

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA
SALUD ANIMAL

IDENTIFICACION DE ANTIGENOS PROTEÍCOS
INMUNODOMINANTES DE *Mannheimia*
(*Pasteurella*) *haemolytica-like* DE ORGEN AVIAR.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

EDGAR EMILIO PEÑA FLORES

TUTOR: ANTONIO VERDUGO RODRIGUEZ
COMITE TUTORAL: FRANCISCO SUAREZ GÜEMES.

MEXICO, D. F.

2004

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

AGRADECIMIENTOS.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

AL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA.

AL DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ Y AL DR FRANCISCO SUAREZ GÜEMES.

Por el apoyo y consejos para la realización de este trabajo.

AL DR DANIEL MARTÍNEZ GÓMEZ Y RIGOBERTO HERNÁNDEZ

Por el tiempo y el apoyo técnico dedicados a esta tesis.

A LOS INTEGRANTES DEL JURADO:

DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES

DRA. MIREYA DE LA GARZA AMAYA

DR. VICTOR TENORIO GUTIERREZ

DR. ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ

Por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

A LA EMPRESA BAKITY, EN PARTICULAR A ALBERTO ESPINOZA BECERRIL.

Por el apoyo y facilidades otorgadas para la culminación de este proyecto.

A TODAS LAS PERSONAS QUE CONTRIBUYERON DE ALGUNA FORMA PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

Gracias.

DEDICATORIA.

A MIS PADRES: MARTHA FLORES MORA Y EMILIO PEÑA CRUZ.

A MIS HERMANOS: ZAIRA PEÑA FLORES Y GUSTAVO PEÑA FLORES.

Por todo lo que significan para mí y por los logros alcanzados, que sin ustedes, jamás hubieran sido posibles. Comparto con ustedes la culminación de este importante proyecto en mi vida.

A TODOS LOS MIEMBROS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR.

Por que fuimos, y seguiremos siendo compañeros en la misma odisea.

A TODOS MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS.

Por los invaluables momentos y experiencias que hemos compartido.

INDICE

Agradecimientos

Dedicatoria

Indice

Resumen

Abstract

Introducción

Pasteurellosis neumónica

Factores de virulencia de *Mannheimia haemolytica*

Leucotoxina

Sialoglicoproteasa

Neuraminidasa

Polisacárido capsular

Proteínas de la membrana externa

Proteínas de la membrana externa reguladas por hierro

Justificación

Objetivo

Hipótesis

Materiales y métodos

Bacterias y condiciones de crecimiento

Curvas de crecimiento

Obtención de proteínas del sobrenadante

Lisado de bacterias

Extracción de proteínas de la membrana externa

Cuantificación de proteína

Separación electroforética de las proteínas de la membrana externa

Tinción azul brillante de Coomassie

Inmunoelectrotransferencia

Geles de doble dimensión

Análisis de los geles y membranas

Resultados

Discusión

Conclusiones

Referencias

Lista de cuadros y figuras.

IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS PROTEICOS INMUNODOMINANTES DE *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica-like* DE ORIGEN AVIAR.

Resumen.

Recientemente, organismos similares a *Mannheimia haemolytica* (Mh-*like*) han sido asociados con brotes de signología respiratoria y reproductiva en pollo de engorda y gallina de postura en diferentes zonas de México. Hasta el momento se desconoce la identidad exacta de dichos aislamientos, así como las estructuras antigénicas inmunodominantes de los mismos. En este trabajo, se obtuvo el perfil electroforético de las proteínas de la membrana externa (PME) y de las proteínas del sobrenadante de cultivo (PSN) de tres diferentes aislamientos de Mh-*like*, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Además, se detectaron varias proteínas inmunodominantes mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia (*Western-Blot*), con suero de aves convalecientes a la enfermedad. El peso molecular de todos los antígenos identificados se comparó con las PME y antígenos de secreción de una cepa testigo de Mh biogrupo A, serotipo 1 (MhA1), *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Haemophilus paragallinarum*. Se observaron diferencias en la velocidad de crecimiento de los tres aislamientos, así como entre los aislamientos y las cepas testigo. Mediante electroforesis, a partir del aislamiento A, se observaron dos PME principales de 41.6 y 29.6 kDa, una PME de 35.6 kDa, sólo a las 8 h de incubación, y una PSN de 38.6 kDa. Con el aislamiento B se observaron dos PME principales de 29.5 y 43.6 kDa, una PME menor de 32.4 y dos PME de 37.8 y 24.5 kDa sólo a las 8 h de incubación y, del aislamiento C, se observaron dos PME principales de 36.5 y 41.7 kDa y dos PME menores de 29.4 y 46.5 kDa. Mediante inmunoelectrotransferencia se detectaron varios antígenos inmunodominantes. Del aislamiento A una PSN de 38.0 kDa, con el aislamiento B, dos PSN de 64.1 y 37.9 kDa y una proteína estructural de 30.5 kDa y, a partir del aislamiento C, una proteína estructural de 60.9 kDa. Se observaron diferencias entre los perfiles electroforéticos de las PME de los tres aislamientos, y entre los perfiles de los aislamientos y las cepas testigo. También se detectaron diferencias entre los patrones de antígenos inmunodominantes de los tres aislamientos y entre los patrones de los tres aislamientos y las cepas testigo. Por su carácter inmunodominante, y por el patrón de detección, se sugiere la caracterización de los antígenos inmunodominantes de 38.0 kDa del aislamiento A y de los de 64.1, 37.9 y 30.5 kDa del aislamiento B. Mediante la separación electroforética de doble dimensión se identificaron cinco antígenos de tamaño similar al de los antígenos previamente mencionados (36.6, 36.5, 37.2, 29.3 y 28.8 kDa). Los resultados demuestran la presencia de antígenos inmunodominantes en los tres aislamientos de Mh-*like* de esta tesis, tales como PME y proteínas, posiblemente de secreción.

Identification of immunodominant proteic antigens of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica-like* from avian strains.

Abstract.

Recently, similar organisms to *Mannheimia haemolytica* (Mh-like) have been associated with respiratory and reproductive signology in broilers and laying hens in different areas of Mexico. Until now it is unknown the correct identity of such isolations and their immunodominant antigenic structures. In this study, the outer membrane proteins (OMP) electrophoretic profile and the supernatant proteins from the culture (SPC) of three different isolations from Mh-like were obtained through polyacrylamide agar gel electrophoresis (SDS-PAGE). Furthermore, several immunodominant proteins were detected using sera from convalescent birds using the immunoelectroblotting technique (*Western-Blot*). The molecular weight in all antigens of OMP and secretory antigens were compared against the antigens from control strain of MH biogroup A, serotype 1 (MhA1), *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus paragallinarum*. Differences in the growth velocity among the three isolations were observed and also between the three isolations and control strains. From isolation A through SDS-PAGE, they were observed two main OMP of 41.6 and 29.6 kDa, a SPC of 38.6 kDa and just to 8 hours of incubation was observed an OMP of 35.6 kDa. From isolation B they were observed two main OMP of 29.5 and 43.6 kDa, a minor OMP of 32.4 and also, just to 8 hours of incubation two OMP de 37.8 and 24.5 kDa. From isolation C two main OMP of 36.5 and 41.7 kDa and two minors OMP of 29.4 and 46.5 kDa were observed. Immunoelectroblotting detected several immunodominant antigens. From isolation A one SPC of 38.0 kDa, from isolation B two SPC of 64.1 and 37.9 kDa and a structural protein of 30.5 kDa and from isolation C a structural protein of 60.9 kDa. Differences among electrophoretic profiles of OMP from the three isolation were observed and also between the three isolations and control strains. Differences between the immunodominant antigenic pathways in the three isolations and also the pathways among the three isolations and control strains were detected. The immunodominant feature and detection pathway suggest the immunodominant antigen characterization of 38.0 kDa from the isolation A and 64.1, 37.9 and 30.5 kDa from isolation B. Five antigens of similar molecular weight were identified by two-dimensional gel electrophoresis gels (36.6, 36.5, 37.2, 29.3 y 28.8 kDa). The results of this study demonstrate the presence of immunodominant Mh-like antigens, such as OMP's and proteins, probably of secretory nature.

IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS PROTEICOS INMUNODOMINANTES DE *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica-like* DE ORIGEN AVIAR.

INTRODUCCIÓN.

Se considera a las neumonías como los padecimientos de mayor importancia en los animales domésticos¹ y, a las bacterias de los géneros *Mannheimia* y *Pasteurella*, como los microorganismos más relacionados con ellas.² El término "pasteurelosis", se emplea para referirse a los padecimientos causados por *Mannheimia* y *Pasteurella* en todas las especies animales.² En los bovinos, la pasteurelosis neumónica (PN) resulta particularmente importante por las enormes pérdidas económicas que ocasiona.³ En Norteamérica, esta enfermedad ocasiona la muerte de al menos el 1% del ganado de engorda, y es responsable de la disminución de la ganancia de peso en otro 10%;⁴ las pérdidas económicas, en ese mismo país, se estiman de los 600 a los 1000 millones de dólares anualmente.⁵

Se sabe que la PN del bovino es el resultado de una alteración en los mecanismos de depuración pulmonar, ocasionada por diversos factores condicionantes, durante el manejo del ganado como transporte prolongado, hacinamiento, o ambientales como cambios extremos de la temperatura, humedad relativa elevada, lo mismo que a infecciones virales predisponentes, rinotraqueitis infecciosa bovina, parainfluenza-3 ó diarrea viral bovina. Por estas razones también se le refiere como complejo de la enfermedad respiratoria de los bovinos.^{3,6,7} Sin embargo, el término PN persiste debido a la relevancia de *Mannheimia haemolytica* (Mh), más que *Pasteurella multocida* en la generación del daño pulmonar y, por ende, en las manifestaciones clínicas derivadas del padecimiento.^{3,6,8} Por otra parte, también se ha estudiado la reducida capacidad pulmonar de los bovinos como una condición inherente que los predispone a padecer enfermedades pulmonares como la PN.⁹

La causa definitiva para la presentación de la PN, es la colonización de los pulmones por bacterias patógenas. *Mannheimia haemolytica* biotipo A serotipo 1 (MhA1) es la bacteria aislada con mayor frecuencia de animales con fiebre de embarque severa.^{10,11} *Pasteurella multocida* y *Haemophilus somnus* son aislados ocasionalmente; sin embargo, Mh es la bacteria mas importante para el desarrollo de la pasterelosis neumónica.¹⁰

Mannheimia haemolytica es un cocobacilo Gram negativo, hemolítico. Originalmente fue denominada *Bacterium bipolare multocidum* por Theodore Kitt en 1885.¹² En 1896, Flugge la llamó *Bacillus bovisseptica*, para posteriormente ser subdividida en dos grupos, uno causante de neumonía fibrinosa bovina (*Pasteurella bovisseptica*) y otro responsable de la septicemia hemorrágica (conocido ahora como *Pasteurella multocida*).¹³ En 1932, Newson y Cross propusieron el nombre de *Pasteurella haemolytica* para la bacteria que originaba neumonía en los bovinos.¹⁴

Tradicionalmente, Mh había sido subdividida en dos biotipos, A y T, basados en características bioquímicas (la fermentación de arabinosa y trealosa, respectivamente).^{15,16} Con base en variaciones del polisacárido capsular, en 1962 se estableció un sistema de serotipificación¹⁷ y actualmente se conocen 17 serotipos.¹⁸ A partir de resultados obtenidos de ensayos de hibridación DNA-DNA, en 1985, *P. haemolytica* fue excluida del género *Pasteurella*.¹⁹ Sin embargo, además de las características bioquímicas y serológicas, también existen variaciones epidemiológicas y patogénicas entre los biotipos A y T;²⁰ este último, fue considerado como una especie diferente, denominada *Pasteurella trehalosi*.^{21,22}

El biotipo A estaba asociado a 13 serotipos capsulares: 1, 2, 5-9, 11-14, 16 y el 17, aunque aislamientos pertenecientes al serotipo 11 no pueden ser clasificados fácilmente en el biotipo A y se había propuesto un tercer biotipo para ellos;²³ además, mediante comparación de la secuencia ARNr 16S se observó que el serotipo 11 es filogenéticamente diferente a los demás.²⁴ Por otro lado, aproximadamente el 10% de aislamientos provenientes de bovinos y borregos no son tipificables.^{25,26}

Mientras que MhA1 es un serotipo aislado de bovinos con PN, MhA2 se aísla en menos ocasiones, aunque es aislada con frecuencia a partir de animales sanos.³ En contraste, el serotipo A2 se recupera frecuentemente a partir de casos de PN de ovejas (aunque también se puede aislar de ovinos aparentemente sanos), mientras que el A1 no es aislado comúnmente de animales sanos de esta especie.²⁰

Cultivos bacterianos realizados a partir de lavados nasales de bovinos sanos, a menudo muestran la presencia de MhA2, un comensal no patógeno.^{27,28} El serotipo A1 puede estar presente²⁹, sin embargo, la cantidad de esta bacteria es demasiado baja para ser aislada fácilmente. Una vez que el ganado es transportado, sometido a estrés o infectado con algún virus respiratorio, MhA1 es el organismo aislado con mayor frecuencia.³⁰ Aunque el mecanismo es aún desconocido, el estrés, de alguna manera, propicia condiciones más favorables en el tracto respiratorio superior para el desarrollo del serotipo 1 que para el serotipo 2. Hasta el momento, no se ha observado tal cambio de serotipos en ovinos, tal vez porque todos los serotipos pueden ocasionar enfermedad. No obstante, los serotipos A1, A2, A6, A7 y el A9 predominan en los corderos.²⁰ La colonización de la cavidad nasal por grandes cantidades de MhA1 aumenta la inhalación de aerosoles, conteniendo dicha bacteria, hacia la tráquea y vías respiratorias inferiores.³¹ En animales sometidos a estrés, simultáneamente infectados con algún virus, o posiblemente si la dosis inhalada de MhA1 es grande, la bacteria puede multiplicarse y causar un influxo de neutrófilos, deposición de fibrina en el alveolo, trombosis capilar, y formación de focos necróticos.³²

Mannheimia haemolytica también es responsable de procesos neumónicos y septicémicos en otros rumiantes incluyendo cabras,³³ bisontes³⁴ y en el carnero cimarrón de cuernos grandes.³⁵ Ocasionalmente, Mh ha sido asociada a infecciones en humanos.^{36,37} Sin embargo, con base en la información existente acerca de la especificidad de especie y mecanismos de virulencia que posee, resulta difícil dar soporte a tales observaciones.³⁸

El conjunto de serotipos que integran el complejo *P. haemolytica* ha sido reclasificado recientemente, con base en ensayos de hibridación ADN-ADN, el análisis de la secuencia del ARNr

16S y tipificación bioquímica.³⁹ Se han identificado un total de 17 serotipos de *P. haemolytica* de los cuales los serotipos 3, 4, 10 y 15 están asociados al biotipo T y son considerados como *Pasteurella trehalosi*.^{21,39} El serotipo 11 es considerado *Mannheimia glucosida* y los serotipos A1,A2, A5-9, A12-14 y el A16 han sido reclasificados como *Mannheimia haemolytica*,³⁹ irónicamente, ninguna de esas cepas fermenta la L-arabinosa.^{39,40} Ensayos de electroforesis enzimática multilocus concuerdan con dicha reclasificación.²⁴

Aunque la fiebre de embarque es una enfermedad multifactorial, se considera de manera general que, el control de la infección de Mh reduce notoriamente la prevalencia y severidad de dicha enfermedad. Lo anterior se fundamenta en evidencia de estudios de campo, en los cuales el ganado de engorda con anticuerpos contra Mh, posiblemente de una infección natural previa, muestra muy baja probabilidad de enfermar o morir debido a la PN.^{41,42}

Mh posee un polisacárido y produce varias proteínas potencialmente antigénicas, de las cuales, algunas han sido caracterizados bioquímica e inmunológicamente, con particular énfasis en moléculas de secreción y de superficie. Entre estas se encuentran una exotoxina denominada leucotoxina,⁴³⁻⁴⁵ una sialo-glicoproteasa,⁴⁶⁻⁵⁰ una neuraminidasa,⁵¹⁻⁵³ una delgada cápsula de polisacárido,^{54,55} una envoltura celular con una superficie compuesta por lipopolisacáridos,^{56,57} proteínas de la membrana externa,^{58,59} y la fimbria.⁶⁰⁻⁶² Adicionalmente, las bacterias Gram negativas poseen una estructura de envoltura interna compuesta de lipoproteínas, proteínas y peptidoglicano.

LEUCOTOXINA.

La leucotoxina (LT), es una exotoxina proteica secretada por todos los serotipos, únicamente durante la fase de crecimiento logarítmico.^{63,64} Es una molécula grande de 101 a 105 kDa; sin embargo, las proteínas de este tamaño parecen ser las subunidades activas de una forma multimérica de 300 kDa o más.^{43,44,64} El gen que codifica para la leucotoxina ha sido clonado y expresado en *Escherichia coli*.^{65,66} Recientemente se ha demostrado su capacidad hemolítica sobre eritrocitos de rumiantes y conejo.⁶⁷ Los efectos tóxicos de la leucotoxina se han demostrado *in vitro*

en macrófagos, neutrófilos, linfocitos, células de linfoma y plaquetas.^{2,64} Su efecto sobre las células endoteliales del pulmón bovino ocurre a través de la activación de los neutrófilos.⁶⁸ Así mismo, se ha reconocido su acción *in vivo*, sobre leucocitos, particularmente sobre macrófagos.¹¹

La LT pertenece a un grupo de toxinas bacterianas denominadas "citolisinas formadoras de poros", por sus típicos efectos sobre las membranas celulares; estos poros de 0.9 a 1.2 nm de diámetro, permiten la disipación de los gradientes transmembranales de K⁺ y Na⁺, ocasionando un desbalance coloido-osmótico y el consecuente hinchamiento celular.^{2,11,64} Subsecuentemente, el Ca²⁺ extracelular puede entrar a la célula, ya sea a través de la activación de fosfolipasas membranales,⁶⁹ o de la destrucción del citoesqueleto; la citólisis es evidente por la formación de graves defectos en la membrana reconocidos ultra estructuralmente y, la aparición en el cultivo, de enzimas indicativas de la extrusión de componentes citoplasmáticos, como la deshidrogenasa láctica.⁶⁴

La LT de Mh está genéticamente relacionada con la citotoxina de *Actinobacillus pleuropneumoniae*,^{70,71} la α -hemolisina de *E. coli*⁷² y una toxina de *A. actinomycetemcomitans*.⁷³ Estas citolisinas, denominadas RTX, constituyen una familia de exotoxinas de bacterias gram negativas codificadas por genes con alta homología.⁷⁴ Se sabe que estas toxinas son el producto de un operón constituido por 4 genes agrupados en el siguiente orden: C, A, B y D. El gen A codifica la estructura de la pretoxina, el gen C codifica una proteína encargada de activar la toxina y los genes B y D codifican proteínas encargadas de la secreción de la misma.^{67,71} Estas citolisinas poseen entre 7 y 13 nonapéptidos con secuencias de aminoácidos altamente conservadas, en las que predomina la glicina y el ácido aspártico.⁷⁵ Se ha demostrado que estos dominios son el sitio de unión con el Ca²⁺, e imprescindibles para su actividad tóxica.^{64,71} El receptor celular de la LT pertenece a la familia de las β_2 -integrinas^{76,77} Se ha observado que la LT de *A. actinomycetemcomitans* y la α -hemolisina de *E. coli* utilizan también receptores de la familia de las β_2 -integrinas.⁷⁸ En bajas concentraciones, la leucotoxina de Mh es capaz de inducir muerte celular programada (apoptosis) en leucocitos de bovino.^{77,79}

La participación de la LT en la generación de daño tisular en el pulmón, ocurre a través de la activación y destrucción de neutrófilos polimorfonucleares y macrófagos. En efecto, la activación de fosfolipasas con la subsecuente liberación del factor activador plaquetario, la activación de compuestos quimiotácticos y vasoactivos derivados del ácido araquidónico, la degradación del arsenal enzimático contenido en los lisosomas, la generación de radicales tóxicos del oxígeno y la liberación de citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF), contribuyen a la saturación de la respuesta inflamatoria, y en consecuencia al daño tisular;^{11,80,81} así mismo, las plaquetas pueden también contribuir a liberar fibrinógeno y compuestos vasoactivos en presencia de la LT.⁶⁴ Por otra parte, se ha demostrado que la LT también induce la liberación de histamina de las células cebadas del pulmón del bovino *in vitro*.⁸² Se ha observado que la leucotoxina puede inhibir la participación de monocitos y macrófagos en la respuesta inmune, al disminuir en ellos la expresión de antígenos de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad y por ende, su capacidad para presentar antígenos durante la interacción con linfocitos T.⁸³

Como se puede observar, la LT de Mh no tiene un efecto directo en la generación del daño tisular, sino más bien participa en la activación y destrucción de las células susceptibles, y por lo tanto, su función parece tener más relación con un mecanismo de defensa para la bacteria que con un factor promotor del daño tisular.

En los bovinos, se ha observado una correlación positiva de altos títulos de anticuerpos anti-LT en suero, con resistencia a la PN.^{42,84-86} Los anticuerpos anti-LT pueden ser medidos por pruebas de neutralización y ELISA, utilizando como antígeno a la LT parcialmente purificada.⁸⁷⁻⁸⁹ No obstante, el estudio de la respuesta de anticuerpos inducida en animales inmunizados con bacterinas con adyuvante incompleto de Freund (AIF) y con adyuvante completo de Freund (ACF) mostró que ese tipo de vacunaciones estimulan la resistencia contra el desafío, pero no se observó la producción de anticuerpos antileucotoxina, sugiriendo que además de la LT son importantes otros antígenos en la inducción de resistencia.^{85,90}

SIALOGLICOPROTEASA.

La sialoglicoproteasa (GP) es una metaloproteasa de 35.2 kDa.^{46,47} Se ha observado que el sobrenadante del cultivo en fase logarítmica de Mh contiene actividad de sialoglicoproteasa, indicando la presencia de la enzima en dicha fracción.⁴⁷ Esta enzima es específica únicamente para O-sialoglicoproteínas, mientras que las proteínas que carecen de los residuos O-sialoglicopéptidos no son sustrato para esta enzima.^{46,49} El gen de la SG (*gcp*) ha sido clonado en *E. coli* y secuenciado.⁴⁹ Desafortunadamente, esta proteína se acumula en el periplasma de *E. coli* en forma de agregados y es inactiva, resultando difícil la purificación en una forma nativa.⁵⁰ El estudio de la producción de esta enzima en los diferentes serotipos muestra que, todos los serotipos del biotipo A (*M. haemolytica* y *M. glucosida*) poseen el gen de la GP; sin embargo, parece que el biotipo T (*P. trehalos*) no posee el este gen, ni la respectiva actividad proteolítica.^{48,91}

Actualmente, el sustrato mejor caracterizado para esta enzima, es la glicoporina A membranal del eritrocito humano; sin embargo, no actúa sobre eritrocitos, células endoteliales ni macrófagos de bovino⁴⁶, por lo cual, su participación en la patogénesis del daño pulmonar es incierta.² No obstante, Nyarko *et al.*,⁹² observaron que tanto la LT como la SG, incrementan la adhesión y agregación plaquetaria en presencia de Ca²⁺. Se ha observado, que cepas mutantes de Mh que no producen leucotoxina, mantienen su actividad secretora de sialoglicoproteasa.⁹³ Por otro lado, animales vacunados y desafiados con Mh inducen anticuerpos anti-SG, además, estos animales poseen menos lesiones en pulmón después de un desafío con Mh.⁹⁴

NEUROAMINIDASA.

La neuraminidasa (NA), es una enzima extracelular termolábil y alcanza el máximo pico de producción en la fase de crecimiento estacionaria,⁵³ el peso molecular de la enzima es de 150 kDa y 170 kDa estimado mediante filtración en gel y SDS-PAGE, respectivamente.⁵² Straus *et al.*,⁹⁵ caracterizaron la enzima de 12 serotipos y observaron una especificidad de sustrato y pesos moleculares similares a los observados con anterioridad, así como similitud antigénica, ya que las NA

de todos los serotipos son neutralizadas por anticuerpos anti-NA de Mh A1. Parece que la enzima, además de ser secretada, se encuentra formando parte del complejo antigénico de la pared celular, ya que un antisuero contra la bacteria íntegra, fue capaz de neutralizar la actividad de la enzima.⁹⁶

Los primeros en investigar la producción de NA (o sialidasa) en el género *Mannheimia* fueron Scharmann *et al.*, en 1970.⁹⁷ Dichos investigadores observaron la producción de esta enzima en 3 de 5 aislamientos de Mh y en 102 de 104 de *P. multocida*. Mas tarde, Frank y Tabatabai,⁵¹ observaron la producción de la enzima por los serotipos 1, 4, 5, 6, 7, 9 y 12 de Mh, no así en los serotipos 2, 3, 8, 10 y 11 (en ese entonces, solo se habían identificado 12 serotipos). Estos resultados contrastan con lo observado por Straus *et al.*,⁹⁵ quienes observaron que todos los serotipos de Mh excepto el 11, fueron capaces de producir la enzima. Una posible explicación a estos resultados es que, en el primer caso, la enzima detectada estaba, en su mayoría, unida a la célula bacteriana; en el segundo caso, se trataba de enzima extracelular previamente secretada por la bacteria.⁹⁵

Se piensa que la NA producida *in vivo* por otras bacterias, actúa como un factor de virulencia, tal es el caso de *Vibrio cholerae*,⁹⁸ *Corynebacterium diphtheriae*⁹⁹ y *Streptococcus pneumoniae*.¹⁰⁰ Poco se sabe acerca de cual podría ser el mecanismo de virulencia de esta enzima. Un posible mecanismo fue propuesto por Gottschalk;¹⁰¹ quién demostró, que la remoción de ácido siálico de las glicoproteínas salivares, reducía su efecto protector contra potenciales patógenos. Debido a esto, la NA bacteriana podría facilitar en gran medida la sobrevivencia de la bacteria en condiciones *in vivo*.^{101,102}

No se conoce si existe relación alguna entre la capacidad de la bacteria para inducir neumonía en el ganado y la producción de la NA. Se sabe que los serotipos 1 y 2 son los que se aíslan con mayor frecuencia del tracto respiratorio superior del ganado.³ Aislamientos del serotipo 1 de Mh producen mayores niveles de neuraminidasa que los del serotipo A2.⁵¹ Por otro lado, se observa una especificidad similar hacia los diferentes substratos de las diferentes NA; sin embargo, de todas éstas, la NA de Mh A1 liberó mas ácido siálico de todos los substratos probados que cualquiera de las otras NA.⁹⁵ Se determinó la relación entre la producción de la enzima de Mh aislada

de casos de pasteurelisis neumónica ovina y bovina.⁹⁶ Los resultados sugieren que los niveles de actividad de la enzima en los aislamientos examinados están asociados al serotipo. Lo anterior podría indicar que la NA está involucrada en el proceso invasivo de Mh.

CÁPSULA (POLISACÁRIDO CAPSULAR).

Otro factor de virulencia asociado con la estructura celular de Mh es su cápsula, que posee propiedades antifagocíticas² al igual que sucede en otras bacterias.¹⁰³ El sistema de serotipificación se basa en diferencias de los antígenos capsulares. Se ha determinado la estructura de la cápsula de MhA1, A2 y A7.^{54,104,105} El polisacárido capsular (PC) de MhA1 es complejo y de alto peso molecular, compuesto por azúcares manosamina, mientras que la de MhA2 se compone de ácido siálico, idéntico al polisacárido capsular de *N. meningitidis* y *E. coli*.¹⁰⁴ El PC de MhA1 es producido durante la fase de crecimiento logarítmico de la bacteria¹⁰⁶ Las cápsulas cuyo componente principal es el ácido siálico no son inmunogénicas, ya que este es un componente común de las membranas celulares del huésped. En el caso de MhA1 la cápsula parece estar involucrada en la adherencia,^{107,108} la inhibición del efecto bactericida mediado por factores del Complemento, así como resistencia a la fagocitosis^{2,109} e inhibición de los efectos bactericida y fagocítico de los neutrófilos.¹¹⁰ Anticuerpos dirigidos al material capsular opsonizan la bacteria, facilitando su internación por macrófagos.¹¹¹

Se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra el PC en ganado, posterior a la exposición experimental con Mh.^{86,112,113} Otros estudios aportan fuerte evidencia de correlación entre altos títulos de anticuerpos hacia el PC y resistencia.^{55,113,114} Sin embargo, los títulos iniciales de anticuerpos anti-PC son generalmente bajos, a menudo carecen de especificidad y no son bactericidas.¹¹⁵ No obstante, es posible incrementar la inmunidad protectora inducida por el PC. Por ejemplo, las bacterinas de Mh administradas con adyuvante completo (ACF) o incompleto (AIF) de Freund producen respuestas de anticuerpos hacia el PC más altas, que correlacionan con resistencia

a la pastereiosis neumónica natural¹¹⁵ o experimentalmente inducida,¹¹³ en comparación a las inducidas en ausencia de dicho adyuvante.

Se ha investigado la capacidad del muramil-dipéptido, MDP (estructura mínima del ACF) para incrementar la respuesta humoral protectora en bovinos y corderos hacia el PC, sin los efectos adversos del ACF.¹¹⁶ Se comparó la eficiencia de dos vacunas comerciales con la de 2 vacunas de-PC, administradas con MDP y se observó mayor eficacia y títulos de anticuerpos bactericidas más altos, siguientes a la vacunación PC-MDP. No obstante, el material capsular de MhA1 no es un antígeno protector por sí solo.^{55,113}

PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA.

Se ha demostrado en otras bacterias, que las proteínas de la membrana externa (PME) son potenciales candidatos para ser utilizados como inmunógenos.¹¹⁷⁻¹²⁰ La inmunización subcutánea con un extracto de PME de *M. haemolytica*, confiere protección contra el desafío en bovinos¹²¹⁻¹²³ y ovinos.¹²⁴

Squire et al.,⁵⁸ identificaron dos PME principales de MhA1 de 30 y 42 kDa. Knights *et al.*,¹²⁵ observaron diferencias en el perfil de PME de los biotipos A y T, así como entre los diferentes serotipos de *M. haemolytica* y *P. multocida*. Rossmanith *et al.*,¹²⁶ estudiaron la susceptibilidad antimicrobiana, los perfiles de plásmidos y de PME de 12 serotipos de *P. haemolytica* biotipos A y T, de aislamientos de campo de *P. haemolytica* A1 y de *P. multocida*. También observaron en los 12 aislamientos del biotipo A, dos principales proteínas de 29 y 43 kDa; además, una cepa de desafío serotipo A1 y un aislamiento serotipo A11 mostraron una tercera banda prominente de 40 kDa. Tres aislamientos serotipos T3, T4 y T10 mostraron tres principales PME de 25, 36 y 43 kDa.

Davies *et al.*,¹²⁷ investigaron la diferencia de los perfiles de PME y de lipopolisacárido (LPS) de MhA1 bajo diferentes condiciones de crecimiento *in vitro*. Ellos observaron cinco PME principales de 18, 29, 39.5, 40.5, 42 kDa y expresión diferencial dependiendo de la fase de crecimiento (18, 24, 40.5 y 94 kDa), grado de aireación (40.5, PME reguladas por hierro [PME-rh]

71, 77 y 100 kDa), adición de 5% CO₂ (sin efecto) y adición de suero fetal bovino o suero neonatal bovino (18, 28, 39.5, 52, 97, 98, PME-rh 71, 77 y 100 kDa). Gatewood *et al.*,¹²⁸ también observaron diferencias en la expresión de las PME de MhA1 en medio BHI y RPMI con o sin hierro y suero fetal bovino.

McCluskey *et al.*,¹²⁹ evaluaron los perfiles de LPS y PME de MhA1 y MhA2, ambas provenientes de animales sanos y de animales con pasterelosis neumónica. Dichos investigadores obtuvieron perfiles de PME similares a los observados previamente por Davies *et al.*,¹²⁷ y encontraron diferencias entre los perfiles de aislamientos provenientes de animales sanos con respecto a los de animales enfermos, entre aislamientos de diferente serotipo, e incluso entre los aislamientos de un mismo serotipo, poniendo de manifiesto la diversidad y variabilidades que existen entre aislamientos de un mismo serotipo. Aunque estas diferencias no fueron detectadas en un principio mediante SDS-PAGE, fue posible su observación mediante *Western-Blot*.¹²⁹

De forma similar, Davies *et al.*,⁵⁹ identificaron diferencias en el perfil de PME de 55 diferentes aislamientos de MhA1 y 55 de MhA2. Se detectaron 3 PME principales comunes a todos los aislamientos de MhA1: 39, 40 y 41 y expresión diferencial de: 16, 17, 30.5, 31, 31.5, 65, 90 kDa. Además, observaron diferencias significativas entre el perfil de aislamientos de origen bovino y de origen ovino del mismo serotipo. Davies *et al.*,¹³⁰ estudiaron los perfiles de las PME de MhA1 *in vivo* e *in vitro*, y encontraron diferencias en las proteínas de 18, 19, 31, 39.5, y las PME-rh de 71, 77 y 100 kDa.

Mediante dos métodos de extracción, Morton *et al.*,¹³¹ reportaron tres principales PME de 30.5, 38.5, 96 y tres menores de 37, 44.5, 49 y 62.5 kDa.

MhA1 posee una PME (PomA) de 30 y 35 kDa (SDS-PAGE 12 y 18%, respectivamente) que pertenece a la familia de proteínas OmpA.¹³² Comparando la secuencia de aminoácidos N-terminal se observó 60, 65, 85, 100 y 100% de identidad con OmpA de *E. coli*,¹³³ *Salmonella typhimurium*,¹³⁴ *Haemophilus influenzae*,¹³⁵ *H. somnus*¹³⁶ y *A. actinomycetemcomitans*,¹³⁷ respectivamente. Además, mediante ELISA Y *Western-Blot*, se observó que animales previamente inmunizados con una vacuna

de Mh, incrementan significativamente la producción de anticuerpos contra PomA.¹³² El gen de esta proteína ha sido secuenciado, clonado y expresado.¹³⁸

PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA REGULADAS POR HIERRO.

Se ha demostrado, en condiciones limitadas de hierro, tanto *in vitro*,^{130,139-141} como *in vivo*,^{130,140} la expresión de tres PME-rh principales (71, 77, 100 kDa); además, mediante *Western-Blot*, un conjunto de sueros provenientes de animales experimentalmente infectados y convalecientes a PN, fue capaz de reaccionar con dichas proteínas.^{139,140} En otro estudio, el suero de animales inoculados con MhA1 sólo fue capaz de reconocer dos de esas proteínas (71 y 77 kDa).¹⁴² Al parecer, los anticuerpos contra estas proteínas no confieren protección al desafío por sí solos, sin embargo, en conjunto con aquellos dirigidos a otros antígenos, pueden participar en la protección contra MhA1.^{142,143}

Se ha demostrado la especificidad, afinidad y unión de las proteínas de 71 y 100 kDa a la transferrina bovina.^{141,144,145} Los genes que codifican las proteínas de 71 y 100 kDa han sido clonados, secuenciados e identificados como los receptores de unión a la transferrina, denominados TbpA y TbpB.¹⁴⁴ Animales inmunizados con TbpA y TbpB fueron protegidos contra un desafío con una cepa de herpesvirus-1 y MhA1. No se observó protección en animales inmunizados únicamente con TbpA o con TbpB. Además, se observó relación entre los títulos de anticuerpos anti TbpB y protección al desafío. No se observó una respuesta humoral significativa contra TbpA, posiblemente su contribución en la protección observada sea por medio de una respuesta de tipo celular.¹²³

JUSTIFICACIÓN.

Anteriormente, el aislamiento de Mh a partir de algún caso con signología respiratoria en aves no era considerado significativo, ya que se consideraba como un organismo oportunista, dándosele mayor importancia a otro tipo de aislamientos como *E. coli*, *Pseudomonas* spp, o el diagnóstico era orientado al aislamiento de otros agentes como el virus de la enfermedad de Newcastle o de la bronquitis infecciosa.¹⁴⁶

Mannheimia haemolytica ha sido asociada al incremento de la mortalidad y anormalidades de la producción de huevo en aves (postura comercial, reproductoras y pollo de engorda); los órganos afectados son: pulmón, tráquea, bazo, hígado y oviducto.¹⁴⁷⁻¹⁵⁷ Se ha observado también la presencia de *M. haemolytica* en aves sanas,^{158,159} por lo que es posible que forme parte de la microbiota traqueal y, bajos ciertas condiciones, podría desencadenar enfermedad.¹⁵⁹

Durante los últimos años, Mh ha cobrado mayor importancia en la avicultura nacional, debido a la presentación de varios brotes de signología respiratoria y reproductiva, de forma sobreaguda hasta crónica, a partir de los cuales ha sido posible la obtención de varios aislamientos bacterianos, los cuales muestran características fenotípicas y morfológicas similares a las descritas anteriormente para Mh.^{146, 160-162,164}

La terapia tradicional para este agente se basa en el uso masivo de antibióticos, sin embargo, en el caso de las cepas de origen bovino, se ha observado un aumento de la incidencia de cepas multi-resistentes;^{165,166} en el caso de las cepas aviares se ha observado un comportamiento similar,¹⁶² por lo tanto, la profilaxis a través de inmunógenos se vuelve más recomendable.³⁸

El desarrollo de vacunas efectivas requiere del estudio y la comprensión de los factores de virulencia y los antígenos necesarios para estimular una protección inmune.³⁸ En el caso de Mh, los antígenos protectores se espera sean componentes de la superficie bacteriana, tales como las PME, el antígeno-O del lipopolisacárido, además de moléculas de secreción, tales como la leucotoxina.³⁸

Se ha observado que altos títulos de anticuerpos anti-leucotoxina confieren protección a la enfermedad.^{42,84-86} Sin embargo, el tratamiento de animales con leucotoxina recombinante purificada

fue incapaz de conferir protección, indicando que este antígeno, por sí solo, no es suficiente para el desarrollo de protección ante la enfermedad.^{167,168} De manera similar, el uso del polisacárido capsular por sí sólo, o en combinación con la leucotoxina, no confiere protección.⁵⁵ El uso de un inmunógeno que incluye sobrenadante de cultivo, adicionado con leucotoxina recombinante ha sido efectivo,¹⁶⁷ sugiriendo que el mejor biológico para la prevención de la PN es aquel que contiene la leucotoxina, además de antígenos contenidos en el sobrenadante.³⁸ Otros investigadores han obtenido éxito con el uso de una vacuna,^{169,170} pero aún existe controversia respecto a la virulencia de dicha vacuna. En particular, las PME y las PME-rh han recibido especial interés en el desarrollo de vacunas subunitarias.^{121,123,124,142,171,172}

Aún cuando existe información considerable acerca de estos antígenos (en el caso de las cepas y aislamientos de Mh provenientes de rumiantes), actualmente no se ha descrito la existencia de posibles moléculas de secreción, PME o algún otro antígeno inmunodominante, a partir de aislamientos similares a Mh provenientes de aves.

A nivel mundial, México es el cuarto y sexto principal productor de carne de pollo y huevo, respectivamente,¹⁷³ con producciones en el año 2000 de 1,944,718 (UNA)¹⁷³ o 1,787,942 Tons. (SAGARPA)¹⁷⁴ de huevo para plato y 1,935,966¹⁷³ o 1,825,249¹⁷⁴ Tons de carne de pollo

En 2000, la participación de la avicultura en el producto interno bruto (PIB) agropecuario fue de 8.3% y de 33.4% dentro del PIB pecuario.¹⁷³ Varios de los principales estados productores de carne y huevo han presentado brotes de *M. haemolytica-like*, por lo que se vuelve imprescindible conocer plenamente el agente o los agentes responsables de estos brotes y, a su vez, proponer posibles estrategias para su control.

OBJETIVO GENERAL.

-Identificación y caracterización parcial de dos de los antígenos proteicos inmunodominantes de *Mannheimia haemolytica-like* de origen aviar.

OBJETIVOS PARTICULARES.

-Biotipificación y obtención de las curvas de crecimiento de 3 aislamientos similares a Mh provenientes de aves.

-Obtención de lisados bacterianos totales, proteínas del sobrenadante de cultivo bacteriano y proteínas de la membrana externa de tres aislamientos similares a Mh provenientes de aves.

-Identificación de posibles proteínas de secreción y proteínas de la membrana externa principales.

-Detección de antígenos inmunodominantes.

-Caracterización parcial de dos de los antígenos inmunodominantes detectados.

HIPÓTESIS.

Los antígenos proteicos membranales y de secreción generan una respuesta inmune que podría estar relacionada con protección.

MATERIALES Y MÉTODOS.

BACTERIAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

Se cultivaron tres diferentes aislamientos de *Mannheimia haemolytica-like* (Mh-like) y como testigos las siguientes cepas: *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1 de referencia (MhA1),* *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 1, serotipo 11, de origen Canadiense (Ap) y *Haemophilus paragallinarum* cepa W (Hp), aislado de muestras clínicas en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la UNAM.

Todas las cepas y los aislamientos se cultivaron en 5 ml. de caldo infusión cerebro corazón (CICC)^a estéril, durante toda la noche a 37°C a 200 revoluciones por minuto^b (rpm). De este caldo, se depositó 1 ml en 9 ml de CICC y se incubó 3 h a 37°C a 200 rpm. Después de la incubación, se tomaron 800 µl del cultivo y se inocularon en 400 ml de CICC. Todos los aislamientos se cultivaron durante 3, 6 y 8 h a 37°C a 200 rpm. En el caso de Hp se cultivó durante 11, 21 y 28 h. Para el cultivo de Ap y Hp al medio se adicionó NAD (dinucleótido de adenoín-nicotinamida)^c y suero de equino^c estéril a una concentración final de 0.1% y 2%, respectivamente.

CURVAS DE CRECIMIENTO.

Por cada aislamiento de Mh-like se inocularon 50 ml de CICC. Al momento de la inoculación, y a intervalos de una hora, durante 12 h, se tomó 1 ml del cultivo en condiciones de esterilidad y se determinó densidad óptica (DO) a 600 nm.^d Simultáneamente se tomaron 100 µl del cultivo, se realizaron diluciones décuples seriadas (con CICC estéril) y, de cada dilución se tomaron 100 µl que se sembraron en una caja de agar infusión cerebro corazón, dispersando el inóculo en toda la

*Donada por el Dr. G.H. Frank. National Animal Disease Center. Ames, Iowa. USA.

^a Bioxon. Becton Dickinson.

^b Lab-Line Instruments, Inc. Orbit Incubator-Shaker.

^c Sigma-Aldrich Química.

^d Pharmacia Biotech. Mod. Ultrospec 3000.

superficie de la misma. Las cajas se incubaron^e durante 24 h a 37°C y se determinó el número de unidades formadoras de colonia por ml (UFC.ml⁻¹).

OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DEL SOBRENADANTE.

Se cultivaron 400 ml de CICC con las condiciones y bacterias previamente descritas. Se separaron el sobrenadante (SN) y las células bacterianas mediante centrifugación a 3500 x *g* durante 10 min a 4°C.^f La pastilla de bacterias se conservó aparte. Se precipitaron las proteínas del SN (PSN) con un volumen igual de ácido tricloroacético al 20% durante 45 min a 4°C. Se centrifugó a 25,000 x *g* durante 15 min a 4°C.^g Se decantó el sobrenadante y la pastilla de proteínas precipitadas se recuperó con acetona a 4°C. Se centrifugó a 14,000 x *g* durante 15 min a 4°C.^h Se decantó el sobrenadante y las proteínas se lavaron 2 veces, resuspendiéndolas en 1 ml de solución de Na₂HPO₄ 10 mM pH 7.2, se centrifugaron a 14,000 x *g* durante 45 min a 4°C.^h Las PSN se resuspendieron en 500 µl de solución salina fosfatada amortiguada (PBS) pH 7.4 y se mantuvieron en congelación a -79°C hasta su uso. Finalmente, se obtuvieron PSN de todos los aislamientos y cepas a las 3, 6 y 8 h de incubación (a las 11, 21 y 28 h, en el caso de Hp).

LISADO DE BACTERIAS.

La pastilla de bacterias obtenida se lavó dos veces, resuspendiéndolas en 20 ml de una solución de Na₂HPO₄, 10 mM, pH 7.2 y se centrifugó a 3500 x *g* durante 10 min a 4°C. La pastilla de bacterias equivalente a aproximadamente 15 ml de cultivo se aforó a 1 ml con PBS y se conservó a -79°C hasta su uso. El lisado (L) se obtuvo al colocar las bacterias en amortiguador de lisis de Laemmli y ebullición a 95-100 °C previo a la separación electroforética. Se conservaron células de todos los aislamientos y cepas a las 3, 6 y 8 h de incubación (a las 11, 21 y 28 h, en el caso de Hp).

^e New Brunswick Scientific. Mod. G-24.

^f IEC International. Mod PR-2.

^g Beckman Mod J2-21.

^h Jouan, Inc. Mod 18-22

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA.

Las PME se obtuvieron de acuerdo al método de Schnaitman *et al.*¹⁷⁵ El resto de la pastilla de bacterias se resuspendió en 20 ml de una solución de Na₂HPO₄, 10 mM, pH 7.2. Las células se sonicaron a 4°C hasta obtener una suspensión transparente y se centrifugó a 10,000 x *g* durante 5 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 13,000 x *g* durante 45 min a 4°C. La pastilla se resuspendió en 20 ml de una solución 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, Tritón X-100 2%, pH 8.0 y se incubó durante 45 min a 37°C. Se centrifugó a 13,000 x *g* durante 45 min a 4°C. La pastilla se lavó dos veces resuspendiéndola en 1 ml de una solución de Na₂HPO₄, 10 mM, pH 7.2 y se centrifugó a 13,000 x *g* durante 45 min a 4°C. Al final, la pastilla se resuspendió en 500 µl de PBS. Se obtuvieron PME a las 3, 6 y 8 h de los tres aislamientos de *Mh-like*, a las 6 h de MhA1 y AP; y a las 21 h de incubación de Hp.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA.

Para la cuantificación de las proteínas se utilizó la técnica de Bradford.¹⁷⁶ Se realizó una curva testigo de proteína con albúmina sérica bovina (ASB). Se depositaron 0, 1, 20, 40, 60, 80, y 100 µg de ASB en celdas desechables para espectrofotómetro^c, se aforó a 100 µl con PBS y se agregó 1 ml de reactivo de Bradford. Se pipeteó para homogenizar la mezcla. Después de 2 minutos se determinó la DO a 595 nm.^d Para cuantificar la proteína se repitió el procedimiento, sustituyendo la ASB por 5 µl de cada una de las muestras.

SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA.

Las 9 fracciones de cada aislamiento de *Mh-like* (PSN, L y PME a las 3, 6 y 8 h de incubación), y las siete fracciones de cada aislamiento (las mismas excepto PME a las 3 y 8 h de incubación), así como una muestra del medio de cultivo bacteriano sin inocular, fueron separados electroforéticamente en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (poliacrilamida-SDS). Se prepararon geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS al 12%, de 0.75 mm (sólo para las preparaciones de Hp) y de 1.5 mm de

grosor (para las preparaciones de las demás cepas y aislamientos). La composición de los geles y de las soluciones amortiguadoras se hizo de acuerdo a la técnica de Laemmli.¹⁷⁷ Los geles ya polimerizados se colocaron en la cámara de electroforesis.^l A las diferentes fracciones de cada aislamiento se les agregó amortiguador de muestra a una concentración final de 1:5 y se colocaron en agua a ebullición por 5 min. En los pozos del gel se colocaron 20 y 30 µg de de proteína (geles de 0.75 y 1.5 mm de grosor respectivamente) de cada una de las muestras de los diferentes aislamientos, así como de las proteínas testigo del medio. Se colocó en dos pozos marcador de peso molecular^l (M). Con una fuente de poder^k se aplicó un voltaje de 50 V hasta que el colorante alcanzó el gel separador. Se aumentó el voltaje a 95 V hasta que el colorante comenzó a salir del gel.

TINCIÓN AZUL BRILLANTE DE COOMASSIE.

Se preparó una solución teñidora con azul brillante de Coomassie R-250^c. Los geles se colocaron en dicha solución con agitación constante a 25 rpm durante toda la noche. Se retiró la solución teñidora y se agregó solución desteñidora, cambiándola las veces que fuese necesario para observar teñidas únicamente a las proteínas. Los geles se conservaron en papel celofán dulce.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

Se identificaron las proteínas inmunodominantes de las distintas preparaciones mediante la técnica de inmunoelectrotransferencia (*Western-Blot*).¹⁷⁸ Una vez concluida la electroforesis, se separó el gel concentrador del separador. Se aplicaron dos lavados de 10 minutos cada uno al gel separador, con solución amortiguadora de transferencia (SAT) en agitación a 25 rpm. El casete contenedor^{l,m} se ensambló dentro de un recipiente con SAT de la siguiente manera: se utilizó una de las cubiertas

^l Bio-Rad. Mod Mini-PROTEAN II Cell; Owl Scientific. Mod P9DS-1.

^j Gibco No. Cat. 10747-012.

^k Bio-Rad Mod. 1000/500

^l Bio-Rad Mod. Mini-Transblot Cell.

^m Bio-Rad Mod. Transblot Cell

laterales como base, sobre ésta se colocó un cuadro de fibra *Scotch-Brite*[®], después papel filtro y al final el gel separador. Se removió cualquier burbuja atrapada entre el papel filtro y el gel presionando ligeramente el gel. Se agregó SAT al gel y se colocó encima la membrana de nitrocelulosa.ⁿ Se removieron las burbujas entre el gel y la membrana. Después se colocó papel filtro, la fibra *Scotch-Brite*[®] y finalmente la otra cubierta del casete. La fibra, el papel filtro y la membrana de nitrocelulosa se humedecieron por separado durante 10 minutos con SAT, previo al ensamblaje del casete. La cámara de transferencia se llenó con SAT y se introdujo el casete. Con una fuente de poder^k se aplicó un voltaje de 100 V durante 120 min (geles de 1.5 mm). La transferencia se mantuvo a 4°C con el uso de un refrigerante^l y un sistema de recirculación de agua.^{m,o}

Terminada la transferencia, se lavó la membrana de nitrocelulosa durante 10 minutos con una solución 100 mM Tris, NaCl 0.9%, Tween-20 0.1% (TBS-T20) en agitación a 25 rpm. El bloqueo de la membrana se realizó con una solución de leche descremada^p al 3% durante 2 h en agitación a 25 rpm. Se aplicaron dos lavados de 10 min cada uno, con TBS-T20 en agitación a 25 rpm. Se incubó la membrana con una solución de TBS-T20, gelatina^q 1.0%, suero de ave^r 1:500 (anticuerpo primario) durante toda la noche en agitación a 25 rpm. Se aplicaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T20 con agitación a 25 rpm. Se incubó la membrana con una solución de TBS-T20, gelatina 1.0%, anticuerpo anti-IgG de pollo asociado a fosfatasa alcalina^s 1:1500 (anticuerpo secundario), durante 3 h, a temperatura ambiente y con agitación a 25 rpm. Se aplicaron tres lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T20 en agitación a 25 rpm. Se diluyó una pastilla de cloruro de azul de tetrazolio^t en 10 ml de agua destilada y se reveló la membrana colocándola en dicha solución. La reacción se detuvo con agua fría. Las membranas se conservaron en papel aluminio a 4°C.

ⁿ Amersham. Hybond-C.

^o Haake Mod. K20.

^p Nestle. Svelty.

^q Bio-Rad No. Cat. 170-6537.

^r Suero de aves infectadas en brote de campo.

^s Sigma Immuno-Chemicals. No. de producto A-9171.

GELES DE DOBLE DIMENSIÓN

Se realizaron geles de doble dimensión de acuerdo a la técnica descrita por O'Farrell⁶⁰ en 1975.

Los tubos capilares se llenaron hasta tres cuartas partes de su capacidad con solución monomérica, se dejaron polimerizar 2 h, posteriormente se conectaron los capilares al tubo conectivo y con una jeringa de insulina se llenaron los capilares con NaOH 100 mM, cuando estuvieron llenos los capilares, se colocaron en la cámara superior de geles de doble dimensión,^b la cámara inferior se llenó con 800 ml de amortiguador H₃PO₄ 10 mM, y posteriormente se llenó la cámara superior con 75 ml de NaOH 100 mM. A los capilares se les aplicaron 200, 300 y 400 Volts durante 10, 15 y 15 min, respectivamente. Posteriormente se retiraron los dos amortiguadores de las cámaras, el amortiguador de los capilares se retiró con una jeringa de insulina.

A las PSN del aislamiento B con 6 h de incubación, se les agregó amortiguador de muestra para geles de doble dimensión en una concentración 1:1, y se incubaron 15 min a temperatura ambiente. Con una punta delgada se colocaron 8 µg de la muestra por capilar, posteriormente se agregó la misma cantidad de amortiguador de cubrimiento, se terminó de llenar el capilar con NaOH 100 mM, nuevamente se colocó el capilar en la cámara superior, las dos cámaras se llenaron con sus amortiguadores respectivos; y a los geles se les aplicaron 200 Volts durante 16 h. Posteriormente se retiró el gel del capilar y se colocó sobre un gel de poliacrilamida-SDS al 12% de 1 mm de ancho, y se colocó el marcador de peso molecular.^j Se aplicaron 50 Volts durante 24 h y posteriormente el gel se reveló con nitrato de plata.

^t Sigma-Aldrich Química.

^u Bio-Rad. Mod Mini-PROTEAN 2-D Cell

^v Pierce. Gelcode®

^w Bio-Rad. Diversity Database, Version 2.0

ANÁLISIS DE LOS GELES Y MEMBRANAS.

El peso molecular de las proteínas de las diferentes preparaciones se determinó con el programa comercial Diversity Database^{®.w} Para determinar una posible similitud, entre los antígenos de los aislamientos y las cepas testigo, se estableció un rango de ± 0.5 kDa con respecto al peso molecular original.

RESULTADOS.

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA.

Con el fin de determinar el perfil bioquímico de los tres aislamientos de *Mh-like* de origen aviar (A, B y C), se realizaron por duplicado 17 pruebas bioquímicas. Dichas observaciones fueron comparadas con las características bioquímicas descritas para MhA1 de origen bovino, y *Pasteurella trehalosi* (Pt). Los resultados de las diferentes pruebas bioquímicas fueron similares a los descritos para Mh de origen bovino (**Tabla 1**).

CURVAS DE CRECIMIENTO.

Para reconocer las diferentes fases del crecimiento, se realizaron cinéticas de crecimiento bacteriano. Al medir la DO de 4 diferentes aislamientos (A, B, C y D) se observó una fase de crecimiento de adaptación (lag), desde el inicio de la incubación hasta las 3 h aproximadamente; una fase de crecimiento logarítmico (log) de las 3 a las 6 o 7 h, y una fase estacionaria a partir de las 7 u ocho horas aproximadamente (**Fig 1**). Mediante el conteo de las UFC de tres aislamientos (A, B y C) se observó una tendencia similar. En el caso del aislamiento C, sin embargo, no se logró determinar el punto de inicio de la fase estacionaria (**Fig 2**). Los resultados obtenidos mediante la determinación de la DO sugieren un patrón de crecimiento similar al observado con cepas de MhA1 de origen bovino.

SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA.

Con el propósito de identificar posibles proteínas de secreción y las PME de los aislamientos A, B y C, se obtuvieron proteínas del sobrenadante de cultivo, proteínas de la membrana externa y lisados totales de 3 aislamientos de *Mh-like* de origen aviar (A, B y C), así como de MhA1, Ap y Hp. (**fig 3,5,7,9,10 y 11**). A partir del aislamiento A se observaron dos PME principales de 29.3 y 41.6 kDa. También se observó una PME prominente de 35.6 kDa únicamente a las 8 h de incubación. También se observó una PSN de 38.6 kDa a las 6 y 8 horas de cultivo. Con las preparaciones del aislamiento B

se identificaron dos PME principales de 29.5 y 43.6 kDa, así como una menor de 32.4 kDa. También se observaron dos PME de 24.5 y 37.8 kDa a las 6 h y, en mayor grado, a las 8 horas de incubación. Se observa además, una PSN de 37.8 kDa cuya detección aumenta con el tiempo de incubación. En el caso del aislamiento C se detectaron dos PME principales de 36.5 y 41.7 kDa, así como dos menores de 29.4 y 46.5 kDa. Se observó una PSN de 223 kDa, únicamente a las 6 h de incubación. Se muestra resumen de resultados (**tabla 2 y 4**).

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

A partir de las preparaciones de los diferentes aislamientos se identificaron diversas proteínas inmunodominantes (**fig 4, 6 y 8**). Con el aislamiento A se observó una PSN (previamente identificada mediante SDS-PAGE), ahora de 38.0 kDa, únicamente en el SN a las 6 y 8 h de incubación. Con el aislamiento B se identificaron tres PSN de 37.9, 64.1 y 224.7 kDa, y dos proteínas estructurales de 60.6 y 30.5 kDa. A partir del aislamiento C se identificó una proteína inmunodominante (en grado moderado) de 60.9 kDa y una PSN de 225 kDa, únicamente a las 6 horas de incubación. Se muestra también resumen de resultados (**tabla 3**).

ELECTROFORESIS DE DOBLE DIMENSIÓN.

Con el propósito de determinar si las bandas (proteínas inmunodominantes previamente detectadas mediante *Western-Blot*) corresponden a uno, o varios antígenos, se realizó la electroforesis de doble dimensión con la preparación SN del aislamiento B a 6 horas de incubación. Se identificaron 5 antígenos (36.2, 36.5, 37.2, 29.3 y 28.8 kDa) de tamaño similar a aquellos previamente seleccionados (30.5 y 37.9 kDa).

DISCUSIÓN.

En los últimos años se ha observado un aumento del número de casos clínicos en aves, asociados a organismos similares a *M. haemolytica*. Sin embargo, aún no se conoce la identidad exacta del agente responsable de dichos brotes, tanto en nuestro país, como en otras partes del mundo.

Los resultados obtenidos, mediante la biotipificación de 3 diferentes aislamientos de Mh-*like* de este trabajo, coinciden con las características fenotípicas previamente observadas con aislamientos de MhA1 de rumiantes (**Tabla 1**). Además, con un cuarto aislamiento de Mh-*like* se observó dicha similitud (resultados no incluidos en este trabajo).

Al crecer en agar sangre, dichos aislamientos produjeron una hemólisis de grado mayor a la observada con la cepa de referencia de MhA1 de rumiante. Recientemente, mediante la técnica de Ensayo Simple Visual, Castañeda *et al.*,¹⁷⁹ no observaron la actividad de alguna posible leucotoxina con 10 diferentes aislamientos de Mh de origen aviar. Sin embargo, es probable que los resultados obtenidos estén relacionados a las condiciones de cultivo aplicadas en dicho estudio; además, los aislamientos utilizados en dicha investigación produjeron reacción hemolítica al crecer en agar sangre, lo cual podría indicar la producción de citotoxinas.^{67,180} Los aislamientos empleados en el presente trabajo mostraron una reacción hemolítica similar a la observada por dichos autores, por lo que podría darse el mismo caso.

La velocidad de crecimiento (DO) de los aislamientos de este trabajo, fue similar a la observada previamente con cepas de Mh de origen bovino. Por otra parte, mediante la cuantificación de las UFC, se observó un crecimiento más lento del aislamiento C, con respecto al A y el B, siendo ésta la primera diferencia observada entre estos aislamientos (**Fig 2**).

Mediante SDS-PAGE se obtuvieron los patrones de separación electroforética de las PME de cada aislamiento. Diferentes autores han observado PME de tamaño similar a las obtenidas a partir del aislamiento A, con diferentes aislamientos de campo, cepas de referencia, y bajo diferentes condiciones de crecimiento (30 y 42 kDa⁵⁸; 30, 30.5, 31 y 41 kDa⁵⁹; 29, 40 y 43 kDa¹²⁶; 29 y 40.5 kDa¹²⁷; 31 y 39.5 kDa¹³⁰; 30.5 kDa¹³¹; 30 kDa^{132, 138}; 41.5 kDa¹⁸¹; 31, 40 y 42 kDa¹⁸²).

Otros autores también han identificado PME de tamaño similar a las obtenidas a partir del aislamiento B (30 y 42 kDa⁵⁸; 30, 30.5, 31, 31.5 y 39 kDa⁵⁹; 29 y 43 kDa¹²⁶; 24, 29, 39.5 y 42 kDa¹²⁷; 31 y 39.5 kDa¹³⁰; 30.5, 37, 38.5 y 44.5 kDa¹³¹; 41.5 kDa¹⁸¹; 31, 40 y 42 kDa¹⁸²). Davies *et al.*,¹²⁷ identificaron una expresión diferencial de una PME de 24 kDa, únicamente durante la fase de crecimiento estacionaria (12 h) en condiciones de aireación alta.¹²⁷ La expresión diferencial observada con la proteína de 24.5 kDa de este aislamiento ocurrió, de manera similar, sólo durante la fase estacionaria (8 h), también en condiciones de aireación alta. Davies *et al.*,⁵⁹ identificaron una proteína menor de 31.5 kDa. A partir de este aislamiento, también se observó una PME menor de 32.4 kDa.

En otras investigaciones se han identificado PME de peso molecular similar a las observadas a partir del aislamiento C (30 y 42 kDa⁵⁸; 30, 30.5, 31 y 41 kDa⁵⁹; 29, 40 y 43 kDa¹²⁶; 29, 40.5 y 42 kDa¹²⁷; 31 y 39.5 kDa¹³⁰; 30.5, 37 y 44.5 kDa¹³¹; 41.5 kDa¹⁸¹; 31, 40 y 42 kDa¹⁸²). Mediante SDS-PAGE pudo detectarse una posible proteína de secreción, cuyo tamaño es aproximado (223 kDa) ya que, la última referencia del marcador de peso molecular es de 220 kDa.

En los perfiles electroforéticos de las PME de estos tres aislamientos, se observa una mayor similitud entre el aislamiento A y B, con respecto del C (**Tabla 5**); sin embargo, mediante la inmunoelectrotransferencia no se observa similitud alguna (**Tabla 6**).

Al comparar el peso molecular de los diferentes antígenos (detectados mediante SDS-PAGE), de los tres aislamientos de *Mh-like* y de las cepas testigo, se observó que dos de los cinco antígenos del aislamiento A fueron detectados en la misma preparación de la cepa testigo de MhA1; además, el peso molecular también fue similar (**Tabla 7**). Otros autores, a partir de cepas de MhA1, han detectado antígenos de peso molecular similar a dos de los antígenos del aislamiento A (29.0,^{126,127} 30.0,^{58,59,132,138} 41.5¹⁸¹ y 42.0¹⁸² kDa), por lo que tres de los cinco antígenos detectados a partir del aislamiento A, muestran similitud con los antígenos de la cepa de MhA1 de este trabajo y de otras investigaciones. No se encontró similitud alguna de este aislamiento, con respecto a la cepa testigo de Ap de esta investigación, ni con la de otros autores.¹⁸³ De los cinco antígenos de este aislamiento,

solo existe similitud en el tamaño molecular de la PME de 35.6 kDa con la PME de 35.9 kDa de la cepa testigo de Hp; no así con el patrón de expresión. Otros autores detectaron, a partir de varias cepas de Hp, una PME de 32.5 kDa. Aún cuando el tamaño es relativamente diferente al de la PME de este aislamiento (33.7 kDa), se observa un grado de detección similar en ambos estudios (bajo). Las observaciones anteriores no son contundentes, sin embargo, se observa mayor similitud antigénica de este aislamiento con las cepas de MhA1 de rumiantes.

Al comparar las PME del aislamiento B, con la cepa testigo de MhA1 de esta investigación, no se encontró similitud en el tamaño molecular. Sólo se observó una PME que corresponde en tamaño a una PME de MhA1 (32.4 kDa en ambos organismos). Sin embargo, en otras investigaciones, otros autores han detectado una PME de 30 kDa,⁵⁸ cuyo tamaño es similar a la PME de 29.5 kDa de este aislamiento. También la PME de 24.5 kDa es similar en tamaño a la PME de 24 kDa identificada por otros autores.¹²⁷ Existe menor similitud del tamaño de la PME de 37.8 kDa con respecto a otras previamente identificadas (37.0 y 38.5¹³¹). En otra investigación se encontró una PME de MhA1 de 43.0 kDa,¹²⁶ cuyo tamaño es similar al de La PME de 43.6 kDa de este aislamiento. En resumen, se encontró un antígeno de tamaño similar del aislamiento B con respecto a la cepa testigo de MhA1 de esta investigación. Además, otros autores han identificado tres PME de tamaño similar a las de este aislamiento, por lo que se observan 4 diferentes PME de tamaño molecular similar a las de MhA1 de origen bovino. No existe similitud alguna con las PME de la cepa testigo de Ap, sin embargo, existe similitud del tamaño de las PME de 43.6, 37.8 y 24.5 kDa de este aislamiento, con las PME de 43, 38, 25 y 23 kDa detectadas en otras investigaciones.^{183,185} Existe una menor similitud de la PME de 37.8 kDa con respecto a las PME de la cepa testigo de Hp de 39.0 y 35.9 kDa. Otros autores identificaron una PME de 38.0 y 32.5 kDa de tamaño similar a la de 37.8 y 32.4 kDa de este aislamiento, también con un grado de detección similar.¹⁸⁴ En resumen, se observa una mayor similitud del perfil electroforético de las PME de este aislamiento con MhA1, Ap y Hp (**Tabla 8**).

Con las PME del aislamiento C se observó, que dos de 46.5 y 41.7 kDa son de tamaño similar a las PME de 45.9 y 42.1 kDa de la cepa testigo de MhA1. Las proteínas de 41.7, 36.5 y 29.4 kDa

son similares en tamaño molecular a las de otras investigaciones (41,⁵⁹ 41.5¹⁸¹ y 42.0 kDa;^{58,127,182} 37 kDa;¹³¹ 29.0,^{126,127} 30.0 kDa^{58,59}). La PME de 41.7 kDa muestra un tamaño diferente a la de 40.0 kDa de la cepa testigo de Ap. La PME de 46.5 kDa es de tamaño diferente a la de 48.1 kDa de la cepa testigo de Hp, aún cuando el grado de expresión es similar. La PME de 36.5 es similar en tamaño y grado de expresión que la de 35.9 kDa de la cepa testigo de Hp. Otros autores han observado una PME de 46.5 con grado de expresión similar a la de 46.5 de este aislamiento.¹⁸⁵ También identificaron una PME de 36.5 kDa con grado de expresión bajo, similar solo en tamaño a la PME de 36.5 kDa de este aislamiento. Con este aislamiento también existe mayor similitud del perfil electroforético de las PME, con respecto al de MhA1, ninguna similitud con las PME de Ap, y baja similitud con el perfil de las PME Hp (**Tabla 8**).

Mediante la técnica de *Western-Blot*, con anticuerpos de aves convalecientes a un brote de campo, se detectaron varias proteínas inmunodominantes del aislamiento A; sin embargo, la de mayor reactividad fue la proteína previamente identificada en el SN a las 6 y 8 horas, ahora con un peso de 38.0 kDa. También se detectó exclusivamente en el SN a las 6 y 8 h. Debido a las características particulares de expresión y a su carácter inmunodominante, se propone la caracterización adicional de dicho antígeno.

A partir del aislamiento B, mediante SDS-PAGE, no pudo detectarse algún posible antígeno de secreción. Sin embargo, mediante inmunoelectrotransferencia, se identificaron dos proteínas de 64.1 y 37.9 kDa respectivamente, cuya detección únicamente se realizó en el sobrenadante de cultivo. Además, se observó un aumento del grado de detección conforme transcurre el tiempo de incubación. La PME de 38.0 kDa del aislamiento A (identificada mediante inmunoelectrotransferencia), también se detectó exclusivamente en el SN. Estos hallazgos son característicos de las proteínas de secreción hasta ahora descritos para MhA1, en donde la leucotoxina y la sialoglicoproteasa alcanzan su máximo pico de producción en la fase de crecimiento log, y la neuraminidasa en la fase estacionaria. Además, la actividad enzimática de estas proteínas se observa únicamente en el sobrenadante de cultivo de MhA1.^{47,53,63,64} No obstante, es posible que la

neuraminidasa, además de ser secretada, se encuentre formando parte del complejo antigénico de la pared celular, ya que un antisuero contra la bacteria íntegra, fue capaz de neutralizar la actividad de la enzima.⁹⁶

Cabe resaltar que, tanto el patrón de detección, como el tamaño de las posibles proteínas de secreción (38.0 kDa, aislamiento A y 37.9 kDa, aislamiento B, observados en el ensayo de inmunoelectrotransferencia) son muy similares. Por otro lado, el tamaño de la sialoglicoproteasa de MhA1 es de 35.2 kDa.

Al realizar la inmunoelectrotransferencia de las preparaciones del aislamiento C, se detectó una proteína de tamaño similar al observado mediante SDS-PAGE, ahora con un peso molecular aproximado de 225 kDa. No se conoce alguna molécula de secreción de MhA1 de un tamaño similar. El tamaño de la neuraminidasa es de 170 kDa (mediante SDS-PAGE).⁵² Ninguna de las PME resultó inmunodominante. Esto representa una diferencia entre el aislamiento A, en donde se observaron 3 o 4 PME inmunodominantes, con respecto a B y C, donde se observó sólo una proteína inmunodominante en grado moderado (**Fig 4, 6 y 8**).

En conjunto, los resultados obtenidos muestran diferencias en el perfil electroforético de las PME entre los aislamientos, y entre los aislamientos con respecto a las cepas testigo. Diferentes autores han observado diferencias en el perfil electroforético de las PME de Mh debido al cultivo *in vitro* o *in vivo*,^{130,128} durante las diferentes fases del crecimiento bacteriano,¹²⁷ bajo condiciones estresantes *in vitro* e *in vivo* (temperatura,¹⁶⁸ aireación,¹²⁷ condiciones limitantes de hierro^{141,127,128,139,140}), debido a la virulencia del organismo,^{127,129} en organismos de diferente serotipo,^{59,129} del mismo serotipo,^{59,129} mediante la adición de factores de crecimiento *in vitro*, tales como suero de bovino neonato,¹²⁷ suero fetal bovino,^{127,128} entre otras. Sin embargo, todas las cepas y aislamientos de esta tesis fueron cultivados bajo las mismas condiciones, excepto para Ap y Hp, en donde al cultivo bacteriano se adicionó NAD y suero estéril de equino. El cultivo y la obtención de los antígenos de todas las cepas y aislamientos de este trabajo se realizaron después de un sólo pase *in*

vitro, por lo tanto, las diferencias observadas en los perfiles electroforéticos de las PME no se relacionan con variaciones en el número de pases *in vitro* aplicados a dichos organismos.

Por otro lado, mediante la separación electroforética de doble dimensión se observaron antígenos de tamaño similar a aquellos previamente seleccionados para una caracterización adicional, por lo que posiblemente existan dos, o más antígenos de dicho tamaño. Sin embargo, la cantidad de proteína colocada en dichos geles (8 µg) fue inferior a la empleada para la electroforesis mediante SDS-PAGE (20 µg), por lo que es posible, que existan aún más antígenos de tamaño similar.

A partir de las preparaciones de tres aislamientos de organismos similares a MhA1 y con tres cepas testigo, se observaron diferencias entre dichos aislamientos y entre los aislamientos y las cepas testigo. Otros autores han estudiado el perfil de PME de *Mannheimia haemolytica* junto con otras herramientas moleculares, con el fin de determinar la relación filogenética de dichos organismos. Sin embargo, ellos también observaron marcadas diferencias entre organismos del mismo género y especie. Por lo tanto, es de esperarse que dichas diferencias se vuelvan más evidentes cuando se estudia organismos que no han sido caracterizados del todo, así como cuando se comparara organismos de diferente especie y género.

Además, diferentes autores han encontrado cambios significativos en el perfil de PME de un mismo organismo bajo condiciones de crecimiento diferentes. También, es probable que dichas diferencias sean el resultado del estudio de organismos suficientemente diferentes entre sí. Con el fin de conocer la identidad de los antígenos observados en esta investigación, se propone una caracterización más precisa, con herramientas como isoelectroenfoque, secuenciación aminoterminal, tratamiento con proteasas, ensayos de adsorción a la superficie bacteriana, entre otras. La información generada con tales herramientas, de manera inherente, proporcionará una idea más clara de la identidad de estos organismos.

CONCLUSIONES

- Los tres aislamientos de origen aviar de este trabajo (A, B y C), son fenotípicamente similares a las cepas de MhA1 de origen bovino.
- El perfil electroforético de las PME, por si solo, no es suficiente para determinar la relación filogenética entre organismos.
- A partir de los aislamientos de origen aviar se identificaron proteínas estructurales y proteínas posiblemente de secreción, tales como las de 30.9 y 30.5 kDa de los aislamientos A y B, 38.0 y 37.9 de los aislamientos A y B, las de 60.6 y 60.9 de los aislamientos B y C, respectivamente, que por su carácter inmunodominante y patrón de detección, son candidatos para el desarrollo de inmunógenos.
- Existen diferencias antigénicas y en la velocidad de crecimiento entre los aislamientos de origen aviar de este trabajo, por lo que es probable que la identidad de estos aislamientos sea diferente a la asignada actualmente.

REFERENCIAS.

1. Slauson DO. The mediation of pulmonary inflammatory injury. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med* 1982; 26:99-153.
2. Shewen PE, Conlon JA. *Pasteurella*. In: Gyles CL, Thoen CO, editors. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Iowa: Iowa State University Press, 1993: 216-225.
3. Frank GH. Pasteurellosis of cattle. In: Adlam CF, Rutter JM, editors. *Pasteurella* and *Pasteurellosis*. London: Academic Press, 1989: 197-221.
4. Martin SW, Meek AH, Davis DG, Johnson JA, Curtis RA. Factors associated with morbidity and mortality in feedlot calves: The Bruce County beef project, year two. *Can J Comp Med* 1981; 45:102-112
5. Griffin D. Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. In: Vestweber J, St. Jean G, editors. *Veterinary clinics of North America: food animal practice*, vol 13. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1997: 367-377
6. Trigo FJ. Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurellosis pulmonar bovina. *Vet. Mex* 1991; 22: 131-134.
7. Trigo FJ. El complejo respiratorio infeccioso de bovinos y ovinos. *Ciencia Veterinaria* 1997; 4:1-36.
8. González CT, Maheswaran SK. The role of induced virulence factors produced by *Pasteurella haemolytica* in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis; review and hypotheses. *Br. Vet. J* 1993; 149:183-194.
9. Weekley LB, Veit HP. Potential morphologic and physiologic factors that may predispose the bovine lung to bovine disease. *Compend. Contin. Educ* 1995; 17:974-982.
10. Frank GH, Smith PC. Prevalence of *Pasteurella haemolytica* in transported calves. *Am. J. Vet. Res* 1983; 44:981-985.
11. Whitely LO, Maheswaran SK, Weiss DJ, Ames TR, Kannan MS. *Pasteurella haemolytica* A1 and bovine respiratory disease: pathogenesis. *J. Vet. Int. Med* 1992; 6:11-22.

12. Kitt T. Über eine experimentelle, der Rinderseuche ähnliche Infektionskrankheit. Sitzungsber Ges Morphol Physiol Muenchen 1885: 140-168
13. Jones FA. A study of bacillus bovisepiticus. J Exp Med 1921; 34: 561-577.
14. Newson IE, Cross F. Some bipolar organisms found in pneumonia in sheep. J AM Vet Med Assoc 1932; 80: 711-719.
15. Biberstein EL. Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*. Methods. Microbiol 1978; 10:253-269.
16. Smith GR. Isolation of two types of *Pasteurella haemolytica* from sheep. Nature 1959; 183: 1132-1133.
17. Biberstein EL, Gills M, Knight H. Serological types of *Pasteurella haemolytica*. Cornell Vet 1960; 50: 283-300.
18. Younan M, Fodor I. Characterization of a new *Pasteurella haemolytica* serotype (A17). Res Vet Sci 1995; 58: 98.
19. Mutters R, Ihm P, Pohl S, Frederiksen W, Mannheim W. Reclassification of the genus *Pasteurella trevisan* 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stamatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. Int J Syst Bacteriol 1985; 35: 309-322.
20. Gilmour NJL, Gilmour JS. Pasteurelosis of sheep. In: Adlam CF, Rutter JM, editors. *Pasteurella* and *Pasteurellosis*. London: Academic Press, 1989: 223-261.
21. Sneath PHA, Stevens M. *Actinobacillus rosii* sp. Nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella betti* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairisp* Nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. int J. Syst Bacteriol 1990; 40:148-153.
22. Biberstein EL, Francis CK. Nucleic acid homologies between the A and T types of *Pasteurella haemolytica*. J Med Microbiol 1968; 1: 105-108.
23. Fredericksen W. *Pasteurella* taxonomy and nomenclature. Contrib. Microbiol. Immunol 1973; 2:170-176.

24. Davies RL, Paster B, Dewhirst F. Phylogenetic relationships and diversity within the *Pasteurella haemolytica* complex based on 16S rRNA sequence comparison and outer membrane protein and lipopolysaccharide analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol* 1996; 46: 736-744.
25. Fraser J, Laird S, Gilmour NJL. A new serotype (biotype T) of *Pasteurella haemolytica*. *Res. Vet. Sci* 1982; 32:127-128.
26. Quirie M, Donachie W, Gilmour NJL. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from cattle. *Vet. Rec* 1986; 119:93-94.
27. Confer AW, Panciera RJ, Mosier DA. Bovine pneumonic pasteurellosis-immunity to *Pasteurella haemolytica*. *JAVMA* 1988; 193:1308-1316.
28. Frank GH. When *Pasteurella haemolytica* colonizes the nasal passages of cattle. *Vet. Med* 1988; 83:1060-1064.
29. Biberstein EL. *Haemophilus-Pasteurella-Actinobacillus*: their significance in veterinary medicine. In: Kilian M, Frederiksen W, Biberstein EL, editors. *Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus*. London: Academic Press, 1981: 61-73.
30. Frank GH, Briggs RE, Guillette KG. *Pasteurella haemolytica* serotype 1 colonization of nasal passage of virus infected cattle. *Am. J. Vet. Res* 1987; 48:1674-1677.
31. Grey CL, Thompson RG. *Pasteurella haemolytica* in the tracheal air of calves. *Can. J. Comp. Med* 1971; 35:121-128.
32. Rehmtulla AJ, Thompson RG. A review of the lesions in the shipping fever of cattle. *Can. Vet. J* 1981; 22:1-8.
33. Misra HN, Pandurangarao CC, Khera SS. An outbreak of highly fatal pneumonia in kids due to *Pasteurella haemolytica*. *Indian Vet J* 1970; 47:808-809
34. Dyer NW, Ward AC. Pneumonic pasteurellosis associated with *Pasteurella haemolytica* serotype A6 in American Bison (*Bison bison*). *J Vet Diagn Invest* 1998; 10:360-362.
35. Foreyt JW, Snipes KP, Kasten RW. Fatal pneumonia following inoculation of healthy bighorn sheep with *Pasteurella haemolytica* from healthy domestic sheep. *J Wildl Dis* 1994; 30: 941-943.

36. Rivera M, Hunter GC, Brooker J, O'Berg CW, Smythe SH, Bernhard VM. Aortic graft infection due to *Pasteurella haemolytica* and group C beta-hemolytic streptococcus. Clin Infect Dis 1994; 19: 941-943.
37. Watanabe T, Sato M, Abe T, Oda Y. Bacterial croup caused by *Pasteurella haemolytica*. Acta Paediatr Jpn 1998; 40: 360-361.
38. Highlander SK. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Front Biosci 2001; 6: 1128-1150.
39. Angen O, Mutters R, Caugant DA, Olsen JE, Bisgaard M. Taxonomic relationships of the [Pasteurella] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. Nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1999; 49: 67-86.
40. Angen O, Quirie M, Donachie W, Bisgaard M. Investigations on the species specificity of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotyping. Vet Microbiol 1999; 65: 283-290.
41. Thompson RG, Chander S, Savan M, *et al.* Investigations of factors of probable significance in the pathogenesis of pneumonic pasteurellosis in cattle. Can. J. Comp. Med 1975; 39:194-207.
42. Shewen PE, Wilkie BN. Antibody titers to *Pasteurella haemolytica* A1 in Ontario beef cattle. Can. J. Comp. Med 1982;46:354-356.
43. Baluyut CS, Simonson RR, Bemrick WJ, Maheswaran SK. Interaction of *Pasteurella haemolytica* with bovine neutrophils: identification and partial characterization of a cytotoxin. Am. J. Vet. Res 1981; 42:1920-1926.
44. Mosier DA, Lessley BA, Confer AW, *et al.* Chromatographic separation and characterization of *Pasteurella haemolytica* cytotoxin. Am. J. Vet. Res 1986; 47:2233-2241.
45. Chang YF, Young R, Post D, *et al.* Identification and characterization of the *Pasteurella haemolytica* leucotoxin. Infect. Immunol 1987; 55:2348-2354.

46. Abdullah KM, Udoh EA, Shewen PE, Mellors A. A natural glycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1 specifically cleaves o-sialoglycoproteins. *Infect. Immunol* 1992; 60:56-62.
47. Otulakowski GL, Shewen PE, Udoh EA, Mellors A, Wilkie BN. Proteolysis of glycoprotein by *Pasteurella haemolytica* cytotoxic culture supernatant. *Infect. Immun* 1983; 42:64-70.
48. Abdullah KM, Lo RYC, Mellors A. Distribution of glycoprotease activity and the glycoprotease gene among serotypes of *Pasteurella haemolytica*. *Biochem. Soc. Trans* 1990; 18:901-903.
49. Abdullah KM, Lo RYC, Mellors A. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Pasteurella haemolytica* A1 glycoprotease gene. *J. Bacteriol* 1991; 173:5597-5603.
50. Watt MAV, Mellors A, Lo RYC. Comparison of the recombinant and authentic forms of the *Pasteurella haemolytica* A1 glycoprotease. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 147: 37-43.
51. Frank GH, Tabatabai LB. Neuroaminidase activity of *Pasteurella haemolytica* isolates. *Infect. Immun* 1981; 32:1119-1122.
52. Straus DC, unbehagen PJ, Purdy CW. Neuroaminidase production by a *Pasteurella haemolytica* A1 strain, associated with bovine pneumonia. *Infect. Immunol* 1993; 61:253-259.
53. Straus DC, Purdy CW. *In vivo* production of neuraminidase by *Pasteurella haemolytica* A1 in goats after transthoracic challenge. *Infect. Immunol* 1994; 62:4675-4678.
54. Adlam C, Knights JM, Mugridge A, Lindon JC, Baker PRW, Beesley JE, Spacey B, Craig GR, Nagy LK. Purification, characterization and immunological properties of the serotype-specific capsular polysaccharide of *Pasteurella haemolytica* (serotype A1) organisms. *J. Gen. Microbiol* 1984; 130:2415-2426.
55. Conlon JAR, Shewen PE. Clinical and serological evaluation of a *Pasteurella haemolytica* A1 capsular polysaccharide vaccine. *Vaccine* 1993; 11:767-772.
56. Rimsay RL, Coyle-Dennis JE, Lauerman LH, *et al.* Purification and biological characterization of endotoxin fractions from *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res* 1981; 42:2134-2138.
57. Severn WB, Johnston RAZ, Leitch RA, Richards JC. Structural analysis of the lipopolysaccharide from *Pasteurella haemolytica* serotype A1. *Glycobiology* 1992; 2:463.

58. Squire PG, Smiley DW, Croskell RB. Identification and extraction of *Pasteurella haemolytica* membrane proteins. *Infect. Immunol* 1984; 45:667-673.
59. Davies RL, Donachie W. Intra-specific diversity and host specificity within *Pasteurella haemolytica* based on variation of capsular polysaccharide, lipopolysaccharide and outer-membrane proteins. *Microbiol* 1996; 142: 1895-1907.
60. Morck DW, Raybould TJG, Acres SD, Babiuk LA, Nelligan J, Costerton JW. Electron-microscopic description of glycocalyx and fimbriae on the surface of *Pasteurella haemolytica* A1. *Can. J. Vet. Res* 1987; 51:83-88.
61. Morck DW, Olson ME, Acres SD, Daoust P, Costerton JW. Presence of bacterial glycocalyx and fimbriae on *Pasteurella haemolytica* in feedlot cattle with pneumonic pasteurellosis. *Can. J. Vet. Res.* 1989; 53:167-171.
62. Potter AA, Ready K, Gilchrist J. Purification of fimbriae from *Pasteurella haemolytica* A1. *Microbiol. Pathogenesis* 1988; 4:311-316.
63. Shewen PE, Wilkie BN. Evidence for *Pasteurella haemolytica* cytotoxin as a product of actively growing bacteria. *Am. J. Vet. Res* 1985; 46:1212-1214.
64. Clinkenbeard KD, Clarke CR, Morton RJ, Panciera RJ, Confer AW, Mosier DA. Role of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin in virulence and immunity in shipping fever pneumonia. *Compend. Contin. Educ* 1992; 14:1249-1260.
65. Lo RYC, Shewen PE, Strathdee CA, *et al.* Cloning and expression of the leukotoxin gene of *Pasteurella haemolytica* A1 in *Escherichia coli* K-12. *Infect. Immun* 1985; 50:667-671.
66. Lo RYC, Strathdee CA, Shewen PE. Nucleotide sequence of the leukotoxin genes of *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect. Immun* 1987; 55:1987-1996.
67. Murphy GL, Whitworth LC, Clinkenbeard KD, Clinkenbeard PA. Hemolytic activity of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect. Immun* 1995; 63:3209-3212.

68. Maheswaran SK, Kannan MS, Weiss DJ, Reddy KR, Townsend EL, Yoo HS, Lee BW, Whitely LO. Enhancement of neutrophil-mediated injury to bovine pulmonary endothelial cells by *Pasteurella haemolytica* leucotoxin. *Infect. Immunol* 1993; 61:2618-2625.
69. Hsuan SL, Kannan MS, Jeyaseelan S, Prakash YS, Sieck GC, Maheswaran SK. *Pasteurella haemolytica* A1 derived leucotoxin and endotoxin induce intracellular calcium elevation in bovine alveolar macrophages by different signaling pathways. *Infect Immun* 1998; 66:2836-2844.
70. Devenish J, Rosendale S, Johnson R, Hubler S. Immunological comparison of 104 kDa proteins associated with haemolysis and cytolysis. In *Actinobacillus pleuropneumoniae, Actinobacillus suis, Pasteurella haemolytica* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1989; 57:3210-3213.
71. Jansen R, Briaire J, Kamp EM, Gielkens AMJ, Smits MA. Cloning and characterization of the *Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX_toxin III (Apx III) gene. *Infect. Immunol* 1993; 61:947-954.
72. Strathdee CA, Loo RYC. Cloning, nucleotide sequence, and characterization of genes encoding the secretion function of the *Pasteurella haemolytica* leucotoxin determinant. *J. Bacteriol* 1989; 171:916-928.
73. Kolodrubetz D, Dailey T, Ebersole J, Kraig E. Cloning and expression of the leukotoxin gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immunol* 1989; 57:1465-1469.
74. Welch RA. Phylogenetic analyses of the RTX toxin family. In: Roth JA, Bolin CA, Brogden KA, Minion FC, Wannemuehler MJ, editors. *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1995: 195-206.
75. Welch RA. Pore forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol* 1991; 5:521-528.
76. Ambagala TC, Ambagala APN, Srikumaran S. The leucotoxin of *Pasteurella haemolytica* binds to β_2 -integrins on bovine leukocytes. *FEMS Microbiol. Lett* 1999; 179:161-167.
77. Wang JF, Kieba IR, Korostoff J, Guo TL, Yamaguchi N, Rozmiarek H, Billings PC, Shenker BJ, Lally ET. Molecular and biochemical mechanisms of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced cell death. *Microb Pathog* 1998; 25:317-331.

78. Lally ET, Kieba IR, Sato A, Green C, Rosenbloom J, Korostoff J, Wang JF, Shenker BJ, Ortlepp S, Robinson MK, Billing PC. RTX toxins recognize a β_2 integrins on the surface of human target cells. J. Biol. Chem. 1997; 272:30463-30469.
79. Stevens PK, Czuprynski CJ. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces bovine leukocytes to undergo morphologic changes consistent with apoptosis *in vitro*. Infect Immun 1996; 67: 2687-2694
80. Henricks PAJ, Binhorst GJ, Drijver AA, Nijkamp FP. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin enhances production of leukotriene B4 and 5-hydroxyeicosatetraenoic acid by bovine polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immunol 1992; 60:3238-3243.
81. Yoo HS, Rajagopal BS, Maheswaran SK, Ames TR. Purified *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces expression of inflammatory cytokines from bovine alveolar macrophages. Microb Pathog 1995; 18:237-252.
82. Adusu TE, Conlon PD, Shewen PE, Black WD. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces histamine release from bovine pulmonary mast cells. Can. J. Vet. Res 1994; 58:1-5.
83. Hughes HPA, Campos M, Mc Dougall L, Beskorwayne, Potter AA, Babiuk LA. Regulation of major histocompatibility complex class II expression by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Infect. Immun 1994; 62:1609-1615.
84. Gentry MJ, Confer AW, Panciera RJ. Serum neutralization of cytotoxin from *Pasteurella haemolytica* serotype 1 and resistance to experimental bovine pneumonic pasteurellosis. Vet. Immunol. Immunopathol 1985; 9:239-250.
85. Mosier DA, Simons KR, Confer AW, Panciera RJ, Clinkenbeard KD. *Pasteurella haemolytica* antigens associated with resistance to pneumonic pasteurellosis. Infect. Immun 1989; 57:711-716.
86. Mosier DA, Simons KR, Panciera RJ, Clinkenbeard KD. Serum IgG and IgM antibody responses in cattle to antigens of *Pasteurella haemolytica*. Vet. Immunol. Immunopathol 1989; 22:53-65.
87. Gentry MJ, Confer AW, Kreps JA. A simple visual assay for determination of *Pasteurella haemolytica* cytotoxin neutralizing antibody titles in cattle sera. J. Clin. Microbiol 1985; 22:968-972.

88. Mosier DA, Confer AW, Hall SM, *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to *Pasteurella haemolytica* cytotoxin (leukotoxin) in cattle. J. Clin. Microbiol 1986; 24:218-222.
89. Greer CN, Shewen PE, Automated colorimetric assay for detection of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Vet. Microbiol 1986; 12:33-42.
90. Confer AW, Panciera RJ, Gentry MJ, Fulton RW. Immunologic response to *Pasteurella haemolytica* and resistance against experimental bovine pneumonic pasteurellosis induced by bacterins in oil adjuvants. Am. J. Vet. Res. 1987; 48:163-168.
91. Lee CW, Lo RY, Shewen PE, Mellors A. The detection of the sialoglycoprotease gene and assay for sialoglycoprotease activity among isolates of *Pasteurella haemolytica* A1 strains, serotypes A13, A14, T15 and A16. FEMS. Microbiol. Lett 1994 ; 121(2):199-205.
92. Nyarko KA, Coomber BL, Mellors A, Gentry PA. Bovine platelet adhesion is enhanced by leukotoxin and sialoglycoprotease isolated from *Pasteurella haemolytica* A1 cultures. Vet. Microbiol 1998; 61(1-2):81-91.
93. Petras SF, Chidambaram M, Illyes EF, Froshauer S, Weinstock GM, Reese CP. Antigenic and virulence properties of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin mutants. Infect. Immunol 1995; 63:1033-1039.
94. Lee CW, Shewen PE, Cladman WM, Conlon JAR, Mellors A, Lo RYC. Sialoglycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1: Detection of antisialoglycoprotease antibodies in sera of calves. Can. J. Vet. Res 1994; 58: 93-98.
95. Straus DC, Jolley WL, Purdy CW. Characterization of neuraminidases produced by various serotypes of *Pasteurella haemolytica*. Infect. Immun 1993; 61:4669-4674.
96. Tabatabai LB, Frank GH. Neuroaminidase from *Pasteurella haemolytica*. Curr Microbiol 1981; 5:203-206.
97. Scharman W, Drzeniek R, Blobel H. Neuraminidase of *Pasteurella multocida*. Infect. Immun 1970; 1:319-320.

98. Pardoe GI, The inducible neuraminidases of pathogenic microorganisms. Behring Inst. Mitt 1974; 55:103-122.
99. moriyama T, barksdale L. Neuraminidase of *Corynebacterium diphtheriae*. J. Bacteriol 1967; 94:1565-1581.
100. Kelly RT, Greiff D, Farmer S. neuraminidase activity in *Diplococcus pneumoniae*. J. Bacteriol 1966; 91:601-603.
101. Gottschalk A. Correlation between composition, structure, shape, and function of a salivary mucoprotein. Nature 1960; 186:9945-9951.
102. Straus DC, Purdy CW, Loan RW, Briggs RF, Frank GH. *In vivo* production of neuraminidase by *Pasteurella haemolytica* in market stressed cattle after natural infection. Curr Microbiol 1998; 37:240-244.
103. Smith H. Microbial surfaces in relation to pathogenicity. Bacteriol Rev 1977; 41: 476-500.
104. Adlam C, Knights JM, Mugridge A, Williams JM, Lindon JC. Production of colomic acid by *Pasteurella haemolytica* serotype A2 organisms. FEMS Microbiol Lett 1987; 42: 23-25.
105. Adlam C, Knights JM, Mugridge A, Lindon JC, Williams JM, Beesley JE. Purification, characterization and immunological properties of the serotype-specific capsular polysaccharide of *Pasteurella haemolytica* serotype A7 organisms. J Gen Microbiol 1996; 1079-1087.
106. Corstvet RE, Gentry MJ, Newman PR, *et al*. The demonstration of age-dependent capsular material on *Pasteurella haemolytica* serotype 1. J. Clin. Microbiol 1982; 16:1123-1126.
107. Brogden KA, Adlam C, Lehmkuhl HD, Cutlip RC, Knights JM, Engen RL. Effect of *Pasteurella haemolytica* (A1) capsular polysaccharide on sheep lung *in vivo* and on pulmonary surfactant *in vitro*. Am. J. Vet. Res 1989; 50:555-559.
108. Whitely LO, Maheswaran SK, Weiss DJ, Ames TR. Immunohistochemical localization of *Pasteurella haemolytica* A1-derived endotoxin, leukotoxin, and capsular polysaccharide in experimental bovine pasteurella pneumonia. Vet Pathol 1990; 27: 150-161.

109. Chae CH, Gentry MJ, Confer AW, Anderson GA. Resistance to host immune defense mechanisms afforded by capsular material of *Pasteurella haemolytica*, serotype 1. *Vet Microbiol* 1990; 25: 241-251.
110. Czuprynski CJ, Noel EJ, Adlam C. Modulation of bovine neutrophil antibacterial activities by *Pasteurella haemolytica* purified capsular polysaccharide. *Microb Pathog* 1989; 6: 133-141.
111. Czuprynski CJ, Noel EJ, Adlam C. Interaction of bovine alveolar macrophages with *Pasteurella haemolytica* A1 *in vitro*: modulation by purified capsular polysaccharide. *Vet Microbiol* 1991; 26: 349-358.
112. Townsend EV, Maheswaran SK, Leninger JR, *et al*. Detection of immunoglobulin G to *Pasteurella haemolytica* capsular polysaccharide by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol* 1987; 25:242-247.
113. Confer AW, Simons KR, Panciera RJ, Mort AJ, Mosier DA. Serum antibody response to carbohydrate antigens of *Pasteurella haemolytica* serotype 1: Relation to experimentally induced bovine pneumonic pasteurellosis. *Am J Vet Res* 1989; 50: 98-105.
114. Robinson A, Melling J. Envelop structure and the development of new vaccines. *J. Appl. Bacteriol Symposium supplement* 1993; 74:43s-51s.
115. McVey DS, Loan RW, Purdy DW, Shuman DJ. Specificity of bovine serum antibody to capsular carbohydrate antigens from *Pasteurella haemolytica*. *J. Clin. Microbiol* 1990; 28:1151-1158.
116. Brogden KA, DeBey B, Audibert F, Lehmkuhl H, Chedid L. Protection of ruminants by *Pasteurella haemolytica* A1 capsular polysaccharide vaccines containing muramyl dipeptide analogs. *Vaccine* 1995; 13:1677-1684.
117. Adamus GM, Mulczyk M, Witkowska D, *et al*. Protection against keratoconjunctivitis shigellosa induced by outer membrane proteins of *Shigella* spp. *Infect Immun* 1980; 30:321-324.
118. Dubray G, Bezard G. Isolation of three *Brucella abortus* cell wall antigens protective in murine experimental brucellosis. *Ann. Res. Vet* 1980; 11:367-373.

119. Gulig PA, McCracken GH Jr, Frisch CF, *et al.* Antibody response of infants to cell surface-exposed outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae* type b after systemic *Haemophilus* disease. *Infect Immun* 19982; 37:82-88.
120. Kimura A, Gulig PA, McCracken GH Jr, *et al.* A minor high molecular weight outer membrane protein of *haemophilus influenzae* type b is a protective antigen. *Infect Immun* 1985; 47:252-259.
121. Morton RJ, Panciera RJ, Fulton RW, Frank GH, Ewing SA, Homer JT, Confer AW. Vaccination of cattle with outer membrane protein-enriched fractions of *Pasteurella haemolytica* and resistance against experimental challenge exposure. *Am. J. Vet. Res* 1995; 56:875-879.
122. Simons KR, Morton RJ, Fulton RW, Confer AW. Comparison of antibody responses in cattle to outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* serotype 1 and from eight untypeable strains. *Am. J. Vet. Res* 1992; 53:971-975.
123. Potter AA, Schryvers AB, Ogunnariwo JA, Hutchins WA, Reggie RYC, Watts T. Protective capacity of the *Pasteurella haemolytica* transferrin-binding proteins TbpA and TbpB in cattle. *Microb Pathog* 1999; 27: 197-206.
124. Sabri MY, Zamri-Saad M, Mutalib AR, Israf DA, Muniandy N. Efficacy of an outer membrane protein of *Pasteurella haemolytica* A2, A7 or A9-enriched vaccine against intratracheal challenge exposure in sheep. *Vet Microbiol* 2000; 73: 13-23.
125. Knights JM, Adlam C, Owen P. Characterization of envelope proteins from *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *J Gen Microbiol* 1990; 136: 495-505.
126. Rossmann SE, Wilt GR, Wu G. Characterization and comparison of susceptibilities and outer membrane protein and plasmid DNA profiles of *Pasteurella haemolytica* and certain other members of the genus *Pasteurella*. *Am J Vet Res* 1991; 52: 2016-2022.
127. Davies RL, Parton R, Coote JG, Gibbs HA, Freer JH. Outer-membrane protein and lipopolysaccharide variation in *Pasteurella haemolytica* serotype A1 under different growth conditions. *J Gen Microbiol* 1992; 138: 909-922.

128. Gatewood DM, Fenwick BW, Chengappa MM. Growth-condition dependent expression of *Pasteurella haemolytica* A1 outer membrane proteins, capsule and leukotoxin. *Vet Microbiol* 1994; 41: 221-233.
129. McCluskey J, Gibbs HA, Davies RL. Variation in outer-membrane protein and lipopolysaccharide profiles of *Pasteurella haemolytica* isolates of serotypes A1 and A2 obtained from pneumonic and healthy cattle. *Microbiol* 1994; 140; 807-814.
130. Davies RL, McCluskey J, Gibbs HA, Coote JG, Freer JH, Parton R. Comparison of outer-membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* expressed *in vitro* and *in vivo* in cattle. *Microbiology* 1994; 140:3293-3300.
131. Morton RJ, Simons KR, Confer AW. Major outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* serovars 1-15: comparison of separation techniques and surface-exposed proteins on selected serovars. *Vet Microbiol* 1996; 51: 319-330.
132. Mahasreshti PJ, Murphy GL, Wyckoff JH, Farmer S, Hancock REW, Confer AW. Purification and partial characterization of the OmpA family of proteins of *Pasteurella haemolytica*. *Infect. Immun* 1997; 65:211-218.
133. Beck E, Bremer E. Nucleotide sequence of the gene ompA coding the outer membrane protein II of *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* 1980; 8: 3011-3024.
134. Freund R, Cole ST. Cloning and molecular characterization of the ompA gene from *Salmonella typhimurium*. *Eur J Biochem* 1983; 134: 497-502.
135. Munson RS, Granoff DM. Purification and partial characterization of outer membrane proteins P5 and P6 of *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun* 1985; 49: 544-549.
136. Tagawa Y, Haritani M, Ishikawa H, Yuasa N. Characterization of a heat-modifiable outer membrane protein of *Haemophilus somnus*. *Infect Immun* 1993; 61: 1750-1755.
137. Wilson ME. The heat-modifiable outer membrane protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: relationship to OmpA proteins. *Infect Immun* 1991; 59: 2205-2507.

138. Pandher KH, Murphy GL. Molecular cloning of the *Pasteurella haemolytica pomA* gene and identification of bovine antibodies against PomA surface domains. *Infect Immun* 1999; 67: 4968-4973.
139. Deneer HG, Potter AA. Iron-repressible outer-membrane proteins of *Pasteurella haemolytica*. *J Gen Microbiol* 1989; 135: 435-443.
140. Morck DW, Ellis BD, Dominguez PAG, Olson ME, Costerton JW. In vivo expression of iron regulated outer-membrane proteins in *Pasteurella haemolytica* A1. *Microb Path* 1991; 11:373-378.
141. Ogunnariwo JA, Schryvers AB. Iron acquisition in *Pasteurella haemolytica*: expression and identification of a bovine-specific transferrin receptor. *Infect Immun* 1990; 58: 2091-2097.
142. Confer AW, McCraw RD, Durham JA, Morton RJ, Panciera RJ. Serum antibody responses of cattle to iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* A1. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 47: 101-110
143. Confer AW, Panciera RJ. Testing of two new generation *Pasteurella haemolytica* vaccines against experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Agri-Pract* 1994; 15: 10-15.
144. Ogunnariwo JA, Woo TKW, Lo RYC, Gonzalez GC, Shryvers AB. Characterization of the *Pasteurella haemolytica* transferrin receptor genes and the recombinant receptor proteins. *Microb Pathog* 1997; 23:273-284.
145. Yu R-H, Gray-Owen SD, Ogunnariwo J, Schryvers AB. Interaction of ruminant transferrin receptors in bovine isolates of *Pasteurella haemolytica* and *Haemophilus somnus*. *Infect Immun* 1992; 60: 2992-2994.
146. Vázquez ME, Campogarrido MR, Cubillas CA, Coss J, González CP, Sivanandan V. Reporte de un caso de *Pasteurella haemolytica* en gallina de postura (babcock) en Tehuacán Puebla. *Memorias de la XXVI Convención Anual ANECA*; 2001 abril 25-28; Acapulco (Guerrero) México. México (DF). *Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC*, 2001: 317-319.
147. Harbourne JF. A hemolytic cocco-bacillus recovered from poultry. *Vet Rec* 1962; 74: 566-567
148. Harry EG. A hemolytic coccobacillus recovered from poultry. *Vet Rec* 1962; 74: 640.

149. Greenham LW, Hill TJ. Observations of an avian strain of *Pasteurella haemolytica*. Vet Rec 1962; 74: 861-863.
150. Matthes S, Loliger HC, Schubert HJ. Enzootic in chicken due to *Pasteurella haemolytica*. Dtsch Tierarztl Wochenschr 1969; 76: 88-95.
151. Janetschke P, Risk G. Frequent occurrence of *Pasteurella haemolytica* in the domestic chicken in Syria. Monatsh Veterinarmed 1970; 25; 23-27.
152. Hacking WC, Pettit JR. *Pasteurella haemolytica* in pullets and laying hens. Avian Dis 1974; 18: 483-486.
153. Mwangota AU, Muhammed SI, Thomson RG. Serological types of *Pasteurella haemolytica* in Kenya. Cornell Vet 1978; 68: 84-93.
154. Bisgaard M, Dam A. Salpingitis in poultry. II. Prevalence, bacteriology, and possible pathogenesis in egg-laying chickens. Nord Vet Med 1981; 33: 81-89.
155. Addo PB, Mohan K. Atypical *Pasteurella haemolytica* type A from Poultry. Avian Dis 1985; 29: 214-217.
156. Lin MY, Cheng MC, Huang KJ, Tsai WC. Classification, pathogenicity, and drug susceptibility of hemolytic Gram-negative bacteria isolated from sick or dead chickens. Avian Dis 1993; 37: 6-9.
157. Shaw DP, Cook DB, Maheswaran SK, Lindeman CJ, Halvorson DA. *Pasteurella haemolytica* as a co-pathogen in pullets and laying hens. Avian Dis 1990; 34: 1005-1008.
158. Bisgaard M. Incidence of *Pasteurella haemolytica* in the respiratory tract of apparently healthy chickens and chickens with infectious bronchitis. Characterization of 213 strains. Avian Pathol 1977; 6: 285-292.
159. Mushin R, Weisman Y, Singer N. *Pasteurella haemolytica* found in the respiratory tract of fowl. Avian Dis 1980; 24: 162-168.
160. Aguirre J. Trabajos experimentales con *Pasteurella haemolytica* en pollos de engorda. Memorias del Curso de Enfermedades Respiratorias de las Aves; 1999 febrero 19; DF México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1995: 1-2.

161. Gómez DC. Experiencias de campo con *Pasteurella haemolytica* y uso de una bacterina experimental. Memorias del Curso de Enfermedades Respiratorias de las Aves; 1999 febrero 19; DF México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1995: 22-25.
162. Márquez VMZ, Ríos CJF, Lucio DE. Evaluación de la sensibilidad *in vitro* de cepas de *Pasteurella haemolytica* aisladas de casos clínicos durante 1993 a 1997, frente a diferentes quimioterapéuticos. Memorias de la XXIII Convención Anual ANECA; 1998 mayo 6-9; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF). Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1998: 144-146.
163. Salado CR, Quiroz VM, Jacobs T. Estudio de patogenicidad de una cepa de *Pasteurella haemolytica*, aislada de gallinas de postura con problemas respiratorios. Memorias de la XXIII Convención Anual ANECA; 1998 mayo 6-9; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF). Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1998: 220-221.
164. Suarez-Guemes F, Jaramillo ML, González HC, Raya RR, Trigo FJ. *Pasteurella haemolytica* A13 an emerging disease in poultry. Memorias de HAP Conference 1999. 1999 septiembre 13-17; Johannesburgo Sudáfrica. Sudáfrica (Johannesburgo): HAP Publisher, 1999: 53-54.
165. Khachatourians GG. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. Can Med Assoc J 1998; 159: 1129-1136.
166. Kehrenberg C, Schulze-Tanzi GJ, Martel JL, Dancla EC, Schwarz S. Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. Vet Res 2001; 32: 323-339.
167. Conlon JA, Shewen PE, Lo RYC. Efficacy of recombinant leukotoxin in protection against pneumonic challenge with live *Pasteurella haemolytica* A1. Infect Immun 1991; 59: 587-591.
168. Purdy CW, Straus DC, Struck D, Foster GS. Efficacy of *Pasteurella haemolytica* subunit antigens in a goat model of pasteurellosis. Am J Vet Res 1993; 54: 1637-1647.
169. Confer AW, Panciera RJ, Fulton RW, Gentry MJ, Rummage JA. Effect of vaccination with live or killed *Pasteurella haemolytica* on resistance to experimental bovine pneumonic pasteurellosis. Am J Vet Res 1985; 46: 342-347.

170. Panciera RJ, Corstvet RE, Confer AW, Gresham CN. Bovine pneumonic pasteurellosis: Effect of vaccination with live *Pasteurella* species. Am J Vet Res 1984; 45: 2538-2542.
171. Pandher K, Murphy GL, Confer Aw. Identification of immunogenic, surfaced-exposed outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* serotype 1. Vet microbiol 1999; 65: 215-226.
172. Gilmour NJ, Donachie W, Sutherland AD, Gilmour JS, Jones GE, Quirie M. Vaccine containing iron-regulated proteins of *Pasteurella haemolytica* A2 enhances protection against experimental pasteurellosis in lambs. Vaccine 1991; 9:137-140.
173. Unión Nacional de Avicultores. Compendio de indicadores económicos del sector avícola 2000. México (DF): UNA, 2000.
174. SAGARPA. Estadística Pecuaria. Información estadística ganadera. Available from: URL: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/ganind3.htm>
175. Schnaitman
176. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.
177. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.
178. Towbin, Hstaehelin T, Gordon J. P.N.A.S. 1974; 102: 459
179. Castañeda RA, Suárez GF, Verdugo RA. Tipificación de aislamientos de *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica-like* obtenidos de aves con enfermedad reproductiva y respiratoria (Tesis de Maestría). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.
180. Chidambaram M, Sharma B, Petras SF, Reese CP, Froshauer M, Weinstock GM. Isolation of *Pasteurella haemolytica* leucotoxin mutants. Infect Immun 1995; 63: 1027-1032.
181. Davies RL, Parton R, Coote JG, Gibbs HA, Freer JH. Evaluations of different methods for the detection of outer membrane proteins and lipopolysaccharides of *Pasteurella haemolytica* by immunoblotting. Journal of immunological methods 1994; 167: 35-45.

183. O'Reilly T, Niven DF, Brown MRW. Phenotypic variation in the outer membrane protein composition of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*: non specific-effect of exogenous pyridine nucleotide supply. *Vet Microbiol* 1991; 29: 159-172.
184. Blackall PJ, Rogers DG, Yamamoto R. Outer-membrane proteins of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 1990; 34: 871-877.
185. Analysis of major antigens of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* and related organisms. *Infect Immun* 1987; 55: 1626-1634.
186. Mosier D, Iandolo John, Rogers D, Uhlich G, Crupper S. Characterization of a 54-kDa heat-shock-inducible protein of *Pasteurella haemolytica*. *Vet Microbiol* 1998; 60: 67-73.

Tabla 1.

Prueba	Aislamiento				
	A	B	C	MhA1	Pt
Trealosa	+	+	+	-	+
Xilosa	+	+	+	+	-
MacConkey	-	-	-	+	+(V)
Sangre Hem.	+	+	+	+	+
Citrato	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-
Motilidad	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	V
Salicin	-	-	-	-	+
TSI	6	6	6	6	6
Rafinosa	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+
Arabinosa	V	+	+	V	-
Caldo Nitrato	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	-

Biotipificación de 3 diferentes aislamientos de Mh-*like* de origen aviar y características bioquímicas descritas para MhA1 y *Pasteurella trehalosi* (Pt) de referencia de origen bovino. +, reacción positiva; -, reacción negativa y V, variable. Los ensayos se realizaron por duplicado.

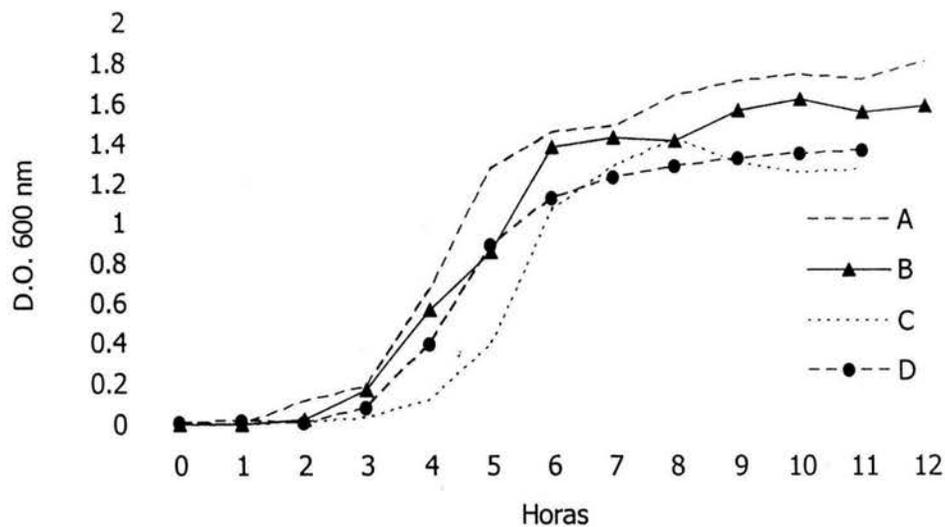


Figura 1. Cinética de crecimiento de 4 diferentes aislamientos de *Mh-like* de origen aviar. DO (600 nm) durante 12 h en CICC. Los ensayos de cada aislamiento se realizaron por duplicado; se muestra el promedio de ambos ensayos.

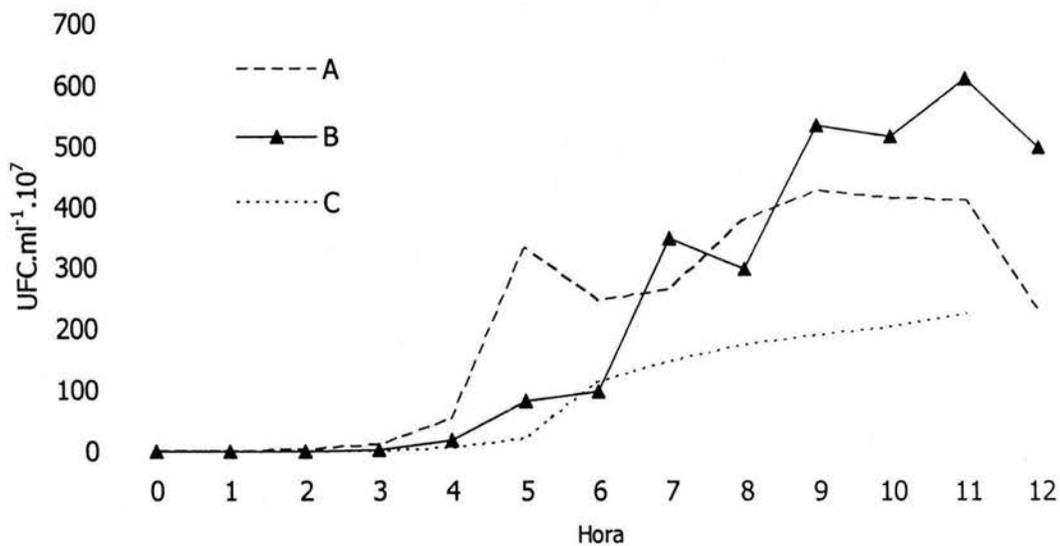


Figura 2. Cinética de crecimiento de 3 diferentes aislamientos de *Mh-like* de origen aviar. Unidades formadoras de colonia (UFC.ml⁻¹.10⁷) durante 12 h en CICC. Los ensayos de cada aislamiento se realizaron por duplicado; se muestra el promedio de ambos ensayos.

Falta página

N° 54

Figura 5.

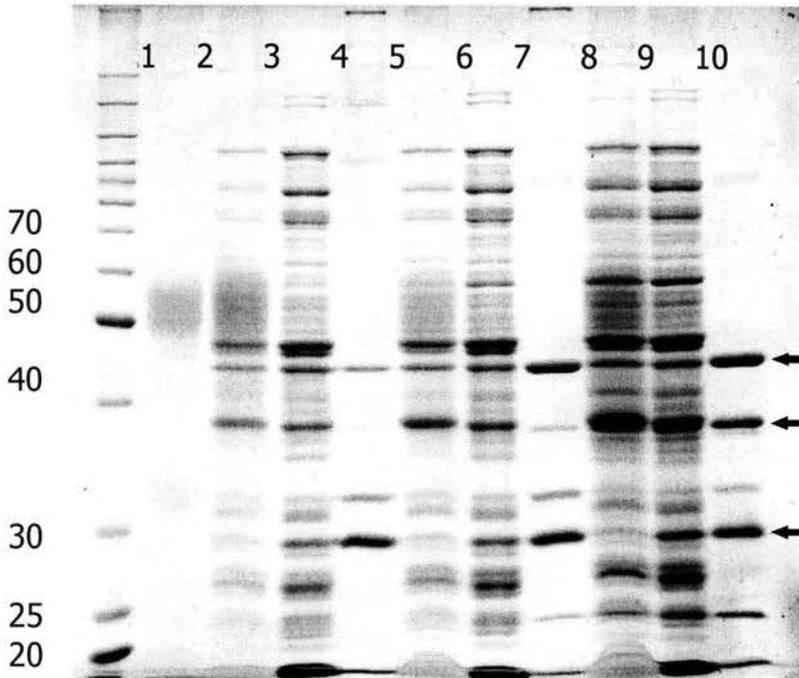


Figura 6.

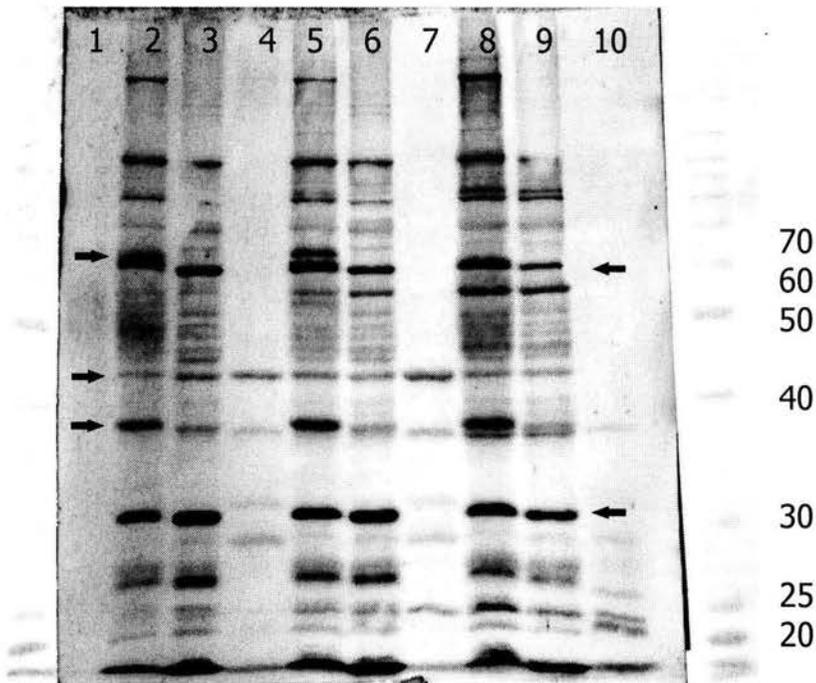


Figura 5. SDS-PAGE de 9 diferentes preparaciones del aislamiento B. **Figura 6,** membrana de nitrocelulosa después de la inmunoelectrotransferencia (*Western blot*). SN, sobrenadante; L, lisado bacteriano total; PME, proteínas de la membrana externa. 1, Medio sin inocular; 2, SN a las 3 h de crecimiento; 3, L a las 3 h de crecimiento; 4, PME a las 3 h de crecimiento; 5, SN a las 6 h de crecimiento; 6, L a las 6 h de crecimiento; 7, PME a las 6 h de crecimiento; 8, SN a las 8 h de crecimiento; 9, L a las 8 h de crecimiento; 10, PME a las 8 h de crecimiento. El marcador se muestra en los carriles externos con la masa molecular expresada en kilo-Daltones. Las flechas corresponden a antígenos inmunodominantes y PME principales. Las preparaciones se muestran con el mismo orden en ambas figuras. Suero de aves convalecientes a brote de campo como anticuerpo primario.

Figura 7.

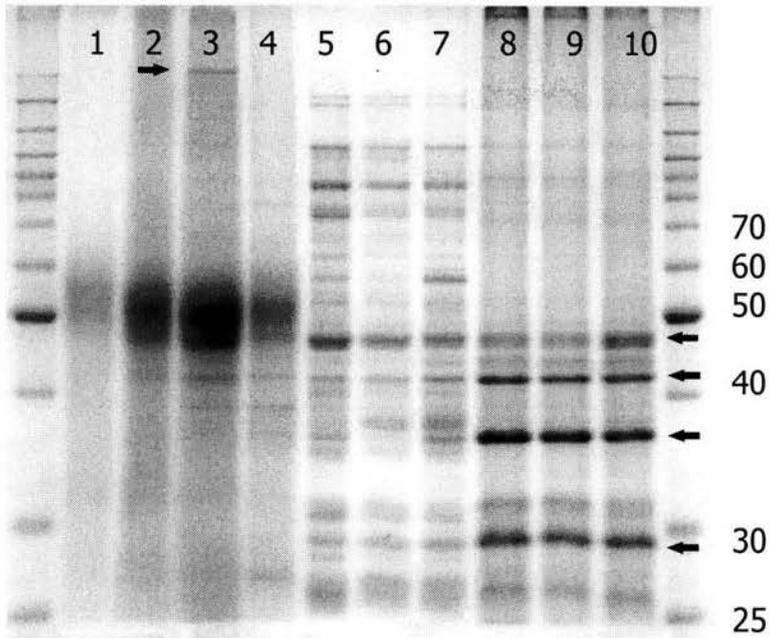


Figura 8.

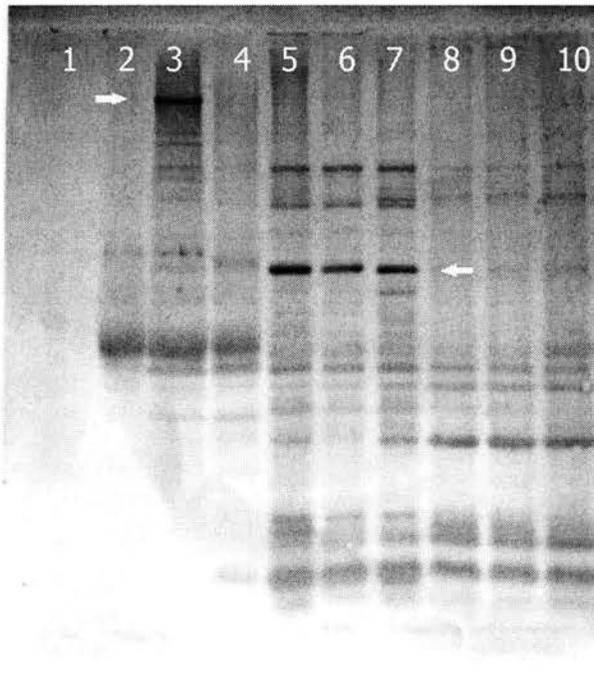


Figura 7. SDS-PAGE de 9 diferentes preparaciones del aislamiento C. **Figura 8,** membrana de nitrocelulosa después de la inmunoelectrotransferencia (*Western blot*). SN, sobrenadante; L, lisado bacteriano total; PME, proteínas de la membrana externa. 1, Medio sin inocular; 2, SN a las 3 h de crecimiento; 3, SN a las 6 h de crecimiento; 4, SN a las 8 h de crecimiento; 5, L a las 3 h de crecimiento; 6, L a las 6 h de crecimiento; 7, L a las 8 h de crecimiento; 8, PME a las 3 h de crecimiento; 9, PME a las 6 h de crecimiento; 10, PME a las 8 h de crecimiento. El marcador se muestra en los carriles externos con la masa molecular expresada en kilo-Daltones. Las flechas corresponden a antígenos inmunodominantes y PME principales. Las preparaciones se muestran con el mismo orden en ambas figuras. Suero de aves convalecientes a brote de campo como anticuerpo primario.

Figura 9.

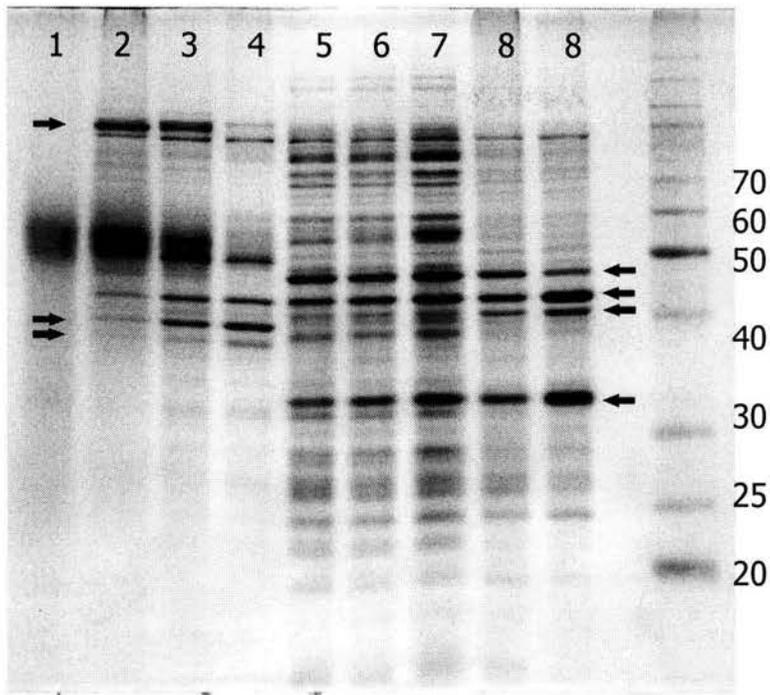
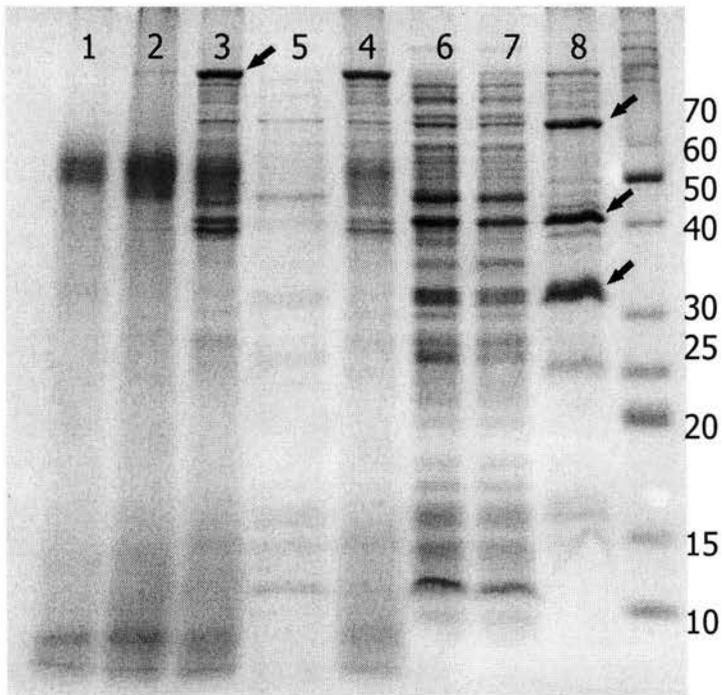


Figura 10.



SDS-PAGE de 7 diferentes preparaciones de MhA1 (**Figura 9**) y Ap (**Figura 10**). SN, sobrenadante; L, lisado bacteriano total; PME, proteínas de la membrana externa. 1, Medio sin inocular; 2-4, SN a las 3, 6 y 8 h de crecimiento, respectivamente; 5-7, L a las 3, 6 y 8 h de crecimiento, respectivamente; 8, PME a las 6 h de crecimiento. El marcador se muestra en los carriles externos con la masa molecular expresada en kilo-Daltones. Las flechas corresponden a antígenos inmunodominantes y PME principales.

Figura 11.

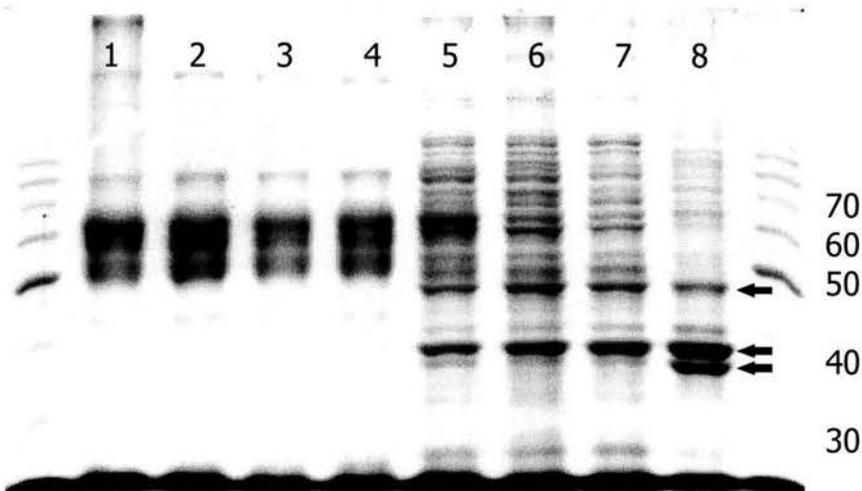


Figura 11. SDS-PAGE de 7 diferentes preparaciones de Hp. SN, sobrenadante; L, lisado bacteriano total; PME, proteínas de la membrana externa. 1, medio sin inocular; 2-4, SN a las 11, 21 y 28 h de crecimiento, respectivamente; 5-7, L a las 11, 21 y 28 h de crecimiento, respectivamente; 8, PME a las 21 h de crecimiento. El marcador se muestra en los carriles externos con la masa molecular expresada en kilo-Daltones. Las flechas corresponden a antígenos inmunodominantes y PME principales.

Figura 12.

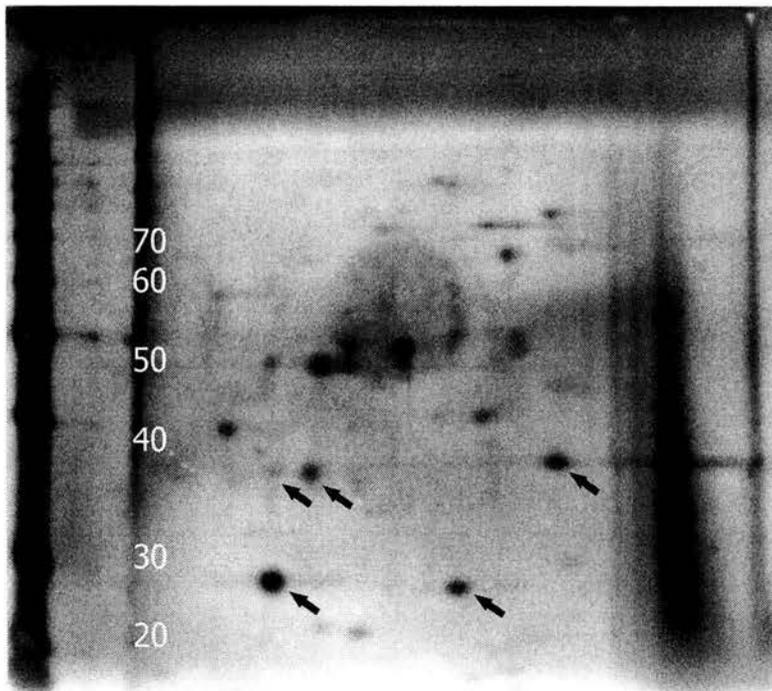


Figura 12. Isoelectroenfoque de la preparación sobrenadante a las 6 h de crecimiento. El marcador se muestra en el carril izquierdo con la masa molecular expresada en kilo-Daltones. Las flechas corresponden a antígenos de peso molecular similar a dos de los antígenos descritos en dicha preparación.

Tabla 2.

Antígenos y PME de tres aislamientos de Mh-like de origen aviar.										
Aislamiento	Proteína [†]	Preparación*								
		SN3	SN6	SN8	L3	L6	L8	PME3	PME6	PME8
A	41.6							+++	+++	+++
A	38.6	+	++	+++						
A	35.6							+	+	+++
A	33.7							+	+	+
A	29.6							+++	+++	+++
B	43.6							+	+++	+++
B	37.8								+	+++
B	32.4							+	+	+
B	29.5							+++	+++	+++
B	24.5								+	++
C	223		++							
C	46.5							++	++	++
C	41.7							+++	+++	+++
C	36.5							+++	+++	+++
C	29.4							++	++	++

La intensidad de detección de los diferentes antígenos se evaluó ópticamente, y se calificó: +++, alta; ++, moderada; +, baja. La detección se realizó mediante SDS-PAGE y la tinción de azul de Coomassie. [†]Tamaño expresado en kDa. *Las literales SN, L y PME corresponden a las preparaciones sobrenadante, lisado y proteína de la membrana externa, respectivamente; los números corresponden al tiempo de incubación en horas.

Tabla 3.

Antígenos y PME inmunodominantes de tres aislamientos de Mh-like de origen aviar										
Aislamiento	Proteína [†]	Preparación*								
		SN3	SN6	SN8	L3	L6	L8	PME3	PME6	PME8
A	40.8	+	+	+	+	+	+	++	++	+++
A	38.0	+	+++	+++						
A	35.9							++	++	+++
A	28.9							++	++	+++
B	224.7	+	+	++						
B	64.1	++	+++							
B	60.6	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
B	43.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B	37.9	++	+++	+++						
B	30.5	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
C	225		++							
C	60.9				+++	+++	+++			
C	44.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+

La intensidad de detección de los diferentes antígenos se evaluó ópticamente, y se calificó: +++, alta; ++, moderada; +, baja. La detección se realizó mediante inmunoelectrotransferencia (*Western-blot*). [†]Tamaño expresado en kDa. *Las literales SN, L y PME corresponden a las preparaciones sobrenadante, lisado y proteína de la membrana externa, respectivamente; los números corresponden al tiempo de incubación en horas.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Tabla 4.

Antígenos y PME de cepas de referencia.								
Aislamiento	Proteína [†]	Preparación*						
		SN3	SN6	SN8	L3	L6	L8	PME6
MhA1	98.0	+++	+++	+				
MhA1	48.7		+++	+++				
MhA1	45.9							+++
MhA1	42.1							+++
MhA1	40.0							+++
MhA1	39	+	+++	+++				
MhA1	37.1	+	+	++				
MhA1	32.4							+++
Ap	107.3	+	+++	+++				
Ap	67.4							+++
Ap	40.0							+++
Ap	31.7							+++
Hp	48.1							++
Hp	39.0							+++
Hp	35.9							+++

La intensidad de detección de los diferentes antígenos se evaluó ópticamente, y se calificó: +++, alta; ++, moderada; +, baja. La detección se realizó mediante SDS-PAGE y la tinción de azul de Coomassie. [†]Tamaño expresado en kDa. *Las literales SN, L y PME corresponden a las preparaciones sobrenadante, lisado y proteína de la membrana externa, respectivamente; los números corresponden al tiempo de incubación en horas.

Tabla 5.

Comparativo de los patrones de detección de las PME de tres aislamientos de Mh-like de origen aviar.		
Aislamiento		
A	B	C
		46.5 ^{m,c}
41.6 ^{a,c}	43.6 ^{a,c}	41.7 ^{a,c}
35.6 ^{a,p8}	37.8 ^{a,p8}	36.5 ^{a,c}
33.7 ^{b,c}	32.4 ^{b,c}	
29.6 ^{a,c}	29.5 ^{a,c}	29.4 ^{m,c}
	24.5 ^{m,p8}	

La detección de las PME se realizó mediante SDS-PAGE y la tinción de azul de Coomassie. La primer literal indica el grado de detección: a, alta; b, baja; m, moderada. La segunda literal indica el patrón de detección: c, constante; p, preferente a alguna de las preparaciones. El número indica el tiempo de incubación de la bacteria (en horas), de donde se obtuvo la preparación.

Tabla 6.

Comparativo de los patrones de detección de antígenos inmunodominantes de tres aislamientos de Mh-like de origen aviar.		
Aislamiento		
A	B	C
		223 ^{a,sn6}
	64.1 ^{a,sn6,8}	
	60.6 ^{a,sn3,6,8}	60.9 ^{a,l3,6,8}
40.8 ^{b,c}	43.0 ^{b,c}	44.1 ^{b,c}
38.0 ^{a,sn6,8}	37.8 ^{a,sn3,6,8}	
35.9 ^{m,pme8}		
	30.5 ^{a,sn-1,3,6,8}	
28.9 ^{m,pme8}		

La detección de los antígenos se realizó mediante inmunoelectrotransferencia (*Western-blot*). La primer literal indica el grado de detección: a, alta; b, baja; m, moderada. La segunda literal indica la preparación donde se detecto el antígeno: pme, proteína de la membrana externa; sn, sobrenadante; l, lisado; c, constante (en todas las preparaciones). El número indica el tiempo de incubación de la bacteria de donde se obtuvo la preparación.

Tabla 7.

Comparativo de los patrones de detección de las PME del aislamiento A y de las cepas testigo.		
Aislamiento	Cepa de referencia	
	223.0 ^{m,sn6}	
		107.3 ^{a,sn6,8}
		90.8 ^{a,sn3,6}
		67.4 ^{a,pme6}
		48.7 ^{a,sn6,8}
	46.5 ^{m,pme3,6,8}	45.9 ^{a,pme6}
	43.6 ^{a,pme6,8}	
41.6 ^{a,pme3,6,8}	41.7 ^{a,pme3,6,8}	42.1 ^{a,pme6}
		40.0 ^{a,pme6}
38.6 ^{a,sn6,8}		39.0 ^{a,sn6,8}
	37.8 ^{a,pme8}	37.1 ^{b,sn3,6,8}
	36.5 ^{a,pme3,6,8}	
35.6 ^{a,pme8}		
33.7 ^{b,pme3,6,8}		
	32.4 ^{b,pme3,6,8}	
29.6 ^{a,pme3,6,8}	29.5 ^{a,pme3,6,8}	32.4 ^{a,pme6}
	29.4 ^{a,pme3,6,8}	31.7 ^{a,pme6}
	24.5 ^{m,pme8}	

La detección de las PME se realizó mediante SDS-PAGE y la tinción de azul de Coomassie. La primer literal indica el grado de detección: a, alta; b, baja; m, moderada. La segunda literal indica la preparación donde se detectó el antígeno: pme, proteína de la membrana externa; sn, sobrenadante; l, lisado. El número indica el tiempo de incubación de la bacteria de donde se obtuvo la preparación