



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE UNEN FIBRINÓGENO  
EN DIFERENTES MIEMBROS DE LA FAMILIA  
*Pasteurellaceae*”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGA**

PRESENTA:

**LÓPEZ RUIZ BRENDA ANABEL**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. SERGIO VACA PACHECO**

Esta tesis fue realizada con apoyo del PAPIIT

Proyecto IN216010

LOS REYES IZTACALA, EDO DE MEX

2011





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

*"Llegará un tiempo en que los seres humanos se contentarán con una alimentación vegetal y se considerará la matanza de un animal como un crimen, igual que el asesinato de un ser humano. Llegará un día en el que los hombres como yo, verán el asesinato de un animal como ahora ven el de un hombre. Verdaderamente el hombre es el rey de las bestias, pues su brutalidad sobrepasa la de aquellas. Vivimos por la muerte de otros.*

*Todos somos cementerios." Leonardo Da Vinci.*

*"Sólo cuando el último árbol esté muerto, el último río envenenado, y el último pez atrapado, te darás cuenta que no puedes comer dinero."*

*Sabiduría indoamericana*

## **La vida ese paréntesis**

Mario Benedetti

*Cuando el no ser queda en suspenso  
se abre la vida ese paréntesis  
con un vagido universal de hambre*

*somos hambrientos desde el vamos  
y lo seremos hasta el vámonos  
después de mucho descubrir  
y brevemente amar y acostumbrarnos  
a la fallida eternidad*

*la vida se clausura en vida  
la vida ese paréntesis  
también se cierra incurre  
en un vagido universal  
el último*

*y entonces sólo entonces  
el no ser sigue para siempre*

## ***AGRADECIMIENTOS***

A Dios, por permitirme este logro y llenarme de bendiciones.

A mi familia por ser el pilar de mi vida. A mi mamá por ser un ejemplo a seguir, con su gran fortaleza y paciencia. Eres una gran mujer. A mi papá por apoyarme durante toda mi carrera y saber que puedo contar siempre con él. A Nery por ayudarme con mis innumerables dudas técnicas y por su paciencia. Muchas gracias. A Jeany por mostrarme su entereza y valor, que me han servido de inspiración. A Haziél por ser tan carismático, alegre y con el que he compartido gran parte de mis sueños. Los quiero mucho.

A la UNAM por brindarme la oportunidad de instruirme en sus instalaciones y por becarme durante mi formación académica.

Al Doctor Sergio Vaca por su apoyo en la realización de este trabajo, por sus consejos, correcciones, charlas, datos culturales y por hacerme entender que los bichos no los son todo.

Al Doctor Erasmo Negrete por la ayuda en la realización de esta tesis, por sus conocimientos, apoyo, consejos y paciencia.

A mis compañeros y profesores de carrera, con los que he vivido esta grata experiencia que es estudiar biología

A mis amigos con los que disfrute tantas aventuras todas ellas inolvidables.

A Liz porque me enseñaste lo hermosa que es la vida, lo positivo de las cosas y el mostrarle siempre una sonrisa a la vida. A Edgar por la curiosidad y pasión que muestras en tus proyectos y logras transmitirme. A Adela por ser una gran persona con la que compartí momentos muy gratos y una amiga con la que siempre puedo contar. Son unos grandes amigos, muchas gracias.

A mis compañero de laboratorio: Mónica, Fernando, Ismael, Frank, Carlos y Karina, por estar ahí cuando los necesite, por enseñarme las técnicas y métodos del laboratorio y, además, por hacer más ameno el trabajo.

A Miguel, mi mejor amigo, compañero, cómplice y novio. Por ayudarme y estar siempre conmigo. Te iubesc, Jeg elsker deg, Ich liebe zu dich, Ti amo molto molto!!!! Y que nunca exista fuerza que rompa el complejo Brenda-Miguel.

Mosho: este trabajo también es tuyo  .

Este proyecto se realizó en el laboratorio de Genética de la UMF de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM y fue financiado por PAPIIT Proyecto IN216010 y PAPCA FESI-UNAM.

## INDICE

|  |    |
|--|----|
| <b>1. RESUMEN</b> .....                                    | 7  |
| <b>2. INTRODUCCIÓN</b>                                     |    |
| <b>2.1. Familia <i>Pasteurellaceae</i></b> .....           | 8  |
| <b>2.2. Género <i>Avibacterium</i></b> .....               | 8  |
| <b>2.2.1. <i>Avibacterium paragallinarum</i></b> .....     | 9  |
| <b>2.2.1.1. Factores de virulencia</b> .....               | 10 |
| <b>2.3. Género <i>Actinobacillus</i></b> .....             | 10 |
| <b>2.3.1. <i>Actinobacillus suis</i></b> .....             | 11 |
| <b>2.3.1.1. Factores de virulencia</b> .....               | 11 |
| <b>2.3.2. <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i></b> ..... | 12 |
| <b>2.3.2.1 Factores de virulencia</b> .....                | 12 |
| <b>2.4. Género <i>Gallibacterium</i></b> .....             | 13 |
| <b>2.4.1. <i>Gallibacterium anatis</i></b> .....           | 14 |
| <b>2.4.1.1. Factores de virulencia</b> .....               | 14 |
| <b>2.5. Adhesión</b> .....                                 | 15 |
| <b>2.6. Matriz extracelular</b> .....                      | 16 |
| <b>2.6.1. Plasma sanguíneo</b> .....                       | 17 |
| <b>2.6.1.1. Fibrinógeno</b> .....                          | 19 |
| <b>3. ANTECEDENTES</b> .....                               | 23 |
| <b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....                              | 24 |

---

|   |     |
|---|-----|
| <b>5. OBJETIVOS</b>                                   |     |
| 5.1. Objetivo general.....                            | 25  |
| 5.2. Objetivos particulares.....                      | 25  |
| <br>  |     |
| <b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>                          |     |
| 6.1. Cepas y medios de cultivo.....                   | 26  |
| 6.2. Proteínas secretadas.....                        | 26  |
| 6.3. Obtención de proteínas de membrana externa.....  | 26  |
| 6.4. Perfil proteico en SDS-PAGE.....                 | 27  |
| 6.5. Inmunorreconocimiento.....                       | 27  |
| 6.6. Biotinilización de fibrinógeno.....              | 27  |
| 6.7. Purificación de proteínas por afinidad.....      | 27  |
| 6.8. Inmunorreconocimiento con distintos sueros.....  | 28  |
| 6.9. Obtención de anticuerpos policlonales.....       | 28  |
| 6.10. Degradación de fibrinógeno.....                 | 28. |
| <br>  |     |
| <b>7. RESULTADOS</b>                                  |     |
| 7.1. Perfiles proteicos.....                          | 29  |
| 7.2. Proteínas que unen fibrinógeno.....              | 30  |
| 7.3. Purificación de la proteína de 60 kDa.....       | 30  |
| 7.4. Inmunorreconocimientos con distintos sueros..... | 32  |
| 7.5. Anticuerpo policlonal.....                       | 33  |
| 7.6. Degradación de fibrinógeno.....                  | 34  |
| <br>  |     |
| <b>8. DISCUSIÓN</b> .....                             | 35  |
| <br>  |     |
| <b>9. CONCLUSIÓN</b> .....                            | 40  |
| <br>  |     |
| <b>10. PERSPECTIVAS</b> .....                         | 41  |

|  |    |
|--|----|
| <b>11. BIBLIOGRAFIA</b> .....  | 42 |
| <b>12. ANEXOS</b>  |    |
| <b>12.1</b> Clasificación de la familia <i>Pasteurellaceae</i> .....                           | 50 |
| <b>12.2</b> Claves de identificación entre miembros de la familia <i>Pasteurellaceae</i> ..... | 52 |

## 1. RESUMEN

Los géneros *Avibacterium*, *Actinobacillus* y *Gallibacterium* pertenecen a la familia *Pasteurellaceae* y son conocidos por las enfermedades que causan en animales. Al invadir al hospedero interactúan con los componentes de la matriz extracelular por lo que las proteínas que unen fibrinógeno pueden ser importantes factores de virulencia de estos microorganismos.

En este trabajo se identificaron proteínas que unen fibrinógeno en extractos totales, sobrenadantes de cultivo y proteínas de membrana externa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, *Actinobacillus suis* ATCC 15555, *Avibacterium paragallinarum* serovar A, ATCC 0083, *Gallibacterium anatis*: F-149<sup>T</sup> y 12656-12.

Utilizando fibrinógeno de borrego biotinilado se identificaron dos proteínas, de aproximadamente 21 y 60 kD en todas las cepas. Mediante ensayos de purificación por afinidad de la proteína en placas de microtitulación de 96 pozos acopladas con fibrinógeno de borrego, se aisló una proteína de 60 kDa a partir de muestras de proteínas de membrana externa.

La proteína de 60 kDa fue reconocida por diferentes anti-sueros: contra vesículas de membrana de *A. pleuropneumoniae*, suero de aves infectadas experimentalmente con *Gallibacterium anatis*, una anti-proteasa de *A. pleuropneumoniae*, una anti-hemaglutinina de *Avibacterium paragallinarum* y transferrina biotinilada

La capacidad de las cepas bacterianas para degradar fibrinógeno se comprobó utilizando distintos componentes bacterianos incubados a 37°C por 24 horas.

De esta forma, la captación de fibrinógeno, la capacidad de degradarlo y su reconocimiento en distintos sueros podrían contribuir a la patogenicidad de estos microorganismos.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Familia *Pasteurellaceae*

La familia *Pasteurellaceae* comprende bacterias Gram negativas, generalmente de formas cocoides o bacilares, anaerobias facultativas, con tamaños de entre 0.2 – 0.4 µm de diámetro, normalmente oxidasa positivas que tienen requerimientos nutricionales de varias clases (Mannheim, 1979). Los miembros de esta familia son conocidos por las enfermedades que causan en humanos y animales e incluyen 65 especies agrupadas en 13 géneros (Bonaventura, *et al.*, 2010). Los géneros que integra son:

1. *Pasteurella*
2. *Actinobacillus*
3. *Haemophilus*
4. *Lonpinella*
5. *Mannheimia*
6. *Phocoenobacter*
7. *Gallibacterium*
8. *Histophilus*
9. *Volucribacter*
10. *Avibacterium*
11. *Nicoletella*
12. *Aggregatibacter*
13. *Bibersteinia*

Dentro de las características que confieren patogenicidad a las bacterias se encuentran la cápsula, los lipopolisacáridos (LPS) de la pared celular, las toxinas y adhesinas, entre otras.

### 2.2 Género *Avibacterium*

Este género incluye bacterias Gram-negativas, en forma de barra o pleomórficas, con células individuales y en parejas o en cadenas cortas. Las colonias son no hemolíticas crecidas en agar sangre, de color grisáceo, no transparente.

Algunas cepas muestran crecimiento simbiótico. La producción de pigmento es variable, sin formación de endosporas. El crecimiento es mesófilo y anaerobio facultativo o microaerófilo. Son oxidasa positivo y reducen nitratos. La reacción en medio Hugh –Leifson con D-glucosa es fermentativa sin producción de gas. Dan positivo a las pruebas de porfirina y de alanina aminopeptidasa y negativo a las pruebas de citrato de Simmons, malonato, triple azúcar hierro (TSI), Voges-Proskauer, rojo de metilo y ureasa. Además presentan reacción negativa con arginina deshidrolasa, lisina descarboxilasa, fenilalanina desaminasa, indol y gelatinasa. Forman ácido a partir de D-fructosa, D-manosa y sacarosa y no lo forman a partir de meso-eritritol, adonitol, L-xilosa, dulcita, D-fucosa, celobiosa, D-glucógeno, inulina, esculina, amigdalina o D-turanosa. No ocurre crecimiento en agar MacConkey (Blackall, *et al.*, 2005).

Cuenta con 5 especies: *Avibacterium gallinarum* (especie tipo), *A. avium*, *A. endocarditidis*, *A. volantium* y *A. paragallinarum* (<http://www.the-icsp.org/taxa/Pasteurellaceae/Avibacterium.html>)

### **2.2.1 *Avibacterium paragallinarum***

*Avibacterium paragallinarum* (antes *Haemophilus paragallinarum*) es una bacteria cocobacilar, nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) dependiente o no, catalasa negativa y oxidasa positiva (Blackall, *et al.*, 2005). Coloniza el tracto respiratorio superior de aves de corral (Mannheim, 1979), siendo el agente causal de la coriza infecciosa. Esta enfermedad se caracteriza por producir descarga nasal, edema facial, lagrimeo y conjuntivitis, es considerada una enfermedad cosmopolita y en México se han registrado casos en Jalisco, Michoacán, Morelos, Puebla y Sonora (Soriano, *et al.*, 2001)

El impacto económico de esta infección radica en pérdidas para la avicultura, debido a que provoca en las aves: pérdida de peso, retraso en el crecimiento y baja en la puesta de huevo hasta un 40% (Blackall y Soriano, 2008). La transmisión es horizontal por el contacto entre las aves, ya sea de forma directa o indirecta.

*A. paragallinarum* es una bacteria no invasiva, presente comúnmente en las células ciliadas de las vías respiratorias altas, por lo que su presencia en otros tejidos se asocia a otros agentes infecciosos o a la baja inmunidad del hospedero (Sandoval, *et al.*, 1994)

### 2.2.1.1 Factores de virulencia

El principal componente de *A. paragallinarum* (*Avpg*) relacionado con su patogenicidad es la hemaglutinina. Estas hemaglutininas median la adhesión a las células epiteliales de la tráquea y son utilizadas para la clasificación serológica de este microorganismo. Cepas mutantes sin esta estructura no son antigénicas ni patogénicas (Yamaguchi *et al.*, 1993). Otros factores de virulencia de este microorganismo son:

- La presencia de cápsula. Protege al microorganismo contra de los mecanismos de defensa del hospedero (Sawata, *et al.*, 1985)
- Lipopolisacáridos. Los extractos de lipopolisacáridos de *Avpg* poseen componentes tóxicos que provocan hipercardia tras la inoculación vía intravenosa en gallinas (Blackall, 1995)
- Hemocina. La producción de esta bacteriocina puede ser un factor de colonización en los tejidos al inhibir el crecimiento de diversas bacterias (Terryt *et al.*, 2003)
- Posible RTX semejante a la *Apxl* de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Mena, *et al.*, 2004)
- Proteasas que catalizan la hidrólisis total o parcial de inmunoglobulinas tipo G de pollo, que presentan reactividad cruzada en sueros policlonales contra metaloproteasas de *A. pleuropneumoniae* (Rivero, *et al.*, 2005)
- *Avpg* crecida bajo condiciones de restricción de hierro incrementa la expresión de proteínas de membrana externa de 60, 68 y 93 kDa, identificadas como receptores de transferrina y proteínas de transporte de hierro, reguladas por la proteína Fur. (Negrete, *et al.*, 2009)

### 2.3 Género *Actinobacillus*

Las primeras descripciones del género *Actinobacillus* fueron realizadas en 1902 por Lignières Spitz en después de estudiar múltiples abscesos subcutáneos en la cabeza y cuello del ganado en Argentina, al notar que el agente infeccioso no era el ya conocido *Actinomyces bovis* (Ricroft and Garside, 2000). Actualmente este género cuenta con 18 especies (<http://www.the-icsp.org/taxa/Pasteurellaceaelist.htm>); sin embargo, existen seis miembros que se reconocen

como causa importante de enfermedades en animales: *A. lignieresii*, *A. suis*, *A. equuli*, *A. seminis*, *A. pleuropneumoniae* y *A. capsulatus* (Ricroft and Garside, 2000).

Las características colectivas del grupo *Actinobacillus* son: pleomórficos, no mótiles, producen β-galactosidasa, fermentan carbohidratos sin producción de gas. Los aislamientos de *Actinobacillus* presentan una reacción variable en las pruebas de catalasa y oxidasa. No convierten el triptófano en indol, pero reducen el nitrato a nitrito.

### 2.3.1 *Actinobacillus suis*

Fue descrito a partir de aislados de cerdos enfermos en 1962 (VanDorseeen and Jaartsveld, 1992) y tradicionalmente ha sido asociado a enfermedades esporádicas de septicemia en cerdos jóvenes, siendo comensal del tracto respiratorio. Sin embargo recientemente se ha relacionado con una variedad de condiciones clínicas como neumonía, artritis y septicemia fatal en animales viejos (Jeannotte, 2002).

*Actinobacillus suis* presenta una forma bacilar, es patógeno de cerdos, caballos y se ha aislado de animales domésticos como gatos y perros. La infección causada por *A. suis* se ha asociado con diversos signos clínicos como: tos, debilidad, disnea, fiebre, abscesos, abortos, hemorragias en los oídos, abdomen y piel e incluso muerte repentina sobre todo en animales jóvenes (Slavic, *et al.*, 2000)

Las lesiones patológicas incluyen varios tipos de neumonía, pleuritis, pericarditis, miocarditis, endocarditis, artritis, mastitis, fluidos en cavidades del cuerpo, focos blanquecinos, de necrosis hepática y linfadenopatía en cerdos lactantes y adultos (MacInnes and Desrosiers, 1998)

#### 2.3.1.1 Factores de virulencia

*A. suis* Presenta factores de virulencia similares a otras bacterias Gram negativas:

- ✓ Cápsula, es la responsable de provocar una respuesta inmune en pulmón.
- ✓ Lipopolisacáridos. Se han descrito dos tipos diferentes de antígenos LPS (O). Las bacterias que portan el serotipo O2 se relacionan con infecciones severas, a diferencia a las producidas por el serotipo O1 (Slavic, *et al.*, 2000)

- ✓ Toxinas que forman poros (Jeannotte, 2002). Las toxinas hemolíticas/citolíticas producidas por este microorganismo están estrechamente relacionadas con las toxinas ApxI y ApxII de *A. pleuropneumoniae*
- ✓ Posee la habilidad de adquirir hierro mediante receptores de transferrina porcina (Bahrami, *et al.*, 2003)

### 2.3.2 *Actinobacillus pleuropneumoniae*

*Actinobacillus pleuropneumoniae* (App), un cocobacilo pleomórfico, que no produce indol y es NAD dependiente, es un huésped obligatorio del tracto respiratorio porcino, y es el agente etiológico de la pleuroneumonía contagiosa porcina (Biberstein and Hirsh, 1999). No ha sido aislado de roedores, seres humanos, ni aves, y no persiste en el medio ambiente (Enriquez, *et al.*, 2003).

La pleuroneumonía contagiosa porcina es una enfermedad grave en cerdos de todas las edades produciendo alta mortalidad (20-80%) y morbilidad (100%), por consiguiente, ocasiona grandes pérdidas económicas a la industria de producción del cerdo a nivel mundial (Enriquez, *et al.*, 2003). Se manifiesta como hiperaguda, aguda o crónica, siendo las dos primeras características de una neumonía hemorrágica necrosante asociada a pleuritis fibrinosa y la lesión crónica se distingue por tejido pulmonar necrosante más pequeño, consolidado, infartado y encapsulado (Haesebrouk, *et al.*, 1997)

Esta enfermedad está ampliamente esparcida en nuestro país. A partir de 1976 se presentaron brotes de pleuroneumonía porcina, producidos por los serotipos 1-8, en: Distrito Federal, Tlaxcala, Michoacán, Jalisco, Puebla, Yucatán, Guanajuato, Querétaro, Estado de México y Sonora (Ciprián, *et al.*, 1995).

#### 2.3.2.1 Factores de virulencia.

La patogénesis de este microorganismo es multifactorial, ya que cuenta con diversos factores de virulencia tales como: cápsula, lipopolisacáridos, adhesinas, proteasas y exotoxinas (Enriquez, *et al.*, 2003)

- Cápsula. Es la responsable de la especificidad del serotipo de *App* y se reconocen 13 serotipos del biotipo 1 debido a la presencia de antígeno capsular. La virulencia por la cápsula es variable en cada serotipo.
- Lipopolisacárido. De manera similar a los de otro tipo de bacterias Gram negativas, el LPS de *App* tiene actividad de endotoxina, induce la liberación de mediadores proinflamatorios y estos mediadores activan varias células, como macrófagos y neutrófilos. La administración de LPS de *A. pleuropneumoniae* a cerdos induce neumonía no necrosante con infiltración de neutrófilos.
- Exotoxinas. Se han identificado cuatro tipos de citotoxinas en *App*, denominadas toxinas Apx, que pertenecen a la familia de las toxinas RTX formadoras de poros. Las toxinas Apx son el principal factor de virulencia y en su ausencia la cepa de *App* es avirulenta (Shin, *et al.*, 2011).
- Proteasas. *App* secreta enzimas proteolíticas hacia el medio de cultivo y éstas tienen actividad sobre varios sustratos como son la gelatina y hemoglobina. Las proteasas de esta bacteria patógena son metaloproteasas neutras y se proponen como un factor de virulencia, ya que pueden facilitar la colonización del hospedero por este microorganismo (Negrete *et al.*, 1994).
- Adhesinas. El Lipopolisacárido es una importante adhesina necesaria para el anclaje de *App* y se han propuesto algunos receptores posibles. Así mismo, se ha demostrado la presencia de fimbrias tipo IV que están localizadas en la superficie de las cepas de *App*; sin embargo, su papel en la adhesión no ha sido establecido (Enriquez, *et al.*, 2003).
- Vesículas membranales. *App* libera vesículas membranales que contienen proteasas y toxinas Apx (Negrete, *et al.*, 2000).

## 2.4 Género *Gallibacterium*

Este género agrupa bacterias antes conocidas como *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus salpingitis* y *Pasteurella anatis*. Las especies que se integran actualmente en este género son: *G. melopsittaci*, *G. trehalosifermentans*, *G. salpingitidis* y *G. anatis*. De esta se conocen dos biovariedades: *G. anatis* biovariedad *haemolytica* y *G. anatis* biovariedad *anatis* (Christensen, *et al.*, 2003). *Gallibacterium spp* puede aislarse de una gran variedad de aves como pollos, pavos, patos, gansos y gallinas de guinea (Neubauer *et al.*, 2009)

Todas las cepas son Gram negativas, las colonias son grisáceas, no transparentes, anaerobias facultativas, fermentativas en medio Hugh & Leifson con glucosa. Son negativas en reacciones de citrato de Simons, crecimiento en KCN y prueba de Voges-Proskauer a 37°C, no producen H<sub>2</sub>S en la prueba de Triple Azúcar Hierro (TSI) ni gas a partir de nitratos. Ninguna de las cepas produce arginina dihidrolasa, lisina decarboxilasa, ornitina decarboxilasa, fenilalanina deaminasa, gelatinasa o pigmentos. No presenta crecimiento simbiótico y la hemólisis de sangre bovino solo se presenta en *G. anatis* biovar haemolytica. Todos los aislados son positivos para la prueba de fosfatasa y rojo de metilo, reducen nitrato y producen alanina aminopeptidasa. Producen ácido a partir de (2)-D-manitol, (2)-D-fructosa, (+)-D galactosa, (+)-D-glucosa, manosa y sacarosa. Ninguno de los miembros del género produce ácido de adonitol, (2)-L-xylosa, (+)-D-fucosa, (+)-L-ramnosa, (2)-L-sorbosa, cellobiosa, (+)-melezitosa, (+)-glicogeno, inulina, aesculina, amigdalina, arbutina, gentiobiosa, salicina, (+)-turanosa o β-N-CH<sub>3</sub>-glucosamida. Presentan reacción negativa para β-glucosidasa, α-fucosidasa, β-glucuronidasa y amannosidasa y no producen gas de D-glucosa.

#### 2.4.1 *Gallibacterium anatis*

Los aislados de esta bacteria son hemolíticos y (2)D-arabinosa y (2)L-fucosa positivos (biovar hemolítica) o no hemolíticos, trehalosa positivo y (2)D-arabinosa-, (2)L-fucosa, maltosa y dextrina negativos (biovar *anatis*). Para estos últimos la cepa tipo es F 149<sup>T</sup> aislada del tracto intestinal de pato.

El potencial patogénico reportado para este microorganismo es muy variable, ha sido aislado de aves sanas, lo que sugiere que es parte de la flora normal del tracto respiratorio superior y el tracto genital inferior (Bojesen, *et al.*, 2003). Sin embargo también es considerada una bacteria patógena oportunista que causa salpingitis, peritonitis, oophoritis, septicemia, pericarditis, hepatitis e infecciones sistémicas (Christensen and Bisgaard, 2008).

##### 2.4.1.1 Factores de virulencia

*G. anatis* biovariedad *haemolytica* tiene la capacidad de producir metaloproteasas relacionadas con su patogenicidad capaces de degradar IgG de pollo (García, *et al.*, 2005), así mismo se ha

encontrado el gen que codifica para toxinas RTX, se trata de citotoxinas activas contra macrófagos y otros tipos celulares de pollo, de éstas se encuentra descrita una toxina denominada GtxA (Kristensen *et al.*, 2009).

Diversas cepas de *Gallibacterium* tienen capacidad hemaglutinante de eritrocitos de pollos, codornices, cerdos y conejos (Zepeda, *et al.*, 2009)

Se ha determinado la capacidad de *G. anatis* de formar biofilms adherentes a superficies inertes (Vaca, *et al.*, 2011)

Las distintas cepas de *G. anatis* se clasifican con base en su virulencia, la cual puede ser severa, moderada o leve. Las dos primeras están asociadas a la mortalidad en aves y la última está asociada a lesiones en oviducto ([www.gallibacterium-anatis.com.mx/](http://www.gallibacterium-anatis.com.mx/))

## 2.5 Adhesión

Los factores de virulencia son los responsables de las reacciones que ocurren durante los procesos de una enfermedad infecciosa, por tanto, su estudio permite entender los mecanismos usados por las bacterias para causar la enfermedad.

La mayoría de las infecciones bacterianas son iniciadas por la adherencia de los microorganismos a los tejidos del hospedero. La adhesión bacteriana se define como la asociación específica y relativamente estable entre la célula bacteriana y una superficie, la que puede ser otra célula o productos celulares. Es un prerrequisito para el mantenimiento de la flora normal o para el establecimiento y perpetuación de patógenos microbianos, que originan el proceso infeccioso y por ende la enfermedad. En este fenómeno participan principalmente dos moléculas: la adhesina, la molécula o estructura de la superficie que forma parte de la bacteria y el receptor, la parte complementaria en el hospedero o en el ambiente (Bisno, 1995).

La capacidad de adhesión de una bacteria es imprescindible para evitar su eliminación del huésped por distintos mecanismos de limpieza mediante los fluidos biológicos e incluso por parte de la microflora. Una adhesina puede enlazar muchos ligandos como es el caso de la proteína YadA de *Yersinia enterocolitica* que puede enlazar colágena, laminina y fibronectina, o en el caso de la adhesina de *Porphyromonas gingivalis* que reconoce fibrinógeno y fibronectina (Patti, *et al.*, 1994). Existe un grupo de adhesinas denominadas componentes de superficie microbianos que reconocen moléculas adherentes de la matriz (MSCRAMMs) que permiten que el microorganismo

se una a los tejidos. Aunque se ha mostrado que diferentes microorganismos se unen a la matriz extracelular del hospedero mediante las MSCRAMMs, en la mayoría de los casos éstas no han sido identificadas o caracterizadas (Joh, *et al.*, 1993).

## 2.6 Matriz extracelular

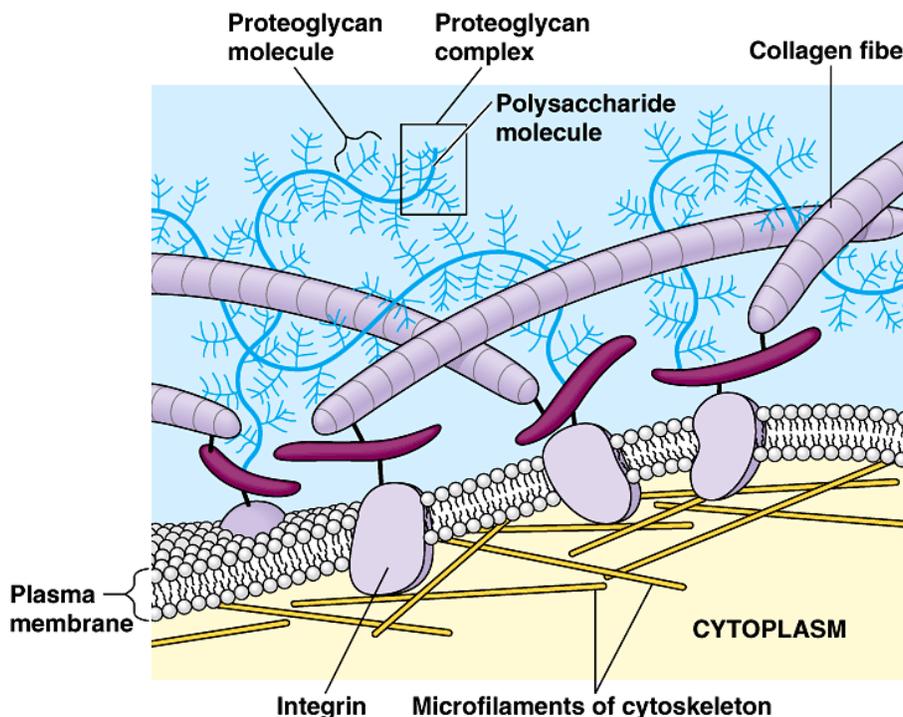
La matriz extracelular (MEC) es un tejido biológicamente activo, compuesto de una mezcla de macromoléculas complejas. Las principales funciones de la matriz son: rellenar los espacios no ocupados por las células, conferir a los tejidos resistencia a la compresión y estiramiento, constituir el medio donde llegan los nutrientes y se eliminan los desechos celulares, proveer a diversas clases de células puntos fijos de anclaje. La MEC está involucrada también en la migración, proliferación y diferenciación celular (Sakay, 1995).

Las principales moléculas que componen la matriz extracelular son de tres clases (Kleinsmith and Kish, 1995):

- 1) Glucosaminoglicanos y proteoglicanos que forman una sustancia gelatinosa en la que los otros componentes de la matriz son embebidos. Los glucosaminoglicanos son cadenas de polisacáridos, que se unen covalentemente a proteínas y forman a los proteoglicanos. Existen diversos grupos de glucosaminoglicanos los cuales tienen carga negativa y son: hialurona; condroitín-sulfato o dermatánsulfato; heparán-sulfato y heparina y queratán-sulfato.
- 2) Proteínas estructurales como el colágeno y la elastina que imparten fuerza y flexibilidad a la matriz
- 3) Proteínas adhesivas como la fibronectina y laminina que promueven el anclaje de las células a la matriz.

Es la cantidad, proporción y el tipo de cada una de estas macromoléculas lo que distingue a unas matrices extracelulares de otras. Así mismo, la composición y la disposición de la matriz extracelular dependen del tipo de tejido considerado. Hay algunos como el epitelial y el nervioso que carecen o tienen muy poca matriz extracelular, mientras que en otros como el tejido conectivo la MEC es el elemento más importante en volumen. En los tejidos vegetales la pared celular se puede considerar como una matriz extracelular especializada con unas características muy diferentes a la de los tejidos animales.

Entre los componentes de la matriz extracelular que son reconocidos por las bacterias se encuentran: el fibrinógeno, la fibronectina, el colágeno, la elastina, vitronectina, laminina y la heparina, entre otros (Joh, *et al.*, 1993).



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Fig. 1 Matriz extracelular (<http://kentsimmons.uwinnipeg.ca/cm1504/cellwall.htm>)

### 2.6.1 Plasma sanguíneo

La sangre es el medio de transporte más importante del organismo, mantiene la homeostasis y participa en la defensa contra los agentes patógenos, está formada por células, denominado hematocrito, y por restos celulares, en una solución acuosa: el plasma sanguíneo (Koolma, 2005). Esta solución constituye una matriz extracelular fluida donde las células están inmersas, está compuesta por 90% de agua y múltiples sustancias disueltas en ella. De éstas las más abundantes son las proteínas.

En el plasma sanguíneo existen diversas proteínas y la separación electroforética de las mismas hace que se distingan diversas fracciones: albumina,  $\alpha_1$ -globulinas,  $\alpha_2$ -globulinas,  $\beta$ -globulinas y

γ globulinas. La función de muchas proteínas plasmáticas es la unión y transporte de distintos metabolitos. La albúmina transporta ácidos grasos, billirrubina o distintos cationes. Las haptoglobinas forman complejos con la hemoglobina impidiendo la pérdida de hierro, mientras que la ceruloplasmina transporta cobre y la transferrina hierro (Teijón, *et al.*, 2006)

Las proteínas presentes en el plasma sirven también como receptores para bacterias, como es el caso del fibrinógeno (Enríquez, *et al.*, 2003)

**Tabla 1. Proteínas plasmáticas y su función (Koolman, 2002)**

| Grupo                      | Proteína  | Masa en kDa  | Función   |
|----------------------------|---|--|---|
| Albúmina                   | Transtiretina<br>Albúmina   | 50-66<br>67  | Transporte de la tiroxina de la triyodotironina<br>Conservación de la presión osmótica, transporte de ácidos grasos, ácidos biliares, hormonas esteroides, fármacos   |
| α <sub>1</sub> -globulinas | Antitripsina<br>Antiquimiotripsina<br>Lipoproteína (HDL)<br>Protrombina<br><br>Transcortina<br><br>Glucoproteína ácida<br>Globulina fijadora de tiroxina                  | 51<br>58-65<br>200-400<br>72<br><br>51<br><br>44<br>54 | Inhibición de la tripsina y otras proteasas<br>Inhibición de la quimiotripsina<br>Transporte de los lípidos<br>Factor II de la coagulación, precursor de la trombina<br>Transporte del cortisol, la corticosterona y la progesterona<br>Transporte de la progesterona<br>Transporte de la tiroxina y de la triyodotironina. |
| α <sub>2</sub> -globulinas | Ceruloplasmina<br>Antitrombina III<br>Haptoglobina<br>Colinesterasa<br>Plasminógeno<br>Macroglobulina<br>Proteína fijadora de retinol<br>Proteína fijadora de vitamina A. | 135<br>58<br>100<br>350<br>90<br>725<br>21<br>52       | Transporte de los iones Cu<br>Inhibición de la coagulación<br>Unión de la hemoglobina<br>Hidrólisis de los ésteres de la colina<br>Precusores de la plasmina<br>Unión a proteasas, trasporte de los iones Zn<br>Transporte de la vitamina A.<br>Transporte de los calcioes  |
| β-globulinas               | Lipoproteínas (LDL)<br>Transferrina<br><b>Fibrinógeno</b><br>Globulina fijadora de hormonas sexuales<br>Transcobalamina<br>Proteína C-reactiva                            | 2000-4500<br>80<br><b>340</b><br>65<br>38<br>110       | Transporte de los lípidos<br>Transporte de los iones Fe<br><b>Factor de la coagulación</b><br>Transporte de testosterona y estradiol<br><br>Transporte de la vitamina B12<br>Activación del complemento   |
| γ-globulinas               | IgC<br>IgA<br>IgM<br>IgD<br>IgE   | 150<br>360<br>935<br>172<br>196                        | Anticuerpos tardíos<br>Anticuerpos protectores de la mucosa<br>Anticuerpos tempranos<br>Receptores de linfocitos B<br>Reaginas  |

### 2.6.1.1 Fibrinógeno

El fibrinógeno (Fg) es la principal proteína estructural en la sangre, responsable de la formación de coágulos. Es una glicoproteína dimérica heterogénea del plasma, de 340 kDa, altamente soluble, con tres pares de cadenas polipeptídicas no idénticas:  $\text{A}\alpha$ ,  $\text{B}\beta$  y  $\gamma$  de 47.5 nm de longitud. Las tres cadenas peptídicas se encuentran conectadas por 29 puentes disulfuro. Posee cuatro grupos carbohidratos, el calcio lo estabiliza contra la desnaturalización por calor, contra la digestión por tripsina y acelera la formación de fibrina. Se encuentra en el plasma en concentraciones de 160 – 415 mg/dL (Bello, 2000). Es una molécula altamente heterogénea debido al *splicing* alternativo, modificación postraduccional y degradación proteolítica. Existe una variación polimórfica en las cadenas  $\text{A}\alpha$  y  $\text{B}\beta$ , sugiriendo que cada individuo puede llevar más de un millón de moléculas no idénticas en la sangre (Herry, *et al.*, 1999)

Por estudios de microscopía electrónica, la estructura del fibrinógeno ha sido definida como dos dominios D, flanqueados por un dominio central E (Fig. 2)

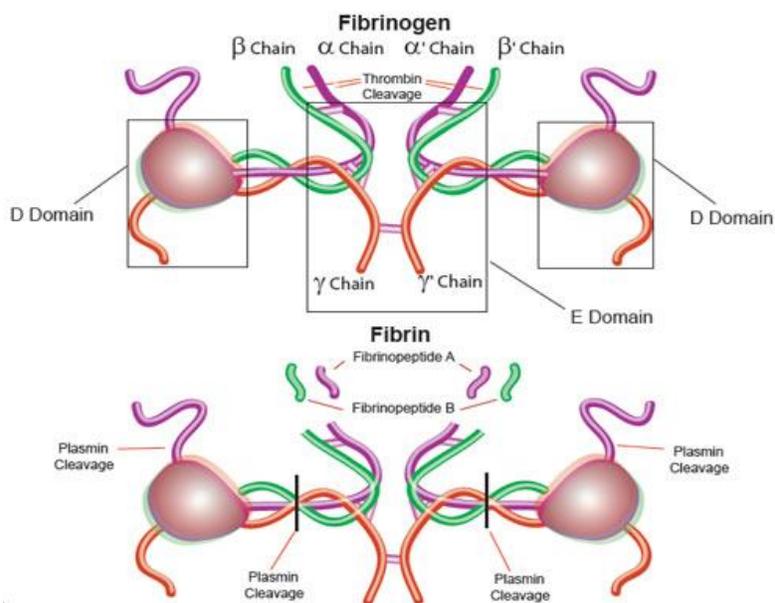


Fig. 2. Estructura del fibrinógeno. Se muestran sus tres cadenas y sus dos dominios

El fibrinógeno es sintetizado principalmente en el hígado bajo condiciones normales, sin embargo también es sintetizado bajo condiciones inflamatorias y de estrés en el pulmón y en el epitelio del

intestino como en el caso de las infecciones sistémicas. Esta regulación de la expresión del fibrinógeno indica que esta proteína participa en la defensa del hospedero contra las infecciones. (Rivera, *et al.*, 2007). Así mismo, es un ligando para la integrina B $\beta$ , un receptor en plaquetas e interactúa con diferentes sustancias con consecuencias fisiológicas importantes, por ejemplo se enlaza al plasminógeno, la trombina y la fibronectina.

El paso determinante en las vías de coagulación involucra la conversión de Fg a fibrina catalizado por la  $\alpha$ -trombina, liberando los péptidos fibrina A y B del N-terminal de las cadenas A $\alpha$  y B $\beta$ . Los monómeros de fibrina polimerizan espontáneamente y ello provoca la formación de coágulos de fibrina en los sitios lesionados (Doolittle, 2010).

En los últimos años se ha descrito un número de proteínas que unen fibrinógeno, especialmente en bacterias Gram positivas (Tabla 2), estas proteínas se dividen en dos categorías: adhesinas de la superficie bacteriana o MSCRAMMs y adhesinas secretadas denominadas SERAMs (Amplio Repertorio de Moléculas Adhesivas Secretables)

**Tabla 2. Proteínas que unen fibrinógeno en bacterias Gram positivas** (Rivera, *et al.*, 2007)

| Proteína  | Sitio de unión en fibrinógeno | Mecanismo de unión                                   |
|---|-------------------------------|--|
| <i>S. aureus</i> FnbpA (fibronectin binding proteína A)     | Cadena "γ" C-terminal         | Mecanismo "Dock, Lock and Latch" (DLL)               |
| <i>S. aureus</i> ClfA (clumping factor A)                   | Cadena "γ" C-terminal         | DLL  |
| <i>S. epidermis</i> SdrG (serine –aspartate repeat protein) | Cadena "β" N-terminal         | DLL  |
| Grupo A, C y G de proteínas streptococci M                  | Fragmentos D                  | ND   |
| Grupo A streptococci SOF (Serum opacity factor)             | Cadena "β"                    | ND   |
| FbsA (Fibrinogen binding protein <i>S. agalactiae</i> )     | Fragmentos D                  | ND   |
| <i>S. aureus</i> Eap (Extracelular adherence protein)       | Cadena "α"                    | ND   |
| <i>S. aureus</i> Efb (Extracelular fibrinogen binding)      | Cadena "α"                    | ND*  |
| <i>S. aureus</i> Proteína coagulasa                         | ND                            | Complejo coagulasa-protrombina forma el sitio activo |
| *No determinado.  |                               |  |

Tres MSCRAMMs staphylococales interactúan con el fibrinógeno y son importantes factores de virulencia: clumping factor A (ClfA), proteína A de unión a fibronectina (FnbpA) de *S. aureus* y proteína G repetidos serin-aspartato (Sdr G) de *S. epidermidis*.

Estas proteínas que unen fibrinógeno: ClfA, FnbpA, y SdrG pertenecen a una familia de proteínas estructurales de la pared celular y se encuentran en la mayoría de bacterias Gram positivas.

El N-terminal de estas proteínas contiene una secuencia señal de aproximadamente 40 residuos seguidos por un dominio A, expuesto sobre la superficie bacteriana, y contiene la región unión-ligando compuesto de tres subdominios N1-N3 (Fig. 3). Los dominios de unión a fibrinógeno de ClfA, FnbpA y SdrG se encuentran dentro de los subdominios N2 y N3, una región compuesta de aproximadamente 320 residuos. Las proteínas ClfA, y SdrG poseen dos estructuras similares IgG. El C-terminal contiene el motivo LPXTG requerido para el anclaje de la superficie celular, un dominio hidrofóbico transmembranal y un extremo citoplasmático con carga positiva.

Las proteínas ClfA y FnbpA unen los 17 residuos del C-terminal (residuos 395–411) de la cadena y del Fg. Esta misma región en el fibrinógeno contiene residuos importantes para unión a receptores  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrina a plaquetas. En contraste, la región de unión al Fg de SdrG está localizada al N-terminal de la cadena B $\beta$  del Fg. Esta unión se superpone con la escisión de la trombina y se ha demostrado que SdrG inhibe la coagulación de la fibrina.

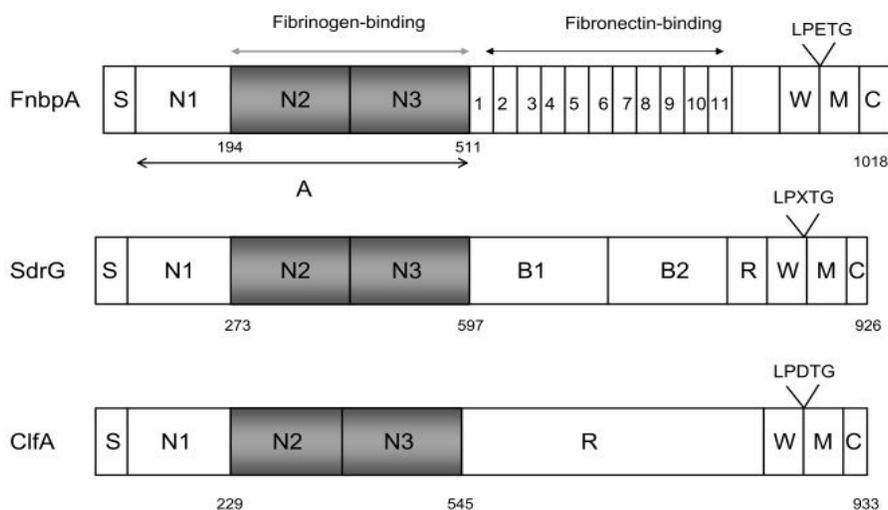


Fig. 3. Esquema de las proteínas FnbpA y ClfA de *S. aureus* y SdrG de *S. epidermidis*. Estas MSCRAMMs muestran una organización del dominio similar al dominio A del N-terminal. Los sitios de unión a fibrinógeno se encuentran dentro de los subdominios N2-N3. Estos dos subdominios se encuentran dentro como dos estructuras IgG en SdrG y ClfA y probablemente en FnbpA. Las dos estructuras IgG forman una cavidad en la que el ligando se une a Fg (Rivera, *et al.*, 2007)

Así mismo, existen enzimas bacterianas que facilitan la invasión y pueden intervenir en la acción patógena; como la coagulasa, cuyo sustrato es el fibrinógeno y su función es convertir esta proteína en fibrina, en presencia de un factor del plasma (Pumarola, 1995).

### 3. ANTECEDENTES

Las principales investigaciones sobre proteínas que unen fibrinógeno se han realizado en bacterias Gram positivas especialmente *streptococcus* y *staphylococcus*. Se han hecho escasos trabajos con microorganismos de la Familia *Pasteurellaceae*.

- Herrmann y colaboradores estudiaron en 1988 la acción de la fibronectina, fibrinógeno y laminina como mediadores en la adherencia de aislados de *Staphylococcus*, para lo cual emplearon 8 cepas de *Staphylococcus aureus* y 19 cepas coagulasa-negativas, encontrando que el fibrinógeno fue un importante promotor de la adherencia de las cepas de *S. aureus*, lo que reveló la existencia de receptores para fibrinógeno.
- Meehan, *et al.* (2000 y 2002) encontraron que la principal proteína asociada a la pared celular (FgBP) de *Streptococcus equi* subsp. *Equi*, posee bloques internos de secuencias repetidas (A y B) que unen fibrinógeno e IgG-Fc equino a través de residuos localizados en el N terminal en la mitad de la molécula. Esta proteína es, también, anti-fagocítica, reacciona con suero de caballos convalecientes y juega un potencial papel protector. Sin embargo, mediante proteínas recombinantes de (FgBP) que contenían deleciones internas de esta secuencia encontraron que ninguno de estos repetidos es esencial para la unión a fibrinógeno.
- McNeil y colaboradores (2002) encontraron proteínas que unen fibrinógeno de borrego en los sobrenadantes de cultivo de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella trehalosi*. Estas mismas proteínas reaccionan con suero bovino, lo que apoya su relevancia inmunológica. Estos resultados pueden más adelante ayudar a elucidar la patogénesis de la pasteurelosis neumónica provocada en estos animales.
- Jacobson (2003) identificó un receptor extracelular que une fibrinógeno en *Streptococcus agalactiae*. Esta proteína pertenece a una familia de al menos tres receptores que son secretados al sobrenadante de cultivo y comparten la región de unión a fibrinógeno, así como la secuencia señal N-terminal, sin embargo, la zona intermedia varía en tamaño y no tiene casi ninguna similitud de secuencia.
- Enríquez y colaboradores (2004) estudiaron la adherencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* al colágeno del tracto respiratorio de cerdos, observando que existe una proteína de membrana externa (OMP) de 60 kDa que se une colágeno y fibrinógeno.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Las especies de la familia *Pasteurellaceae*: *Avibacterium paragallinarum*, *Actinobacillus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Gallibacterium anatis* son responsables de diversas enfermedades en animales de importancia económica para el hombre, provocando grandes pérdidas a las industrias avícola y porcina, por lo que es necesario identificar los factores de virulencia de estos microorganismos; sobre todo uno involucrado en la primera fase de la infección: la adhesión.

Proteínas que unen fibrinógeno no han sido descritas en las especies: *Avibacterium paragallinarum*, *Actinobacillus suis* y *Gallibacterium anatis* y pueden constituir importantes factores de virulencia en el proceso de adhesión bacteriana a los tejidos del huésped. Así mismo, no se ha registrado la capacidad de degradar fibrinógeno de todas las cepas bacterianas usadas en este trabajo.

## 5. OBJETIVOS.

### 5.1 Objetivo general

Identificar proteínas que unen fibrinógeno en diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae*

### 5.2 Objetivos particulares

- Determinar la presencia de proteínas que puedan unir fibrinógeno
- Purificar alguna de las proteínas que se unen a fibrinógeno mediante ensayos de afinidad.
- Realizar pruebas de inmunoreconocimiento de las proteínas que unen fibrinógeno utilizando diferentes anti-sueros contra microorganismos o componentes de ellos, pertenecientes a la familia *Pasteurellaceae*
- Obtener un anticuerpo policlonal contra alguna de las proteínas que unen fibrinógeno.
- Observar si distintos componentes bacterianos (extractos totales, proteínas secretadas o proteínas de membrana externa) tienen la capacidad de degradar fibrinógeno

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Cepas bacterianas y medio de cultivo

*Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, *Actinobacillus suis* ATCC 15555, *Avibacterium paragallinarum* serovar A, ATCC 0083, *Gallibacterium anatis*: F-149<sup>T</sup> (García *et al.*, 2005) y 12656-12 se crecieron en caldo Infusión Cerebro Corazón por 24 h a 37°C. Aquellos microorganismos que lo requirieron (*Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Avibacterium paragallinarum*), se les adicionó en el medio de cultivo NAD 10 µg/ml

### 6.2 Proteínas secretadas

El sobrenadante de cultivo libre de células se precipitó en frío con sulfato de amonio al 70%, por 24 h. Para recuperar las proteínas precipitadas, el sobrenadante se centrifugó a 11000 rpm a 4°C y el concentrado de proteínas se resuspendió en Tris-HCl 20 mM (Negretel *et al.*, 1999)

### 6.3 Obtención de proteínas de membrana externa

Las cepas se cultivaron en 250 ml de medio BHI, se centrifugaron a 14 000 rpm por 2 min. La pastilla se lavó con 500 µl de Tris HCl 20 mM NaCl 25 mM y se centrifugó a 14 000 rpm 2 min. La pastilla se resuspendió en 1 ml de HEPES 10 mM pH 7.4 con lisozima (0.5 mg/ml) y se incubó 30 min. a 37°C en agitación. Las muestras se sonicaron durante 7 ciclos de 15 segundos en hielo. Posteriormente se centrifugaron a 14 000 rpm por 2 min para desechar remanentes celulares, el sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 14 000 rpm por 30 min.

La pastilla se resuspendió en 200 µl de HEPES 10 mM pH 7.4 con Tritón X-100 al 2% y se incubó 30 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 14 000 rpm 30 min., la pastilla se lavó sin resuspender en 500 µl de HEPES 10 mM, se centrifugó 2 min a 14 000 rpm, la pastilla se resuspendió en 500 µl de HEPES 10 mM (Blackall *et al.*, 1990)

#### **6.4 Perfil proteico en SDS-PAGE**

El perfil proteínico de extractos totales y de proteínas secretadas al medio se obtuvo por corrimientos electroforéticos en geles de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) (Negrete, *et al.*, 1994).

#### **6.5 Biotinización de fibrinógeno**

Se utilizó fibrinógeno de borrego y de cerdo; tomando 1 mg de cada uno, se disolvió en 1 ml de PBS pH 7.2 y se dializó con bicarbonato de sodio 0.1 M pH 8.2 a 4°C durante toda la noche.

Transcurrido este tiempo, se disolvieron 2 mg de biotina en 100 µl de dimetil sulfóxido (DMSO) y de esta solución se tomaron 50 µl para cada una de las muestras de fibrinógeno. Posteriormente se dejaron en agitación durante 4 h, para finalmente dializar con PBS 1x durante toda la noche a 4°C. (Kittigul *et al.*, 1998)

#### **6.6 Inmunoreconocimiento**

Para determinar la presencia de proteínas con capacidad inmunogénica se realizaron geles de poliacrilamida al 10%. Después de la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue bloqueada con leche al 5 %. Posteriormente se incubaron con el fibrinógeno de cerdo y borrego biotinilado, por separado. Para evidenciar la unión del fibrinógeno a alguna de las proteínas, se empleó avidina-peroxidada. La interacción entre avidina y fibrinógeno se determinó con diaminobencidina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Towbin, *et al.*, 1979).

#### **6.7 Purificación de proteínas**

De los 96 pozos de una placa de microtitulación, a 80 se les colocó 50 µg de fibrinógeno de borrego en buffer de carbonato (0.1 M, pH 9.6) a 4°C. Posteriormente los pozos se lavaron tres veces con 200 µl de PBS y se bloquearon con 200 µl de BSA 1% por una hora a 37°C. Después se lavaron tres veces con PBS, a continuación 2-3 µg de proteínas de membrana externa fueron colocados en cada pozo por tres horas a 37°C. Los pozos se lavaron 5 veces para remover cualquier proteína que no se hubiera unido; posteriormente las proteínas fueron liberadas con

100 µl de SDS 1% y precipitadas con 10% de ácido tricloracético por al menos 1 hora a 4°C. Las proteínas purificadas fueron recuperadas por centrifugación (12 000 rpm x 10 min) y lavadas con acetona. Como control se utilizaron 16 pozos únicamente con buffer de carbonato (Lo y Sorensen 2007). Las muestras fueron resuspendidas en PBS con buffer de muestra y β-mercaptoetanol. De estas muestras se realizó electroforesis y Western Blot.

### 6.8 Inmunoconocimiento con distintos sueros

Así mismo, la proteínas que unen fibrinógeno se incubaron con anti-sueros contra vesículas membranales de *A. pleuropneumoniae* (Negrete, *et al.*, 2000) o sueros de aves infectadas experimentalmente con *Gallibacterium anatis* (Salgado, 2011), transferrina biotinilada, anti-proteasa de *A. pleuropneumoniae* (Negrete, *et al.*, 1998) y una anti-hemaglutinina de *Avibacterium paragallinarum*. Como anticuerpos secundarios se emplearon proteína A, suero anti IgG-pollo, avidina o anti-conejo todos ellos peroxidados.

### 6.9 Obtención de Anticuerpos policlonales

Ratas macho de la cepa Wistar de 0.25 kg, proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, (mantenidas de acuerdo a la NOM-062-700-1999), se inocularon vía subcutánea con bandas del gel de poliacrilamida conteniendo a la proteína de interés, las cuales se trituraron y deshidrataron a 37° C por 24h. Para su inoculación, las muestras se suspendieron en PBS. Se dieron tres refuerzos adicionales a intervalos de 2 semanas (Mena, *et al.*, 2004)

### 6.10 Degradación de fibrinógeno

La capacidad de las cepas para degradar fibrinógeno se evaluó utilizando distintos componentes bacterianos (extractos totales, proteínas secretadas y proteínas de membrana externa) incubándolos a distintos tiempos: 1, 3, 5, 8, 12 y 24 horas a 37°C. A cada componente se le agregaron 0.25 mg de fibrinógeno de cerdo. Como control negativo se utilizó únicamente Tris HCl 20 mM con el fibrinógeno.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Perfiles proteicos

Se realizaron perfiles proteicos de las cinco cepas utilizadas, tanto de extractos totales (fig.4) como de proteínas secretadas (fig. 5). De este perfil proteico se identificaron las proteínas que unen fibrinógeno

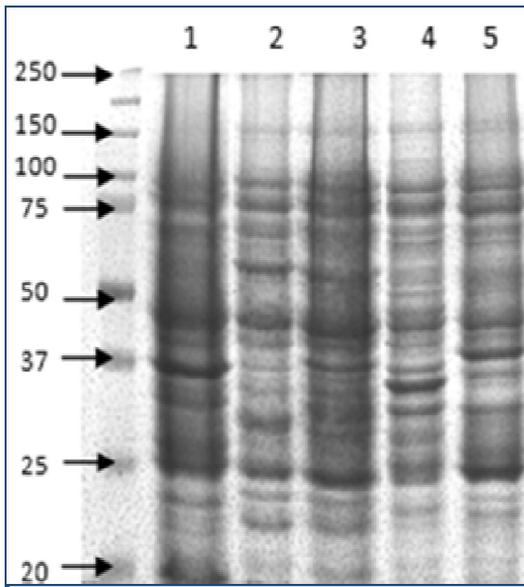


Fig. 4. SDS-PAGE al 10% donde se observan las proteínas de extractos totales provenientes de (1) *Avpg*, (2) *G. anatis* 12656-12, (3) *G. anatis* F-149<sup>T</sup>. (4) *A. suis*. (5) *A. pleuropneumoniae*

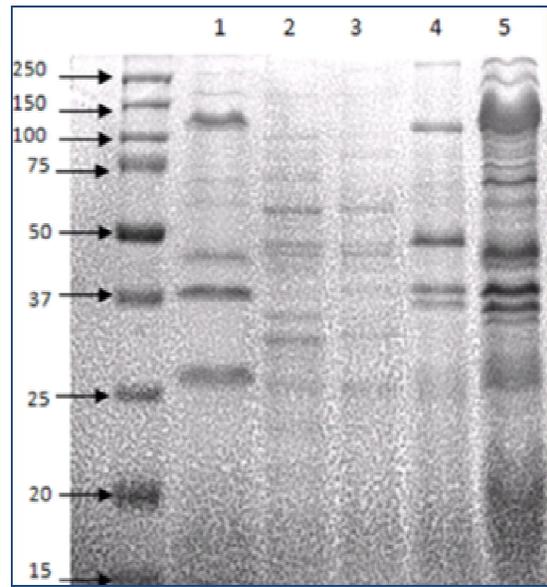


Fig. 5. SDS-PAGE donde se observan las proteínas secretadas de (1) *Avpg*, (2) *G. anatis*:12656-12, (3) *G. anatis* F-149<sup>T</sup>. (4) *A. suis*. (5) *A. pleuropneumoniae*

A partir de muestras de extractos totales y proteínas secretadas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1, *Actinobacillus suis*, *Avibacterium paragallinarum* y *Gallibacterium anatis* F-149<sup>T</sup> y 12656-12 se observaron 2 bandas de reconocimiento de aproximadamente 60 y 21 kDa al utilizar fibrinógeno biotinilado de borrego tal como se muestra en las figuras 6 y 7

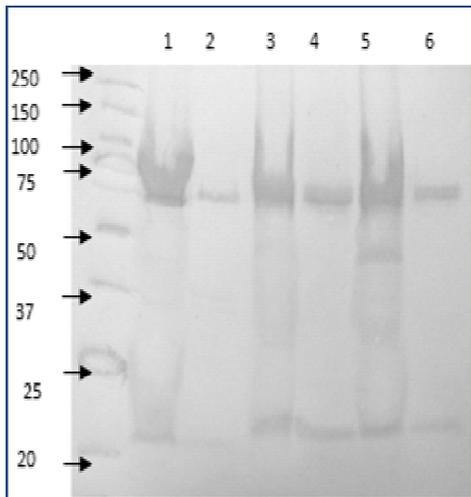


Fig. 6. Reconocimiento de proteínas de 60 y 21 kDa con fibrinógeno biotinilado de borrego. Extractos totales carriles: 1,3 y 5. Proteínas secretadas: 2,4 y 6. *Avpg* : 1y 2, *G. anatis* 12656: 3 y 4, *G. anatis* F-149: 5y 6.

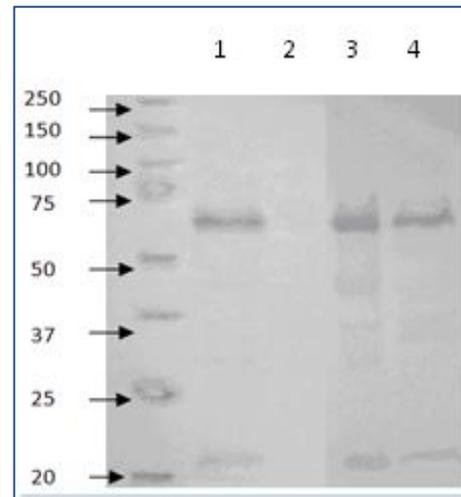


Fig. 7. Reconocimiento de proteínas de 60 y 21 kDa con fibrinógeno biotinilado de borrego. Extractos totales carriles: 1 y 3. Proteínas secretadas: 2 y 4. *A.suis*: 1 y 2 *A. pleuropneumoniae*: 3 y 4

## 7.2 Purificación de la proteína de 60 kDa

La purificación de la proteína de 60 kDa se logró mediante ensayos de afinidad de muestras de proteínas de membrana externa de *A. pleuropneumoniae* con fibrinógeno de borrego en placas de microtitulación (Fig. 8). Para corroborar que se tratara de la proteína inicialmente observada en los primeros ensayos de reconocimiento, se realizó un Western blot usando fibrinógeno biotinilado de cerdo y borrego con avidina peroxidada. De esta forma se notó que la proteína purificada es reconocida por tipos de fibrinógeno (Fig. 9)

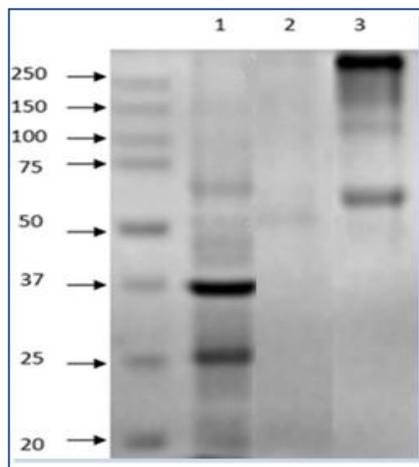


Fig. 8. Proteína de 60 kDa de *Ap*, purificada por afinidad con fibrinógeno de borrego. (1) muestra de OMPs aplicada, (2) control negativo, sin fibrinógeno (3) proteína purificada

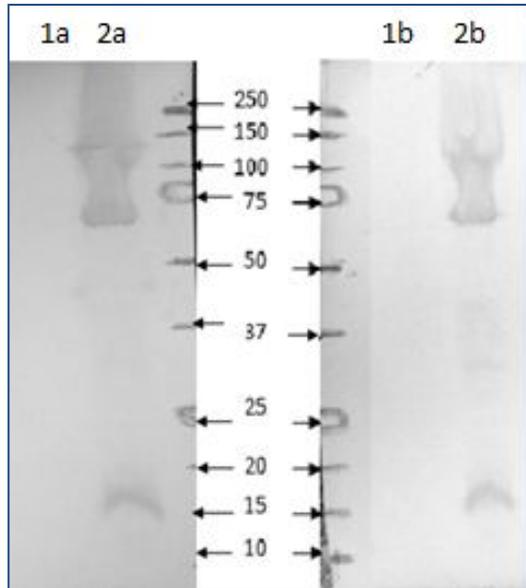


Fig. 9. Reconocimiento de la proteína purificada de 60 kDa de *A. pleuropneumoniae* con fibrinógeno biotinilado de borrego (Izquierda) o de cerdo (Derecha). (1) Control negativo sin fibrinógeno, (2) proteína purificada.

Así mismo, se purificaron las proteínas que unen fibrinógeno en las cepas restantes en las que se observa la proteína de 60 kDa al ser reconocida con fibrinógeno biotinilado de borrego

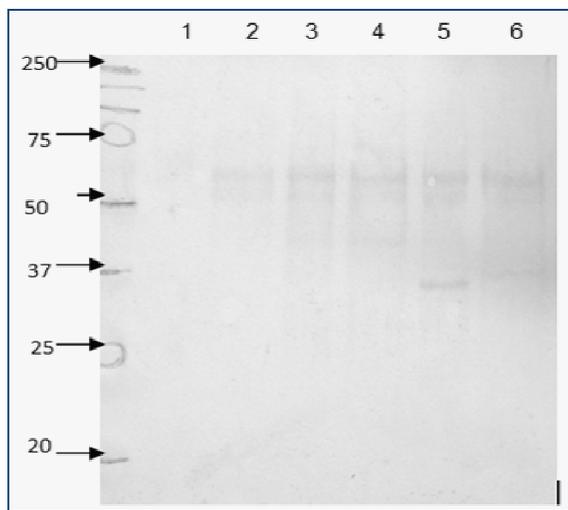


Fig. 10. Reconocimiento de la proteína purificada de 60 Kda con fibrinógeno biotinilado: 2) Avpg, 3) *G. anatis* 12656-12, 3) *G. anatis* F-149, 4) *A. suis* y 5) *A. pleuropneumoniae*. Carril 1, muestra sin fibrinógeno acoplado.

### 7.3 Inmunoconocimiento con distintos sueros

Para determinar la capacidad inmunogénica de la proteína se probaron distintos anti-sueros contra microorganismos o componentes de ellos, pertenecientes a la familia *Pasteurellaceae*. En la fig. 11 se muestra el reconocimiento de la proteína purificada de 60 kDa de todas las cepas con transferrina biotinilada

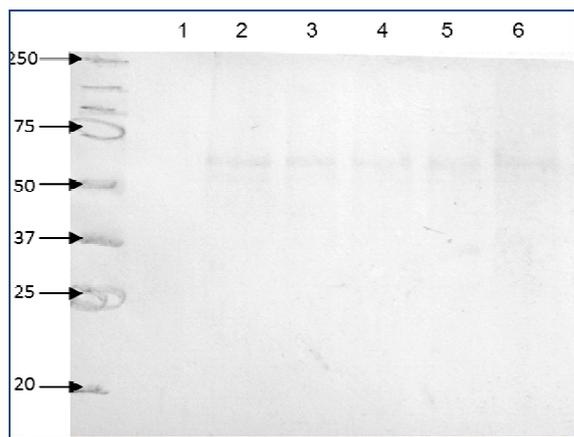


Fig. 11. Reconocimiento de la proteína purificada de 60 Kda con lactoferrina biotinilada 2) Avpg, 3) *G. anatis* 12656-12, 4) *G. anatis* F-149, 5) *A. suis* y 6) *A. pleuropneumoniae*. Carril 1, muestra sin fibrinógeno acoplado.

También, se probó el reconocimiento de la proteína purificada de 60 kDa de *G. anatis* 1265612 usando anti-sueros contra vesículas membranales de *A. pleuropneumoniae*, sueros de aves infectadas experimentalmente con *Gallibacterium anati*, una Hemaglutinina de *A. paragallinarum* y un suero anti proteasas de *A. pleuropneumoniae* (Fig. 12)

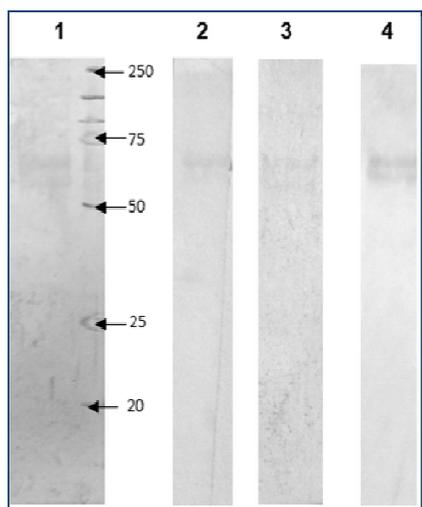


Fig. 12. Reconocimiento inmune de la proteína de 60 Kda purificada de *G. anatis* 12656-12 Carril 1) anti-suero contra vesículas de membrana de *A. pleuropneumoniae*, 2) suero de aves infectadas experimentalmente con *G. anatis*, 3) Anti-hemaglutinina de *A. paragallinarum*, 4) Anti-proteasa de *A. pleuropneumoniae*

## 7.4 Anticuerpo policlonal

El anticuerpo obtenido contra la proteína de 60 kDa que se une a fibrinógeno obtenida de proteínas de membrana externa de *A. pleuropneumoniae* fue probado para ver si reconocía una proteína similar en otras bacterias: *G. anatis* F-149<sup>T</sup>, *G. anatis* 12656-12, *A. suis* y *A. paragallinarum*. Una proteína de aproximadamente 60 kDa fue reconocida en todas las muestras ensayadas por el antisuero policlonal, tal como se observa en la fig.13.

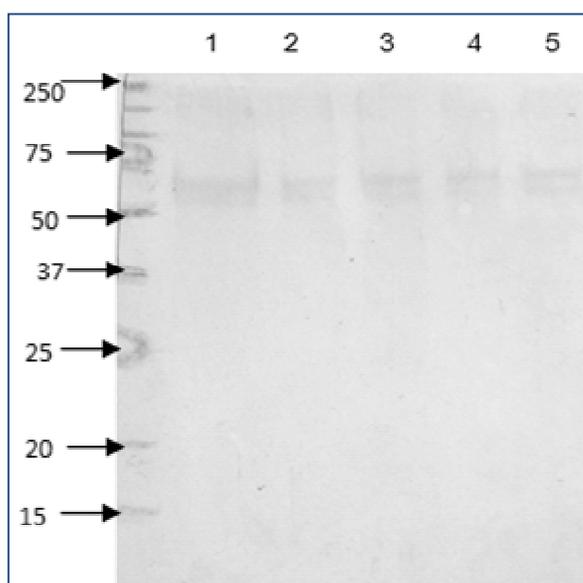


Fig. 13. Reconocimiento de la proteína de 60 kDa purificada de diferentes microorganismos con el anticuerpo policlonal contra esta proteína obtenida de *A. pleuropneumoniae*. Carril: 1) Aavg, 2) *G. anatis* 12656-12, 3) *G. anatis* F-149, 4) *A. suis* y 5) *A. pleuropneumoniae*.

## 7.5 Degradación de fibrinógeno

Para determinar si algún componente bacteriano podía degradar total o parcialmente el fibrinógeno, se realizaron pruebas en las que se colocaron 0.25 mg de fibrinógeno y 150  $\mu$ l de extractos totales, proteínas de membrana externa, o proteínas secretadas, de *A. pleuropneumoniae*. Las muestras fueron incubadas a 37° C por distintos tiempos. De esta forma se comprobó que todos los componentes degradan parcialmente a la proteína a las 24 h.

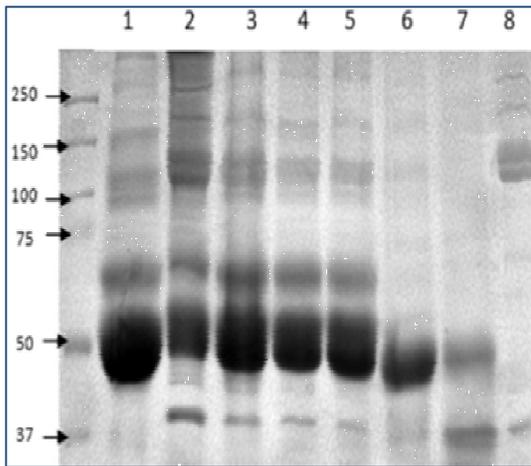


Fig. 11. Degradación de fibrinógeno por Extractos totales de *A. pleuropneumoniae* (1) Control a las 24 h. (2) 1h, (3) 3h (4) 5h, (5) 8h, (6) 12 h (7) 24 h. (8) Muestra de extractos totales sin fibrinógeno

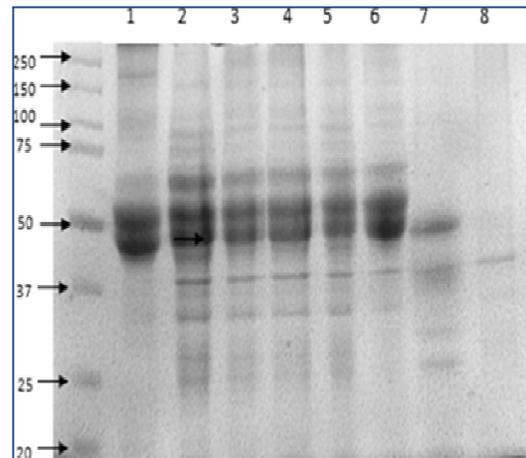


Fig. 12. Degradación de fibrinógeno por Omp's de *A. pleuropneumoniae* (1) Control a las 24 h. (2) 1h, (3) 3h (4) 5h, (5) 8h, (6) 12 h (7) 24 h. (8) Muestra de Omp's.

Posteriormente se realizaron pruebas de degradación de fibrinógeno por OMPs y proteínas secretadas de las cepas restantes, únicamente a las 24 horas. En la fig. 13 se observan las diferencias entre las cepas: *A. paragallinarum*, *G. anatis* 1265612, *G. anatis* F-149<sup>T</sup> y *A. suis* con el control. Los carriles **a** corresponden a proteínas secretadas y los **b** a proteínas de membrana externa. Se observa que existe mayor degradación en las muestras de OMPs a excepción de la muestra de *G. anatis* 12656-12, donde existe mayor degradación de fibrinógeno con proteínas secretadas

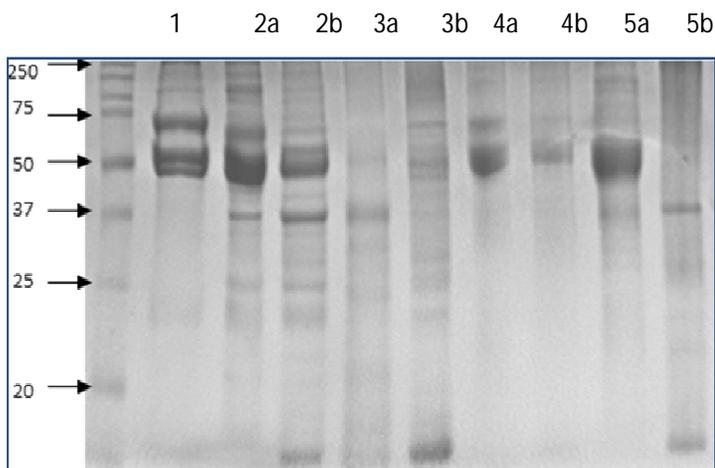


Fig. 13. Degradación de fibrinógeno con proteínas secretadas (carriles **a**) y OMP'S (carriles **b**) de: (2) *A. paragallinarum*, (3) *G. anatis* 1265612. (4) *G. anatis* F-149<sup>T</sup> (5) *A. suis*. Control carril (1) a las 24 h.

## 8. DISCUSION

### 8.1 Proteínas que unen fibrinógeno y purificación de la proteína de 60 kDa.

El proceso infectivo involucra una compleja serie de eventos que pueden resultar en el malfuncionamiento de tejidos del hospedero o incluso en su destrucción. El primer paso de una infección es la adherencia de una bacteria patógena a la superficie de células blanco, esto es usualmente facilitado por la interacción específica entre proteínas de la superficie celular en la bacteria y las glicoproteínas de la matriz extracelular, debido a que muchas de ellas sirven como receptores de proteínas de unión para los patógenos durante el proceso de infección (Lo, *et al.*, 2007).

Este proceso, así mismo, puede conllevar a una invasión celular, donde la bacteria logra escapar de los mecanismos defensivos del hospedero e invade tejidos alrededor del sitio inicial de infección.

La matriz extracelular es una estructura que se encuentra por debajo de células epiteliales, endoteliales y células de tejido conectivo circundante. La matriz puede ser invadida por microorganismos patógenos, dañando el epitelio superficial, lo que lleva a la adhesión, la colonización y la invasión del hospedero.

Existen diversas matrices extracelulares dependiendo del tejido; de éstas, el plasma sanguíneo constituye una matriz fluida formada por diversas proteínas, de las que el fibrinógeno es la principal proteína estructural. El fibrinógeno, precursor de la fibrina, es considerado un factor importante en el sistema de defensa contra microorganismos (Wikstrom, *et al.*, 1983). Se une a multitud de tipos celulares como leucocitos, plaquetas y células endoteliales para mediar procesos biológicos fundamentales incluyendo la homeostasis, angiogénesis, inflamación y cicatrización de heridas (Pietrocola, *et al.*, 2006)

En este trabajo se identificaron proteínas de aproximadamente 21 y 60 kDa, que unen fibrinógeno, en extractos totales y proteínas secretadas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Avibacterium paragallinarum* y *Gallibacterium anatis*: F-149<sup>T</sup> y 12656-12. A partir de proteínas de membrana externa se purificó una proteína de 60 kDa en todas las cepas. Por tanto, es posible que se trate de la misma proteína o de proteínas con dominios conservados en distintos géneros de la familia *Pasteurellaceae* que permitan la unión de fibrinógeno.

Proteínas que unen fibrinógeno han sido reportadas en otros organismos, principalmente Gram positivos como: *Staphylococcus aureus* (Josefsson, 2001), *S. epidermidis* (Hartford *et al.*, 2001) y *Streptococcus agalactiae* (Spellerberg, *et al.*, 2001), en los que las proteínas se encontraron involucradas en la adhesión o en el bloqueo de la fagocitosis.

*S. aureus* expresa una familia específica de adhesinas (MSCRAMMs) que unen fibrinógeno que está integrada por tres proteínas de 87, 60 and 19 kDa (Boden y Flock, 1989). Las proteínas de 87 kDa y 19 kDa se encuentran en altas concentraciones en los sobrenadantes, indicando que son destinadas para la secreción y su localización en la superficie puede ser transitoria. La proteína de 60 kDa se une también a protrombina y tiene actividad de coagulasa.

Otras MSCRAMMs staphylococales que interactúan con el fibrinógeno son ClfA (*S. aureus*), FnbpA (*S. aureus*), y Sdr G de *S. epidermidis*. Estas proteínas poseen dos subdominios N2 y N3 donde se une el fibrinógeno y a pesar de que pertenecen al mismo género *Staphylococcus* o incluso a la misma especie, sus subdominios únicamente comparten cerca del 20% de identidad en la secuencia de aminoácidos.

La proteína ClfA tiene una masa de 92 KDa, es una proteína de superficie que, también, muestra una alta similitud con la proteína que une fibronectina (Jonsson, *et al.*, 1991).

Por otra parte, la proteína FbsA de *Streptococcus agalactiae* presenta una secuencia similar a las encontradas en las bacterias Gram positivas. Una secuencia señal N-terminal para la secreción es seguida por un dominio compuesto de repetidos en tándem de 16 aminoácidos, una región de anclaje a la pared con un motivo LPTKTG y un segmento hidrofóbico corto que abarca la membrana celular. La proteína FBSA protege a las células streptococales de opsonofagocitosis y promueve la adherencia de *S. agalactiae* a epitelio humano y endotelio microvascular cerebral. Se une a la región D del fibrinógeno y forma agregados de fibrinógeno facilitando la infección (Pietrocola, *et al.*, 2006).

En lo que respecta a miembros de la familia *Pasteurellaceae*, Heather y colaboradores en el 2002 descubrieron que los sobrenadantes de cultivo de *Mannheimia haemolytica* serotipo 1 y *Pasteurella trehalosi* contenían proteínas que unían fibrinógeno biotinilado y estas proteínas fueron igualmente reconocidas usando suero de bovino.

Enriquez y colaboradores en 2004, identificaron una OMP de 60 kDa involucrada en la adherencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* al colágeno del tracto respiratorio de cerdos, y reportaron que ésta fue reconocida por fibrinógeno de cerdo biotinilado. Sin embargo esta proteína no se une

a fibronectina ni a laminina. Encontraron también que anticuerpos contra la proteína de 60 kDa inhibieron la adhesión de colágeno en un 70%.

En este trabajo de tesis, una proteína similar fue encontrada y purificada a partir de proteínas de membrana externa en todas las cepas así, como en sobrenadantes de cultivo.

## 8.2 Inmunoconocimientos con distintos sueros

En los experimentos de inmunoconocimiento se demostró que los sueros contra vesículas de membrana de *A. pleuropneumoniae*, los sueros de aves infectadas experimentalmente con *Gallibacterium anatis*, transferrina biotinilada y suero anti-proteasa de *A. pleuropneumoniae* reconocen a la proteína purificada de 60 kDa de *G.anatis* 12656-12.

El reconocimiento de la proteína de 60 kDa por el anti-suero contra vesículas de membrana externa (OMVs) de *A. pleuropneumoniae* se debe al origen de las OMVs, ya que se encuentran formadas por los componentes de la membrana externa y el periplasma incluyendo proteínas que pueden secretarse y OMP's (Kuehn y Kesty, 2005) y, debido a que la proteína fue purificada a partir de OMP's, se puede inferir que las vesículas de membrana contienen una proteína similar.

La proteína de 60 kDa fue reconocida por el suero de aves infectadas experimentalmente con *Gallibacterium anatis*, lo que sugiere su expresión *in vivo*.

El anticuerpo policlonal dirigido contra la proteína de 60 kDa de *A. pleuropneumoniae* reconoció a las proteínas purificadas de unión a fibrinógeno, también de 60 kDa, de *Actinobacillus suis*, *Avibacterium paragallinarum* y *Gallibacterium anatis* F-149<sup>T</sup> y 12656-12, lo que demuestra la presencia de dominios conservados en las proteínas de estas especies para el reconocimiento de fibrinógeno.

El hecho de que la proteína purificada haya sido reconocida por sueros contra una hemaglutinina, una proteasa y por lactoferrina biotinilada sugiere la presencia de distintos dominios de unión a estas moléculas. Por ejemplo, la proteína de superficie de 72 kDa de *S. aureus* codificada por el gen *map* (MHC class 1 analogous protein) se une a varias proteínas de la matriz, incluyendo fibrinógeno, fibronectina vitronectina, trombospondina, y, en cierta medida, colágeno. (Homonylo, 1993). Además, la proteína secretada de unión a fibrinógeno Eap de esta misma bacteria (proteína extracelular adherente) de aproximadamente 70 KDa, que se expresa en todos

los casos clínicos aislados y es capaz de interactuar con varias proteínas del plasma incluyendo la cadena  $\alpha$  del fibrinógeno, fibronectina y protombrina.

El inmunoreconocimiento de la proteína purificada de 60 kDa por sueros contra una hemaglutinina y contra una proteasa sugiere que se trata de una proteína con estas dos funciones tal como ocurre en *Vibrio cholerae* que produce una hemaglutinina/proteasa (HapA), codificada por *hapA* (Hase y Finkelstein, 1991), involucrada como factor de virulencia en este microorganismo. HapA puede degradar proteolíticamente varias proteínas de importancia fisiológica para el hospedero, incluyendo la mucina, fibronectina, y provoca el rompimiento de la molécula de lactoferrina (Finkelstein, *et al.*, 1983). Por otra parte se ha visto que anticuerpos específicos contra la hemaglutinina purificada inhiben la proteasa funcional y también el ataque al epitelio.

En cuanto al reconocimiento de la proteína que une fibrinógeno por transferrina biotinilada se refiere, este resultado sugiere la presencia de un dominio de unión a esta proteína. Dabo y colaboradores (2003) identificaron cuatro proteínas que se unen a fibronectina, una de las cuales fue identificada, mediante análisis MALDI-TOF, como una proteína de unión a transferrina.

Existen reportes donde se indica que las cepas utilizadas pueden unirse a transferrina y señalan a proteínas de peso semejante a la proteína purificada de 60 kDa que se une a fibrinógeno (Bog, *et al.*, 2001, Bahrami, *et al.*, 2003, Negrete, *et al.*, 2009), por lo que es posible que estas proteínas compartan algún dominio de unión a estas dos moléculas del plasma sanguíneo.

### 8.3 Degradación de fibrinógeno

Las proteínas de membrana externa y las proteínas secretadas de todas las cepas empleadas fueron capaces de degradar parcialmente el fibrinógeno a las 24 hrs de incubación (fig. 12 y13), lo que se sugiere que las cepas secretan enzimas proteolíticas.

Estudios realizados en *Bacteroides gingivalis* han mostrado que esta bacteria Gram negativa se une a fibrinógeno humano con alta afinidad en una región específica entre los dominios E y D de esta molécula (Lantz, *et al.*, 1986) y que tiene la capacidad de degradarlo mediante componentes localizados en su superficie celular, identificados como proteasas tiol-dependientes (Lantz, *et al.*, 1991). La unión de fibrinógeno a las células bacterianas ocurre a 4°C, 22°C y 37°C y su

degradación, sin embargo, no ocurre a 4°C, pero si a 22°C y más efectivamente a 37°C, tal como lo reportado en este trabajo de tesis.

Existen ya evidencias que demuestran que *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Avibacterium paragallinarum* y *Gallibacterium anatis* secretan proteasas al medio (Negrete, *et al.*, 2000, Rivero, *et al.*, 2005, Jeannotte, 2002, García, *et al.*, 2005). Con esta batería de productos, el patógeno causa daño a los tejidos con la consiguiente exposición de los componentes de la matriz extracelular reconocidos por las adhesinas bacterianas y con esto, el logro de la infección. De esta forma, proteínas que unen fibrinógeno pueden facilitar la invasión de los tejidos y el éxito de la infección.

Como resultado del rol crítico en el proceso infeccioso, la adherencia bacteriana a tejidos del hospedero representa un objetivo potencial para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, agentes que puedan bloquear la adherencia, como anticuerpos específicos y que puedan ser efectivos en el combate de enfermedades infecciosas (Joh, 1999). Por tanto, el hecho que la colonización e infección bacteriana puedan ser prevenidos por el bloqueo de la adherencia promueve la investigación de adhesinas, su caracterización molecular y su especificidad de unión.

## 9. CONCLUSIONES

- Se identificaron dos proteínas, de ~ 21 y 60 kDa, que unen fibrinógeno, en muestras de extractos totales, proteínas secretadas y de membrana externa en todas las cepas bacterianas utilizadas.
- El ensayo con placas de microtitulación permitió el aislamiento de la proteína de 60 kDa a partir de muestras de proteínas de membrana externa de *A. pleuropneumoniae*.
- A las 24 horas el fibrinógeno fue degradado parcialmente por los diferentes componentes bacterianos utilizados.
- La proteína de 60 kDa purificada a partir de *G. anatis* fue reconocida por los sueros contra vesículas de membrana de *A. pleuropneumoniae*, suero de aves infectadas experimentalmente con *G. anatis*, transferrina biotinilada, anti-proteasa de *A. pleuropneumoniae* y un suero contra una hemaglutinina de *Av. Paragallinarum*.
- El anticuerpo policlonal dirigido contra la proteína de 60 kD de *A. pleuropneumoniae* reconoció a proteínas con el mismo peso molecular de *A. suis*, *A. paragallinarum* y *G. anatis*.
- La captación de fibrinógeno y la capacidad de degradarlo podrían contribuir a la patogenicidad de *A. pleuropneumoniae* y de los diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae*

## 10. PERSPECTIVAS

- ✓ Identificar la proteína que une fibrinógeno mediante análisis MALDI-TOF.
- ✓ Identificar el gen que codifica para la proteína de 60 KDa.
- ✓ Determinar el sitio y mecanismo de unión de la proteína de 60 KDa en la molécula de fibrinógeno
- ✓ Determinar el efecto de la proteína sobre la fibrina y otras moléculas de la matriz extracelular.

## 11. BIBLIOGRAFIA

- Bahrami, F., A. Ekins and D. Niven. 2003. Iron acquisition by *Actinobacillus suis*: identification and characterization of transferrin receptor proteins and encoding genes. *Veterinary Microbiology* 94: 79-92.
- Bello, A. 2000. Hematología básica. Prado. 3 ed. México, D.F. p. 377.
- Blackall, P., D. Rogers, and R. Yamamoto. 1990. Outer-Membrane Proteins of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Diseases* 34: 871-877.
- Blackall, P., H. Christensen, T. Beckenham, L. Blackall and M. Bisgaard. 2005. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium paragallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 353-362.
- Blackall, P. and V. Soriano. 2008. Infectious coryza and related bacterial infections. In: Saif Y. *Diseases in Poultry*. 12th ed. Blackwell Publishing pp. 789-799.
- Biberstein, E. and D. Hirsh. 1999. *Actinobacillus*. In: *Veterinary microbiology*. D. Hirsh and Y. Zee. Blackwell Science. EUA.
- Bisno, A. 1995. Molecular aspects of bacterial colonization. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 16: 648-657.
- Boden, M. and J. Flock. 1989. Fibrinogen-binding protein/clumping factor from *Staphylococcus aureus*, *Infection and Immunity* 57:2358-2363.

- Bøg, Y., L. Andresen, L. Bastholm, F. Elling, Ø. Angen and P. Heegaard. 2001. The transferrin receptor of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: quantitation of expression and structural characterization using a peptide-specific monoclonal antibody. *Veterinary Microbiology* 81: 51-64.
- Bojesen, A., S. Nielsen, and M. Bisgaard. 2003. Prevalence and transmission of haemolytic *Gallibacterium* species in chicken production systems with different biosecurity levels. *Avian Pathology* 32: 503-510.
- Bonaventura, M., E. Lee, R. De Salle and P. Planet. 2010. A whole-genome phylogeny of the family *Pasteurellaceae*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 950-956.
- Cheung, A., S. Projan, R. Edelstein and V. Fichetti. 1995. Cloning, expression, and nucleotide sequence of a *Staphylococcus aureus* gene (*fbpA*) encoding a fibrinogen-binding protein. *Infection and Immunity* 63:1914-1920.
- Christensen, H., M. Bisgaard, A. Bojesen, R. Mutters and J. Olsen. 2003. Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, '*Actinobacillus salpingitidis*' or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 275-287.
- Christensen, H. and M. Bisgaard. 2008. Taxonomy and biodiversity of members of *Pasteurallaceae*. In: *Pasteurellaceae: Biology, Genomics and Molecular Aspects*. Kuhnert P. and Christensen H. Caister Academic Press. Great Britain pp. 1-26.
- Ciprián, A. and S. Mendoza. 1995. Importancia de identificar el serotipo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en la pleuroneumonía contagiosa porcina por la clase de citolisina excretada. *Porcira* 5: 6-20.
- Doolittle, R. 2010. Fibrinogen and fibrin. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Enríquez, I., R. Godínez, J. Martínez, M. de la Garza, R. Hamer y A. Guerrero. 2003. Adhesión de *Actinobacillus Pleuropneumoniae* a componentes de Matriz extracelular de cerdo. *Ciencia Veterinaria* 9: 269-293.

- Enríquez, I., A. Guerrero, J. Serrano, R. Godínez, J. Rosales, V. Tenorio y M. de la Garza. 2004. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine-lung collagen. *Microbiology* 150: 2391-2400.
- Finkelstein, R., M. Boesman-Finkelstein, and P. Holt. 1983. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/lectin/protease hydrolyzes fibronectin and ovomucin. F. M. Burnet revisited *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80:1092-1095.
- García, E., S. Vaca, M. Pérez, C. Ibarra, M. Perez, V. Tenorio and E. Negrete. 2005. *Gallibacterium anatis*-secreted metalloproteasas degrade chicken IgG. *Avian Pathology* 34: 426-429.
- Hartford, O., L. O'Brien, K. Schofield, J. Wells and T. Foster. 2001. The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. *Microbiology* 147:2545-2552.
- Hase, C. and R. Finkelstein. 1991. Cloning and nucleotide sequence of the *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease (HA/protease) gene and construction of an HA/protease negative strain. *Journal of Bacteriology* 173:3311-3317.
- Herrmann, M., P. Vaudaux, D. Pittet, R. Auckenthaler, D. Lew, F. Schumacher, G. Peters and A. Waldvogel. 1988. Fibronectin, fibrinogen and laminin act as mediators of adherence of clinical *Staphylococcal* isolates to foreign material. *Infectious Diseases* 158: 693-700.
- Homonylo, M., D. Krajewska-Pietrasik, C. Ryden, and M. Hook. 1993. Identification of a *Staphylococcus aureus* Extracellular Matrix-Binding Protein with Broad Specificity. *Infection and Immunity* 61: 2479-2485.
- Jacobson, K. 2003. A novel family of fibrinogen-binding proteins in *Streptococcus agalactiae*. *Veterinary Microbiology* 96: 103-113.
- Jeannotte, M., D. Slavic, J. Frey, P. Kuhnert and J. MacInnes. 2002. Analysis of non-porcine isolates of *Actinobacillus suis*. *Veterinary Microbiology* 85: 83-93.

- Joh, D., E. Wann, B. Kreikemeyer, P. Speziale, and M. Hook. 1993. Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. *Matrix Biology* 18: 211-223.
- Jonsson, K., C. Signas, H. Muller and M. Lindber. 1991. Two different gene encode fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Biochemistry* 202: 1041 - 1048.
- Josefsson, E., O. Hardford, L. O'Brien, J. Patti and T. Foster. 2001. Protection against experimental *Staphylococcus aureus* arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant. *Journal of Infectious Diseases* 184:1572-1580.
- Haesebrouk, F., K. Chiers, I. Van Overbeke and R. Ducatelle. 1997. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Veterinary Microbiology* 58: 239-249.
- Herry, S., O. Blanc, A. Graya and G. Laurent. 1999. Fibrinogen. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31: 741-746.
- Kittigul, L., S. Suthachana, C. Kittigul and V. Pengruangrojanachai. 1998. Immunoglobulin m-capture biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to dengue viruses. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 59:352-356
- Kleinsmith, L. and V. Kish. 1995. The Cell Surface and Cellular Communication in Principles of Cell and Molecular Biology. 2 ed. *Harper Collins College Publishers* 224-231.
- Koolma, J. 2005. *Bioquímica*. Ed. Médica Panamericana, pp. 274-276.
- Kristensen, M., D. Frees and A. Bojensen. 2009. Gtxa from *Gallibacterium anatis*, a cytolytic RTX-toxin with a novel domain organization. *Veterinary Research* 4:1-25.
- Kuehn, M. and N. Kesty. 2005. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes and Development* 19(22): 645-265.
- Lantz, M., R. Rowland, L. Switalski, and M. Hook. 1986. Interactions of *Bacteroides gingivalis* with fibrinogen. *Infection and Immunity* 54:654-658.

- Lantz, M., L. Roger, D. Allen, T. Vail, L. Switalski and M. Hook. 1991. Specific cell components of *Bacteroides gingivalis* mediate binding and degradation of human fibrinogen. *Journal of Bacteriology* 173: 495-504.
- Lo, R. and L. Sorensen. 2007. The Outer membrane protein OmpA of *Mannheimia haemolytica* A1 is involved in the binding of fibronectin. *FEMS Microbiology Letters* 274: 226–231.
- MacInnes, J. and R. Desrosiers. 1998. Agents of the “Suis-ide Diseases” of Swine: *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis* and *Streptococcus suis*. *Canadian Journal of Veterinary Research* 63:83-89.
- Mannheim, W. 1979. Family *Pasteurellaceae*. In: Systematic Bacteriology. N. Krieg y J. Holt. Board. EUA pp. 550 – 575.
- Meehan, M., D. Muldowney, F. O'Meara and P. Owen. 2000. Neither the A- nor B-repeat regions of the fibrinogen-binding protein of *Streptococcus equi subsp. equi* are essential for fibrinogen binding *FEMS Microbiology Letters* 190: 317-321.
- Meehan, M., S. Kelly, N. Price and P. Owen. 2002. The C-terminal portion of the fibrinogen-binding protein of *Streptococcus equi subsp. equi* contains extensive alpha-helical coiled-coil structure and contributes to thermal stability. *FEMS Microbiology Letters* 206: 81-86.
- Mena, E., C. Vázquez, S. Vaca, O. García, V. Pérez, A. Pérez, J. Ibarra, M. De la Garza, E. Zenteno and E. Negrete. 2004. Antigenic secreted proteins from *Haemophilus paragallinarum*. A 110 kDa putative RTX-protein. *FEMS Microbiology Letters* 232:83-87.
- McNeil, H., P. Shewen, R. YC Lo, J. Conlon and M. Miller. 2002. *Mannheimia haemolytica* serotype 1 and *Pasteurella trehalosi* serotype 10 culture supernatants contain fibrinogen-binding proteins. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 90:107-110.
- Negrete, E., V. Tenorio, J. Serrano, C. García and M. De la Garza. 1994. Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. *Canadian Journal of Veterinary Research* 58:83-86.

- Negrete, E., V. Tenorio, A. Guerrero, R. Garcia, M. Reyes and M. de la Garza. 1998. Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1, an antigen common to all the serotypes. *Canadian Journal of Veterinary Research* 62: 183-190.
- Negrete, E., V. Tenorio and M. de la Garza. 1999. Secretion of Proteases from *Pasteurella multocida* isolates. *Current Microbiology* 38:64-67.
- Negrete, E., R. García , M. Reyes, D. Godínez and M. de la Garza. 2000. Membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain proteases and Apx toxins. *FEMS Microbiology Letters* 191:109–113.
- Negrete, E., A. Chantes, A. Serrano, V. Tenorio, C. Vázquez, E. Zenteno, G. Paniagua and S. Vaca. 2009. Identification of iron-acquisition proteins of *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Pathology* 38: 209-213.
- Neubauer, C., M. De Souza, A. Bojesen, M. Bisgaard and M. Hess. 2009 Tissue distribution of haemolytic *Gallibacterium anatis* isolates in laying birds with reproductive disorders. *Avian Pathology* 38: 1-7.
- Patti, J., B. Allen, M. McGavin and M. Hook. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual Review of Microbiology* 48: 585-617.
- Pietrocola, G., L. Visai, V. Valtulina, E. Vignati, S. Rindi, C. Renata, A. Piazza and P. Speziale. 2006. Multiple Interactions of FbsA, a Surface Protein from *Streptococcus agalactiae*, with fibrinogen: Affinity, Stoichiometry, and Structural Characterization. *Biochemistry* 45: 12840-12852.
- Pumarola, A. 1995. Relación huésped bacteria en: Microbiología y parasitología médica. Elsevier España. p. 173.
- Ricoft, A. and L. Garside. 2000. *Actinobacillus* Species and their Role in Animal Disease. Review. *The Veterinary Journal* 159: 18-36.
- Rivera, J., G. Vannakambadi, M. Höök and P. Speziale. 2007. Fibrinogen-binding proteins of Gram positive bacteria. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 98: 503–511.

- Rivero, P., C. Vázquez, A. Sánchez, S. Vaca and E. Negrete. 2005. *Haemophilus paragallinarum* secretes metalloproteases. *Canadian Journal of Microbiology* 51:893-896.
- Sakai, L. 1995. The extracellular matrix. *Scientific American Science and Medicine* 58-67.
- Salgado, M. 2011. Identificación de *fimbriae* en *Gallibacterium anatis*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
- Sandoval, V., H. Terzolo and P. Blackall. 1994. Complicated infectious coriza outbreaks in Argentina. *Avian Disease*. 38:672-678.
- Sawata, A., T. Nakai, K. Kume, H. Yoshikawa and T. Yoshikawa. 1985. Lesions induced in the respiratory tract of chickens by encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*. *American Journal of Veterinary Research* 46: 1185–1191.
- Shin, M., M. Kang, S. Cha, W. Lee, J. Sung and H. Yoo. 2011. An immunosorbent assay based on the recombinant ApxIa, ApxIIa, and ApxIIIa toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its application to field sera. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23:736-742.
- Schubert, A., K. Zakikhany, M. Schreiner, R. Frank, B. Spellerberg, B. Eikmanns and D. Reinscheid. 2002. A fibrinogen receptor from group B *streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. *Molecular Microbiology* 2:557–569.
- Slavic, D., J. Delay, M. Hayes and J. MacInnes 2000. Comparative pathogenicity of different *Actinobacillus suis* O/K serotypes. *Canadian Journal of Veterinary Research* 64: 84-87.
- Soriano, V., P. Blackall, G. Dabo, G. Téllez and R. Fernández. 2001. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates from México by the Kume Hemagglutinin Scheme. *Avian Disease* 45:680-683.
- Teijón, J., A. Garrido., D. Blanco, C. Villaverde, C. Mendoza y J. Ramírez. 2006. *Bioquímica estructural*. 2 ed. Tébar pp. 175-177.
- Terry, T., Y. Zalucki, S. Walsh, P. Blackall and M. Jennings. 2003. Genetic analysis of plasmid encoding haemocin production in *Haemophilus paragallinarum*. *Microbiology* 147:3177-3184.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76: 4350-4354.

Vaca, S., E. Monroy, L. Rojas, C. Vasquez, P. Sánchez, E. Soriano, A. Bohensen and E. Negrete. 2011. Adherence of *Gallibacterium anatis* to Inert Surfaces. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 10: 1688-1693.

VanDorssen, C., and F. Jaartsveld. 1962. *Actinobacillus suis* (novo species). A bacterium occurring in swine. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 87: 450-458.

Wikstrom, M., G. Dahltn and A. Linde. 1983. Fibrinogenolytic and Fibrinolytic Activity in Oral Microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology* 17: 759-767.

Yamaguchi, T., M. Kobayashi, S. Masaki and Y. Iritani. 1993. Isolation and characterization of a *Haemophilus paragallinarum* mutant that lacks a hemagglutinating antigen. *Avian Diseases* 37: 970-976.

Zepeda, A., S. Ramírez, V. Vega, V. Morales, M. Talavera, C. Salgado, J. Simon, A. Bojensen and E. Soriano. 2009. Hemagglutinating activity of *Gallibacterium* strains. *Avian Diseases* 53:115-118.

<http://www.the-icsp.org/taxa/Pasteurellaceaelist.htm>

[www.gallibacterium-anatis.com.mx/](http://www.gallibacterium-anatis.com.mx/)

**ANEXO I. Clasificación de la familia Pasteurellaceae**

**Tabla 3. Clasificación de la familia Pasteurellaceae (<http://www.the-icsp.org/taxa/Pasteurellaceae/elist.htm>)**

| Nº  | GÉNERO                | ESPECIES   |
|-----|-----------------------|--|
| I   | <i>Pasteurella</i>    | <p><i>Pasteurella multocida</i> (especie tipo)<br/> <i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>Multocida</i><br/> <i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>Gallicida</i><br/> <i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>Séptica</i><br/> <i>Pasteurella pneumotropica</i><br/> <i>Pasteurella testudinis</i><br/> <i>Pasteurella aerogenes</i><br/> <i>Pasteurella canis</i><br/> <i>Pasteurella dagmatis</i><br/> <i>Pasteurella langaaensis</i><br/> <i>Pasteurella stomatis</i><br/> <i>Pasteurella bettyae</i><br/> <i>Pasteurella caballi</i><br/> <i>Pasteurella mairii</i><br/> <i>Pasteurella skyensis</i></p>  |
| II  | <i>Actinobacillus</i> | <p><i>Actinobacillus lignieresii</i> (especie tipo)<br/> <i>Actinobacillus equuli</i> subsp. <i>Equuli</i><br/> <i>Actinobacillus equuli</i> subsp. <i>Haemolyticus</i><br/> <i>Actinobacillus capsulatus</i><br/> <i>Actinobacillus suis</i><br/> <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i><br/> <i>Actinobacillus hominis</i><br/> <i>Actinobacillus ureae</i><br/> <i>Actinobacillus muris</i><br/> <i>Actinobacillus seminis</i><br/> <i>Actinobacillus indolicus</i><br/> <i>Actinobacillus minor</i><br/> <i>Actinobacillus porcinus</i><br/> <i>Actinobacillus rossii</i><br/> <i>Actinobacillus delphinicola</i><br/> <i>Actinobacillus scotia</i><br/> <i>Actinobacillus succinogenes</i><br/> <i>Actinobacillus arthritidis</i></p> |
| III | <i>Haemophilus</i>    | <p><i>Haemophilus influenzae</i> (especie tipo)<br/> <i>Haemophilus haemolyticus</i><br/> <i>Haemophilus aegyptius</i><br/> <i>Haemophilus parainfluenzae</i><br/> <i>Haemophilus ducreyi</i><br/> <i>Haemophilus haemoglobinophilus</i><br/> <i>Haemophilus parahaemolyticus</i><br/> <i>Haemophilus parasuis</i><br/> <i>Haemophilus paraphrohaemolyticus</i></p>  |

|             |                          |   |
|-------------|--------------------------|---|
|             |                          | <i>Haemophilus paracuniculus</i><br><i>Haemophilus felis</i><br><i>Haemophilus pittmaniae</i>   |
| <b>IV</b>   | <i>Lonepinella</i>       | <i>Lonepinella koalarum</i> (especie tipo)  |
| <b>V</b>    | <i>Mannheimia</i>        | <i>Mannheimia haemolytica</i> (especie tipo)<br><i>Mannheimia glucosida</i><br><i>Mannheimia granulomatis</i><br><i>Mannheimia ruminalis</i><br><i>Mannheimia varigena</i>              |
| <b>VI</b>   | <i>Phocoenobacter</i>    | <i>Phocoenobacter uteri</i> (especie tipo)  |
| <b>VII</b>  | <i>Gallibacterium</i>    | <i>Gallibacterium anatis</i> (especie tipo)<br><i>Gallibacterium melopsittaci</i><br><i>Gallibacterium trehalosifermentans</i><br><i>Gallibacterium salpingitidis</i>                   |
| <b>VIII</b> | <i>Histophilus somni</i> | <i>Histophilus somni</i> (especie tipo)   |
| <b>IX</b>   | <i>Volucribacter</i>     | <i>Volucribacter psittacida</i> (especie tipo)<br><i>Volucribacter amazonae</i>   |
| <b>X</b>    | <i>Avibacterium</i>      | <i>Avibacterium gallinarum</i> (especie tipo)<br><i>Avibacterium avium</i><br><i>Avibacterium endocarditidis</i><br><i>Avibacterium paragallinarum</i><br><i>Avibacterium volantium</i> |
| <b>XI</b>   | <i>Nicoletella</i>       | <i>Nicoletella semolina</i> (especie tipo)  |
| <b>XII</b>  | <i>Aggregatibacter</i>   | <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (especie tipo)<br><i>Aggregatibacter aphrophilus</i><br><i>Aggregatibacter segnis</i>  |
| <b>XIII</b> | <i>Bibersteinia</i>      | <i>Bibersteinia trehalosi</i> (especie tipo)  |
| <b>XIV</b>  | <i>Chelonobacter</i>     | <i>Chelonobacter oris</i> (especie tipo)  |
| <b>XV</b>   | <i>Basfia</i>            | <i>Basfia succinicoproductens</i> (especie tipo)  |

**ANEXO II. Claves de identificación entre miembros de la familia *Pasteurellaceae* (Blackall, et al., 2005)**
**Table 1.** Key characters for differentiation of genera within the family *Pasteurellaceae*

Genera: 1, *Avibacterium* gen. nov.; 2, *Pasteurella*; 3, *Actinobacillus*; 4, *Haemophilus*; 5, *Lonepinella*; 6, *Mannheimia*; 7, *Phocoenobacter*; 8, *Gallibacterium*; 9, *Histophilus*; 10, *Volucribacter*. Data based on Angen et al. (1999, 2003), Bisgaard & Mutters (1986), Blackall & Reid (1982), Blackall et al. (1989), Christensen & Bisgaard (2003, 2004), Christensen et al. (2003a, b, 2004a, b), Mutters et al. (1985a, b) and this study. Characters are scored as: +, 90% or more of strains positive within 1–2 days; (+), 90% or more of strains positive within 3–14 days; –, less than 10% of strains positive within 14 days; d, 11–89% of strains positive; w, weakly positive.

| Characteristic           | 1               | 2              | 3              | 4  | 5   | 6 | 7  | 8   | 9  | 10   |
|--------------------------|-----------------|----------------|----------------|----|-----|---|----|-----|----|------|
| Catalase                 | d               | +              | +              | +  | –   | + | –  | +   | +  | +    |
| Symbiotic growth         | + <sup>a*</sup> | – <sup>b</sup> | – <sup>c</sup> | +  | –   | – | –  | –   | –  | –    |
| Voges–Proskauer, 37 °C   | –               | –              | –              | ND | d   | – | +  | –   | –  | –    |
| Urease                   | –               | – <sup>d</sup> | +              | +  | –   | – | –  | –   | –  | –    |
| Ornithine decarboxylase  | – <sup>e</sup>  | d              | –              | d  | –   | d | –  | –   | –  | –    |
| Indole                   | –               | +              | –              | d  | –   | – | –  | –   | +  | –    |
| Phosphatase              | + <sup>f</sup>  | +              | +              | +  | –   | + | +  | +   | +  | + /w |
| Growth on MacConkey agar | –               | –              | –              | ND | –   | d | –  | d   | ND | –    |
| Acid from:               |                 |                |                |    |     |   |    |     |    |      |
| D-Arabinose              | d               | d              | –              | ND | (+) | d | ND | (+) | ND | –    |
| Dulcitol                 | –               | d              | –              | –  | +   | – | –  | –   | ND | –    |
| meso-Inositol            | – <sup>g</sup>  | –              | –              | –  | –   | d | –  | d   | ND | d    |
| D-Mannitol               | d               | d              | + <sup>h</sup> | –  | –   | + | –  | +   | ND | –    |
| D-Fructose               | +               | +              | +              | –  | +   | + | ND | +   | –  | +    |
| D-Mannose                | +               | +              | d              | –  | +   | – | –  | +   | ND | +    |
| Maltose                  | d               | – <sup>i</sup> | +              | +  | +   | d | –  | d   | –  | d    |
| Sucrose                  | +               | +              | +              | –  | d   | + | –  | +   | –  | +    |
| Dextrin                  | d               | – <sup>i</sup> | +              | ND | (+) | d | ND | d   | ND | d    |
| Glycosides               | –               | –              | d              | –  | +   | d | d  | –   | ND | –    |
| α-Fucosidase             | –               | –              | –              | –  | –   | d | ND | –   | ND | –    |
| α-Glucosidase            | d               | +              | –              | –  | –   | – | ND | +   | ND | –    |
| β-Glucuronidase          | –               | –              | –              | –  | +   | – | ND | –   | ND | –    |

\*Discrepant results are indicated by: a, *Avibacterium gallinarum* negative, some isolates of *Avibacterium paragallinarum* also negative (biovar 2); b, *Pasteurella multocida* might be positive; c, *Actinobacillus pleuropneumoniae* biovar 1 positive; d, *Pasteurella dagmatis* positive; e, *Avibacterium volantium* can be positive; f, *Avibacterium paragallinarum* biovar 1 might be negative; g, *Avibacterium gallinarum* might be positive; h, *Actinobacillus suis* negative; i, *Pasteurella dagmatis* and *Pasteurella* sp. B positive.