multocida*, que presentan un peso molecular de 26 kDa y 44 kDa respectivamente. Uno de los procesos cruciales para el desarrollo de la enfermedad consiste en la capacidad de adhesión de la bacteria a los sustratos de la célula hospedera, quedando establecido que para la adhesión tanto de *M. haemolytica* serotipo A1 y A6 así como para *P. multocida* A a CBE es necesaria la presencia de FN, ya que al eliminar esta glicoproteína de la célula, la capacidad de adhesión de estos microorganismo se disminuye significativamente, comprobando con esto la presencia de proteínas de unión a FN (FNbp) en los serotipos probados de *M. haemolytica*, así como en *P. multocida* A. Este trabajo contribuye a un mejor entendimiento en la interacción entre *M. haemolytica* y *P. multocida* con las proteínas del hospedero.

2. SUMMARY.

Respiratory diseases produce high economic losses in bovines worldwide. One of the main diseases is the bovine pneumonic pasteurellosis, produced by *M. haemolytica* and *P. multocida*. These microorganisms produce disease through different mechanisms of virulence and toxins secretion. Bacterial adhesins are

responsible for the recognition and binding to specific receptors in host cells, being the adhesion a crucial process for the beginning of the infection. Extracellular matrix contain molecules that are displayed to the extracellular spaces; one of them is fibronectin (FN), which modulates the adhesion of the bacterium to the host cell. The objective of the present work was to determine the adhesion of *M. haemolytica* and *P. multocida* to cells of the bovine oral epithelium and whether FN participates in this adhesion, as well as to identify the bacterial outer membrane proteins involved in the adhesion. They were used isolates of *M. haemolytica* (serotype A1 and A6) and *P. multocida* serotype A, obtained from pneumonic processes in bovines. Bovine bucoepitelial cells were collected (BEC) by scraping the oral epithelium. For adherence assays, the adhesion of bacteria to BEC in the presence or absence of host FN was evaluated. The FN adhesion index for *M. haemolytica* A1 was of 140 ± 16 , whereas for serotype A6 was of 123 ± 16 ; and to *P. multocida* A 175 ± 16 bacteria adhered per cell, respectively. In the absence of FN, adhesion of the bacteria tested was reduced by 75%. Membrane outer proteins that bind FN were identified in *M. haemolytica* and *P. multocida* A; they showed a molecular mass of 26 and 44 kDa, respectively. One of the crucial processes for the development of a disease consists on the capacity of the bacterium adhesion to substrates of the host cell. It was established that in the adhesion steps for *M. haemolytica* A1 and A6 as well as *P. multocida* A to BEC is necessary the FN presence, since when we eliminate this glycoprotein of the cell, the capacity of adhesion of these microorganisms was significantly diminished, verifying the importance of adhesins for the binding to FN (FNbp). This work contributed to a better understanding of the interaction between *M. haemolytica* and *P. multocida* with the host proteins.

3. INTRODUCCIÓN.

Las pérdidas producidas por enfermedades respiratorias en bovinos representan anualmente en Estados Unidos de América (EUA) cerca de 700 millones de dólares, donde mueren 1.2 millones de bovinos en ese mismo periodo. Las principales enfermedades respiratorias son la pasteurelisis neumónica bovina, la neumonía enzoótica de los bovinos y la neumonía intersticial atípica (1, 2, 3). Los costos de prevención, tratamiento y manejo de cada uno de los animales que llegan a morir pueden abarcar desde los 15 hasta los 38 dólares en EUA y México, dependiendo del manejo clínico de la enfermedad y de los programas de medicina preventiva empleados en cada explotación (4, 5, 6).

Los problemas respiratorios en bovinos a nivel mundial son más evidentes en explotaciones con más de 40 animales, ya que se produce una constante entrada y salida de éstos, y por tanto, hay ingreso también de nuevos microorganismos. La medicación individual de los animales y la bioseguridad deficiente llevada a cabo por el personal hacen más frecuente la aparición de enfermedades respiratorias (7).

El complejo respiratorio bovino es de origen multifactorial, donde al romperse el equilibrio interno del animal, se favorece la colonización pulmonar por agentes infecciosos como virus, bacterias y sinergismos entre virus y bacterias, produciéndose la neumonía y en casos muy severos puede provocar la muerte del animal. Entre los factores ambientales que favorecen la aparición de enfermedades respiratorias se encuentran las temperaturas extremas, la elevada humedad relativa, la adaptación al medio, así como una ventilación inadecuada de las instalaciones; también contribuyen los factores propios del animal como son la edad, disminución de la respuesta inmune por estrés, vacunación, cambios en la alimentación, manejo zootécnico, mezcla de animales de diferentes edades, estados inmunológicos y jerarquías sociales. Los principales signos clínicos que presentan los bovinos enfermos son: aumento en la frecuencia respiratoria, tos, descarga nasal, fiebre y pérdida del apetito, entre otros. Los agentes etiológicos involucrados en las neumonías pueden ser virus, micoplasmas, clamidofilas y las bacterias frecuentemente involucradas son: *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni* (3, 8, 9, 10).

Entre las propiedades de las bacterias para producir daño están su adherencia a las células del huésped y su capacidad para producir invasividad y toxigenicidad y para evadir el sistema inmunitario, para degradar inmunoglobulinas y otros

productos de defensa y tejidos (11, 12, 13).

3.1 Pasteurelosis neumónica.

Mannheimia haemolytica y *Pasteurella multocida* son bacterias aisladas de manera frecuente de los procesos neumónicos de los animales domésticos, siendo la pasteurelosis neumónica bovina (PNB) o fiebre de embarque el principal problema respiratorio en bovinos. Esta es una enfermedad generalmente fatal, que se caracteriza por una pleuroneumonía fibrinosa grave y que afecta principalmente a animales menores de un año recientemente transportados, o a becerros de 1 a 5 meses de edad (10, 14, 15). Se ha demostrado que las enfermedades respiratorias en bovinos se presentan por lo general en becerros de 6 semanas a 6 meses de edad, ya que son destetados y confinados en áreas con animales de diferentes edades y su sistema inmunológico se está aún desarrollando (16, 17).

Mannheimia haemolytica y *Pasteurella multocida* son flora normal del tracto respiratorio superior de los bovinos, sin embargo, bajo ciertas condiciones de inmunosupresión, se comportan como oportunistas llegando a invadir el tracto respiratorio inferior. Para que se establezca la PNB se deben presentar uno o varios factores, como por ejemplo el estrés, que produce inmunosupresión al aumentar el nivel de cortisol, las infecciones virales, que al inmunosuprimir o lesionar el tejido del pulmón favorecen las infecciones bacterianas, y también las bajas en los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos del pulmón, que permiten el establecimiento de la infección bacteriana (18). Se ha demostrado que los periodos prolongados de estrés producirán un aumento en la secreción de corticoesteroides que comprometen la respuesta inmune del animal contra el agente infeccioso, debido a que los macrófagos alveolares no liberan factores quimiotácticos y se bloquea la unión de estos factores a los granulocitos (15, 19, 20). El tiempo de incubación de esta enfermedad varía entre 2 a 14 días después de que el animal sufrió estrés. Los animales afectados de manera aguda mueren a las 3 semanas de arribar a la explotación y los que logran recuperarse de la enfermedad desarrollan un proceso crónico y no serán productivos (19).

3.2 Bacterias asociadas a la pasteurelosis neumónica.

Mannheimia haemolytica y *Pasteurella multocida* son bacterias comensales habituales del tracto respiratorio superior de los rumiantes domésticos y silvestres,

aunque también se han aislado de aves y reptiles. Sin embargo, llegan a estar presentes en mayor número en casos de enfermedades respiratorias, con variaciones entre cepas en su capacidad para producir enfermedad a los diferentes hospedadores animales ⁽¹⁴⁾. Se ha aislado con mayor frecuencia a *M. haemolytica* que a *P. multocida* de los procesos neumónicos de bovinos ^(14, 17). Los serogrupos más frecuentemente aislados de *P. multocida* en bovinos son A1 y A3 y de *M. haemolytica* es el A1 ^(21, 22).

Estos microorganismos son Gram negativos, no móviles, de forma cocobacilar, mesofílicos, aerobios o anaerobios facultativos y oxidasa positivos. *P. multocida* es indol positiva, mientras que *M. haemolytica* es indol negativa. La presencia de cápsula con propiedades de superficie antifagocíticas, las hacen parcialmente resistentes a la fagocitosis ^(23, 24). Inhiben la fusión del fagosoma con el lisosoma, permitiendo escapar al citoplasma y evitan el estallido respiratorio, mecanismos por los cuales estos microorganismos sobreviven en el interior del macrófago ⁽²⁵⁾.

El primer informe sobre estos microorganismos en bovinos fue hecho en 1921 por Jones, posteriormente Newson y Cross en 1932, propusieron el nombre de *Pasteurella haemolytica* ^(20, 26), que se clasificó en 17 serotipos con base en pruebas de hemoaglutinación indirecta usando extractos de antígenos de superficie capsular. Con base en la capacidad de fermentar arabinosa y trehalosa se ha dividido en los biotipos A y T, respectivamente; se han identificado 13 serotipos A y 4 serotipos T ^(26, 27). En 1990, mediante estudios de hibridación de DNA-DNA y por sus propiedades bioquímicas y análisis genéticos, el biotipo T (serotipos T3, T4, T10 y T15) se reclasificó como una especie separada llamada *Pasteurella trehalosi* ^(26, 28, 29, 30). Angen *et al.* ⁽²⁷⁾ mediante las técnicas de ribotipificación, comparación de la secuencia 16S del rRNA e hibridación de DNA-DNA, reclasificó a *P. haemolytica* serotipo A en un nuevo género llamado *Mannheimia*. *P. haemolytica* serotipo A (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 y A17) ahora es llamado *Mannheimia haemolytica*. El serotipo A11 no tiene relación con *M. haemolytica* y se le nombró *M. glucosida*. *M. granulomatis* incluye cepas que previamente fueron clasificadas como *P. granulomatis* Bisgaard taxón 20 y *P. haemolytica* biogrupo 3J. *M. ruminalis* incluye cepas no hemolíticas de *P. haemolytica* previamente descritas como *A. lignieresii* y *P. haemolytica* biogrupo 3J, aisladas de rumen de bovinos y ovinos no asociados a estados patológicos. *M. varigena* comprende un grupo de cepas originalmente clasificadas como *P.*

haemolytica biogrupo 6 y Bisgaard taxón 15 y 36 han sido aisladas de bovinos y porcinos asociados con neumonía y otros estados patológicos (30, 27).

Pasteurella multocida presenta antígenos capsulares (polisacáridos) y antígenos somáticos (lipopolisacáridos). Carter (31), mediante hemoaglutinación indirecta del antígeno capsular, reconoció cuatro tipos (A, B, D, E). Hedleston *et al.* (32) mediante prueba de precipitación en agar, reconocieron 16 serotipos diferentes con base en los antígenos somáticos; Jones *et al.* (33) reconocieron el biotipo F aislado de bovinos con la enfermedad de cabeza de hipopótamo y por Rimler (34) en pavos con cólera aviar.

Los biotipos A y D se asocian con infecciones respiratorias, mientras los biotipos B y E producen septicemia hemorrágica en los bovinos y búfalos del sur de Europa, Asia y África (35). El biotipo A está asociado con problemas neumónicos del ganado, distribuyéndose en Europa, México, Canadá y Estados Unidos (36, 37, 38). El Tipo D es aislado con menor frecuencia o de forma esporádica que el A en pulmones neumónicos de becerros (38, 39).

En México, Blanco-Viera *et al.* (40), encontraron que el serotipo más frecuentemente aislado de *M. haemolytica* es el A1 y en menor cantidad el A2 y el A6; mientras que los biotipos de *P. multocida* aislados a partir de bovinos en nuestro país son el A y el D, en los cuales, los serotipos somáticos encontrados son el 3, 4, 7 y 12.

3.3 Mecanismos de patogenicidad.

Las bacterias pueden producir enfermedades a través de diferentes mecanismos, pero esta depende de la resistencia del hospedero, los tipos de tejidos lesionados, la localización del microorganismo en el cuerpo y la capacidad de producir toxinas y otros factores de virulencia (8, 41, 42).

La producción de cápsula es importante factor de virulencia de las bacterias, para evitar ser eliminadas por el organismo. La cápsula protege a la bacteria contra

los mecanismos de respuesta inmune del hospedero, los agentes quimioterapéuticos y la fagocitosis.

Los factores de patogenicidad producidos por la membrana externa en las bacterias Gram negativas juegan un papel importante durante la patogénesis, ya que pueden producir choque séptico a causa de la combinación de citocinas, fracciones del complemento y factores de la cascada de la coagulación ⁽⁴³⁾. Las bacterias Gram negativas producen una endotoxina no proteica denominada LPS (lipopolisacárido) ⁽⁴⁴⁾. Además, ciertas bacterias producen toxinas que actúan directamente formando poros en la membrana de la célula hospedera, estas toxinas pertenecen a la familia RTX ⁽⁴³⁾. La membrana externa de las bacterias Gram negativas consiste de lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas; la propiedad tóxica del LPS se debe al lípido A, sin embargo, el componente polisacárido es la causa de la antigenicidad característica de los antígenos O, también llamados antígenos somáticos. Estas bacterias se producen en dos formas: una se llama lisa, debido al aspecto de la colonia, es muy virulenta; la otra es la forma rugosa, no son bacterias virulentas y se han utilizado para vacunas ⁽¹²⁾.

Las adhesinas son responsables del reconocimiento y unión a receptores específicos de las células. La unión al receptor puede activar complejas señalizaciones en la cascada de la transcripción de la célula hospedera, donde se puede incluir la activación de la respuesta innata del hospedero o la subversión de procesos celulares facilitando la colonización e invasión bacterianas. Algunas adhesinas están asociadas a la superficie de la bacteria y se denominan adhesinas no pilosas, mientras que otras son ensambladas en apéndices (hair-like) llamadas pili o fimbrias que se extienden fuera de la superficie de la bacteria. Estos apéndices pueden ser ensamblados mediante cuatro mecanismos: la vía chaperonausher, la vía del sistema de secreción tipo IV, la vía del ensamblaje del pilus tipo IV y la vía alterna de la chaperona ^(45, 46, 47).

3.3.1 Mecanismos de patogenicidad de *M. haemolytica*.

En cepas de *M. haemolytica* que afectan a rumiantes se han identificado diversos mecanismos de expresión de su patogenicidad a través de potentes antígenos, los cuales incluyen: una leucotoxina RTX (LktA) con actividad específica contra leucocitos, lipopolisacárido (LPS), proteínas de membrana externa (PME), proteínas reguladas por hierro (PRH), fimbrias, enzimas

degradativas (neuraminidasa, proteasas, metaloglicoproteasas), antígenos aglutinantes serotipo-específicos y adhesinas; además de la cápsula y plásmidos de resistencia a antibióticos (48, 49, 50).. Todos estos mecanismos juegan un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad causada por *M. haemolytica*, sin embargo, la LktA es considerada el factor de patogenicidad primario más importante

Cápsula.

La cápsula se produce durante la fase de crecimiento logarítmico; cepas sin cápsula de *M. haemolytica* son fácilmente fagocitadas por los macrófagos alveolares, en comparación con aquellas que presentan cápsula. Se ha reportado que el material capsular puede interactuar con el surfactante pulmonar, facilitando la adherencia de la bacteria a las células (51).

Proteínas de membrana externa (PME).

Si bien el papel de las PME como factor de virulencia no está del todo establecido, diversos estudios han confirmado su importancia en la patogénesis de las infecciones y resaltan su participación potencial en la respuesta de anticuerpos en la protección antibacteriana y en la adhesión a la célula hospedera (52, 53, 54, 55). Se han encontrado proteínas ligadas a fibrinógeno en sobrenadante de cultivos de *M. haemolytica* serotipo 1 y *P. trehalosi* serotipo 10, que inician la cascada de la coagulación que finaliza con la producción de fibrina (56). Las proteínas, trabajando en conjunción con los mediadores de la inflamación, pueden provocar lesiones severas en el pulmón, como se observa en la pasteurelisis neumónica (57).

Se han logrado caracterizar 2 antígenos de *M. haemolytica* serotipo A1, el primero es un receptor de membrana externa, regulador de hierro dependiente de Ton B y el segundo es una proteína homóloga de la adhesina de alto peso molecular de *Haemophilus influenzae* de 240 kDa, cuyo peso es similar a adhesinas de otros microorganismos involucrados en neumonías en ganado (15).

Toxinas.

La LktA pertenece al grupo de exotoxinas que producen su daño primario en los leucocitos de rumiantes, especialmente en las células polimorfonucleares (PMN), el daño final de la toxina es una pleuroneumonía fibrinosa aguda. El peso

molecular de la toxina es de 104 kDa (20, 24). Su ha sugerido que las citocinas proinflamatorias juegan un papel importante en el aumento de la respuesta biológica de los PMN de bovino contra la LktA de *M. haemolytica* (58). Encontraron que el aumento en los linfocitos con función asociada al antígeno 1 (LFA-1) por presencia de PMNs expuestos a IL-1 β , TNF- α o IFN- γ , esta asociado al incremento de la LktA. Las moléculas de adhesión de la familia de los leucocitos CD18 (β -integrinas), favorecen la migración de neutrófilos del septo alveolar al lumen alveolar. Al llegar a pulmón, estas células participan en los cambios patológicos de ese órgano, las β -integrinas contribuyen *in vivo* a la inducción de citocinas proinflamatorias como el IFN- γ y el TNF- α , iniciando el proceso inflamatorio. Estos mediadores de la inflamación inducen de nueva cuenta la expresión de moléculas de adhesión de leucocitos y células endoteliales, que favorecen la infiltración de otros linfocitos. La deficiencia en la adhesión de leucocitos de bovino (BLAD) es una enfermedad genética autosomal recesiva, donde se produce una sustitución de un aminoácido en la subunidad β (CD18) de la familia de las β integrinas, los animales afectados con frecuencia presentan infecciones bacterianas, virales o fúngicas, el ganado frecuentemente muere por infecciones respiratorias o entéricas a pesar del uso de quimioterapéuticos (59, 60).

La LktA solamente es específica de bovinos y los leucocitos presentan un receptor específico (β integrina) para unirse a la toxina (61). La actividad de la LktA contra las células blanco es dosis-dependiente y se puede clasificar en tres categorías. A muy bajas concentraciones la leucotoxina activa las células blanco provocando una interrupción en la respiración de las células y la desgranulación. A medida que la concentración de leucotoxina aumenta, las células blanco son estimuladas para que sufran apoptosis. Cuando la concentración de la leucotoxina es alta se presenta una necrosis de las células blanco como consecuencia del daño a la membrana debido a la formación de poros, favoreciendo la colonización de la mucosa respiratoria por parte del microorganismo (24, 50). La LktA produce poros que atraviesan la membrana de los neutrófilos y macrófagos alveolares. En altas concentraciones (1 000-2 000 moléculas de toxina por célula), la LktA causa una rápida (5-15 min) pérdida del potasio intracelular y el hinchamiento de la célula. La formación, dependiente del calcio, de numerosos desperfectos de la membrana plasmática, incluye poros hasta de 10 nm de diámetro sobre la superficie de la

célula con la salida de lactato deshidrogenasa del citoplasma. Estos poros hacen que la membrana celular sea permeable a los iones y a la salida de agua (20, 24, 49, 50).

La Lkt tiene una gran cantidad de aminoácidos, ya que el gen que codifica para esta toxina (*lktA*) presenta un complejo mosaico estructural que se ha transferido de manera horizontal y mediante recombinación intragénica. Davies y Baillie (67) determinaron mediante inhibición de la quimioluminiscencia de neutrófilos la actividad citotóxica de varios tipos de LktA (Cuadro 1).

Cuadro 1. Actividad citotóxica de la LktA de varios serotipos de *M. haemolytica*

Actividad citotóxica de la LktA de <i>M. haemolytica</i>.			
Lkt A	Hospedero	Serotipo	Actividad contra neutrófilos
1.1	bovino	A1	bovino y ovino
1.2	ovino	A1, A5, A6, A7, A8, A9, A12	Ovino
1.3	ovino	A1, A5, A6, A7, A8, A9, A12	Ovino
2.1	bovino	A2	bovino y ovino
3	bovino	A2	bovino y ovino
6	ovino	A2, A7, A13, A14, A16	Ovino
7	ovino	A16	Ovino
8.1	ovino	A7	Ovino
9	ovino	A14	Ovino
10	ovino	A2, A7, A13, A14, A16	Ovino

Adhesinas.

Se han reportado dos tipos de fimbria en cepas de *M. haemolytica* serotipo A1 aislada de tejido pulmonar de bovinos con neumonía. Una de las fimbrias es larga y rígida, mide 10-12 nm de diámetro y de 100-250 nm de largo. Esta observación se hizo al microscopio electrónico, mediante tinción negativa con 2% de ácido fosfotúngstico. La otra fimbria es pequeña y flexible, de 5 nm de diámetro y con una longitud de 300 nm, aparentemente más flexible que la primera ^(62, 63).

En animales con 6 días de movilización, que enfermaron de neumonía, se recuperó *M. haemolytica* A1. Mediante tinción negativa, las bacterias se observaron al microscopio electrónico de transmisión y se encontraron fimbrias de 75 a 120 nm de largo. No se ha establecido la función exacta de la fimbria, pero podría participar en los eventos iniciales de colonización en el tracto respiratorio superior favoreciendo la adhesión bacteriana ⁽⁶⁴⁾.

Enzimas extracelulares.

Entre los antígenos presentes en el sobrenadante de cultivos de *P. haemolytica* A1 destaca una *O*-sialoglicoproteína (Gcp) que es una metaloproteasa neutra, con actividad de endopeptidasa y neuraminidasa, que tiene la capacidad de romper glicoproteína A tipo mucina en diferentes sitios ^(65, 66, 67). Esta enzima es capaz de fraccionar la principal sialoglicoproteína de la membrana de las plaquetas humanas, GP1b (CD42b), incluyendo además otros antígenos glicoproteínicos de las plaquetas; se supone que en bovinos se encuentra un homólogo de la GP1b humana. Se ha establecido que las metaloproteasas son activadas en pulmón con lesiones producidas por la fiebre de embarque y que *M. haemolytica* induce la proliferación, liberación y activación de gelatinasas B en células inflamatorias de bovino *in vitro* ⁽⁶⁸⁾.

3.3.2 Mecanismos de patogenicidad de *P. multocida*.

Cápsula

Se desconoce la estructura química de la cápsula de la cepa de *P. multocida* M1404 que pertenece al serotipo B2, mientras que *P. multocida* B6 presenta D-manosa, D-galactosa y D-arabinosa en razón de 2:0.8:0.5 ⁽⁶⁹⁾. Los extractos de la cápsula purificada de *P. multocida* B6 no son tóxicos, ni protegen a conejos y

ratones, pero tienen una buena actividad antifagocítica, aunque esto pudo deberse a que el extracto contenía pequeñas cantidades de contaminantes como ácido nucleico y proteínas.

La cápsula está formada por ácido hialurónico y otros polisacáridos. El ácido puede ser eliminado de la bacteria mediante la enzima hialuronidasa, lo que provoca una disminución en la adhesión de esta bacteria a las células. Trabajando con cepas de *P. multocida* A, demostraron que la adhesión de este microorganismo a los macrófagos de sacos aéreos de pavos, pero no la penetración, está mediada por el ácido hialurónico de la cápsula (70).

Cepas de *P. multocida* biotipo A inhibieron la actividad fagocítica de los neutrófilos, ya que sólo 3.8% de las bacterias fueron fagocitadas. Cuando la bacteria fue tratada con hialuronidasa testicular bovina, el 90% de las bacterias que no presentaban cápsula fueron fagocitadas. Por lo que concluyen que un factor que inhibe la actividad fagocítica de los PMN es probablemente el ácido hialurónico, que es el mayor componente de la cápsula (71). Se ha demostrado que *P. multocida* serotipo A de origen bovino, o fracciones de este microorganismo, inhiben la fagocitosis y la iodación de proteínas de PMN (72, 73).

Proteínas de membrana externa

Muchas bacterias requieren hierro para multiplicarse. En los animales, el hierro se encuentra asociado a proteínas como hemoglobina, transferrina, lactoferrina, haptoglobina y ferritina. Cuando se da la invasión bacteriana, la absorción intestinal de hierro cesa, la interleucina 1 (IL-1) de los macrófagos hace que los hepatocitos secreten transferrina y haptoglobina, y hay una mayor incorporación de hierro al hígado, reduciéndose la disponibilidad de este elemento y obstaculizando su utilización por las bacterias (42). Sin embargo, las bacterias son capaces de captar el Fe de estas proteínas para poder crecer dentro del hospedero.

Se ha identificado en *P. multocida*, una nueva proteína receptora (TbpA) que hace más eficiente la adquisición de hierro a partir de transferrina de bovino, sin necesidad de utilizar una segunda proteína receptora (TbpB) (74). Al crecer esta cepa en un medio sin hierro, al cual se le añadieron diferentes fuentes de este mineral, sobreexpresaron diferentes genes que codifican para proteínas que transportan y unen hierro a partir de hemoglobina, transferrina, ferritina y citrato férrico (75). Cepas de *P. multocida* B2 y A3 provenientes de bovinos que cultivaron en un

medio limitado de hierro produjeron proteínas de membrana externa reguladoras de hierro de 84 y 86 kDa ⁽⁷⁶⁾; algunas proteínas reguladoras de hierro y proteínas de membrana externa de *P. multocida* B2 se utilizaron como inmunógenos en bovinos, ya que utilizando técnicas de inmunoblot y ELISA se determinó que producían títulos altos de anticuerpos ⁽⁷⁷⁾.

Se ha caracterizado mediante técnica de PCR el gen (*hgbA*) que codifica para la producción de una proteína de unión de hemoglobina en cepas de *P. multocida* serotipo A y D de varias especies animales ⁽⁷⁸⁾. Algunas bacterias gram negativas secretan este tipo de proteínas que quitan el grupo hemo de la hemoglobina y se unen a proteínas específicas de membrana externa de las células que los introducen. Otros microorganismos Gram negativos tienen un receptor que se ancla en la membrana externa de la célula y une directamente a la hemoglobina e introduce hierro o el grupo hemo ⁽⁷⁹⁾.

Se ha determinado mediante Western blot una proteína de membrana externa de 16 kDa que es altamente inmunodominante, proveniente de una cepa de *P. multocida* serotipo B2; esta cepa es utilizada en la India como vacuna para prevenir la septicemia hemorrágica ⁽⁸⁰⁾. Mediante el uso de proteínas y péptidos catiónicos se ha determinado que presentaban propiedades antibacterianas, al encontrar una disminución en el crecimiento de cepas de *P. multocida* B2, atribuible a la internalización o absorción selectiva de péptidos por el microorganismo o por el daño que producen en la membrana de la bacteria ⁽⁸¹⁾.

Se ha identificado una proteína de membrana externa de 39 kDa que participa en la adhesión de *P. multocida* a células de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) ⁽⁸²⁾. Además se ha establecido que la presencia de cápsula de *P. multocida* aumenta la adhesión de ésta a CEF ⁽⁸³⁾. El grosor de la cápsula y una proteína capsular de 39 kDa en aislamientos de cepas de *P. multocida* tipo A en aves favorece la capacidad de producir daño a la célula blanco ^(73, 82, 84).

Adhesinas

En cepas de *P. multocida* serotipo A aisladas de cerdos con neumonía, se han observado, mediante microscopía electrónica la presencia de fimbrias. Al realizar inoculaciones experimentales con estas cepas, comparando con otras que no presentaban fimbrias, se encontró que los cerdos infectados con las cepas fimbriadas presentaron problemas de neumonías más severos que el resto de los

animales, concluyendo que la presencia de fimbrias juega un papel importante en la patogenia de la enfermedad ⁽⁸⁵⁾.

Al medir la adhesión de *P. multocida* a tráquea de conejos, se encontró que el serotipo D1 fue más adherente que el serotipo A3. Ambas cepas presentaban fimbrias, pero la primera no presentaba cápsula, mientras que el serotipo A3 sí la presentaba; se determinó que las fimbrias favorecen la adherencia a las células, ya que en la superficie de la fimbria se encontraban adhesinas (aminoazúcares) ⁽⁸⁶⁾.

En cepas aisladas de conejo y crecidas en caldo infusión cerebro corazón (BHI), teñidas mediante tinción negativa con ácido fosfotúngstico al 2%, se encontraron proyecciones filamentosas de 5 nm de largo, pero sin precisar la longitud de las mismas ⁽⁸⁷⁾.

Se ha logrado expresar la fimbria de cepas provenientes de aves en condiciones de laboratorio, que habían perdido la capacidad de producirla, utilizando diferentes medios de cultivo para la bacteria. En las bacterias crecidas en agar sangre se produjo una mayor cantidad de fimbrias (120 por bacteria), mientras que las crecidas en caldo y almidón-dextrosa se expresaron en poca cantidad ⁽⁸⁸⁾.

Se ha descrito la presencia de fimbrias en cepas de *P. multocida* A1 y A3 provenientes de aves con cólera aviar; determinándose que el serotipo A3 presentaba apéndices de 7-7.5 nm de diámetro y 20 µm de largo, así como un peso molecular de 18 kDa. Se ha aislado y secuenciado el gen *ptfA* que produce la subunidad fimbrial tipo 4 (proteína PtfA), resultando similar a la proteína Pil E que forma el cuerpo de la fimbria de *Neisseria* spp ^(89, 90).

Lipopolisacárido (endotoxina).

El lipopolisacárido es un factor de virulencia importante, responsable de los 16 serotipos somáticos. Este compuesto estimula la liberación del TNF-α por parte de los macrófagos alveolares ⁽⁹¹⁾.

Exotoxinas.

Pasteurella multocida produce una toxina dermonecrótica (DNT) con un peso molecular estimado de 112 a 160 kDa. Esta toxina tiene actividad citotóxica en células pulmonares embrionarias de bovino, produce diarrea mucoide y atrofia de bazo en ratones, además de atrofia de cornetes nasales en cerdos, ratas y conejos ⁽⁹²⁾.

Enzimas extracelulares.

En aislamientos de *P. multocida* a partir de pollos, borregos y cerdos se demostró que todos producían proteasas. Estas proteasas degradaron IgG de las mismas especies animales que se utilizaron en el estudio ⁽⁹³⁾. Las proteasas permiten que los microorganismos eviten su destrucción, al reducirse la opzonización producida por el complemento y las inmunoglobulinas ⁽⁹⁴⁾.

Los productos que libera *P. multocida* son factores que tienen un papel importante en el proceso infeccioso. Este microorganismo excreta una cantidad significativa de neuraminidasa hacia el medio externo, mientras que el resto lo retiene en su superficie; el 47% del total de la neuraminidasa es liberado como una enzima extracelular durante su crecimiento *in vitro* ⁽⁹⁵⁾; lo mismo ocurre con *M. haemolytica* que libera neuraminidasa *in vitro* e *in vivo* ^(96, 97). La neuraminidasa producida por varios serotipos de *P. multocida* es neutralizada por anticuerpos específicos anti-*P. multocida* A3 y demostrándose que la neuraminidasa producida por los 16 serotipos de este microorganismo tiene un peso molecular aproximado de 500 kDa ⁽⁹⁸⁾.

3.4 Inmunogenos de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*.

La bioseguridad es muy importante para reducir la introducción, exposición y transmisión de agentes infecciosos, mediante técnicas de higiene y manejo. Si bien la bioseguridad no garantiza totalmente la eliminación de los agentes infecciosos, sí disminuye la probabilidad de que los animales se enfermen, ya que limita la exposición del agente y el animal. También hay que combinar otras medidas como la vacunación que debe ser a todos los animales, sanos y recién transportados, antes de que tengan contacto con otros animales y además hacerles revacunaciones periódicas ⁽³⁾.

Para asegurar una vacunación exitosa se deben escoger apropiadamente la vacuna (bacteria viva o muerta, combinación virus-bacteria, etc.), el tiempo de vacunación adecuado, el tiempo de almacenamiento y la vía de administración ⁽²⁾.

Un factor importante cuando se trata de proteger a los animales es la vacunación antes de que se produzca un brote de pasteurelosis y se recomienda no vacunar al hato cuando ya inició el brote, ya que disminuye la eficacia de la vacuna (3, 7). Si el becerro recibió calostro de forma adecuada, los niveles séricos de IgG comienzan a disminuir a partir de los 4 meses de vida, por lo que se deben aplicar las primeras vacunas a esa edad. Al estudiar el suero de becerros que no recibieron calostro se observa una ausencia en la actividad neutralizante contra la toxina de *M. haemolytica* A1 y los animales mueren; si la administración de calostro fue deficiente en el becerro, la aplicación de vacunas debe iniciarse en el primer mes de edad (99, 100).

Existe el interés en desarrollar vacunas que proporcionen suficiente protección contra la pasteurelosis neumónica, ya que las vacunas comerciales que se manejan en la actualidad no protegen de forma efectiva a los animales. Tan solo en Canadá, más del 80% de los biológicos autorizados para usarse en bovinos contienen agentes que participan en las enfermedades respiratorias, ya sean virus, bacterias o combinación de ambas (2). Durante muchos años estuvieron disponibles y se usaron vacunas preparadas con células muertas, las cuales fueron muy poco efectivas y llegaron a ocasionar tasas de morbilidad y mortalidad más altas en animales vacunados que en los controles no vacunados, de ahí que muchos de los ensayos para la inmunización de bovinos con bacterinas de *M. haemolytica* y *P. multocida* no fueron del todo exitosos (54, 101, 102, 103). Al respecto, se encontró que algunas bacterinas preparadas con *M. haemolytica* disponibles en el comercio no resultaron eficaces en la prevención de enfermedades respiratorias y los resultados de ensayos de laboratorio y de campo sugirieron efectos adversos de la vacunación (104).

Al aplicar vacunas vivas de *P. multocida* B3 y B4 por vía subcutánea o intradérmica a becerros y búfalos menores de 5 meses de edad, se provocaron reacciones severas y la muerte en los animales (104); También se ha visto que al vacunar con *M. haemolytica* A1 por vía subcutánea se da la respuesta inmune, pero la protección es parcial (105). Se ha demostrado que la administración de vacunas vía intranasal mediante aerosol es segura y se utiliza para animales mayores de 6 meses (106); su eficacia radica en que la vacuna es introducida al animal de la misma forma en que se inicia la pasteurelosis, se estimula la inmunidad de la superficie mucosa del tracto respiratorio y la inmunidad mediada por células (107, 108, 109).

Se ha utilizado a la cápsula y al LPS como inmunógenos en *P. multocida*. En el caso del LPS la respuesta de anticuerpos después de la inmunización dependió del tipo de LPS utilizado y de la especie animal inoculada, además de la ruta y el método de inoculación, ya que se vio que ratones, bovinos y conejos obtuvieron buena protección contra *P. multocida* después de ser vacunados (3, 110).

Se han identificado varias PME que se encuentran en la superficie de los microorganismos, que se han empezado a utilizar como inmunógenos. Estas PME se han utilizado solas o en conjunto con PME reguladoras de Fe con buenos resultados en los bovinos inmunizados (80, 84). Se han desarrollado vacunas a partir de *P. multocida* y *M. haemolytica* sin citoplasma: controlando la temperatura con un bacteriófago, provocaron la lisis de la bacteria por la expresión del plásmido que codifica para el gen *E* de la bacteria, hubo formación de un túnel transmembranal por donde pasó el DNA del citoplasma y los plásmidos, quedando la bacteria vacía en su interior. Se inmunizaron becerros de 2 y 4 semanas de edad, y también conejos y ratones, obteniendo niveles de protección similar a las vacunas comerciales (111, 112). Se ha demostrado que calentando a 41°C una bacterina con cepas de *P. multocida* serotipos 1, 3 y 4 que afectan a aves, se disminuyó la reacción tisular local, además de que se produjo una buena cantidad de anticuerpos (113).

3.5 Matriz extracelular.

La matriz extracelular (MEC) esta compuesta de moléculas sintetizadas por las células y secretadas a los espacios extracelulares. Estas moléculas tienen la capacidad de mediar funcional y estructuralmente entre las células mismas y el ambiente que las rodea. La MEC forma una estructura estable por debajo de las células epiteliales, endoteliales y alrededor de las células que forman el tejido conectivo. La MEC tiene funciones de separar grupos celulares adyacentes, previniendo cualquier tipo de interacción entre ellas. Sus componentes actúan como sustrato por medio del cual las células deben migrar y también pueden servir como inductoras de patrones de diferenciación en algunos tipos celulares. La constitución de la MEC esta dada mayormente por colágena, y en menor cantidad por otras glicoproteínas como fibronectina (FN), laminina y proteoglicanos que poseen proteínas de unión a cadenas de glicosaminoglicanos. Los componentes de

la MEC también pueden funcionar como blanco para la adhesión de microorganismos colonizadores (114, 115).

3.6 Integrinas.

Los microorganismos patógenos se unen a receptores localizados en la superficie de la célula hospedera, esta interacción está dada por la unión del microorganismo a una proteína de la célula, o bien, por un ligando localizado en la superficie, promovido por el microorganismo. Esta unión facilita la adhesión extracelular del patógeno con la posterior invasión e internalización de la célula hospedera (116).

Las integrinas son proteínas heterodiméricas formadas por una pequeña subunidad denominada β rica en disulfuro y una subunidad más larga denominada α ; son de alto peso molecular y se ubican en la superficie celular de mamíferos; se han reportado al menos 21 integrinas diferentes. La mayoría de las integrinas promueven la adhesión a las proteínas de la MEC, como FN, colágena y laminina. Una cadena β puede asociarse a un número definido de cadenas α y los heterodímeros resultantes tienen diferentes preferencias de ligandos. Se cree que la cadena α es responsable de determinar la especificidad del ligando (117, 118). La principal función de las integrinas es su participación en las interacciones célula-célula o célula-matriz, algunas de estas funciones se han establecido por la unión a glicoproteínas de la MEC en regiones que presentan la secuencia RGD; también actúan con el citoesqueleto. Algunas bacterias intracelulares usan integrinas para adherirse a las células, así como muchos virus utilizan proteoglicanos asociados con la superficie celular del hospedero con la misma finalidad (119, 120).

3.7 Fibronectina.

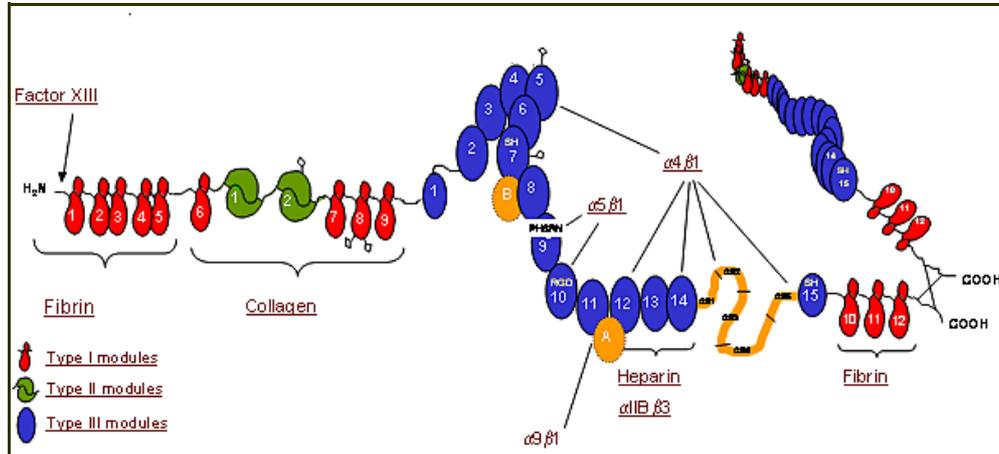
La fibronectina (FN) es una glicoproteína localizada en la MEC y en el plasma, con peso molecular aproximado de 500 kDa. Esta proteína participa en la adhesión y migración de células, así como en eventos fisiológicos como embriogénesis, reparación de heridas y trombosis (121).

La FN es codificada por un solo gen, pero esta proteína existe en varias formas, que difieren en la secuencia de las tres regiones generales del corte alternativo de su precursor de RNAm. El corte alternativo produce la inserción o delección de sitios de adhesión específicos del tipo celular; la primera región en la

IIICS (llamada también V), en humanos puede producir moléculas de FN con 5 diferentes patrones de secuencia en esta región: presenta los sitios denominados CS1 y CS5 con diferentes secuencias de reconocimiento a la adhesión y las otras dos regiones se denominan ED-A (ED-1) y ED-B (ED-2), que producen la inserción o delección de unidades repetidas del dominio F3. La presencia de estos sitios se correlaciona temporal y espacialmente con periodos de migración celular y morfogénesis. Los cortes diferenciales dentro de las tres regiones alternativas del mismo gen en FN humana producen 20 variantes diferentes de cada cadena de FN (122).

En el plasma sanguíneo la FN se encuentra como dímero soluble unido por puentes disulfuro y como multímero insoluble en la MEC. Cada monómero esta formado por tres tipos diferentes de módulos de proteína (F1, F2 y F3), los cuales se definieron en fibronectina mediante estudios de fragmentación proteolítica y análisis de DNA recombinante, pero se han encontrado en otras proteínas (Fig. 1) (121, 122, 123).

Fig. 1. Dominios estructurales de la fibronectina.



Dominios estructurales de la fibronectina. Módulo tipo I (rojo), tipo II(verde) y tipo III (azul).

El conocimiento del mecanismo por medio del cual los módulos interaccionan y presentan sus dominios funcionales es vital para entender la estructura y función de las proteínas modulares. F1 presenta dominios de unión a heparina, fibrina y algunas veces a colágena; el dominio F2 presenta sitios de unión exclusiva a colágena y en ocasiones a heparina y fibrina; y el dominio F3 se une a las células o a heparina, pero no a colágena, este dominio presenta la secuencia Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS), pero los primeros tres aminoácidos son importantes ya que definen el

motivo de reconocimiento RGD y una región sinérgica que aumenta la afinidad de la FN a los receptores de integrina $\alpha_5\beta_1$ (122, 124, 125, 126).

Las FNs plasmática y celular presentan del 5 al 9% de carbohidratos, unidos a residuos de asparagina (110, 116). Una secuencia presente en péptidos que se adhieren a varias integrinas es Arg-Gly-Asp (RGD), entre estos péptidos está la FN (119).

La adhesión de los microorganismos a la FN ha sido caracterizada en bacterias gram positivas (127, 128), gram negativas (129, 130), micoplasmas (131, 132), hongos (133) y parásitos (134, 135). Sin embargo, a principios de la década de los 80s se encontró que la pérdida de FN de la superficie de las células propiciaba una mejor adhesión por parte de algunas bacterias gram negativas (136).

La interacción y unión de las bacterias a la FN están dadas por las proteínas de unión a ella (FNbp). La expresión de estas proteínas depende de la vía de entrada y la capacidad de invasión de la bacteria, así como del tejido afectado o de la cepa utilizada (125), pero esta unión o la inhibición de la adhesión se pueden ver afectadas por factores como pH, presencia o ausencia de Fe, calcio, lectinas o azúcares (135, 137, 138). Se ha encontrado que la expresión de estas FNbp produce inflamación sistémica, caracterizada por pérdida de peso, secreción de IL-6 y mortalidad en ratones (139). Las FNbp presentan sitios de unión repetidos de 35-40 residuos en su extremo C-terminal para unirse a la FN, pero hay sitios fuera de este extremo que también interactúan con el ligando (128).

Las moléculas receptoras o adhesinas de *Staphylococcus aureus* y de otros microorganismos se han denominado “componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas adhesivas de matriz” (CMSRMAM). Estos componentes interactúan con tejidos humanos y de animales, con proteínas del suero y con polipéptidos de la MEC (140). Para colonizar, esta bacteria forma biofilms; algunos de los componentes de esta estructura son dos proteínas de superficie, una de estas es denominada “proteína asociada al biofilm” (Bap), con capacidad para disminuir la unión e inmovilización de FN por las CMSRMAM (141). La FN actúa como ligando entre las CMSRMAM, FNbpA y FNbpB, y la β integrina de la célula hospedera, para favorecer la colonización bacteriana (142).

Se han identificado dos FNbp en *S. aureus* que se han denominado FNbpA y FNbpB, que aparte de unirse a la FN tienen la capacidad de unirse a otras moléculas de la MEC. Esto fue demostrado por Roche *et al.* (143) al adherir e inmovilizar péptidos de elastina provenientes de ligamento de bovino y de aorta y

pulmón humanos, además encontraron que el dominio de unión a elastina se encuentra ubicado en la región A del extremo N-terminal de la FNbp.

Las FNbp se han caracterizado también en micobacterias, donde existe una región conservada en estas proteínas dentro de este género bacteriano. Esta región no es homóloga a FNbp de células eucarióticas, ni está relacionada con péptidos de unión a FN de bacterias Gram positivas ⁽¹⁴⁴⁾. Se ha descrito que la FNbp de *Campylobacter jejuni* es una PME de aproximadamente 37 kDa; también en *Neisseria meningitidis* se han descrito dos PME que son Opa y Opc, esta última interactúa con componentes de la MEC y con proteínas del suero ^(145, 146). La PME A (FNbp) es componente integral de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, presenta la capacidad de ser modificable mediante calor, dentro de sus funciones incluyen la de mantener la integridad de la membrana externa y la conformación física de la célula, así como también participa en la conjugación, en la resistencia a los efectos bactericidas del suero y en la adherencia a diferentes microorganismos ⁽¹⁴⁷⁾. Se ha caracterizado la PME A (FNbp) de *P. multocida* serotipo A3 proveniente de bovino, con peso molecular de 35 kDa que es homóloga a la PME A (FNbp) de *E. coli*; la proteína caracterizada presenta la capacidad de unirse a FN y heparina ⁽¹²⁹⁾.

4. JUSTIFICACIÓN.

Una vez establecida la participación de *M. haemolytica* y *P. multocida* en la patogénesis de la pasteurelosis neumónica. Se hace necesario estudiar los mecanismos de adhesión que intervienen entre estas especies bacterianas y las células del hospedero, estableciéndose que la adhesión representa un primer paso en la colonización de las células hospederas.

5. OBJETIVO GENERAL.

Determinar la adhesión de *M. haemolytica* y *P. multocida* a las células del epitelio oral de bovino.

Determinar si la adhesión de *M. haemolytica* y *P. multocida* a las células del epitelio oral esta mediada por la fibronectina.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

1.- Establecer si *M. haemolytica* y *P. multocida* se unen específicamente a células del epitelio oral de bovino (CEOB).

1.1.- Evaluar la adhesión de los serotipos de *M. haemolytica* A1 y A6 y de *P. multocida* A de bovino.

2.- Establecer si *M. haemolytica* y *P. multocida* se unen a las células del epitelio oral mediante fibronectina.

6. MATERIALES Y METODOS.

6.1 Microorganismos y cultivos.

Las cepas utilizadas de *M. haemolytica* y *P. multocida* fueron obtenidas de aislados de bovinos con neumonía mediante hisopo nasal, provenientes del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca (CAIT), ubicado en Tizayuca, Hidalgo, y de pulmones con neumonía de bovinos provenientes del rastro municipal de Tlalnepantla, Estado de México. También se utilizaron para comparación una cepa de *M. haemolytica* A2 aislada de un borrego con neumonía, y una cepa de *P. multocida* D aislada de cerdo con proceso neumónico (Cuadro 2).

Cuadro 2. Microorganismos utilizados.

Bacteria	Especie animal	Aislada	Origen
<i>M. haemolytica</i> A1	Bovino	hisopo nasal	CAIT
<i>M. haemolytica</i> A2	Ovino	pulmón neumónico	INIFAP
<i>M. haemolytica</i> A6	Bovino	pulmón neumónico	Rastro Tlalnepantla
<i>P. multocida</i> A	Bovino	hisopo nasal	CAIT
<i>P. multocida</i> D	Cerdo	pulmón neumónico	*
<i>A. pleuropneumoniae</i> 1	Cerdo	*	*

* No hay datos

Se crecieron en agar sangre de ovino al 5% adicionados con 5% de suero estéril de caballo, medio que favorece la expresión de factores de virulencia en microorganismos Gram negativos (75, 101). Las bacterias se incubaron por 24 hr a 37°C.

6.2 Adhesión de *M. haemolytica* y *P. multocida* a Células bucoepiteliales (CBE) de bovino.

Para observar la adhesión de *M. haemolytica* y *P. multocida* a CBE de bovino, se recolectaron células de la mucosa bucal de bovinos por medio del tallado del carrillo interno con hisopos estériles de algodón. Las CBEs se suspendieron

sumergiendo el hisopo en 5 ml de Tris 0.1 M y se lavaron tres veces en ese amortiguador a 200 X g durante 15 min a 4°C cada uno. En el último lavado se resuspendieron en 1 ml de Tris 0.1 M ⁽¹⁴⁸⁾.

Las CBE se separaron en dos tubos, a uno de ellos se le agregó 0.2 ml de tripsina (2.5 mg/ml) y el otro sin tripsina (la tripsina digiere la FN que se encuentra en la superficie de estas células) durante 10 min y se incubó a 37°C a 100 rpm. Posteriormente se adicionó 0.2 ml de bacterias a 1 ml de las células CBE (2 X 10⁸ bacterias/ml) y se incubó 2 horas a 37°C en agitación orbital lenta (50 rpm). Se lavaron las CBE durante 3 ciclos más, se realizó un frotis, que fue teñido con azul de metileno al 0.4 % durante 10 minutos y se contaron las bacterias adheridas en el microscopio óptico ⁽¹⁴⁸⁾.

6.3 Obtención y purificación de FN.

La muestra de sangre completa de bovino se obtuvo mediante punción de la vena caudal, se recolectó en tubos vacutainer con EDTA (ácido etilén-diamino-tetracético) al 2.5% como anticoagulante. Los tubos con sangre se centrifugaron a 10000 X g durante 15 minutos a 4°C. El plasma se recolectó en condiciones de esterilidad, en tubos Falcon de 50 ml colocando en cada tubo 25 ml de plasma, al cual se le agregó 250 µl de PMSF (fenil-metil-sulfonil-fluoruro) 0.1 mM y se congeló a -70°C hasta su utilización.

La FN se purificó a partir de plasma de bovino por medio de cromatografía de afinidad utilizando columnas de sefarosa 4-B acoplada a gelatina, modificando el método de Ruoslahti *et al.* ⁽¹²¹⁾.

El plasma obtenido se descongeló toda la noche a 4°C y se centrifugó a 10000 X g por 20 minutos a 4°C. El plasma se pasó dos veces por la columna de sefarosa 4-B a 4°C mediante goteo lento, se lavó la columna de sefarosa pasando a través de ésta PBS 1X con urea 1M (pH 7.4) y PMSF 0.1 mM; después se realizó la elución de FN mediante PBS 1X con urea 4M (pH 7.4) y PMSF 0.1 mM. Se colectaron 15 fracciones de 40 gotas en criotubos de plástico, a estas fracciones se les midió la absorbancia a 280 nm para determinar el pico de elución máximo, utilizando PBS 1X como blanco. Finalmente la columna se lavó pasando a través de ella PBS 1X (pH 7.4) y se almacenó resuspendiendo la sefarosa en PBS 1X con azida de sodio al 2% (pH 7.4) hasta la siguiente utilización ⁽¹³³⁾. Para determinar la pureza de la

FN, se sometió el pico con mayor cantidad de proteína a electroforesis en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida al 7.5% con SDS ⁽¹⁴⁹⁾.

La cuantificación de la FN se realizó mediante el método Bradford, donde se utilizó un estándar de albúmina sérica bovina (ASB). Se preparó una curva con la ASB de 1-10 µg/ml, 10 µl de PBS 1X y 190 µl de reactivo de Bradford, en placas de fondo plano para ELISA. Se colocaron 10 µl de muestra de proteína purificada con 190 µl de reactivo de Bradford. La absorbancia se midió en el lector de ELISA a 590 nm, utilizando regresión lineal ⁽¹⁴⁹⁾.

Para determinar la presencia de FN se utilizó SDS-PAGE por el método de Laemmli ⁽¹⁵⁰⁾. La FN purificada se mezcló con amortiguador de muestra (4 ml de agua destilada, 1 ml de Tris-HCl al 0.5 M con un pH de 6.8, 0.8 % de glicerol, 1.6 ml de dodecil-sulfato de sodio al 10%, 4 ml de β-mercaptoetanol y 0.2 ml de azul de bromofenol al 0.5%) y se sometió a ebullición a 95°C durante 10 min. Estas muestras se corrieron en SDS-PAGE al 7.5%. En el gel concentrador se formaron pozos mediante la inserción de un peine y en cada uno de los carriles se depositaron 20 µl de la muestra, excepto en el primer carril en donde se depositaron 15 µl de marcador de peso molecular. Los geles se corrieron a 100 volts utilizando una solución buffer de corrida 1X (Tris-glicina) con un pH de 8.3 con SDS. El gel se tiñó con azul de Coomassie al 0.2 % por 12 horas a temperatura ambiente en agitación y se destiñó mediante un lavado a base de ácido acético y metanol a diferentes concentraciones, hasta que se observó la banda deseada. El gel se conservó en ácido acético al 10% o bien, se deshidrató ⁽¹⁴⁹⁾ y finalmente se analizó por inmunotransferencia.

6.4 Adhesión de FN a PME de *M. haemolytica* y *P. multocida*.

Se sembraron las cepas de *M. haemolytica* A1, A2, A6 y de *P. multocida* A y D por 12 horas a 37°C en medio sólido (agar sangre). Posteriormente se resembraron en 500 ml de medio de cultivo líquido BHI, incubándolos a 37°C hasta una D. O. de 0.9 a 600 nm. Se cosecharon las bacterias por centrifugación a 4°C, a 4800 X g/30 min, el sobrenadante se desechó, la pastilla comprendía la fracción completa de la bacteria (FC). Se lavaron las células obtenidas del centrifugado anterior con HEPES 10 mM (2 veces), por resuspensión y posteriormente se centrifugaron a 4°C, a 4800 X g/30 min. La pastilla se resuspendió en 80 ml de Hepes 10 mM, adicionando inhibidor de proteasas PMSF 0.1 M (3 ml).

Para obtener las fracciones celulares se sonicó la muestra distribuyendo las células en 4 tubos Falcon, en cantidades de 20 ml, se colocaron en baño de hielo y a cada muestra se le realizaron 10 pulsares de 10 seg por 1 min de descanso, de tres tiempos cada uno con sonicador de punta. La muestra sonicada se centrifugó a 1000 X g/15 min para la remoción de los restos celulares. Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 31500 X g/1 hr en Hepes 10 mM. La pastilla obtenida se consideró que correspondía a una fracción de la envoltura celular cruda que contiene membrana externa y membrana citoplasmática, mientras que el sobrenadante corresponde a las proteínas del citosol (PC). La pastilla de membranas totales se disolvió en Hepes 10 mM y sarcosyl al 2% (20 ml) y se puso en agitación suave por 45 min a temperatura ambiente. Finalmente la muestra se centrifugó a 31500 X g/1 hr y el paquete resultante, correspondiente a PME, se disolvió en agua desionizada, mientras que el sobrenadante correspondió a la fracción de membranas internas (PMI) ⁽⁵²⁾.

Para la obtención de proteínas en solución, en presencia de detergentes y lípidos, se utilizó 400 µl de metanol a los cuales se le añadieron 100 µl de la solución de proteínas de PC, PMI, PME o FC de *M. haemolytica* y *P. multocida* y se sometieron a la acción del vortex. Posteriormente se centrifugó durante 10 seg a 9500 X g en microtubos cónicos de polietileno, para la colección total de la muestra, que correspondía cada proteína de membrana y fracción completa. Se adicionaron 200 µl de cloroformo a la muestra anterior, sometiéndola de nueva cuenta a la acción del vortex y se centrifugó 10 seg a 9000 X g. La separación de las fases se realizó adicionando 300 µl de agua desionizada y sometiéndola suavemente a la acción del vortex y finalmente centrifugando 1 min a 9000 X g. La fase superior se removió cuidadosamente y se eliminó. Al final se adicionaron 300 µl de metanol al resto de la fase clorofórmica inferior y la interfase con las proteínas precipitadas, que fueron mezcladas y centrifugadas 2 min a 9000 X g, se removió el sobrenadante. La pastilla de proteínas se secó bajo rocío de aire y se guardó hasta su uso ⁽¹⁵¹⁾.

Cuantificación de proteínas.

El contenido de proteínas totales fue determinado por colorimetría, utilizando el método de microtitulación de Bradford, usando un estándar de albúmina sérica bovina (ASB), como se realizó para la cuantificación de FN bovina purificada ⁽¹⁴⁹⁾.

Para la separación analítica de las proteínas en función de sus pesos moleculares, se utilizó PAGE-SDS por el método de Laemmli ⁽¹⁵⁰⁾. Se ajustó la cantidad de proteínas necesarias a utilizar en el corrimiento electroforético, la pastilla se disolvió en 50 µl de amortiguador de muestra y se colocaron 10 µl de la muestra en cada carril del gel de poliacrilamida.

Se separaron las proteínas de las fracciones de MI, ME y citosol mediante corrimiento electroforético. Una vez marcadas las diferencias entre las fracciones se procedió a correr nuevamente las PME en geles de poliacrilamida.

Las proteínas se solubilizaron mezclando 50 µg de proteína con 200 µl de amortiguador de muestra (4 ml de agua destilada, 1 ml de Tris-HCl al 0.5 M y un pH de 6.8, 0.8 ml de glicerol, 1.6 ml dodecil-sulfato de sodio al 10 %, 4 ml de 2β-mercaptoetanol y 0.2 ml de azul de bromofenol al 0.5%), sometiéndose a ebullición (95°C) por 1 min. A cada carril se le adicionan 25 µg de la muestra, haciéndola correr en PAGE-SDS al 12.5%, por el método de Laemmli ⁽¹⁵⁰⁾. Se formaron carriles en el gel concentrador mediante un peine y sobre estos pozos se depositaron las muestras de las proteínas a probar, excepto en un pozo en el cual se depositó una muestra de los marcadores de peso molecular. El corrimiento se realizó a 80 volts para el gel concentrador y 120 volts para el gel separador, en solución amortiguadora de corrida. De cada corrimiento se hicieron 2 geles, uno se tiñó con azul de Coomassie y el otro se usó para realizar la inmunotransferencia. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie por 12 horas a temperatura ambiente en agitación, después se eliminó el colorante con una solución de lavado, hasta observar las bandas deseadas, finalmente los geles se conservaron en ácido acético al 10% o deshidratados. El peso molecular de las bandas fue estimado por su posición en el gel, comparándolas con un estándar de proteínas de pesos moleculares conocidos, corrido en el mismo gel ⁽¹⁵²⁾.

Conjugación de FN con peroxidasa de rábano picante (PRP).

Se disolvieron 10 mg de PRP en 200 µl de glutaraldehído al 1.25%, se incubó a 4°C por 18 hr. Para la eliminación del exceso de glutaraldehído se activó una membrana de diálisis de 10 kDa SnakeSkin, sometiéndola a ebullición por 5

minutos en una solución de buffer de carbonatos (NaHCO_3) 200 mM y EDTA 5 mM en 2 ocasiones, finalmente se sometió a ebullición con la misma solución por 10 minutos. La membrana se cerró por un extremo y se le introdujo la PRP con glutaraldehído, se cerró por el otro extremo y se mantuvo en movimiento constante en PBS 1X por 24 hr a 4°C. Se concentró la enzima en 10 mg/ml (1 ml vol final) 200 μl de PRP con glutaraldehído y 800 μl de buffer de carbonatos, se mantuvo en movimiento constante por 24 hr a 4°C.

Se adicionaron 10 mg de FN a 1 ml de NaCl 0.15 M, de esta solución se adicionan 0.1 ml (0.5 mg de FN) a la solución enzimática y se incubó este conjugado a 4°C por 24 hr. Se agregaron 100 μl de etanolamina 0.2 M pH 7.0 al conjugado por 2 hr para eliminar grupos aldehídos no reactivos, el conjugado final se usa inmediatamente o se congela a -20°C hasta su uso ⁽¹⁵³⁾.

Después de separar las proteínas por PAGE-SDS, las bandas de las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa mediante electrotransferencia a 80 volts o 400 mAp durante 1 hora ⁽¹⁵⁰⁾.

La membrana de nitrocelulosa fue tratada por 24 horas con PBS-Tween 20 al 0.05% con leche descremada al 5% con la finalidad de bloquear puntos de unión no específicos para los anticuerpos. A continuación se retiró la leche descremada, se lavó la membrana en 2 ocasiones con PBS-Tween 20 al 0.05% por 5 min.

Se colocó la FN peroxidada diluida en PBS-Tween 20 con leche descremada al 5% en la membrana y se procedió a incubar por 24 hr a 4°C. Después la membrana se lavó en 2 ocasiones con PBS-Tween 20 durante 5 min cada uno.

Para el revelado de la membrana se utilizó 3'3 diamino-bencidina (DAB) al 0.05% (20 mg de DAB) en ácido fosfórico 50 mM a pH 7.4, la cual se agitó por 40 min y se filtró. A 10 ml de DAB se agregó lentamente 300 μl de solución de níquel y cobalto (30 mg de NiCl_3 y 30 mg de CoCl_2 en 3 ml de H_2O) y 100 μl de H_2O_2 al 33 %. Una vez que se prepararon estas soluciones se le agregaron a las membrana en agitación y la reacción se paró hasta obtener la intensidad deseada de las bandas con agua corriente ⁽¹⁵⁴⁾.

7. RESULTADOS.

Se realizaron ensayos de adhesión con varios serotipos de *M. haemolytica* (A1, A2 y A6) y *P. multocida* (A y D) a CBE de humano, ovino y bovino. Los datos fueron analizados mediante un modelo factorial de interacciones de segundo grado, las variables que se utilizaron fueron las diferentes cepas bacterianas, el tipo de CBE, presencia o no de tripsina, se realizaron comparaciones múltiples entre ellas utilizando la prueba de Tukey. Se determinó la adhesión de *M. haemolytica* A1 y A6 provenientes de bovino y el serotipo A2 de ovino, así como la adhesión de *P. multocida* A proveniente de bovino y *P. multocida* D proveniente de cerdo, a células del epitelio oral humano, bovino y ovino; con y sin tripsina. Las bacterias que presentaron mayor adhesión a células de bovino sin tratar éstas con tripsina, fueron: *P. multocida* A (175 bact/cel) aisladas de bovino con neumonía y *M. haemolytica* A1 (123 bact/cel) y *M. haemolytica* A6 (123 bact/cel) (Cuadro 3, Figs. 2, 3 y 4).

Cuadro 3. Adhesión de *M. haemolytica* y *P. multocida* a células de epitelio oral de humano, bovino y ovino, tratadas con tripsina y sin tripsina.

	Con tripsina						Sin tripsina					
	Control	Mh A1	Mh A2	Mh A6	Pm A	Pm D	Control	Mh A1	Mh A2	Mh A6	Pm A	Pm D
Bovino	6 (22)	20 (14)	24 (41)	19 (15)	20 (11)	21 (43)	27	140	58	123	175	48
	SD ± 3	± 8	± 6	± 6	± 5	± 8	± 6	± 13	± 8	± 16	± 16	± 15
Ovino	9 (28)	26 (36)	20 (12)	42 (75)	21 (45)	25 (75)	32	72	164	56	46	33
	SD ± 4	± 7	± 8	± 11	± 8	± 4	± 7	± 10	± 11	± 11	± 11	± 10
Humano	6	16	15	17	15		7	19	16	20	20	
	SD ± 3	± 4	± 4	± 4	± 5		± 3	± 6	± 5	± 5	± 8	

El número entre paréntesis corresponde al valor de adhesión, en porcentaje.
SD, desviación estandar.

Figura 2. Adhesión de *M. haemolytica* A1, *M. haemolytica* A2, *M. haemolytica* A6, *P. multocida* A y *P. multocida* D a células del epitelio oral de bovino y ovino tratadas con tripsina y sin tratar.

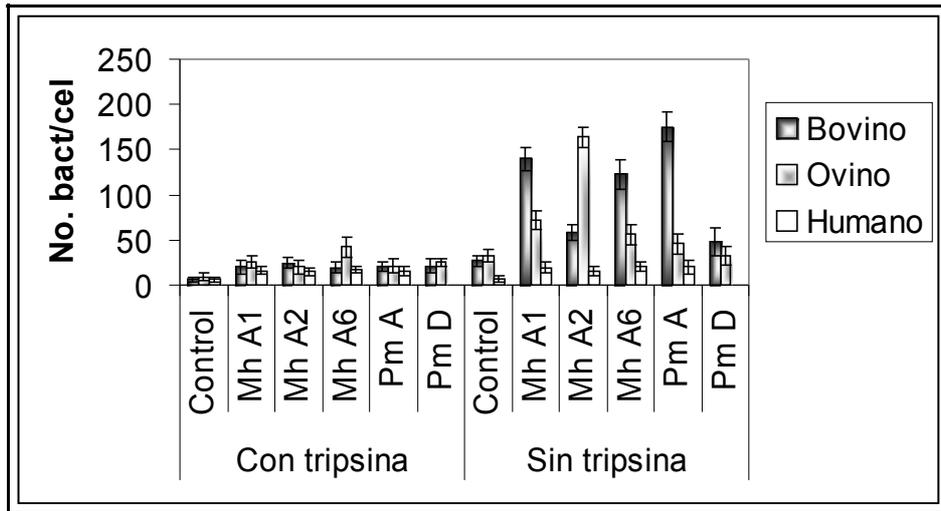


Figura 3. Adhesión de *M. haemolytica* A1, *M. haemolytica* A2, *M. haemolytica* A6, *P. multocida* A y *P. multocida* D a células del epitelio oral de bovino, ovino y humano sin tratamiento con tripsina.

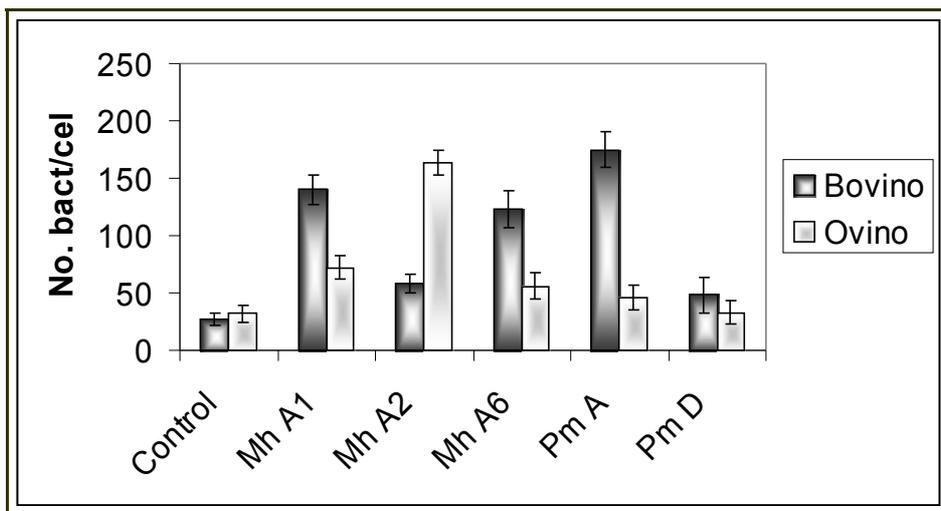
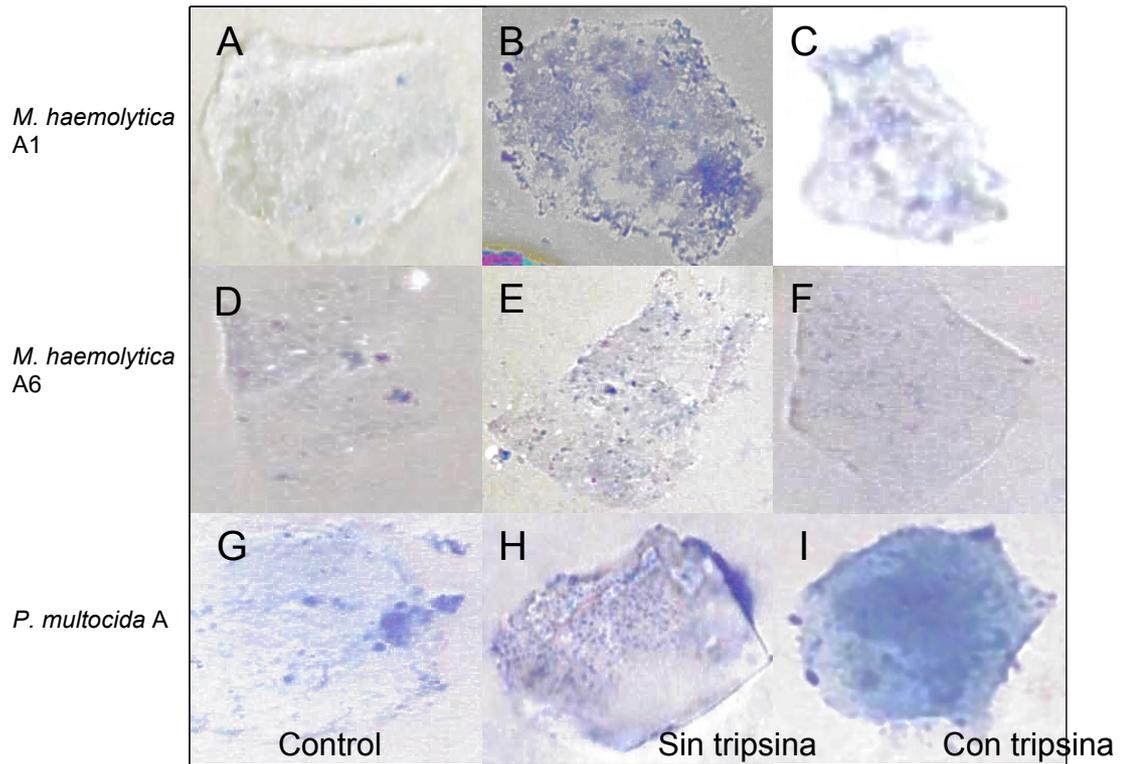


Figura 4. Adhesión de *M. haemolytica* A1, *M. haemolytica* A6 y *P. multocida* A a células del epitelio oral de bovino.



Adhesión bacteriana a células bucoepiteliales (CBE) de bovino. Adhesión de *M. haemolytica* A1 (B), *M. haemolytica* A6 (E), *P. multocida* A (H), a CBE sin tripsina. Adhesión de *M. haemolytica* A1 (C), *M. haemolytica* A6 (F), *P. multocida* A (I), a CBE en presencia de tripsina. *M. haemolytica* A1, *M. haemolytica* A6 y *P. multocida* A (A, D y G respectivamente)

Los otros serotipos presentaron menos de 60 bacterias por célula. En CBE de ovino sin tratar con tripsina se encontró una mayor adhesión de *M. haemolytica* A2 (164 bact/cel), mientras que los demás serotipos probados presentaron una adhesión menor a 72 bact/cel. Se encontró que hubo especificidad de huésped de acuerdo al serotipo, ya que *M. haemolytica* A2 se adhirió en mayor cantidad a células de ovinos y *M. haemolytica* A1 y A6 a células de bovinos.

En CBE de bovino y ovino tratadas previamente con tripsina por 10 min, se encontró que la adhesión se vio disminuida, sobre todo cuando se analizaron células y bacterias aisladas de la misma especie animal, lo que sugiere que la adhesión depende de proteínas de la MEC, probablemente FN. La adhesión de *P. multocida* D proveniente de cerdo fue baja en ambos ensayos (con y sin tripsina) demostrándose la especificidad de huésped ya que se han reportado casos de *P.*

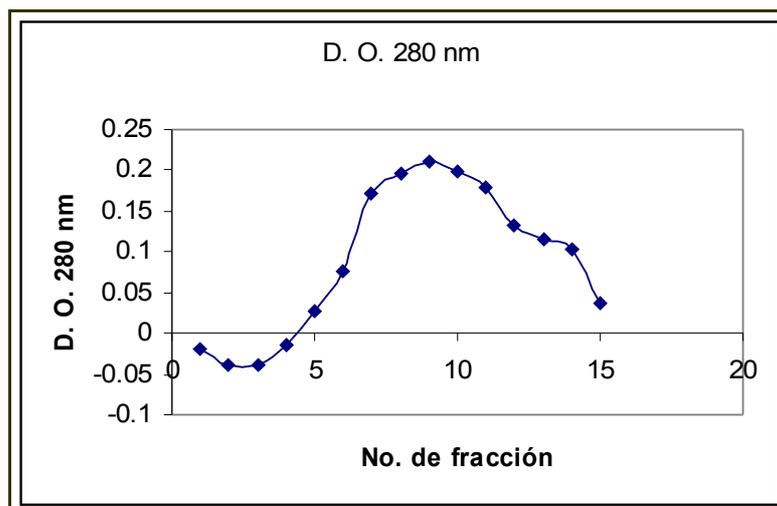
multocida D aislados de bovino (49, 50), sin embargo, como la cepa probada provenía de cerdo no hubo una adhesión favorable por parte de la bacteria.

La purificación de FN de plasma de bovino se realizó por medio de cromatografía de afinidad utilizando columnas de sefarosa 4-B acoplada a gelatina. Al obtener las fracciones correspondientes, se les determinó su D. O. a 280 nm mostrando el patrón de elución con urea 4M. A partir de la fracción 6 se comenzó a tener una buena concentración de proteína y teniendo su máximo en las fracciones 8, 9 y 10 (Cuadro 4 y Fig. 5). Se considera que el patrón de elución presenta un comportamiento esperado en este tipo de columnas.

Cuadro 4. Fracciones obtenidas de FN bovina a D. O. de 280 nm

No. Fracción	D. O. 280 nm
1	-0.020
2	-0.038
3	-0.038
4	-0.014
5	0.027
6	0.077
7	0.172
8	0.197
9	0.211
10	0.198
11	0.179
12	0.133
13	0.115
14	0.102
15	0.038

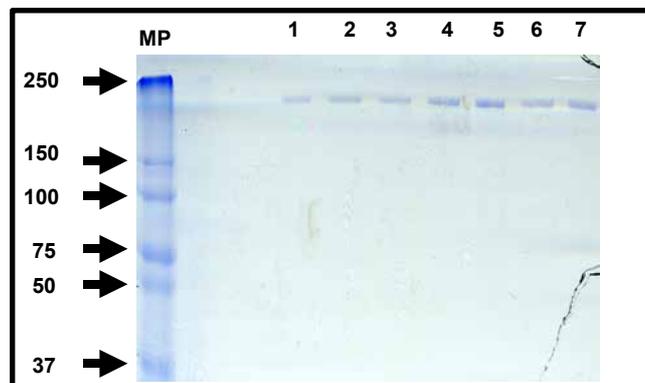
Figura 5.
máximo de
de FN
D. O. de



Pico
elusión
bovina a
280 nm.

Para confirmar la purificación de FN de bovino, las fracciones con mayor concentración de FN se corrieron en SDS-PAGE al 7.5% en presencia de β -mercapto etanol, observando uno de los dímeros de la molécula de FN plasmática, el cual tiene un peso aproximado de 240 kDa, lo cual está por debajo del primer marcador de peso molecular (Fig. 6).

Fig. 6. SDS-PAGE al 7.5% teñido con Azul de Coomassie de FnB purificada.

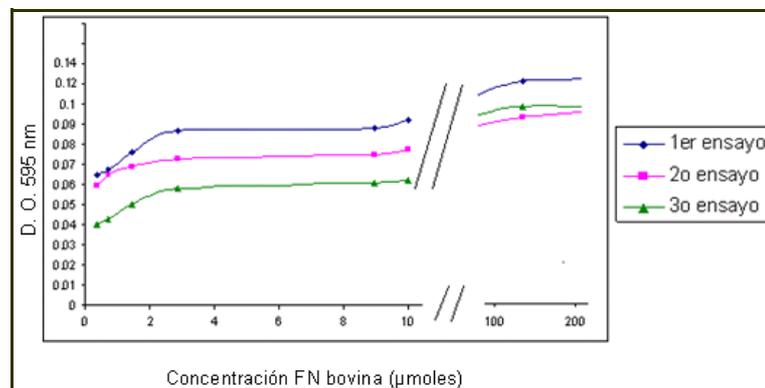


Carril 1 marcador de peso molecular (kDa), carril 1-7 fibronectina bovina purificada

Una vez obtenida la FN se procedió a realizar estudios de cinética de adhesión para caracterizar la unión de las bacterias con FN. La adherencia de *M. haemolytica* A1 (3 ensayos) ocurrió inmediatamente a una concentración muy baja

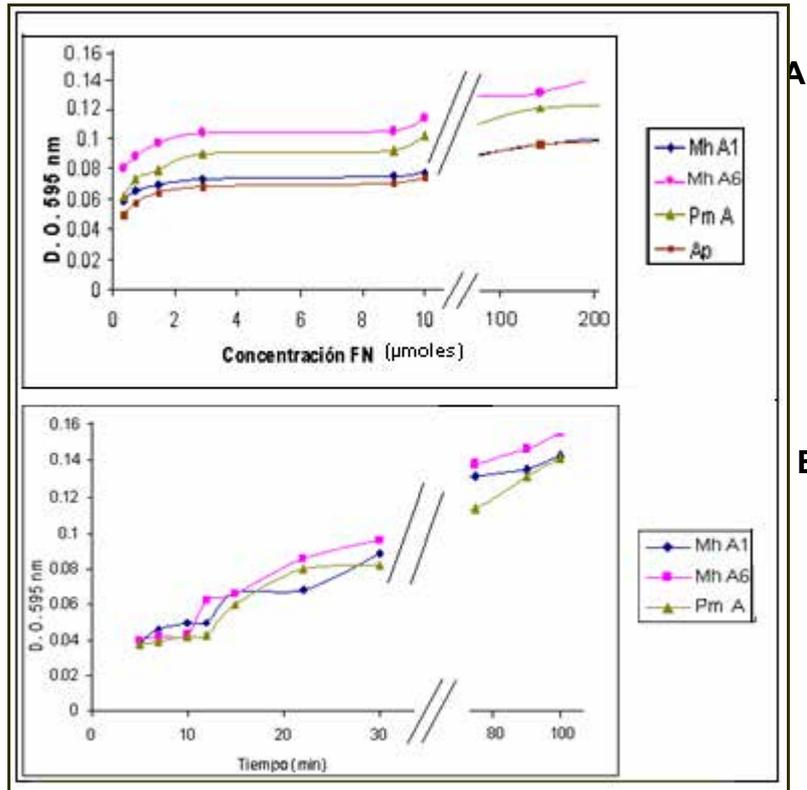
de FN, 0.36 μ moles hasta llegar a la concentración de 2.88 μ moles, a partir de esta concentración la adhesión fue estable pero aumentando lentamente a medida que incrementábamos la cantidad de FN. De igual manera pasó con los demás microorganismos probados (*M. haemolytica* A6, *P. multocida* A y *A. pleuropneumoniae* 1), encontrándose un patrón de adhesión similar al de *M. haemolytica* A1. Al caracterizar la adhesión dependiendo del tiempo se encontró que la capacidad de adhesión por parte de *M. haemolytica* A1, *M. haemolytica* A6 y *P. multocida* A, vimos que se inició a partir de los 10 minutos de incubación con una concentración fija de FN de 100 μ moles, aumentando la adhesión hasta llegar a los 120 min, en donde se observó una saturación en la adhesión en los 3 microorganismos (Fig. 7 y 8).

Fig.7. Cinéticas de adhesión de *M. haemolytica* A1 a diferentes concentraciones de FN de plasma bovino (μ moles).



Cinética de adhesión de *M. haemolytica* A1 a FN obtenida de plasma bovino.

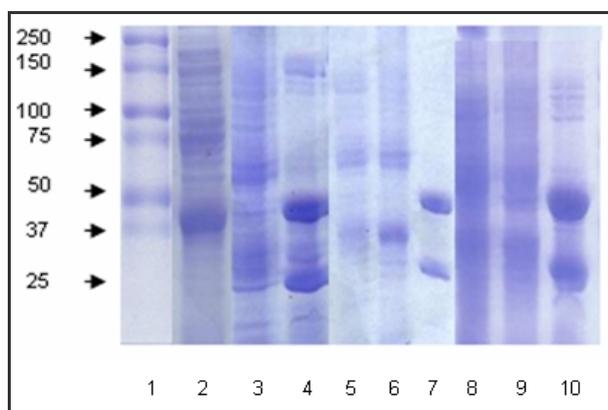
Fig. 8. Cinéticas de adhesión de *M. haemolytica* A1, *M. haemolytica* A6, *P. multocida* A y *A. pleuropneumoniae* 1 a diferentes concentraciones de FN de plasma bovino (μ moles).



Cinética de adhesión. (A) De *M. haemolytica* A1, *M. haemolytica* A6, *P. multocida* A y *A. pleuropneumonie* a diferentes concentraciones de FN bovina cuantificada en μ moles, (B) cinetica de adhesión de *M. haemolytica* A1, *M. haemolytica* A6, *P. multocida* A dependiente del tiempo a una concentración de FN de 100 μ moles.

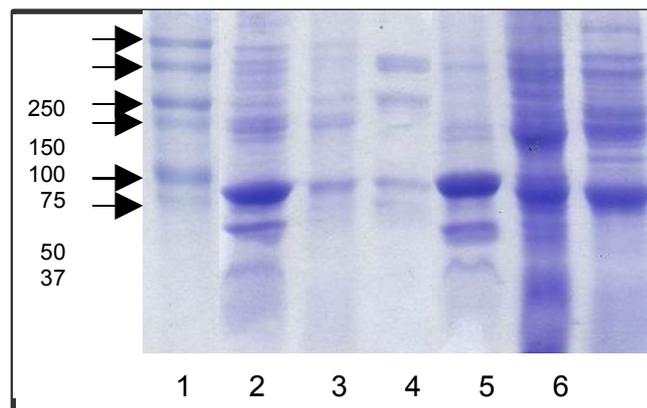
Para demostrar que las PME participan en la adhesión de *M. haemolytica* y *P. multocida* a FN de bovino se siguió la técnica de Squire *et al.*, 1984 donde se obtuvieron 3 fracciones de cada cepa bacteriana: proteína de membrana externa (PME), proteína de membrana interna (PMI) y proteína de citosol (PC), después la separación analítica de las proteínas en función de sus pesos moleculares, se llevó a cabo mediante PAGE-SDS. Se separaron las proteínas de las fracciones de citosol, MI, ME mediante corrimiento electroforético de *M. haemolytica* A1, A2 y A6, así como *P. multocida* A y D (Figs 9 y 10).

Fig. 9. SDS-PAGE al 12% teñido con Azul de Coomassie de proteínas de citosol, MI y ME de *M. haemolytica* A1, A2 y A6.



Carril 1 marcador de peso molecular (kDa); carril 2, 5 y 8, proteínas del citosol de *M. haemolytica* serotipos A1, A2 y A6, respectivamente; carriles 3, 6 y 9, proteínas de MI de *M. haemolytica* serotipo A1, A2 y A6, respectivamente; carril 4, 7 y 10, proteínas de ME de *M. haemolytica* serotipo A1, A2 y A6 respectivamente.

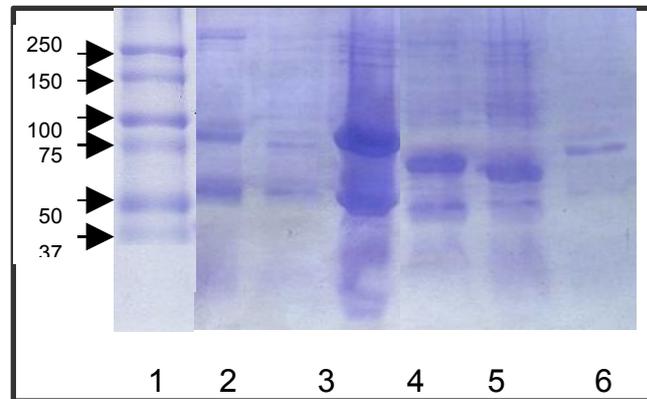
Fig. 10. SDS-PAGE al 12% teñido con Azul de Comassie de proteínas de citosol, MI y ME de *P. multocida* A y *P. multocida* D.



Carril 1 marcador de peso molecular (kDa); carriles 2 y 5 proteínas del citosol de *P. multocida* A y *P. multocida* D respectivamente; carril 3 y 6 proteínas de MI de *P. multocida* A y *P. multocida* D respectivamente; carril 4 y 7 proteínas de ME de *P. multocida* A y *P. multocida* D.

Una vez que se obtuvo el patrón electroforético de las 3 fracciones bacterianas, solamente se trabajaron PAGE-SDS las PME de *M. haemolytica* A1, *M. haemolytica* A2, *M. haemolytica* A6, *P. multocida* A, *P. multocida* D y *A. pleuropneumoniae* 1 (Fig. 11).

Fig. 11. SDS-PAGE al 12% teñido con Azul de Coomassie de proteínas de membrana externa de *M. haemolytica* A1, A2, A6 y de *P. multocida* A y *P. multocida* D.

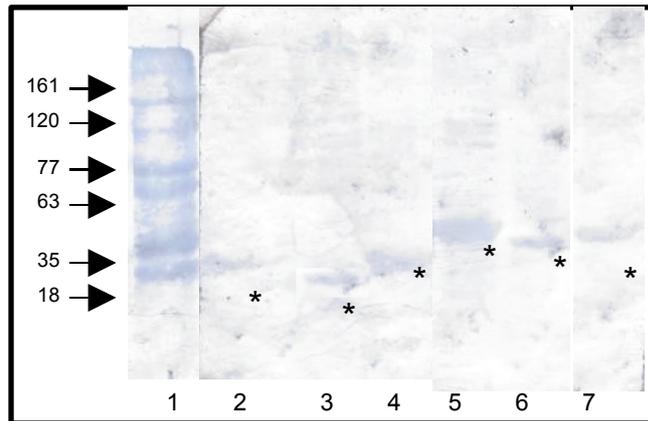


Proteínas de ME. Carril 1 marcador de peso molecular (kDa), carril 2 *M. haemolytica* A1, carril 3 *M. haemolytica* A2, carril 4 *M. haemolytica* A6, carril 5 *P. multocida* A, carril 6 *P. multocida* D y carril 7 *A. pleuropneumoniae*

El gel con las diferentes PME se transfirió a membranas de nitrocelulosa mediante electrotransferencia durante 1 hr, para probar si hay alguna PME que se una a FN. Después de la transferencia a la membrana de nitrocelulosa se le agregó FN peroxidada y se reveló con DAB. En todas las cepas probadas se encontró una PME que reaccionó con la FN marcada, por lo que podemos establecer que en algunos miembros de la familia *Pasteurellaceae* se presentan proteínas de unión a FN (FNbp), sin importar la procedencia de la bacteria (bovino, ovino y cerdo).

Mannheimia haemolytica A1 presenta una PME de 26 kDa, *M. haemolytica* A2 una de 16 kDa, *M. haemolytica* A6 una de 26 kDa, mientras que *P. multocida* A una de 44 kDa, *P. multocida* D una proteína de 35 kDa y *A. pleuroneumonie* 1 presenta una PME de 30 kDa, que reconocen FN bovina (Fig 12).

Fig. 12. Electrotransferencia de PME de *M. haemolytica* A1, *M. haemolytica* A2, *M. haemolytica* A6, *P. multocida* A, *P. multocida* D y *A. pleuropneumoniae*, reconociendo a FN peroxidada.



Unión de fibronectina bovina a PMEs. Carril 1 Marcador de peso molecular, carril 2 *M. haemolytica* A1 (26 kDa), carril 3 *M. haemolytica* A2 (16 kDa), carril 4 *M. haemolytica* A6 (26 kDa), carril 5 *P. multocida* A (44 kDa), carril 6 *P. multocida* D (35 kDa) y carril 7 *A. pleuropneumoniae* (30kDa).

Cuadro 5. Proteínas de membrana externa de *M. haemolytica*, *P. multocida* y *A. pleuropneumoniae* 1 que reconocen FN peroxidada

Cepa	PME (kDa)
<i>M. haemolytica</i> A1	26
<i>M. haemolytica</i> A2	16
<i>M. haemolytica</i> A6	26
<i>P. multocida</i> A	44
<i>P. multocida</i> D	35
<i>A. pleuropneumoniae</i> 1	30

8. DISCUSIÓN.

Las bacterias pueden producir infecciones a través de diferentes mecanismos, pero el desarrollo de la enfermedad depende de la resistencia del hospedero, de los tipos de tejidos lesionados, de la localización del microorganismo en el cuerpo y de la capacidad del patógeno de producir toxinas y otros factores de virulencia ^(10, 52). Los factores de virulencia que se encuentran en la membrana externa de las bacterias Gram negativas influyen de manera importante en la patogénesis, ya que pueden producir choque séptico a causa de la producción combinada de citocinas, fracciones del complemento y factores de la cascada de la coagulación ⁽⁵⁴⁾. Entre los factores de virulencia de la membrana externa bacteriana se encuentran las adhesinas que son responsables del reconocimiento y unión a receptores específicos de las células del hospedero.

En el tracto respiratorio superior de bovinos se encuentran como flora normal *M. haemolytica* y *P. multocida*, pero, bajo ciertas condiciones de inmunosupresión, se comportan como oportunistas, llegando a invadir el tracto respiratorio inferior produciendo una pleuroneumonía fibrinosa ^(10, 27).

La adhesión es uno de los primeros pasos para el desarrollo de un proceso infeccioso, ya que este mecanismo le permite a la bacteria resistir los mecanismos de limpieza y le permite expresar otros factores de virulencia que afectan a las células ⁽¹³⁰⁾. Algunas glicoproteínas como la fibronectina (FN), producida por las células y que es un componente de la matriz extracelular (MEC), pueden servir como blanco para la adhesión de *M. haemolytica* y *P. multocida* en el tracto respiratorio inferior del bovino ^(129, 130). Se ha demostrado la adhesión a FN por parte de distintas especies de bacterias ^(144, 145), parásitos ⁽¹⁵⁰⁾ y hongos ⁽¹⁴⁹⁾.

Como se ha demostrado una similitud estructural y de composición química entre los epitelios oral y nasal, se decidió utilizar las células bucoepiteliales (CBE) de los bovinos como modelo para estudiar la adhesión mediante FN por *M. haemolytica* y *P. multocida*, entendiendo que no son la célula blanco, pero podrían participar en el establecimiento de las mismas en vías respiratorias superiores.

Se realizaron ensayos de adhesión con varios serotipos de *M. haemolytica* (A1, A2 y A6) y *P. multocida* (A y D) a células CBE de humano, ovino y bovino, que fueron analizados mediante un modelo factorial de interacciones de segundo grado, las variables que se utilizaron fueron las diferentes cepas bacterianas, el tipo de CBE, presencia o no de tripsina, se realizaron comparaciones múltiples entre ellas

utilizando la prueba de Tukey. Durante los ensayos de adhesión de los microorganismos a CBE obtenidas de bovino, ovino y humano, se encontró que las cepas reportadas con mayor frecuencia en México por Blanco-Viera *et al.* (40), presentan una mayor adhesión de acuerdo al tipo celular utilizado. Es decir, los microorganismos aislados de procesos neumónicos de bovinos mostraron una especificidad hacia las CBE de bovino de acuerdo al serotipo, ya que los serotipos A1 y A6 de *M. haemolytica* presentaron una adhesión alta (más de 123 bact/cel) al igual que *P. multocida* A (175 bact/cel), mientras que el serotipo A2 de *M. haemolytica*, aislado de ovino con neumonía presentó mayor capacidad de adhesión a las CBE de ovino (164 bact/cel). Todos estos resultados fueron estadísticamente significativos ($p > 0.05$). Estos mismos microorganismos presentaron una escasa adhesión cuando ésta se probó en CBE diferentes al de la especie animal de la cual se aislaron. Además, al probar la adhesión de *P. multocida* serotipo D proveniente de cerdo a CBE de bovino o de ovino mostró un pobre nivel de adhesión (menos de 48 bact/cel). Por otra parte, ninguno de los microorganismos presentó una adhesión mayor a 20 bact/cel cuando se probaron en CBE humanas. Estos datos nos indican la importancia de la adhesión de los microorganismos a las células del hospedero, pues bacterias comensales, oportunistas o patógenas utilizan sus adhesinas para interaccionar con el hospedero y después llevar a cabo la colonización, aumentando la capacidad de adherirse cuando el microorganismo es específico de un hospedero. Nuestros datos coinciden con lo reportado por Hamer-Barrera *et al.* (130), que utilizando varias especies de la familia *Pasteurellaceae*, realizó ensayos de adhesión a CBE humanas, de rata y de cerdo, encontrando mayor adhesión y especificidad de esta para *A. pleuropneumoniae* a células de cerdo. En este trabajo, *A. porcinius* (una bacteria de la flora normal del cerdo) mostró una alta adhesión (> 140 bact/cel) seguido de *A. pleuropneumoniae* (bacteria patógena del cerdo) (> 100 bact/cel), mientras que *M. haemolytica* A2 proveniente de ovino y *P. multocida* aislada de cerdo, pero que es considerado un patógeno oportunista, mostraron una adhesión baja, comprobándose en el primer caso una especificidad de especie y con *P. multocida* un mecanismo pobre de unión a la célula.

En los estudios realizados por Woods *et al.* (148), se encontró que al tratar las CBE humanas con tripsina, el componente de la MEC más afectado fue la FN. En nuestro trabajo, al tratar las CBE con tripsina, se encontró una significancia

estadística ($p > 0.05$), en la disminución de la adhesión en todas las cepas estudiadas a: *M. haemolytica* A1 (10%), *M. haemolytica* A6 (10.5%) y *P. multocida* A (8%) a CBE de bovino y *M. haemolytica* A2 (6.7%) a CBE de ovino. Cuando se midió la adhesión a CBE tratadas con tripsina, las bacterias aisladas de bovinos mostraron una pobre adhesión a CBE de ovino (*M. haemolytica* A1 (23%), *M. haemolytica* A6 (58%) y *P. multocida* A (26%)), mientras que la adhesión de *M. haemolytica* A2 a CBE de bovino fue de 30% demostrándose que la adhesión bacteriana se ve disminuida significativamente ($p = 0.05$) al darle a las células no blanco un tratamiento con tripsina, probablemente porque las cepas bacterianas podrían compartir receptores para adherirse a la superficie de la célula y que fueron eliminados de la célula por acción de la tripsina. Al medir la adhesión a las CBE de humano tratadas con tripsina, la adhesión fue alta ($> 70\%$) en todas las cepas comparada con las células no tratadas con tripsina. Estos resultados nos sugieren que la adhesión de *M. haemolytica* A1 y *P. multocida* A a CBE podría estar mediada por FN como lo han demostrado también estudios previos de Konkel *et al.* ⁽¹⁴⁶⁾ con CBE humanas, Hamer-Barrera *et al.* ⁽¹³⁰⁾ con CBE de cerdo y López M ⁽¹⁵⁵⁾ con CBE de ovino. Todos ellos encontraron que la adhesión se inhibió casi del 100 %, por lo que nuestros resultados presentan similitud con los de ellos, concluyendo que hay otros componentes de la MEC que en menor grado sirven como componentes de unión, pero que FN es la principal molécula del hospedero que participa en dicha adhesión.

Al caracterizar la adhesión de los microorganismos a FN se realizaron 2 tipos de cinéticas de adhesión, una variando el tiempo pero con una concentración fija de FN de 100 μ moles y otra manteniendo fijo el tiempo en 2 hr pero variando la concentración de la glicoproteína. Encontramos que la adhesión de FN se da desde concentraciones muy bajas de la glicoproteína (0.36 μ moles) indicándonos que estas bacterias presentan una alta afinidad por la FN y que por tanto, la FN es uno de los principales componentes de la MEC a los cuales se une para posteriormente causar daño. También esta adhesión se da casi de manera inmediata ya que a los 10 minutos de interacción de la bacteria con la FN se inicia la adhesión, aumentando hasta llegar a lo 90 min donde se vio una saturación en la capacidad de adhesión de la bacteria; en este aspecto, se encontró diferencia con el resultado obtenido por Enríquez-Verdugo *et al.* ⁽¹⁵⁶⁾, quienes trabajaron con cinéticas de adhesión de *A.*

pleuropneumoniae a colágena tipo III proveniente de pulmón de cerdo, determinando una saturación a los 90 min.

Se han encontrado moléculas de superficie en varios microorganismos, las cuales se han denominado “componentes microbianos de superficie que reconocen moléculas adhesivas de matriz” (CMSRMAM). También se han descrito proteínas de unión a FN (FNbp), en donde la FN actúa como ligando entre estos componentes y la MEC del hospedero, para favorecer la colonización bacteriana ⁽¹⁴²⁾. Sin embargo, a principios de la década de los 80s se encontró que la pérdida de FN de la superficie de las células propiciaba una mejor adhesión por parte de algunas bacterias gram negativas ⁽¹³⁶⁾, por lo que se pensó que la adhesión de estas bacterias era hacia otro ligando. Pero en estudios recientes se ha demostrado la importancia de la presencia de FN para favorecer la adhesión de microorganismos a diferentes tipos celulares, siendo cada vez mayor el número de especies bacterianas encontradas donde la FN es el componente de la MEC responsable de la adhesión.

Se investigó también si alguna PME es capaz de funcionar como FNbp en *M. haemolytica* y *P. multocida*. Después de transferir las ME de estas bacterias a membranas de nitrocelulosa e incubarlas con FN peroxidada, se encontró que *M. haemolytica* A1 y *M. haemolytica* A6 (ambas provenientes de bovino) presentan una FNbp de 26 kDa. En cambio, *M. haemolytica* A2 (proveniente de ovino) presentó una FNbp de 16 kDa. En el caso de *P. multocida* A, de *A. pleuropneumoniae* (usada como testigo positivo) y *P. multocida* D, las FNbp fueron de 44 kDa, 30 kDa y 35 kDa, respectivamente. El peso molecular de estas proteínas, de unión a FN es similar al reportado en el estudio desarrollado por Konkel *et al.* ⁽¹⁴⁶⁾, donde encontró una PME que une FN de 37 kDa en *Campylobacter jejuni*, así como por Davies *et al.* ⁽¹⁴⁷⁾ que ha caracterizado la PME A (FNbp) de *P. multocida* serotipo A3 proveniente de bovino, con peso molecular de 35 kDa que es homóloga a la PME A (FNbp) de *E. coli*; la proteína caracterizada presenta la capacidad de unirse a FN y heparina. Los presentes resultados nos podrían indicar que las FNbp podrían presentar sitios de unión repetidos de 35-40 residuos en su extremo C-terminal para unirse a la FN, como lo describió Schwarz-Linek *et al.* ⁽¹²⁸⁾, pero podría también unirse a sitios fuera de este extremo que también interactúan con el ligando.

En el presente trabajo se han cumplido los objetivos planteados, ya que en base a los resultados, las células del epitelio oral funcionaron como sustrato para la adhesión bacteriana, aclarando que no son el tipo de célula blanco de los microorganismos, pero que por su localización puede ser un sitio inicial para que las bacterias entren al tracto respiratorio superior y posteriormente invadir y colonizar el tracto respiratorio inferior.

El segundo objetivo se cumplió ya que se demostró que la adhesión a las CBE esta mediada por FN, ya que al eliminar esta de la célula la adhesión bacteriana disminuye en todas las cepas probadas. Además se identificaron para cada uno de los microorganismos FNbp que la reconocen cuando esta glicoproteína esta peroxidada.

9. CONCLUSIONES.

1.- *M. haemolytica* A1, *M. haemolytica* A2 y *P. multocida* A se adhieren a fibronectina (FN) de la matriz extracelular (MEC), de células bucoepiteliales (CBE) de bovinos en gran cantidad. La cantidad de FN que se encuentra en la MEC de cada CBE es muy variable, así como en las diferentes células que se colectan al obtenerla muestra, lo que influye, en la cantidad de bacterias que se adhieren a las mismas.

2.- La adhesión de los microorganismos es específica, pues esta fue mayor en las CBE aisladas de la misma especie animal de donde se obtuvieron las bacterias.

2.- *M. haemolytica* A1, *M. haemolytica* A2 y *P. multocida* A se adhieren de forma rápida y a bajas concentraciones a la FN purificada, mostrando una saturación a bajas concentraciones y en 90 min.

3.- Los 2 serotipos de *M. haemolytica* (A1 y A6) así como *P. multocida* A, específicos de bovino, se unen a FN de plasma bovino mediante PME de 26 kDa para los 2 serotipos de *M. haemolytica* y de 44 kDa para *P. multocida* A.

10. LITERATURA.

- 1.- Verma R, Jaiswal TN. Haemorrhagic septicaemia vaccines. *Vaccine* 1998;16(11-12):1184-1192.
- 2.- Bowland SL, Shewen PE. Bovine respiratory disease: Commercial vaccines currently available in Canada. *Can Vet J* 2000;41:33-48.
- 3.- Callan RJ, Garry BF. Biosecurity and bovine respiratory disease. *Vet Clin Food Anim* 2002;18:57-77.
- 4.- Hurd HS, Kaneene JB. The national animal health monitoring system in Michigan. II. Methodological issues in the estimation of frequencies of diseases in a perspective study of multiple dynamic population. *Prev Vet Med* 1990;8:115-125.
- 5.- Confer WA. *Pasteurella haemolytica* en foro veterinario bovino. *Veterinary Learning System Co. Inc.* 1992;7:1-17.
- 6.- Pijoan AP, Chávez DJA. Costos provocados por neumonías en becerras lecheras para reemplazo, mantenidas bajo dos sistemas de alojamiento. *Vet Mex* 2003;34(4): 333-342.
- 7.- Dutil L, Fecteau G, Bouchard E, Dutremblay D, Paré J. A questionnaire on the health, management, and performance of cow-calf herds in Québec. *Can J Vet* 1999;40:649-656.
- 8.- Trigo F. Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelisis pulmonar bovina. *Vet Mex* 1991;22(2):31-134.
- 9.- Morales AJ, Jaramillo ML, Oropeza VZ, Tórtora PJ, Trigo TF, Espino RG. Evaluación experimental de un inmunógeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos. *Vet Mex* 1993;24(2):97-105.
- 10.- Juárez F. Estudio patológico, microbiológico y epidemiológico de enfermedades respiratorias en bovinos de engorda en Sinaloa, Mex. (tesis de maestría) México (D. F.) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2001.
- 11.- Bonilla RLF. Adherencia específica “*in vitro*” de cepas de *Pasteurella multocida* a células del tracto respiratorio superior del conejo. (tesis de maestría). México (D. F.) México: Universidad Nacional Autónoma de México. 1989.
- 12.- Jacques M, Paradis S. Adhesin-receptor interactions in *Pasteurellaceae*.

FEMS Microbiol Rev 1998;22:45-59.

13.- Serrano RLE. Participación de componentes aislados de *Mannheimia haemolytica* en el mecanismo de adhesión a cortes de tejido y arteria pulmonar de ovino; y en una línea celular vero. (tesis de maestría). México (D. F.) México: Universidad Nacional Autónoma de México. 2003.

14.- Pijoan PA, Aguilar RF, Morales AJ. Caracterización de los procesos neumónicos en becerros de la región de Tijuana, Baja California, México. 1999;30(2):149-155.

15.- Lo RYC. Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. Vet Microbiol 2001;83:23-35.

16.- Virtala AK, Mechor GD, Grohn YT, Erb HN, Dubovi EJ. Epidemiologic and pathologic characteristics of respiratory tract disease in dairy heifers during the first three month of life. J Am Vet Med Assoc 1996;208:2035-2042.

17.- de la Rosa RJL. Frecuencia de neumonías bacterianas asociadas con *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) en bovinos del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca (CAIT), estado de Hidalgo. (tesis de licenciatura) México (D. F.) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2004.

18.- Fillion LG, Wilson PJ, Bielefeldt-Ohmann H, Babiuk LA, Thomson RG. The possible role of stress in the induction of pneumonic pasteurellosis. Can J Com Med 1984;48:268-274.

19.- Trigo F. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. En: Moreno CR, editor. UNAM. México. Cien Vet. 1987;4:1-36.

20- González RC. Perfil serológico contra antígenos de *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* en corderos clínicamente enfermos de neumonía y desafiados experimentalmente (tesis de maestría). México (D. F.) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2002.

21.- Purdy CW, Raleigh RH, Collins JK, Watts JL, Straus DC. Serotyping and enzyme characterization of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolates recovered from pneumonic lungs of stressed feeder calves. Current Microbiol 1997;34:244-249.

- 22.- Dabo SM, Debey BM, Montelongo M, Confer AW. Genomic DNA restriction site heterogeneity in bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates detected with an rRNA probe. J Med Microbiol 1999;48:279-286.
- 23.- Morales JF, Ayala D, Jaramillo L, Trigo FJ. Evaluación de la fagocitosis, efecto bactericida y citotoxicidad de *Pasteurella haemolytica* y *Pasteurella multocida* en macrófagos alveolares de bovinos. Rev Lat-Amer Microbiol 1994;36:57-66.
- 24.- Narayanan SK, Nagaraja TG, Chengappa MM, Stewart GC. Leukotoxins of gram-negative bacteria. Vet Microbiol 2002;84:337-356.
- 25.- Dowling A, Hodgson JC, Dagleth 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 and Immunopathol 2004;100:197-207.
- 26.- Lo RYC, Shewen PE. The genus *Pasteurella* in: Barlows., Truper HG, Dworkin M, Hardr W, Schleifer KH, (Eds), The Prokariotes, 2a ed. Springer Toronto 1992.
- 27.- Angen O, Mutters R, Caugant DA, Olsen JE, Bisgaard M. Taxonomic relationships of the (*Pasteurella*) *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. Int J Syst Bacteriol. 1999;49:67-86.
- 28.- Bingham DP, Moore R, Richards AB. Comparison of DNA:DNA homology and enzymatic activity between *Pasteurella multocida* and related species. Am J Vet Res 1990;51:1161-1166.
- 29.- Sneath PHA, Stevens M. *Actinobacillus seminis* sp. Nov., nom. Rev., *Pasteurella bettii* sp. Nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. No., and *Pasteurella trehalosi* sp. Nos. Int J Syst Bacteriol 1990;40:148-153.
- 30.- Younan M, Fodor L. Characterization of a new *Pasteurella haemolytica* serotype (A17). Res Vet Sci 1995;58:98.

- 31- Carter GR. Studies on *Pasteurella multocida*. A hemoagglutination test for the identification of serological types. Am J Vet Res 1955;16:481-484.
- 32.- Hedleston KL, Gallagher JE, Rebers PA. Fowl cholera: gel, diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. Avian Dis 1972;16:925-936.
- 33.- Jones TO, Minns M, Pimler RB. Isolation of *Pasteurella multocida* F 3-4 from a calf in the United Kingdom. 1988;123(13):354-356.
- 34.- Rimler RB. Presumptive identification of *Pasteurella multocida* serogroups A, D and F by capsule depolymerisation with monopolysaccharidases, 1994;134:191-291.
- 35.- Trigo TF. Patología sistémica veterinaria. Tercera edición, McGraw-Hill Interamericana. México 1998.
- 36.- Jaramillo ML, Aguilar RF, Trigo TF. Serotipificación de *Pasteurella haemolytica* y determinación de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida* aislada de pulmones neumónicos de becerros en México. Vet Mex 1987;185-188.
- 37.- García HE, Trigo TF, Sánchez MH, Aguilar RF. Serotipos de *Pasteurella multocida* en bovinos productores de carne en México. Vet Mex 1988;19:199-203
- 38.- Jubb KV, Kennedy PC, Palmer N. Pathology of domestic animals. Vol. 2, Tercera edición. Academic Press. Inc. London 1991.
- 39.- Subronto P, Carter GR, Conner GH. Serologic study of bovine strains of *Pasteurella multocida* Am J Vet Res 1974;35:111-114.
- 40.- Blanco-Viera FJ, Trigo FJ, Jaramillo-Meza L, Aguilar-Romero F. Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from México. Rev Lat Amer Microbiol 1995;37:121-126.
- 41.- González CT, Maheswaran SK. The role of induced virulence factors produced by *Pasteurella haemolytica* in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis: review and hypotheses. Br Vet J 1993;149 (2):183-190.
- 42.- Tizard I. Inmunología veterinaria. 6ª edición. México: Interamericana McGraw-Hill. 2000.

- 43.- Wilson JW, Schurr MJ, LeBlanc CL, Ramamurthy R, Buchanan KL, Nickerson CA. Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgrad Med J* 2002;78:216-224.
- 44.- Rietschel ET, Brade H. Bacterial exotoxins. *Medicine* 1992:156-163.
- 45.- Klemm P, Schembri MA. Fimbrial surface display systems in bacteria: from vaccines to random libraries. *Microbiol* 2000;146:3025-3032.
- 46.- Sauer FG, Barnhart M, Choudhury D, Knight SD, Waksman G, Hultgren S. Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment. *Current Opinion in Structural Biology* 2000;10:548-556.
- 47.- Craigh L, Pique ME, Tainer JA. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Microbiol* 2004;2:363-378.
- 48.- Burrows LL, Olah-Winfield E, Lo CR. Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. *Infect Immun* 1993;61(12):50001-5007.
- 49.- Marciel AM, Highlander SK. Use of operon fusions in *Mannheimia haemolytica* to identify environmental and *cis*-acting regulators of leukotoxin. *Infect Immun* 2001;69:10 6231-6239.
- 50.- Castañeda RA. Tipificación de aislamientos de *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-like obtenidos de aves con enfermedad reproductiva y respiratoria (tesis de maestría). México (D.F) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2002.
- 51.- Brogden KA, Adlam C, Knights RC. Effect of *P. haemolytica* (A1) capsular polysaccharides on sheep lung *in vivo* and pulmonary surfactant *in vitro*. *Am J Vet Res* 1989;50:555-559
- 52.- Squire PG, Smiley DW, Croskell RB. Identification and extraction of *Pasteurella haemolytica* membrane proteins. *Infect Immun* 1984;45(3):667-673.
- 53.- Nelson SL, Frank GH. Purification and characterization of a 94-kDa *Pasteurella haemolytica* antigen. *Vet Microbiol* 1989;21:57-66.
- 54.- Davies RL, Baillie S. Citotoxic activity of *Mannheimia haemolytica* strains in relation to diversity of the leukotoxin structural gene *lktA*. *Vet Microbiol* 2003;92:263-279.

- 55.- McVicker JK, Tabatabai LB. Isolation of immunogenic outer membrane proteins from *Mannheimia haemolytica* serotype 1 by use of selective extraction and immunoaffinity chromatography. *AJVR* 2002;63(12):1634-1640.
- 56.- McNeil HJ, Shewen PE, Lo RYC, Conlon JA, Miller MW. *Mannheimia haemolytica* serotype 1 and *Pasteurella trehalosi* serotype 10 culture supernatants contain fibrinogen-binding proteins. *Vet Immun and Immunopath* 2002;90:107-110
- 57.- Trigo TF, Mateos PA. *Patología General Veterinaria*. 2ª ed. Interamericana McGraw-Hill. 1993, México.
- 58.- 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;70:8 4336-4343.
- 59.- Ackermann MR, Brodgen KA, Florance AF, Kehrli ME. Induction of CD18-mediated passage of neutrophils by *Pasteurella haemolytica* in pulmonary bronchi and bronchioles. *Infect Immun* 1999;67(2):659-663.
- 60.- Lee HY, Kehrli ME, Brodgen KA, Gallup JM, Ackermann MR. Influence of B2-integrin adhesion molecule expression and pulmonary infection with *Pasteurella haemolytica* on cytokine gene expression in cattle. *Infect immune* 2000;68(7):4274-4181.
- 61.- Thumbikat P, Briggs RE, Kaanan MS, Maheswaran SK. Biological effects of two genetically defined leucotoxin mutants of *Mannheimia haemolytica*. *Microb Pathogen* 2003;34:217226.
- 62.- Mork DW, Raybould TJG, Acres SD, Babiuk LA, Nelligan J, Costerton JW. Electron microscopic description of glycocalyx and fimbriae on the surface of *Pasteurella hamolytica*-A1. *Can J Vet Res* 1987;51:83-88.
- 63.- Mork DW, Watts TC, Acres SD, Costerton JW. Electron microscopic examination of cells of *Pasteurella haemolytica*-A1 in experimentally infected cattle. *Ca J Vet Res* 1988;52:343-348.
- 64.- Mork DW, Olson ME, Acres SD, Daoust PY, Costerton JW. Presence of bacterial glycocalyx and fimbriae on *Pasteurella haemolytica* in feedlot cattle with pneumonic pasteurellosis. *Can J Vet Res* 1989;53:167-171.

- 65.- Lee CW, Shewen PE, Cladman WM, Conlon JA, Mellors A, Lo RY. Sialoglycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1: detection of antisialoglycoprotease antibodies in sera of calves. *Can J Vet Res* 1994;58(2):93-8.
- 66.- Nyarko KA, Coomber BL, Mellors A, Gentry PA. Bovine platelet adhesion is enhanced by leukotoxin and sialoglycoprotease isolated from *Pasteurella haemolytica* A1 cultures. *Vet Microbiol* 1998;61(1-2):81-91.
- 67.- Jaramillo L, Diaz F, Hernandez P, Debray H, Trigo F, Mendoza G, Zenteno E. Purification and characterization of an adhesin from *Pasteurella haemolytica*. *Glycobiol* 2000;10(1):31-37.
- 68.- Starr AE, Dan T, Minhas K, Shewen PE, Coomber BL. Potential involvement of gelatinases and their inhibitors in *Mannheimia haemolytica* pneumonia in cattle. *Infect Immun* 2004;72:8 4393-4400.
- 69.- Muniandy N, Edgar J, Woolcock JB, Mukkur TK. Virulence, purification, structure, and protective potential of putative capsular polysaccharide of *Pasteurella multocida* type 6:B In: Patten BE, Spencer TL, Johnson RB, Lehane HD. (Eds.), *The international Workshop on Pasteurellosis in Production Animals* 1992 Bali Indonesia.
- 70.- Pruijboom IM, Rimler RB, Ackermann MR. Enhanced adhesion of *Pasteurella multocida* to cultured turkey peripheral blood monocytes. *Infect Immun* 1999;67(3):1292-1296.
- 71.- Maheswaran SK, Thies ES. Influence of encapsulation on phagocytosis of *Pasteurella multocida* by bovine neutrophils. *Infect Immun* 1979;26:76-81
- 72.- Ryu H, Kaeberle ML, Roth JA, Griffith RW. Effect of type A *Pasteurella multocida* fractions on bovine polymorphonuclear leucocyte functions. *Infect Immun* 1984;43(1):66-71.
- 73.- Boyce JD, Adler B. The capsular is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infect Immun* 2000;68(6):3463-3468.
- 74.- Ogunnariwo JA, Schryvers AB. Characterization of a novel transferring receptor in bovine strains of *Pasteurella multocida*. *J Bacteriol* 2001;183(3):890-896.

- 75.- Paustian ML, May BJ, Cao D, Boley D, Kapur V. Transcriptional response of *Pasteurella multocida* to defined iron sources. J Bacteriol 2002;184(23):6714-6720.
- 76.- Borkowska-Opacka B, Kedrak A. Expression of iron-regulated outer membrane proteins (IROMPs) by *Pasteurella multocida* strains isolated from cattle. Bull Vet Inst Pulawy 2002;46:157-164.
- 77.- Borkowska-Opacka B, Kedrak A. Evaluation of immunogenicity of outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* serotype B:2,5 in cattle. Bull Vet Inst Pulawy 2003;47:377-385.
- 78.- Bosch M, Garrido ME, Llagostera M, Pérez de Rozas AM, Badiola I, Barbé J. Characterization of the *Pasteurella multocida* hgbA gene encoding a hemoglobin-binding protein. Infect Immun 2002;70(11):5955-5964.
- 79.- Braun V. Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. FEMS Microbiol Rev 1995;16:295-307.
- 80.- Goswami PP, Chaudhuri P, Tiwari V, Parihar NS, Harbola PC. Cloning and sequencing of a 16 kDa outer membrane protein gene of *Pasteurella multocida* P52. Vet Res Communications 2004;28:17-25.
- 81.- Roy SC, More T. Antibacterial activity of buffalo polymorphonuclear cationic peptides on *Pasteurella multocida*. Indian J Animal Science 2003;73(10):1114-1117.
- 82.- Borrathybay E, Sawada T, Kataoka Y, Ohtsu N, Takagi M, Nacamura S, Kawamoto E. A 39 kDa protein mediates adhesion of avian *Pasteurella multocida* to chicken embryo fibroblast cells. Vet Microbiol 2003;97:229-243.
- 83.- Borrathybay E, Sawada T, Kataoka Y, Okiyama E, Kawamoto E, Amao H. Capsule thickness and amounts of a 39 kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* type A strains correlate with their pathogenicity for chickens. Vet Microbiol 2003;97:215-227.
- 84.- Kedrak A, Borkowka-Opacka B. Immunological response to outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* serotype A:3 in calves. Bull Vet Inst Pulawy 2003;47:387-394.

- 85.- Fuentes RM, Pijoan AC. *Pasteurella multocida* fimbriada como agente desencadenante de pleuritis y neumonía fibrinosa en cerdos. Vet Mex 1992;23(3):231-233.
- 86.- 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, lung and aorta of rabbits. Vet J 2000;159:274-281.
- 87.- Glorioso JC, Jones GW, Rush HG, Pentler LJ, Darif CA, Coward JE. Adhesion of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infections. Infect Immun 1982;35(3):1103-1109.
- 88.- Rebers PA, Jensen AE, Laird GA. Expression of pili and capsule by the avian strain P-1059 of *Pasteurella multocida*. Avian diseases 1988;32:313-318.
- 89.- Ruffolo CG, Tennet JM, Michalsky WP, Adler B. Identification, purification, and characterization of the 4 fimbriae of *Pasteurella multocida*. Infect Immun 1997;65:339-343.
- 90.- Doughty SW, Ruffolo CG, Adler B. The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol 2000;72:79-90.
- 91.- Horadagoda UN, Hodgson JC, Moon GM, Eckersall PD. Role of endotoxins in the pathogenesis of haemorrhagic septicaemia in buffalo. Microbiol. Pathol. 2001;30(3):171-178.
- 92.- Lax AJ, Grigoriadis AE. *Pasteurella multocida* toxins: the mitogenic toxin that stimulates signalling cascades to regulate growth and differentiation. Int J Med Microbiol 2001;291(4):261-268.
- 93.- Negrete-Abascal E, Tenorio VR, de la Garza M. Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolates. Current Microbiol 1999;38:64-67.
- 94.- Maeda H. Role of microbial proteases in pathogenesis. Microbiol Immunol 1996;40:685-699.
- 95.- White DJ, Jolley WL, Purdy CW, Straus DC. Extracellular neuraminidase production by a *Pasteurella multocida* A3 strain associated with bovine pneumonia. Infect Immun 1995;63(5):1703-1709.

- 96.- Straus DC, Unbehagen PJ, Purdy CW. Neuraminidase production by a *Pasteurella haemolytica* A1 strain associated with bovine pneumonia. *Infect Immun* 1993;61(1):253-259.
- 97.- Straus DC, Jolley WL, Purdy CW. Characterization of neuraminidases produced by various serotypes of *Pasteurella multocida*. *Infect Immun* 1996;64(4):1446-1449.
- 98.- Straus DC, Purdy CW, Loan RW, Briggs RF, Frank GH. In vivo production of neuraminidase by *Pasteurella haemolytica* in market stressed cattle after natural infection. *Curr Microbiol* 1998;37:240-244.
- 99.- El-Eragi AMS, Mukhtar MM, Babiker SH. Specific antibodies of *Pasteurella multocida* in newborn calves of vaccinated dams. *Trop Anim Health Product* 2001;33:275-283
- 100.- 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.
- 101.- Confer AW. Immunogens of *Pasteurella*. *Vet Microbiol* 1993;37:353-368.
- 102.- Confer AW, Panciera RJ. Testing of two new generation *Pasteurella haemolytica* vaccines experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Agri-Pract* 1994;15(8):10-15.
- 103.- Srinand S, Maheswaran SK, Ames TR, Werdin RE, Hsuan SL. Evaluation of efficacy of three commercial vaccines against experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Vet Microbiol* 1996;52:81-89.
- 104.- Jones TO, Myint A, Carter GR. Live hemorrhagic septicaemia vaccine for cattle and buffaloes. *Vet Rec* 2000;150:120.
- 105.- Mathy NL, Mathy JPD, Lee RP, Walker J, Lofthouse S, Meeusen ENT. Pathological and immunological changes after challenge infection with *Pasteurella multocida* in naive and immunized calves. *Vet Immunol and Immunopathol* 2002;85:179-188.

- 106.- Carter GR, Myint A, Van Khar R, Khin A. Immunisation of cattle and buffaloes with live haemorrhagic septicaemia vaccine. *Vet Rec* 1991;129:203
- 107.- Confer AW, Panciera RJ, Corstvet RE, Rummage JA, Fulton RW. Bovine pneumonic pasteurellosis: Effect of culture age of *Pasteurella haemolytica* used as alive vaccine. *Am J Vet Res* 1984;45(12):2543-2545.
- 108.- Panciera RJ, Corstvet RE, Confer AW, Gresham MPH. Bovine pneumonic pasteurellosis: Effect of vaccination with live *Pasteurella* species. *Am J Vet Res* 1984;45(12):2538-2542.
- 109.- Dougan G. The molecular basis for the virulence of bacterial pathogens: implications for oral vaccine development. *Microbiology* 1994;140:215-224.
- 110.- Rimler RB, Phillips M. Fowl cholera: protection against *Pasteurella multocida* by ribosome-lipopolysaccharide vaccine. *Avian Dis* 1986;30:409-415.
- 111.- Marchant J, Rehagen M, Dropmann G, Szostak MP, Alldinger S, Lechleitner S, Schlapp T, Resch S, Lubitz W. Protective immunity against pasteurellosis in cattle, induced by *Pasteurella haemolytica* ghosts. *Vaccine* 2003;21:1415-1422.
- 112.- Marchant J, Dropmann G, Lechleitner S, Schlapp T, Wanner G, Szostak MP, Lubitz W. *Pasteurella multocida*- and *Pasteurella haemolytica*-ghosts: new vaccine candidates. *Vaccine* 2003;21:3988-3997.
- 113.- Burns KE, Ruiz J, Glisson R. Evaluation of the effect of heating and oil-emulsion *Pasteurella multocida* bacterin on tissue reaction and immunity. *Avian diseases* 2003;47:54-58.
- 114.- Mercado E, Rosado A. Moléculas de adhesión celular. *Ciencia* 1994;45:339-358.
- 115.- Westerlund B, Korhonen TK. Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. *Mol Microbiol* 1993;9(4):687-694.
- 116.- Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganism to hot tissues. *Annu Rev Microbiol* 1994;48:585-617.
- 117.- Isberg RR, Van Nhieu GT. Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors. *Trends Microbiol* 1994;2:10-14.
- 118.- Ruoslahti E. Stretching is good for a cell. *Science* 1997;276:1345-1346.
- 119.- Hynes RO. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* 1987;48:549-554.

- 120.- Mueller SC, Kelly T, Dai M, Dai H, Chen WT. Dynamic cytoskeleton-integrin associations induced by cell binding to immobilized fibronectin. *The J Cell Biol* 1989;10(6):3455-3464.
- 121.- Ruoslahti E, Hayman EG, Pierschbacher M, Engvall E. Fibronectin: Purification, immunochemical properties, and biological activities. *Methods Enzymol* 1982;82:803-831.
- 122.- Hay ED. *Cell Biology of extracellular matrix*. 2a ed. Plenum Press, Nueva York, EUA. 1991.
- 123.- Potts JR, Campbell ID. Structure and function of fibronectin modules. *Mat Biol* 1996;15:313-320.
- 124.- Campbell ID, Spitzfaden C. Building proteins with fibronectin type III modules. *Structure* 1994;2:333-337.
- 125.- Schwarz-Linek U, Höök M, Potts JR. The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. *Mol Microbiol* 2004;52(3):631-641.
- 126.- Ito HO, Soutome S, Nokihara K, Inoue M. Identification and characterization of bacterial-binding property in the type III repeat domain of fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:347-353.
- 127.- Katerov V, Andreev A, Schalén C, Totolian AA. Protein F, a fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, also binds human fibrinogen: isolation of the protein and mapping of the binding region. *Microbiol* 1998;144:119-126.
- 128.- Reddy K, Ross JM. Shear stress prevents fibronectin binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* adhesion to resting endothelial cells. *Infect Immun* 2001;69:3472-3475.
- 129.- Dabo SM, Confer AW, Quijano-Blas RA. Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. *Microb Pathog* 2003;35:147-157.
- 130.- Hamer-Barrera R, Godínez D, Enríquez VI, Vaca-Pacheco S, Martínez-Zúñiga R, Talamás-Rohana P, Suárez-Güemes 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.

- 131.- Giron JA, Lange M, Baseman JB. Adherence, fibronectina binding, and induction of cytoskeleton reorganization in cultured human cells by *Mycoplasma penetrans*. *Infect Immun* 1996;64:197-208.
- 132.- Dallo SF, Kannan TR, Blaylock MW, Baseman JB. Elongation factor Tu and E1 β subunit of pyruvate dehydrogenasa complex act as fibronectina binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbio* 2002;46(4):1041-1051.
- 133.- Marcantonio EE, Hynes RO. Antibodies to the conserved cytoplasmic domain of the integrin β 1 subunit react with proteins in vertebrates, invertebrates and fungi. *J Cell Biol* 1998;106:1765-1772.
- 134.- Talamás-Rohana P, Meza I. Interaction between pathogenic amebas and fibronectina: substrate degradation and changes in cytoskeleton organization. *J Cell Biol* 1988;106:1787-1794.
- 135.- Crouch ML, Benchimol M, Alderete JF. Binding of fibronectin by *Trichomonas vaginalis* is influenced by iron and calcium. *Microb Pathog* 2001;31:131-144.
- 136.- Woods DE, Straus DC, Johanson WG. Factors influencing the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mammalian buccal epithelial cells. *Rev Infect Dis* 1983;5:846-851.
- 137.- Secott TE, Lin TI, Wu CC. Fibronectin attachment protein homologus mediates fibronectina binding by *Mycobacterium avian* subsp. *paratuberculosis*. *Infect Immun* 2001;69(4):2075-2082.
- 138.- Rubiere-Huët J, Di Martino P, Hulen C. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to fibronectin by PA-IL and monosaccharides: involvement of a lectin-like process. *Can J Microbiol* 2004;50:305-312.
- 139.- Palmqvist N, Foster T, Fitzgerald JR, Josefsson E, Tarkowski A. Fibronectin-binding protein and fibrinogen-binding cumpling factors play distinct roles in Staphylococcal arthritis and systemic inflammation. *J Infect Dis* 2005;191(1):791-798.
- 140.- Foster TJ, Höök M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 1998;6:484-488.
- 141.- Cucarella C, Tormo AM, Knecht E, Amorena B, Lasa I, Foster TJ, Penadés JR. Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein

receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. Infect Immun 2002;70(6):3180-3186.

142.- Fowler T, Wann ER, Joh D, Johansson S, Foster TJ, Höök M. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell β 1 integrins. Eur J Cell Biol 2000;79:672-679.

143.- Roche FM, Downer R, Keane F, Speziale P, Park PW, Foster TJ. The N-terminal A domain of fibronectin binding proteins A y B promotes adhesion of *Staphylococcus aureus* to elastin. J Biol Chem 2004;279(37):38433-38440.

144.- Schorey JS, Holsti MA, Ratliff TL, Allen PM, Brown EJ. Characterization of the fibronectin-attachment protein of *Mycobacterium avium* reveals a fibronectin-binding motif conserved among mycobacteria. Mol Microbiol 1996;21:321-329.

145.- Virji M. Microbial utilization of human signalling molecules. Microbiol 1996;142:3319-3336.

146.- Konkel ME, Garbis SG, Tpton SL, Anderson DE, Cieplak WR. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. Mol Microbiol 1997;24:953-963.

147. Davies RL Lee I. Sequence diversity and molecular evolution of the heat-modifiable outer membrane protein gen (*ompA*) of *M. (Pasteurella) haemolytica*, *Mannheimia glucosida* y *Pasteurella trehalosi*. J Bacteriol 2004;186(17):5741-5752.

Collison SK, Doig PC, Doran JL, Clouthier S, Trust TJ, Kay WW. Thin, aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. J Bacteriol 1993;175(1):12-18.

148. Woods DE, Straus DC, Johanson WG Jr, Boss JA. Role of fibronectin in the prevention of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to buccal cells. J Infect Dis 1981;143:784-790.

149.- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-254.

150.- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685.

- 151.- Riezu-Boj JI, Moriyon I, Blasco JM, Gamazo C, Díaz R. Antibody response to *Brucella ovis* outer membrana proteins in ovine brucellosis. *Infect Immun* 1986;58:489-494.
- 152.- Dabo SM, Store D, CONFER AW, Murphy GL. Expresión, purification and immunologic análisis of *Pasteurella haemolytica* A1 28-30 kDa lipoproteins. *Microbiol Pathogen* 1994;17:149-158.
153. Avrameas, Ternynck. Peroxidase labeled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry* 1971;8(12):1175-1179.
154. Toubin H and Gordon J. Immunoblotinn and dot immunoblot. *Current. Status and out luck. J Immunol* 1984;72:313.
- 155.- López GMA. Purificación de fibronectina ovina y su participación en la adhesión de *Mannheimia haemolytica* serotipo A2 con células bucoepiteliales de ovino. (tesis de licenciatura). Cuautitlan Izcalli (Edo Mex) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2006.
- 156.- Enríquez-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;150:1-10