



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

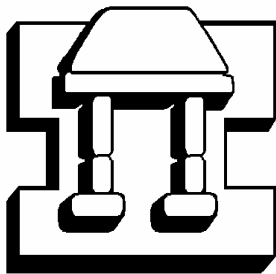
**“IDENTIFICACIÓN DE  
PROTEASAS SECRETADAS POR  
*Haemophilus paragallinarum*.”**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

**RIVERO GARCIA PAULO CESAR**



**IZTACALA**

2004

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL.**

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

*Este proyecto fue financiado por:*

*PAPIIT/IN219203-3*

*PAPCA-UNAM*

## DEDICADA:

*A una maravillosa persona que a pesar de que ya no se encuentra conmigo estoy muy agradecido, por todo tu amor, cariño, comprensión, por mi formación como persona. Mamá te quiero mucho y nunca te voy a olvidar.*

*IRMA FRANCISCA GARCIA ORTIZ.*

*A mi familia y Hermanos*

*A PENELOPE*

*Gracias por todo tu amor, cariño, confianza y sobre todo por el apoyo que me has brindado durante todo este tiempo, te quiero mucho y espero que siempre sigas así.*

*A mi niño SERGIO IVAN:*

*Quiero que sepas que te quiero mucho y que siempre estaré a tu lado. Sabes que cuentas conmigo.*

*A CARLOS y JOSE MANUEL:*

*Gracias por la confianza y sobre todo por todo el apoyo que he recibido en todo momento.*

## AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. Erasmo Negrete Abascal por su asesoría, orientación, paciencia y sobre todo por sus conocimientos en el desarrollo de este trabajo.*

*Al Dr. Sergio Vaca, por sus pláticas tan amenas, la confianza que me brindó y por soportarme durante este tiempo.*

*A mis revisores: Dr. Diego Arenas, M. en C. Gloria Paniagua y Biol. Roberto Moreno por sus observaciones así como los comentarios que enriquecieron este trabajo.*

*A mis dos grandísimos amigos de la carrera:*

*Gabriela y Augusto: por todos los momentos que pasamos juntos, por su sentido del humor, sinceridad, confianza, bueno ya saben todo lo que significan para mí, son unas magníficas personas. Y creo que lo más importante gracias por su amistad y todo el apoyo durante este tiempo.*

*A mis amigos de la Universidad: Alain, Beta, Monse y Olivier por su amistad.*

*A Iván Lara: por su amistad, consejos y por todo lo que hemos pasado juntos y todo lo que nos falta.*

*A mis amigos del Laboratorio de Genética: Lolita, Angel, Angelica, Elizabeth, en especial a Marcela, Favi y Ricardo por todos los ratos agradables que me hicieron pasar.*

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
2.1. Etiología	4
2.2. Descripción del Género	6
2.3. Patogénesis	8
2.4. Síntomas Clínicos	9
2.4.1. Coriza infecciosa complicada	9
2.4.2. Transmisión de la enfermedad	10
2.5. Patología	10
2.6. Antígenos de <i>H. paragallinarum</i>	11
2.6.1. Serotipificación y Serovariedades de <i>H. paragallinarum</i>	12
2.6.2. <i>H. paragallinarum</i> Serovariedad B	13
2.7. Diagnóstico Bacteriológico	13
2.7.1. Infección Experimental y Ensayos de Protección Cruzada	15
2.8. Tratamiento	16
2.9. Profilaxis	17
2.10. Vacunas	17
2.11. Enzimas Proteolíticas	18
2.11.1. Clasificación de las Proteasas	18
2.11.2. Mecanismos Catalítico	19
2.11.2.1. Serin Proteasas	19
2.11.2.2. Cistein Proteasas	20
2.11.2.3. Aspártico Proteasas	20
2.11.2.4. Metaloproteasas	21
2.12. <i>Funciones Fisiologicas de las Proteasas</i>	22

<b>3. ANTECEDENTES</b>	<b>24</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>26</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
5.1. Objetivo general	26
5.2. Objetivos particulares	26
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
6.1. Cepas bacterianas	27
6.2. Concentración de proteínas del sobrenadante	27
6.3. Actividad proteolítica	27
6.4. pH óptimo	28
6.5. Estabilidad al calor	28
6.6. Efecto de inhibidores	28
6.7. Degradación de sustratos	29
6.8. Western Blot (inmunorreconocimiento)	29
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>30</b>
7.1. Actividad proteolítica	30
7.2. Concentración de proteínas	30
7.3. pH óptimo	31
7.4. Estabilidad al calor	32
7.5. Efecto de inhibidores	33
7.6. Degradación de sustrato	34
7.7. Inmunorreconocimiento	35
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>41</b>
<b>10. APENDICE</b>	<b>42</b>
<b>11. REFERENCIAS</b>	<b>45</b>

## 2. INTRODUCCIÓN

Los miembros de la familia *Pasteurellaceae* son bacterias pequeñas Gram negativas que pueden colonizar superficies mucosas de los tractos respiratorio y genital de diferentes especies animales, incluido el humano. Durante mucho tiempo esta familia bacteriana solo consistió de tres géneros: *Haemophilus*, *Actinobacillus*, y *Pasteurella*, pero recientemente se le han agregado otros dos: *Mannheimia* y *Gallibacterium* (Jacques y Mikael , 2002).

La familia *Pasteurellaceae* incluye un número grande de patógenos humanos importantes, como *H. influenzae*, *H. ducreyi* y *A. actinomycetemcomitans* y diferentes patógenos animales. Algunos de estos patógenos infectan diferentes especies animales, causando enfermedades económicamente significativas para la industria pecuaria (Jacques y Mikael, 2002).

La coriza infecciosa es una enfermedad aguda del tracto respiratorio de las gallinas causada por *H. paragallinarum*, que afecta principalmente el pasaje nasal de las aves (Blackall y Yamamoto, 1998).

La enfermedad ocurre mundialmente y su impacto económico radica en las pérdidas que ocasiona a la avicultura por el retardo en el crecimiento de pollos de engorda y en la baja en la postura que puede alcanzar hasta el 50%, principalmente en granjas de aves de edades múltiples (Blackall y Yamamoto, 1998).

La coriza infecciosa se caracteriza usualmente por una baja mortalidad y una alta morbilidad. Todas las edades son susceptibles a contraer la enfermedad, pero ésta es menos severa en aves jóvenes; siendo las aves maduras las más susceptibles (Blackall, 1999).

En 1930 se realizó por primera vez un aislamiento de *H. paragallinarum* a partir de pollos (Bragg y col. 1993). Este agente causal de la coriza infecciosa



fue clasificado como *H. gallinarum* por Elliot y Lewis debido al requerimiento del factor X (hemina) y V (nicotinamida adenin dinucleótido NAD) para su crecimiento *in vitro* (Blackall y Yamamoto, 1998, Hofstad, 1964, Glisson, 1998). Page en 1962 reportó que todas las cepas aisladas de casos de coriza infecciosa requerían solamente del factor V para su crecimiento (Bragg y col. 1993). En base a esto, Blackall y Yamamoto decidieron renombrar a *H. gallinarum* como *H. paragallinarum* (Blackall y Yamamoto, 1998, Bragg y Verschoor, 1993).

A pesar de su importancia, *H. paragallinarum* ha sido poco estudiado en cuanto a los mecanismos por los cuales produce esta enfermedad. Distintos factores de virulencia han sido asociados a la patogenicidad de *H. paragallinarum* entre los cuales destacan los antígenos: L, HL, HS y una hemaglutinina. La hemaglutinina ha sido considerada el principal factor de virulencia con que cuenta esta bacteria y anticuerpos contra ella se consideran protectores (Yamaguchi y col, 1993). Esta bacteria patógena es capaz de adherirse a las células del epitelio respiratorio y este proceso tiene relación con la hemoaglutinación, ya que los eritrocitos y las células del epitelio respiratorio comparten antígenos comunes.

La cápsula también desempeña una función importante en la virulencia de la bacteria, ya que se ha demostrado que los microorganismos capsulados forman colonias iridiscentes y son virulentas, mientras que las no capsuladas forman colonias no iridiscentes y son avirulentas. La cápsula también está involucrada en la adherencia a los cilios del tracto respiratorio de las aves, (Bragg y col. 1993).

Además de la hemaglutinina y la cápsula se han descrito otros antígenos de *H. paragallinarum*; entre ellos se encuentran: polisacáridos, lipopolisacáridos y proteínas de membrana externa. (Bragg y col, 1997).

## 2.1 ETIOLOGÍA

El género *Haemophilus* ha sido tradicionalmente definido como bacterias Gram negativas que requieren uno o dos factores de crecimiento: hemina (factor X) y nicotín-adenín-dinucleótido (NAD o factor V). También pueden requerir otros factores de crecimiento, razón por la que generalmente se utilizan medios enriquecidos para su cultivo y por la que se les denomina bacterias exigentes. La demostración del requerimiento de los factores X y V no es una prueba definitiva de identificación de *Haemophilus*, ya que otras especies como *Actinobacillus* y *Pasteurella* también pueden manifestar dependencia. (Bragg y Verschoor 1993, Hofstand, 1964). En la figura 1 se observa que *H. influenzae* requiere los factores V y X para crecer. Dentro de este género *H. paragallinarum* es el agente etiológico de la coriza infecciosa (Blackall, 1989, Blackall y col. 1998).

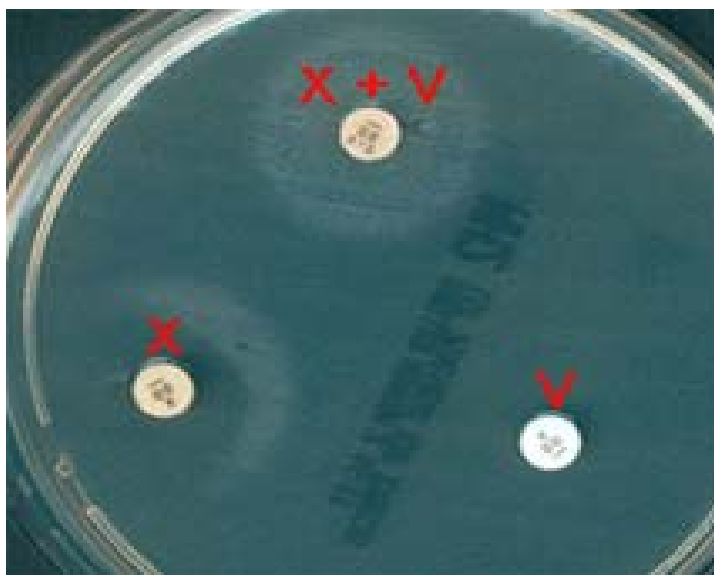


Fig 1. Crecimiento de *Haemophilus influenzae*, dependiente de los factores V y X en medio de cultivo TSB.

Otras tres especies bacterianas de la gallina doméstica, antes integrantes del género *Haemophilus* y descritas en conjunto como *H. avium*, se encuentran actualmente ubicadas dentro del género *Pasteurella*: *P. avium* y *P. volantium* y "*Pasteurella* especie A". Las dos primeras son completamente patógenas mientras que la última se ha descrito como poco virulenta para el

tracto respiratorio de la gallina, aunque ninguna de ellas es causante de coriza (Blackall, 1989).

Originalmente la bacteria considerada el agente causal de la coriza infecciosa se denominó *H. gallinarum* y erróneamente se demostró que requería ambos factores de crecimiento. Ello fue debido a que los antiguos medios de cultivo disponibles para las pruebas tenían serias deficiencias. (Blackall, 1989, Blackall y Terzolo, 1995). Los métodos más habituales de identificación presuntiva de *H. paragallinarum* se basan en determinar la dependencia de los factores X y V mediante la utilización de discos impregnados con estas sustancias; sin embargo, se han demostrado errores en la identificación debido a la posibilidad de arrastrar esos mismos factores a partir de los medios iniciales de crecimiento, que los pueden contener en abundancia.

El modo más fiable para determinar el requerimiento del factor X es mediante la prueba de la porfirina (Blackall y Yamamoto, 1997). *H. paragallinarum* es realmente un hemófilo atípico. De hecho existe evidencia taxonómica de que esta especie bacteriana se encuentra más estrechamente relacionada con el género *Actinobacillus* que con el género *Haemophilus* (Blackall, 1989).

El concepto taxonómico que hasta ahora se sustentaba para definir el género *Haemophilus* ha sido bruscamente cambiado en la literatura internacional cuando en Sudáfrica se describieron brotes de coriza infecciosa causados por cepas de *H. paragallinarum* NAD independientes que son taxonómicamente muy similares a las cepas clásicas (Moauahid y col. 1992, Bragg y Verschoor, 1997, Bragg, 2002). Estas bacterias adquieren la capacidad de sintetizar el NAD al captar el DNA de un plásmido por transformación. Este plásmido puede además difundirse por transformación entre distintas cepas de *H. paragallinarum* y posiblemente también entre cepas de otras especies NAD dependientes de las aves. Es importante mencionar que en este país se describieron también cepas NAD independientes de *H. influenzae* de origen humano. Bragg y col., reportaron el aislamiento de un plásmido, con el que transformaron una cepa de *H. paragallinarum* dependiente de NAD en

independiente, lo que demostró que la capacidad de sintetizar NAD se encuentra codificada en el plásmido (Bragg y Verschoor, 1993). En la actualidad en México se han reportado también cepas independientes de NAD (García y col. 2003).

## 2.2 DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO.

Los miembros del género *Haemophilus* son parásitos obligados que constituyen parte de la flora normal del tracto respiratorio de los humanos y muchas especies de animales. *H. paragallinarum* puede observarse como cocobacilos cortos (1.5  $\mu\text{m}$  de largo) que a veces se presentan en pares o cadenas cortas. En cultivo, la morfología microscópica depende de la edad y del medio. Después de 6 a 8 horas en medio enriquecido, predominan las formas cocobacilares pequeñas. Posteriormente se observan bacilos alargados, bacterias lisadas y formas muy pleomórficas. Su temperatura de crecimiento está en el rango de 25 a 45 °C, siendo el rango óptimo entre los 37 – 38 °C (Jawetz, 2002).

*H. paragallinarum* es una bacteria Gram-negativa pleomórfica, inmóvil y anaerobia facultativa (Blackall y col. 1997, Hofstad 1964, Holt y col. 1994). Tiene coloración bipolar ya sea cuando se encuentra en las fosas paranasales de las aves infectadas o en un medio de cultivo, mide aproximadamente de 0.4 a 0.8  $\mu\text{m}$  de ancho y de 1.5 a 3  $\mu\text{m}$  de largo (Blackall y col. 1997). Figura 2.



Figura. 2 Tinción de Gram de *H. paragallinarum*.

La identificación de los microorganismos del género *Haemophilus* depende en parte de la demostración de la necesidad de los factores X y V para su crecimiento. La fermentación de carbohidratos es escasa e irregular (Bragg, 2002).

Las cepas virulentas forman colonias pequeñas redondas, lisas, convexas con bordes regulares, semiopacas (Bragg y Verschoor, 1997, Negrete-E.1989, Yamamoto,1980), mientras que las cepas no virulentas crecen como colonias planas, rugosas de bordes irregulares o en ocasiones muy bien marcadas con fuerte iridiscencia. También se pueden presentar colonias de formas intermedias, ligeramente convexas, con apariencia entre lisa y rugosa, con bordes moderadamente irregulares (Sawata y Nakai, 1984). Esta bacteria se caracteriza por no ser hemolítica.

En caso de cultivarse este microorganismo en placas de agar sin NAD las colonias de *H. paragallinarum* crecen cerca de los bordes de una cepa nodriza que puede ser *Staphylococcus aureus* o *S. epidermis*, esto se debe a que estas cepas son capaces de proporcionar el NAD para el crecimiento de este microorganismo, sin embargo la cantidad liberada de NAD varía entre cepa y cepa. A este fenómeno se le conoce como “fenómeno satélite”

### **2.3. PATOGÉNESIS**

*H. paragallinarum* infecta al ave por vía respiratoria después de un corto periodo de incubación, que varía entre 1 y 3 días, produce una enfermedad que se manifiesta por inflamación catarral de los senos paranasales. Esta bacteria sobrevive únicamente durante 5h fuera del organismo del ave (Blackall, 1998), el contagio sólo se produce a través de animales infectados, que ya han presentado la enfermedad, ya que permanecen como portadores de la bacteria en la granja durante un tiempo prolongado (Blackall y col. 1997).

Los síntomas clínicos persisten por 3 a 7 días y luego se produce su remisión. Los cambios patológicos que se desencadenan a partir de las 20 h post-infección alcanzan su máxima severidad a los 7-10 días post-infección y la reparación subsecuente recién finaliza a los 14-21 días de la post-infección (Blackall y col. 1997). .

En las gallinas ponedoras causa alta morbilidad, baja o nula mortalidad y una importante pérdida en la producción de huevos, la que generalmente oscila entre un 10% y un 40%. (Blackall y col. 1997). Blackall en 1999 mencionó que una cepa altamente toxigénica de *H. paragallinarum* puede causar una alta mortalidad. En pollos parrilleros puede causar un cuadro similar al descrito como cabeza hinchada (Blagg y col. 1993, Sandoval y col. 1994). En varias ocasiones cuando las lesiones se encuentran en franca remisión y *H. paragallinarum* ya no puede aislarse del tracto respiratorio, produce a continuación una sinusitis muy severa, con pérdida del globo ocular y reemplazo de su contenido por masas caseosas. Sandoval y col. en 1994 reportaron que *P. gallinarum* es el agente oportunista más común en gallinas ponedoras, mientras que en aves jóvenes la bacteria más frecuentemente asociada a casos de coriza infecciosa es *Escherichia coli* (Sandoval y col. 1994).

## **2.4. SÍNTOMAS CLÍNICOS**

La coriza infecciosa se ha descrito como una enfermedad solo importante para las gallinas en postura. Sin embargo esta enfermedad ocurre tanto en pollos parrilleros y gallinas en recría como gallinas ponedoras y en reproducción (Blackall y Yamamoto, 1998). Los síntomas principales consisten en ruidos que denuncian la presencia de mucosidad en las vías respiratorias altas y estornudos en algunos animales, y los signos clínicos más comunes son descarga nasal, lagrimeo, anorexia, tumefacción facial, conjuntivitis con tumefacción en los párpados los cuales se pueden pegar y se origina un edema facial, disnea, postración y diarrea (Blackall y col. 1997, Blackall, 1999).

Se han descrito casos más severos, aunque menos frecuentes, caracterizados por celulitis fibrinopurulenta de la cabeza, se produce inflamación catarral aguda de las membranas mucosas del pasaje nasal y los senos infraorbitarios, puede haber edema subcutáneo, neumonía y aerosaculitis (Blackall y col. 1997).

En casos de coriza no complicada generalmente se produce una alta morbilidad y baja o nula mortalidad, sin embargo, si la cepa infectante es muy patógena o si hay una relación o asociación con otros agentes infecciosos puede ocurrir una alta mortalidad. En países como en Argentina, India, Marruecos y Sudáfrica, se han reportado casos de coriza infecciosa con alta mortalidad debida únicamente a *H. paragallinarum* (Blackall, 1999, Sandoval y col. 1994).

#### **2.4.1 CORIZA INFECCIOSA COMPLICADA.**

Se denomina “coriza infecciosa complicada”, cuando *H. paragallinarum* se llega a asociar con otros agentes, esto produce una alteración grave a la enfermedad. Entre los agentes bacterianos más comunes deben mencionarse *E. coli*, *P. gallinarum* y *Mycoplasma gallisepticum* y menos frecuente *P. haemolytica*, *P. multocida* y *Salmonella entérica* (Blackall, 1999, Sandoval y col. 1994). Vandamme y col. describieron una nueva especie denominada *Ornithobacterium rhinotracheale*, como un agente asociado a la coriza infecciosa y con capacidad patógena para producir infecciones respiratorias en gallinas ponedoras y pollos parilleros (Blackall, 1999, Vandamme y col, 1994).

#### **2.4.2. TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD**

Los huéspedes naturales de *H. paragallinarum* son los pollos y las gallinas, todas las edades son susceptibles a contraer la enfermedad, pero ésta es menos severa en las aves jóvenes. Esta patología puede afectar a otras aves como las codornices y no es transmitida para otra especie de animales (Blackall y col. 1997, Hofstad, 1964).

La enfermedad parece presentarse con más frecuencia en las épocas frías del año y afecta principalmente a aves de granjas con diversas edades. El hombre no presenta esta enfermedad pero puede ser un vehículo de transmisión de la coriza infecciosa para las gallinas, ya que la manipulación de las gallinas enfermas o muertas permite la transmisión de microorganismo; sin embargo, la enfermedad es transmitida principalmente por aerosoles o por contacto entre un ave enferma y una sana (Blackall y col. 1997).

## **2.5. PATOLOGÍA**

*H. paragallinarum* produce inflamación catarral aguda de las membranas mucosas de la nariz y senos infraorbitarios. Frecuentemente se produce edema subcutáneo de la cabeza, barbillones y conjuntivitis catarral (fig. 3). Los cambios en la mucosa de la cavidad nasal, senos y tráquea consisten en descamación, edema e hiperemia con infiltración de heterófilos, mastocitos y macrófagos en la lámina propia. Cuando se afecta el tracto respiratorio inferior se produce bronconeumonía catarral aguda con presencia de heterófilos y restos celulares que ocupan la luz de los bronquiolos secundarios y terciarios. Las células epiteliales de los capilares se encuentran inflamadas e hiperplásicas. Los alvéolos tienen inflamación catarral caracterizada por tumefacciones e hiperplasia celular con abundante infiltración de heterófilos. Los productos de la inflamación de los mastocitos, heterófilos y macrófagos pueden ser los responsables de los severos cambios vasculares y daño celular en la coriza infecciosa. (Blackall y col. 1997).





A

B

C

Fig. 3 Pollos infectados con *H. paragallinarum*. A) Edema facial severo, B) Descarga nasal, C) conjuntivitis con ligera tumefacción.

## 2.6. ANTÍGENOS DE *H. PARAGALLINARUM*

En la actualidad se reconocen tres tipos de antígenos: L (sensible al calor y a la tripsina), HL (sensible al calor y resistente a la tripsina) y HS (estable al calor y resistente a la tripsina). El antígeno L existe en tres formas (L1, L2 y L3). Los antígenos L1 y L2 son respectivamente responsables de la especificidad de serovariedades de Page A y C. El resto de los antígenos (L3, HL y HS) son comunes a todas las cepas (Blackall y col. 1994). El antígeno más importante de las cepas patógenas es el antígeno hemoaglutinante.

Se dice que una cepa de *H. paragallinarum* es patógena cuando es capaz de adherirse a las células que tapizan el epitelio respiratorio. El requisito de adherencia al tracto respiratorio tiene estrecha relación con la hemoaglutinación. Esto se debe a que los eritrocitos y las células del epitelio respiratorio comparten antígenos comunes. De hecho, las cepas que pierden su capacidad de hemoaglutinar también dejan de ser patógenas (Blackall y col. 1994)

Además del antígeno hemoaglutinante se han descrito otros antígenos de *H. paragallinarum* que también inducen protección en las aves inmunizadas. Entre ellos cabe mencionar la cápsula, polisacáridos, lipopolisacáridos y proteínas de membrana externa (Blackall y col. 1994).

### **2.6.1. SEROTIPIFICACIÓN Y SEROVARIEDADES DE *H. paragallinarum***

El primer estudio serológico de *H. paragallinarum* lo realizó Page, quien mediante pruebas de aglutinación en placa describió tres serovariedades: A, B y C. Otros autores describieron distintos tipos de serotipificación que posteriormente se equipararon al original de Page. Sawata y col. en 1984 mostraron que a diferencia del serotipo 1, los microorganismos del serotipo 2 y el serotipo C no tratados carecen de actividad hemaglutinante. Kume y col. (Blackall y col. 1997, Eaves y col. 1989), propusieron una clasificación serológica alternativa basada en la prueba de inhibición de la hemaglutinación. Mediante esta técnica, los serogrupos de Page A, C, y B, fueron clasificados en serogrupos I,II,III, reconociéndose 7 serovares dentro de esos tres serogrupos. Actualmente las tres serovariedades de Page pueden ser reconocidas por pruebas de inhibición de la hemoaglutinación. Existen dos pruebas de hemaglutinación que utilizan cepas de referencia con hemoaglutinante de cada una de las tres serovariedades de Page y eritrocitos de pollo fijados con glutaraldehído. Las cepas de la serovariedad A son generalmente muy hemoaglutinantes mientras que las cepas de las serovariedades B y C necesitan tratamientos previos de los antígenos antes de realizar la prueba hemaglutinante. Para ello se utilizan tratamientos con hialuronidasa o también sonicación combinada con tiocianato de potasio (Blackall, 1995, Blackall y col. 1998). La prueba de HI descrita por Blackall y col. es la más utilizada y detecta las tres serovariedades de Page, mientras que la de Kume y col. permite la detección de 4 subtipos dentro de cada una de las serovariedades A y C de Page (Blackall, 1999, Blackall, 1995, Blackall y col. 1998). Estos subtipos se denominan A1, A2, A3 y A4 y C1, C2, C3 y C4. Esta clasificación se realiza mediante sueros adsorbidos aunque no se utiliza rutinariamente porque la técnica es complicada y los subtipos no tienen relación con la protección vacunal (Blackall, 1999).

### **2.6.2. *H. paragallinarum* SEROVARIEDAD B**

Durante muchos años se creyó que esta serovariedad, representada por las únicas 2 cepas disponibles (Spross y 0222), no existía realmente sino que estaba compuesta por un grupo de cepas variantes patógenas y no capsuladas de las serovariedades A o C que habían perdido su antígeno específico de serovariedad (Blackall y col. 1997). Por ese motivo durante varios años la mayoría de las vacunas contenían únicamente a las serovariedades A y C. Actualmente, debido a la aparición de cepas patógenas y capsuladas de esta serovariedad en Argentina, Sudáfrica, Brasil y Filipinas este antiguo concepto fue dejado de lado y actualmente no se discute que las cepas de la serovariedad B existen como tales y deben ser incluidas en las vacunas (Blackall, 1999, Blackall y col. 1994). Bowles y col. 1993, en un estudio comparativo, determinaron la diversidad genética y las relaciones entre 118 cepas provenientes de seis continentes analizando la variación de la movilidad electroforética de 8 enzimas metabólicas codificadas por genes cromosómicos.

Es evidente que existe diversidad antigénica entre las cepas de la serovariedad B. Se ha demostrado que las vacunas bivalentes preparadas con las serovariedades A y C brindan protección cuando las aves son desafiadas con la cepa B Spross, aunque estas mismas vacunas son ineficaces para proteger a las aves cuando se desafían con dos cepas B de Sudáfrica (Yamaguchi y col. 1991).

### **2.7. DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO**

Se recomienda el estudio de 3 o 4 aves con síntomas agudos de coriza. Si se seleccionan las aves luego del quinto y séptimo día post infección, puede que *H. paragallinarum* ya no se encuentre y sólo se obtengan bacterias complicantes de la enfermedad. El procedimiento de toma de muestras se debe efectuar con estricta esterilidad. Para ello, una vez sacrificada el ave, se cauteriza la piel ubicada debajo de los ojos, se practica una incisión sobre el seno paranasal correspondiente, se separa la piel en la incisión y se introduce en la cavidad del seno un hisopo estéril humedecido en un caldo nutritivo o solución salina fisiológica tamponada a pH neutro (Blackall, 1997, Sandoval y col. 1996). Lo más recomendable es el cultivo antes de las 5 horas debido a la

reducida viabilidad de *H. paragallinarum* en los hisopados (Blackall e Yamamoto 1998). Para la siembra del contenido de los hisopos pueden usarse placas de agar sangre con el agregado de estrías "alimentadoras" de *Staphylococcus* spp., que excretan factor V, o bien usar agar chocolate o agar con sangre hemolisada en vez de los estafilococos (Blackall y Terzolo, 1995, Blackall e Yamamoto, 1998, Sandoval y Terzolo, 1996). Mena (2003) aisló *Haemophilus paragallinarum* en diferentes medios de cultivo (Luria Bertani LB, Luria Bertani con glucosa LBG, Luria Bertani con fosfato LBP, Luria Bertani con glucosa y fosfato LBGP, Caldo de Soya tripticaseína TSB, y caldo infusión cerebro corazón BHI) suplementado con NAD, obteniendo un desarrollo bacteriano puro. Las colonias de *H. paragallinarum* son mucho más grandes y visibles cuando se utiliza agar con sangre chocolatada o hemolisada (Sandoval y Terzolo, 1996). El uso de medios de cultivo selectivos con antibióticos e incubados a 37° C durante 48 horas en una atmósfera microaerofílica, es un procedimiento que permite diferenciar y aislar a las bacterias puras, aún cuando la flora bacteriana sea compleja (Terzolo y col. 1993).

La atmósfera microaerofílica puede obtenerse mediante el clásico método de la vela, que consiste en incubar las placas en un recipiente herméticamente cerrado con una vela que se mantiene encendida hasta que se apaga al consumirse parte del oxígeno contenido en el recipiente o bien usando las distintas opciones disponibles para la obtención de atmósferas para el aislamiento de bacterias del género *Campylobacter*. La identificación de *H. paragallinarum* debe ser efectuada mediante pruebas bioquímicas diferenciales (Blackall, 1989, Blackall, 1999, Blackall y Terzolo 1995).

Las especies de *Haemophilus* fermentan la glucosa con formación de gas y son catalasa negativo (Blackall, 1999, Vandamme y col. 1994). La diferenciación fenotípica entre las especies debe ser realizada mediante la acidificación de algunos hidratos de carbono (Blackall, 1989, Blackall, 1999, Blackall y Terzolo, 1995). No fermenta ni a la galactosa ni a la trehalosa. *H. paragallinarum* NAD independientes son negativos a la prueba de la  $\beta$  - galactosidasa y no fermentan a la maltosa mientras que los NAD dependientes son siempre positivos a ambas pruebas (Blackall y col. 1997).

En 1990, en Sudáfrica fue aislada una nueva bacteria de pollos para asar, en 1994 esta bacteria se clasificó como *Ornithobacterium rhinotracheale*. Este microorganismo causa signos muy parecidos a los producidos por *H. paragallinarum*, la diferenciación entre estos dos microorganismos no es difícil, ya que *H. paragallinarum* muestra dependencia de NAD, mientras que *O. rhinotracheale* es independiente de NAD (Blackall, 1999) Tabla 1.

Pruebas	<i>H. paragallinarum</i>
Catalasa	-
Pigmento	-
Microaerofilia	+
β-galactosidasa	+ <sup>b</sup>
Arabinosa	-
Galactosa	-
Maltosa	+ <sup>b</sup>
Manitol	+
Sorbitol	V
Sacarosa	V
Trehalosa	-

Tabla1. Pruebas bioquímicas para caracterizar *H. paragallinarum*.(+<sup>b</sup>: *H. paragallinarum* NAD independientes son negativos a la prueba de β-galactosidasa y fermentación de la maltosa).

### 2.7.1. INFECCIÓN EXPERIMENTAL Y ENSAYOS DE PROTECCIÓN CRUZADA

El método de infección más adecuado es la inoculación en el seno infraorbitario con cultivos de *H. paragallinarum*. Por la vía intranasal también es posible reproducir la enfermedad pero en este caso los resultados suelen ser variables (Sandoval y Terzolo, 1997).

Los pollos son resistentes a la infección por vía respiratoria, por ello se deben emplear pollitos de más de 7 días de edad cuando se utiliza esa vía. Los pollos de 4-8 semanas se infectan en un 90% mientras que pollos de 13 semanas de edad o mayores son 100% susceptibles. En general, el período de incubación se acorta y el curso de la enfermedad tiende a alargarse en aves de mayor edad (Blackall y col. 1997).

Es necesario tener modelos de reproducción de la enfermedad para la correcta selección de cepas de campo a emplear en las vacunas. Estos

modelos pueden utilizarse para conocer la difusión horizontal, patogenicidad y capacidad septicémica de las cepas en estudio (Sandoval y Terzolo, 1996).

Para conocer la patogenicidad de las cepas, la misma dosis de inóculo se aplica a todos las aves del grupo y éstas se sacrifican entre el 5-6 días, realizándose entonces cultivos bacteriológicos de ambos senos infraorbitarios y globos oculares (Sandoval y Terzolo, 1996). Este último modelo se utiliza también para evaluar vacunas en pruebas de protección cruzada. En estos ensayos el porcentaje de protección se define como el porcentaje de aves vacunadas que no presentan signos clínicos, que no tienen mucus en los senos infraorbitarios y en los cuales no es posible aislar la cepa inoculada. (Terzolo y col. 1997).

## **2.8. TRATAMIENTO**

Varios antibióticos en diferentes combinaciones han sido utilizados para tratar la coriza infecciosa en los animales afectados. La oxitetraciclina, eritromicina, quinolonas y estreptomina solas o en combinación con sulfonamidas y trimetoprima son algunos de los agentes terapéuticos mas utilizados. Sin embargo, ninguno de estos agentes es bactericida y rápidamente se seleccionan cepas de *H. paragallinarum* resistentes a los antibióticos y quimioterápicos empleados (Blackall y Terzolo, 1995).

En las granjas afectadas por la enfermedad luego del tratamiento se mantienen aves portadoras y muchas veces son comunes las recaídas cuando el tratamiento con las drogas impide la inmunización de todas las aves. Por ello, en esta enfermedad es muy importante la prevención, ya que los tratamientos una vez instaurados no sólo no logran impedir la merma en la producción sino que muchas veces es el mismo tratamiento el que agrava la caída de la postura. (Blackall y col. 1997).

## **2.9. PROFILAXIS**

La transmisión de la enfermedad se da principalmente por vía aérea y por agua; el reservorio principal son las aves enfermas o aves portadoras

crónicas, aunque también se ha encontrado que faisanes y las gallinas de Guinea pueden transmitirla.

Las aves enfermas contaminan los bebederos estáticos, contagiando a otras aves, por lo tanto, el peligro de contagio es menor cuando los bebederos son de corriente continua (Blackall y col. 1997, Zinsser 1983).

La coriza infecciosa puede aparecer por la introducción de aves infectadas, por lo que la procedencia de nuevas aves debe ser de una fuente confiable (Blackall y col. 1997).

## **2.10. VACUNAS**

Se han obtenido vacunas a partir de diferentes formas de preparación de antígenos: la propagación vía saco vitelino de embriones de pollo fue un método utilizado a principios de 1960, las vacunas elaboradas en caldos, principalmente en infusión de corazón de pollo y caldo Casman, estos caldos dan mejor protección que los productos propagados en huevo (Blackall. 1995).

Se recomienda vacunar con un nivel mínimo de antígeno de cien millones de bacterias por dosis ( $1 \times 10^8$ ), inoculadas por vía subcutánea detrás del cuello o intramuscular en la pechuga (Blackall,1995, Blackall y Terzolo 1995). Para pollas en recría es conveniente vacunar antes de las 20 semanas de vida, administrando dos dosis separadas por un intervalo de 3 a 4 semanas (Blackall y col. 1997). Si es necesario se pueden vacunar los pollos parrilleros expuestos a brotes de coriza infecciosa con una sola dosis administrada a los 15 o 20 días de vida, lográndose protección adecuada hasta la faena (Terzolo y col. 1997). Vale la pena comentar que rutinariamente se emplean estas vacunas solamente en las gallinas ponedoras o reproductoras, siendo todavía poco frecuente el uso de las mismas en pollos parrilleros.

Para que esta vacuna se utilice en este tipo de aves debe ser económicamente accesible y por ello se debería investigar la protección en pollos parrilleros jóvenes por dosis más bajas que las normalmente se aplican en aves de mayor edad.

## **2.11. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS**

Las proteasas son enzimas degradativas que catalizan la hidrólisis parcial o total de las proteínas. Estas enzimas rompen enlaces peptídicos y degradan las proteínas a péptidos. Algunos microorganismos secretan proteasas con una amplia especificidad de sustrato, lo que les sirve para obtener nutrientes de diversas fuentes (Luna y col. 2001).

Algunas proteasas son consideradas como factores de virulencia, las cuales tienen múltiples funciones, tales como: destrucción de tejidos, causando lesiones necróticas o hemorrágicas; inducción de lesiones edematosas, a través de la generación de mediadores inflamatorios; evasión de la respuesta inmune, a través de la degradación de inmunoglobulinas o de componentes del complemento; y activación de diferentes mecanismos, tales como la cascada de coagulación y la generación de bradiquinina; obtención de nutrientes y elementos esenciales para el desarrollo de las bacterias, como el hierro; además de producir un incremento de la permeabilidad vascular y facilitar la invasión celular (Luna y col. 2001, Negrete y col. 1994).

### **2.11.1. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEASAS**

Según la nomenclatura del Comité Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las proteasas se clasifican en 4 subgrupos de 3 grupos (hidrolasas). Sin embargo, las proteasas no cumplen fácilmente con el sistema general de nomenclatura de las enzimas, debido a su inmensa diversidad de acción y estructura. Actualmente, las proteasas son clasificadas con base a tres criterios mayores, (1) tipo de reacción que catalizan, (2) la naturaleza química del sitio catalizador, y (3) relación evolutiva con la referencia para estructurar (Rao y col.1998).

Las proteasas se subdividen en dos grupos principales: endopeptidasas y exopeptidasas, dependiendo de su sitio de acción. Las exopeptidasas rompen el enlace peptídico proximal al extremo amino o carboxilo terminal del sustrato, mientras que las endopeptidasas rompen enlaces peptídicos internos de la molécula. Conforme al grupo funcional presente en su sitio activo, las proteasas se clasifican en cuatro grupos principales, serin, aspártico, cistein y metaloproteasas (Rao y col. 1998).



## **2.11.2. MECANISMOS CATALITICO**

### **2.11.2.1. SERIN PROTEASAS**

Las serin proteasas se caracterizan por la presencia de un grupo serina en el sitio activo. Son numerosas y muy extensas en los virus, bacterias y eucariontes, sugiriendo que son vitales para el organismo (Rao y col. 1998).

Esta clase de proteasas comprende dos familias distintas. La familia de la quimotripsina, que incluye las enzimas de mamíferos como quimotripsina, tripsina o elastasa y la familia de la subtilisina que incluye las enzimas bacterianas como la subtilisina de *Bacillus subtilis*. Las serin proteasas muestran diferente especificidad de sustrato. Estas proteasas llevan a cabo la hidrólisis de un sustrato a través de una reacción de dos pasos en la que se forma un intermediario peptídico que se une a la enzima con la pérdida del aminoácido o fragmento del péptido. Este paso de acilación es seguido por un proceso de desacilación que ocurre por un ataque nucleofílico sobre el intermediario, este ataque se lleva a cabo por una molécula de agua, y da como resultado la hidrólisis del péptido (Luna y col. 2001).

### **2.11.2.2. CISTEIN PROTEASAS**

Las cistein proteasas ocurren en procariontes y en eucariontes. Esta familia incluye proteasas de plantas como papaína, actinidina, bromelina, varias catepsinas lisosomales de mamíferos y diversas proteasas de parásitos como *Trypanosoma*, *Schistosoma* y *Amoebas* (Rao y col. 1998).

Como las serin proteasas, la catálisis se realiza a través de la formación de un intermediario covalente e involucra un residuo de cisteína y uno de histidina. El nucleófilo es un ión tiolato en lugar de un grupo hidroxilo. El ión tiolato se estabiliza a través de la formación de un ión apareado con un grupo imidazol de la histidina. El nucleófilo que ataca es el ión apareado tiolato-imidazol en ambos pasos (Luna y col. 2001).

### **2.11.2.3. ASPÁRTICO PROTEASAS**

Las aspártico proteasas, normalmente conocidas como proteasas acidificantes, son las endopeptidasas que dependen de residuos de ácido aspártico para su actividad catalítica (Rao y col. 1998).

La mayoría de las aspártico proteasas pertenecen a la familia de la pepsina, que incluye enzimas digestivas como la quimosina, catepsinas lisosomales, enzimas como la renina y ciertas proteasas micóticas como la penicilopepsina, la rhizopuspepsina y la endotiapepsina. Una segunda familia comprende proteasas virales como la del HIV o retropepsina. Este tipo de proteasas no ha sido descrito en bacterias (Rao y col. 1998).

En contraste con las serín y cisteín proteasas, la catálisis por las aspártico proteasas no involucra un intermediario covalente. El ataque nucleofílico se realiza por dos transferencias simultáneas de protones: la primera a partir de una molécula de agua en los dos grupos carboxilo y la segunda en el oxígeno del grupo carbonilo con la ruptura del enlace CO-NH. Esta catálisis ácido-base recibe el nombre de mecanismo “oprima-jale” y conduce a la formación de un intermediario tetrahédrico no covalente neutro (Rao y col. 1998).

### **2.11.2.4. METALOPROTEASAS**

Las metaloproteasas son las más diversas de todos los tipos de proteasas, se caracterizan por el requerimiento de un ión metal divalente para su actividad. Ellas incluyen enzimas de una gran variedad de orígenes como: toxinas hemorrágicas de veneno de las serpientes, termolisina de las bacterias y colagenasas de organismos grandes (Rao y col. 1998).

Se han reconocido aproximadamente 30 familias de metaloproteasas, de las cuales 17 solo contienen endopeptidasas, 12 solo contienen exopeptidasas y 1 contiene endopeptidasas y exopeptidasas (Rao y col. 1998).

Las metaloproteasas son una de las clases de proteínas más viejas y pueden estar presentes en bacterias, hongos y otros organismos. Estas proteasas difieren ampliamente en sus secuencias y su estructura pero la gran mayoría contiene un átomo de zinc que es catalíticamente activo. En algunos casos el zinc puede ser reemplazado por otro metal, como el cobalto o el níquel sin pérdida de su actividad (Luna y col. 2001).

El mecanismo catalítico conduce a la formación de un intermediario tetrahédrico no covalente después del ataque que es llevado a cabo por una molécula de agua que se une al zinc sobre el grupo carbonilo del enlace móvil. Posteriormente, este intermediario tetrahédrico es descompuesto por transferencia de un protón del ácido glutámico al grupo saliente (Luna y col. 2001).

Las proteasas se han clasificado en tres grupos diferentes en base al pH en el que realizan su acción.

**Proteasas ácidas:** son activas en un pH que va de 2 a 6. Incluyen principalmente aspártico proteasas, alguna cisteín proteasas y metaloproteasas, poseen diferentes residuos de aminoácidos constituyendo su sitio activo (Luna y col. 2001).

**Proteasas neutras:** Estas proteasas son activas a pH neutro, débilmente alcalino o débilmente ácido, en las proteasas neutras se incluyen las cisteín proteasas, las metaloproteasas y algunas serín proteasas. Estas proteínas tienen residuos altamente conservados en su extremo amino terminal. Su similitud disminuye hacia el extremo carboxilo (Luna y col. 2001).

**Proteasas alcalinas:** Son activas en un rango de pH que va de 8 a 13. Muestran una homología muy baja entre ellas mismas. Los residuos presentes en sus sitios catalíticos y los residuos que rodean esos sitios son altamente conservados, lo que sugiere que pudieron haber evolucionado a partir de un ancestro común por evolución divergente (Luna y col. 2001)

## **2.12. FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LAS PROTEASAS**

Las proteasas ejecutan una gran variedad de funciones fisiológicas complejas. Su importancia en conducir el metabolismo esencial y las funciones regulatorias es evidente por la ocurrencia en todas las formas de organismos vivientes (Rao y col. 1998).

Las proteasas juegan un papel crítico en la fisiología y en los procesos patológicos como el catabolismo de las proteínas, la coagulación de la sangre, crecimiento celular y migración, arreglo de los tejidos, en el desarrollo de la morfología, inflamación, crecimiento en los tumores y en metástasis, transporte de proteínas secretorias por las membranas, etc. En general las proteasas extracelulares catalizan la hidrólisis de las proteínas grandes a moléculas más pequeñas para su absorción subsecuente por la célula, considerando que las proteasas intracelulares juegan un papel en la regulación del metabolismo (Rao y col. 1998).

### 3. ANTECEDENTES

Sawata y col. en 1991 propusieron la presencia de toxinas secretadas por *H. paragallinarum* y sugirieron realizar estudios para detectar y caracterizar sus factores de patogenicidad. Aunque *H. paragallinarum* cuenta con diferentes factores de virulencia entre los se que cuentan a la hemaglutinina y la cápsula, como los más estudiados.

En el 2004 Mena y col. caracterizaron proteínas de 120 Kda secretadas por *H. paragallinarum* utilizando medios de cultivos sin suero (BHI, TSB, LB, LBG, LBP, LBGP) con la finalidad de ver cual de estos medios era el más eficaz, obteniendo como resultado que los medios de cultivo TSB y BHI fueron los que permitieron el mejor crecimiento bacteriano, por lo que fueron elegidos como los medios más adecuados para la obtención de proteínas secretadas. *H. paragallinarum* secreta proteínas que pueden ser importantes inmunógenos en el control de la coriza infecciosa.

Iritani y col. Describieron entre los años 1978 y 1980 la presencia de dos antígenos en *H. paragallinarum* que eran secretados, uno de los cuales era termoestable y el otro termolábil; este último demostró tener efecto protector al inocularse en aves susceptibles que posteriormente fueron desafiadas con bacterias virulentas. Sin embargo, la identidad de estos antígenos termolábiles no fue caracterizada.

Diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae* son capaces de colonizar mucosas respiratorias. Esta colonización puede verse favorecida por la producción de proteasas que degradan diferentes sustratos, entre ellos inmunoglobulinas, y son capaces de actuar en diferentes condiciones fisicoquímicas, tales como amplios rangos de pH y temperatura.

*Pasteurella trehalosi* aislada de una oveja que había sucumbido de pasteurellosis neumónica reveló alta actividad proteolítica en el sobrenadante de su cultivo. Estas proteasas no son específicas, ya que degradan diferentes sustratos, y pueden ser un antígeno protector importante en las vacunas diseñadas para prevenir la pasteurellosis neumónica (McNeil 2003).

Se ha reportado que *P. multocida* aisladas de diferentes animales secretan proteasas al medio de cultivo. Todos los aislados produjeron proteasas en una amplia gama de peso molecular. Se sugiere que son metaloproteasas neutras, puesto que fueron activas entre pH 6 y 7, inhibidas por agentes quelantes pero no por otros inhibidores de proteasas, y reactivadas por calcio. Las proteasas podían degradar IgG y fueron reconocidas por un antisuero policlonal contra una proteasa purificada de *A. pleuropneumoniae*. Se ha sugerido que la producción de proteasas puede desempeñar un papel importante durante la colonización de tejidos en enfermedades causadas por *P. multocida* (Negrete Abascal y col, 1999).

Negrete Abascal y col., en 1998 purificaron y caracterizaron una enzima proteolítica de alto peso molecular secretada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, un miembro de la familia *Pasteurellaceae* y también un patógeno de mucosas de vías respiratorias de cerdos. Los resultados que obtuvieron mostraron que las proteasas podrían participar en el proceso infeccioso durante el desarrollo de la enfermedad y en la inmunorespuesta de los cerdos infectados con *A. pleuropneumoniae*.

#### **4. JUSTIFICACIÓN:**

*Haemophilus paragallinarum* también es un patógeno de mucosas que se enfrenta a mecanismos de limpieza en su hospedero similares a los que enfrentan *P. multocida* y *A. pleuropneumoniae*, debido a esto, es muy probable que *H. paragallinarum* también secreta proteasas que le ayuden en la colonización y daño tisular en su hospedero. Así que el presente trabajo surgió de la necesidad de conocer si esta bacteria produce proteasas, y si las produce cuales son sus características bioquímicas.

#### **5. OBJETIVOS:**

##### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

- Identificar y caracterizar proteasas secretadas por *H. paragallinarum*.

##### **5.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Obtener condiciones de expresión de las proteasas secretadas por *H. paragallinarum*.
- Caracterizar las proteasas secretadas por *H. paragallinarum*.

## **6. METODOLOGIA:**

### **6.1. CEPAS BACTERIANAS**

Se utilizó una cepa de *H. paragallinarum* aislada de aves con signos de coriza infecciosa (Hpa6), así como la cepa de referencia serogrupo A (0083), las cuales fueron cultivadas en medio BHI (infusión cerebro-corazón), Caldo Soya Tripticaseína (TSB) y Casman; suplementados con 0.01% de NAD.

Para determinar la pureza de los cultivos, se inocularon placas de medio BHI sin NAD, al cual se le inoculó una cepa nodriza (*Staphylococcus aureus*) que le proporcionaría el NAD requerido y se incubaron a 37°C durante 24h.

### **6.2. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DEL SOBRENADANTE**

Para obtener y concentrar las proteínas secretadas, los cultivos se centrifugaron a 8000 r.p.m. durante 20 min. a 4°C. El sobrenadante libre de células se precipitó en frío con 1-2 volúmenes de metanol o con sulfato de amonio al 70% durante 24h. Posteriormente las proteínas precipitadas se concentraron por centrifugación a las mismas condiciones. Las proteínas concentradas se resuspendieron en aprox. 250 µl de buffer TRIS 20 mM, pH 7.5.

### **6.3. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA**

Para evaluar la presencia de actividades proteolíticas en las proteínas obtenidas, se realizaron corrimientos electroforéticos en geles de poliacrilamida al 10% copolimerizados con caseína 1% o gelatina 0.1%. De 10-15 µg de muestra fueron cargados por pozo. Posteriormente el gel se dejó en tritón durante 60 min. Después se dejó toda la noche activándose con CaCl<sub>2</sub> 10mM. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie (Negrete-Abascal et al. 1999).



#### **6.4. pH óptimo**

Para determinar el intervalo de pH y el pH óptimo en el cual se presenta la actividad proteolítica, se llevaron a cabo electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% copolimerizados con gelatina porcina al 0.1%. Después de la separación de las proteínas, los geles se incubaron con diferentes amortiguadores a distinto pH: buffer de boratos 50 mM (pH 3, 4 y 5), buffer TRIS 50 mM (pH 7 y 8) ó buffer glicina-NaOH 50 mM (pH 9 y 10) adicionándoles  $\text{CaCl}_2$  10 mM, durante 24 h a 37°C y para finalmente teñir con azul de Coomassie (Negrete-Abascal et al., 1999).

#### **6.5. Estabilidad al calor**

Para determinar la estabilidad al calor de las proteasas, previo a la electroforesis las muestras se mantuvieron a diferentes temperaturas durante 10 minutos (37, 40, 50, 60, 70, 80°C y temperatura ambiente, incluyendo un control que se mantuvo en refrigeración). Finalmente los geles se incubaron en el buffer con el pH óptimo de actividad de la enzima (Negrete-Abascal et al., 1998).

#### **6.6. EFECTO DE INHIBIDORES**

Para poder determinar el tipo de proteasa de que se trataba, muestras conteniendo actividad proteolítica se incubaron a temperatura ambiente durante media hora con diferentes inhibidores: ácido etilendiamino- tetraacético (EDTA) 10 y 20 mM, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 5mM ó p-hidroximercuribenzoato (pHMB) 10 mM. Después las muestras se separaron por electroforesis para posteriormente agregar a los geles el buffer con el pH óptimo de actividad, más cada uno de los agentes inhibidores a la misma concentración. Para comprobar el efecto de los agentes quelantes se agregaron iones para reactivar la proteasa (Negrete-Abascal et al., 1999).

## 6.7. DEGRADACIÓN DE SUSTRATOS

Se mezclaron 10 µg de IgG de pollo con 20 µg de la mezcla de proteínas y se incubó durante 24, 48 y 72 h a 37°C. Después de cada tiempo se diluyeron las muestras con buffer de muestra en ausencia de β ME y se hirvieron durante 10 min. La posible degradación de la IgG fue puesta de manifiesto por medio de electroforesis SDS-PAGE (Negrete-Abascal et al., 1998).

## 6.8. INMUNORECONOCIMIENTO

La muestra que contenía la actividad proteolítica fue hervida en presencia de β-mercapto-etanol durante 5min, se separó por electroforesis en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), y se transfirió electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa. Al término de la transferencia la membrana se colocó en agitación en un recipiente con PBS Tween-20 y leche al 5%, enseguida, la membrana se enjuagó 3 veces durante 10 min. con PBS-Tween y se le agregó el anticuerpo primario (suero contra la proteasa purificada de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 diluido 1:500). En seguida la membrana se enjuagó 3 veces con PBS Tween y se incubó con el anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-conejo marcado con peroxidasa, diluido 1:1000). Finalmente se realizaron 3 lavados con PBS Tween y un lavado con PBS.

Para poner en evidencia la reacción antígeno-anticuerpo, se usó una solución de Diaminobencidina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción se detuvo colocando la membrana en agua destilada.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Se observó la actividad proteolítica secretada por *H. paragallinarum* en los medios de cultivo BHI, TSB y Casman (fig. 4) , el medio más adecuado para la obtención de proteasas secretadas fue BHI ya que las proteínas precipitadas de este medio, degradaron de manera más intensa los sustratos copolimerizados en los geles de acrílamida (caseína y gelatina). Ambos sustratos fueron degradados, pero la degradación de la gelatina fue visualizada más fácilmente.

### 7.2. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DEL SOBRENADANTE

La actividad proteolítica pudo observarse precipitando las proteínas secretadas en frío, con sulfato de amonio al 70% o con metanol. La actividad proteolítica se pudo observar mejor con sulfato de amonio.

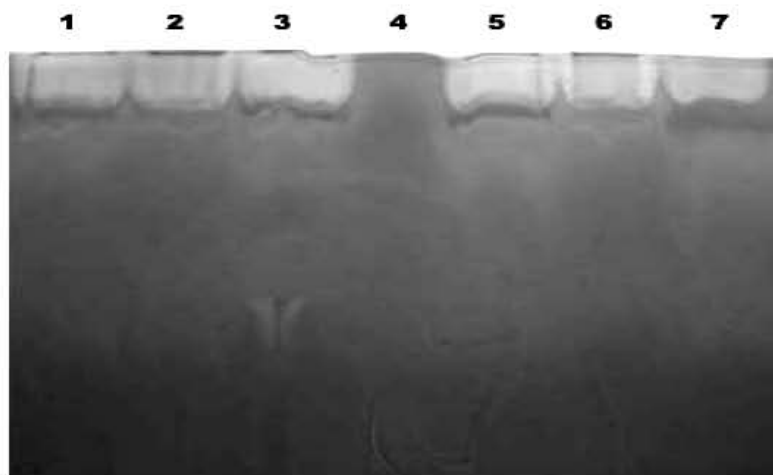


FIG. 4. Actividad proteolítica secretada en diferentes medios. Gel de poliacrilamida al 10% copolimerizado con 0.1% de gelatina. Carriles 1 a 3 cepa 0083, Carriles 5 a 7 cepa Hpa6. Carriles 1 y 5 BHI; 2 y 6 TSB; 3 y 7 Casman; 4 sin muestra

### 7.3. pH ÓPTIMO

La actividad proteolítica fue activa de manera tenue en un amplio rango de pH (3-10), observándose la actividad óptima a un pH de 7.5. (fig. 5. Carril 6.)

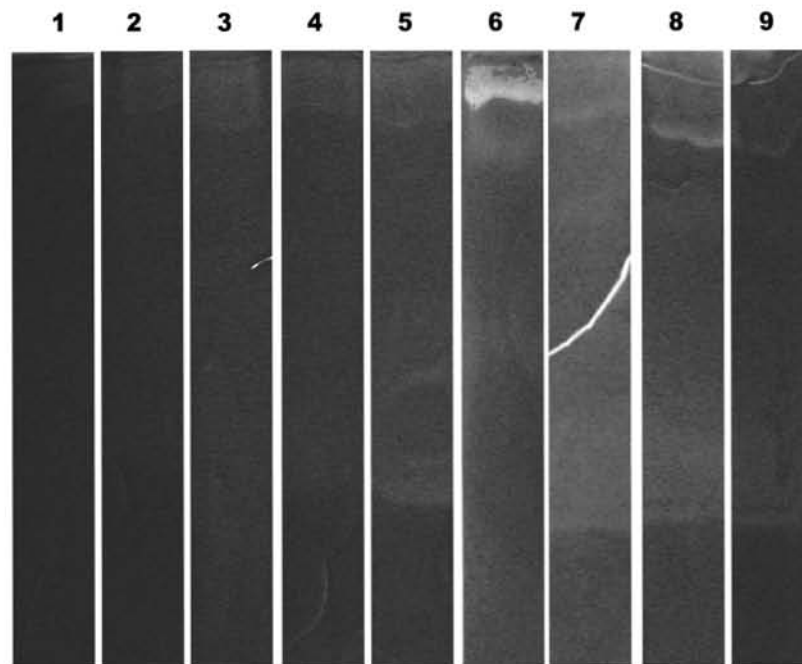


FIG. 5 Efecto del pH sobre la actividad proteolítica. Gel de poliacrilamida al 10% copolimerizado con gelatina al 0.1%. Carril 1, pH 3; 2, pH 4; 3, pH 5; 4, pH 6; 5, pH 7; 6, pH 7.5; 7, pH 8 y 9, pH 10.

#### 7.4. ESTABILIDAD AL CALOR

Después de incubar las muestras a diferentes temperaturas, la degradación del sustrato pudo observarse con muestras mantenidas en refrigeración, a temperatura ambiente, 37, 40, 50 o 60 °C, pero esta actividad disminuyó a los 70 °C y fue inhibida completamente a temperaturas mayores. (fig. 6).

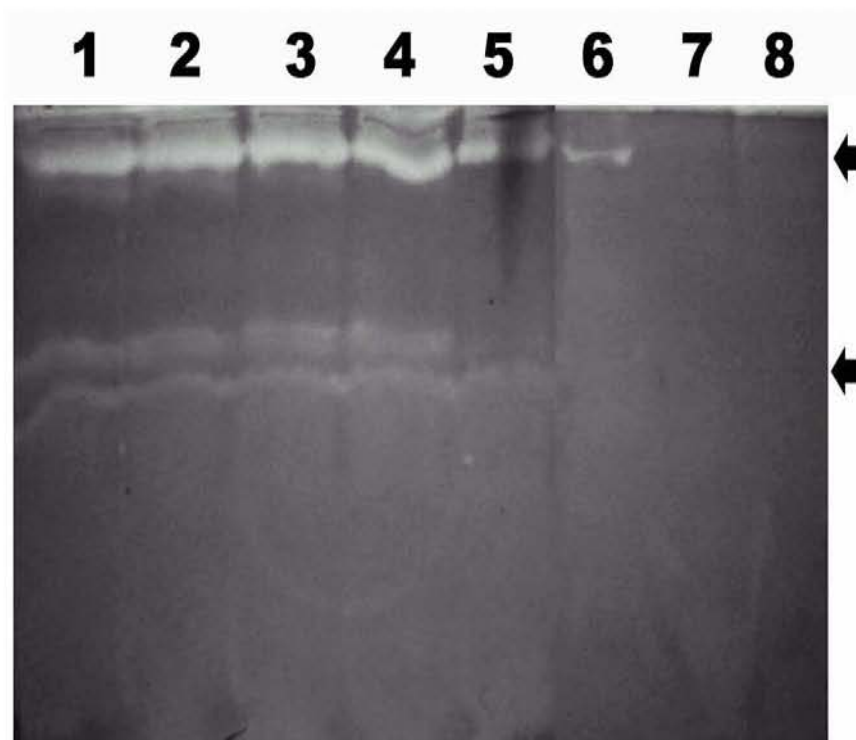


FIG. 6: Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica. Gel de poliacrilamida al 10% copolimerizado con gelatina al 0.1% carril 1, Control; 2, Temperatura ambiente; 3, 37;4, 40; 5, 50; 6, 60; 7, 70; y 8, 80 °C. Las flechas indican donde se presenta la actividad proteolítica

## 7.5. EFECTO DE INHIBIDORES

La actividad proteolítica fue inhibida parcialmente con EDTA 10 mM (Fig. 7, carril 3), y totalmente a una concentración de 20 mM (carril 4). Sin embargo, esta actividad no fue afectada por la presencia de pHMB o PMSF (carriles 1 y 2, respectivamente), por lo cual se concluyó que se trataba de metaloproteasas.

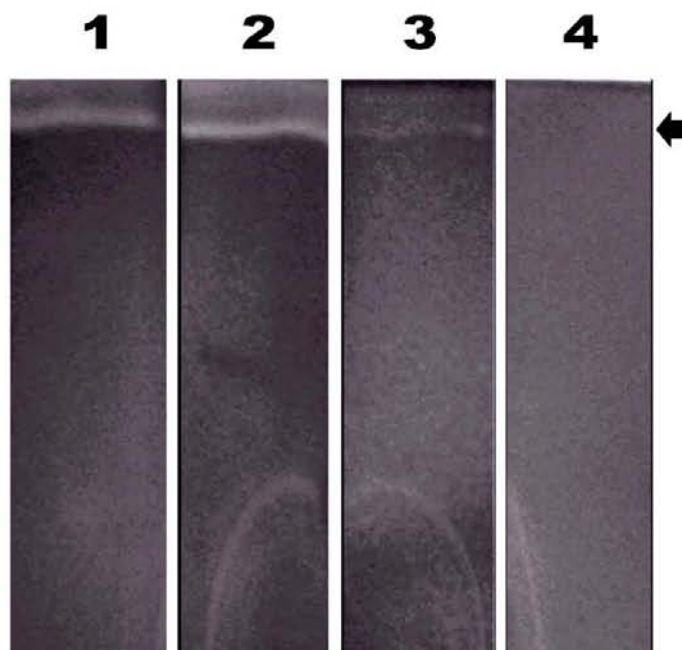


FIG. 7: Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica. Gel de poliacrilamida al 10% copolimerizado con 0.1% de gelatina, Carril 1 PHMB, 2 PMSF, 3 EDTA 10 mM, 4, EDTA 20 mM. La flecha indica donde se presenta la actividad proteolítica

## 7.6. DEGRADACIÓN DE SUSTRATOS

Las proteínas secretadas por *H. paragallinarum* degradaron parcialmente IgG de pollo después de incubarlas durante 24 o 48 h, pero una degradación total no pudo observarse a las 72 h de incubación. (Fig. 8).

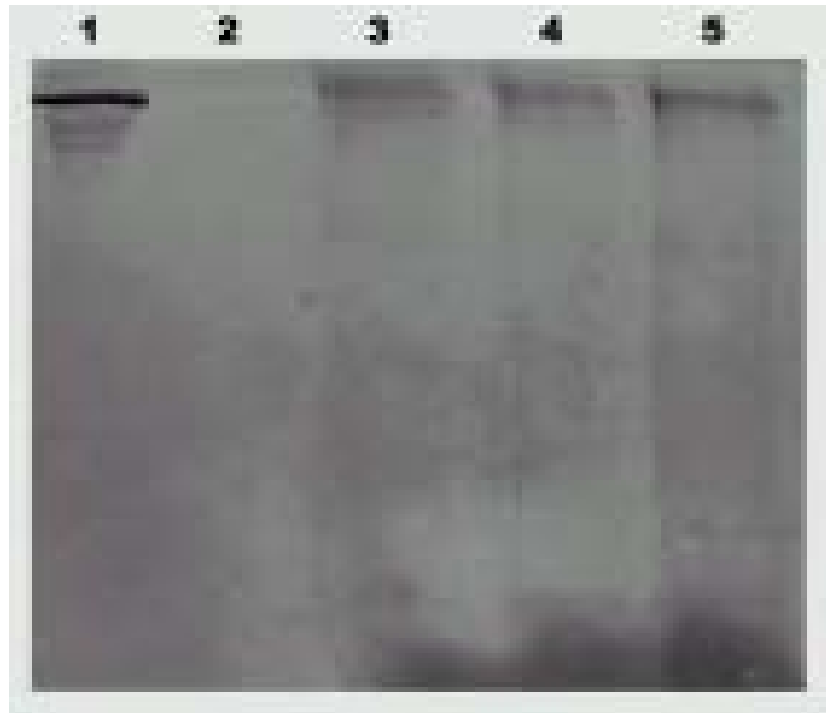


FIG. 8: Degradación de IgG de pollo por las proteasas secretadas de *H. paragallinarum* (0083). Gel SDS-PAGE, carril 1, IgG de pollo control incubada sin proteasas durante 72 h; 2, sin muestra; 3, 24h; 4, 48h; 5, 72h. Incubadas a 37°C

## 7.7. INMUNORECONOCIMIENTO

Por inmunoblot, las proteínas secretadas por *H. paragallinarum* presentaron reactividad cruzada con el suero policlonal dirigido contra la proteasa purificada de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1. Este

inmunoreconocimiento se observó a un peso molecular muy similar al presentado por las proteínas secretadas por *A. pleuropneumoniae* usadas como control positivo.

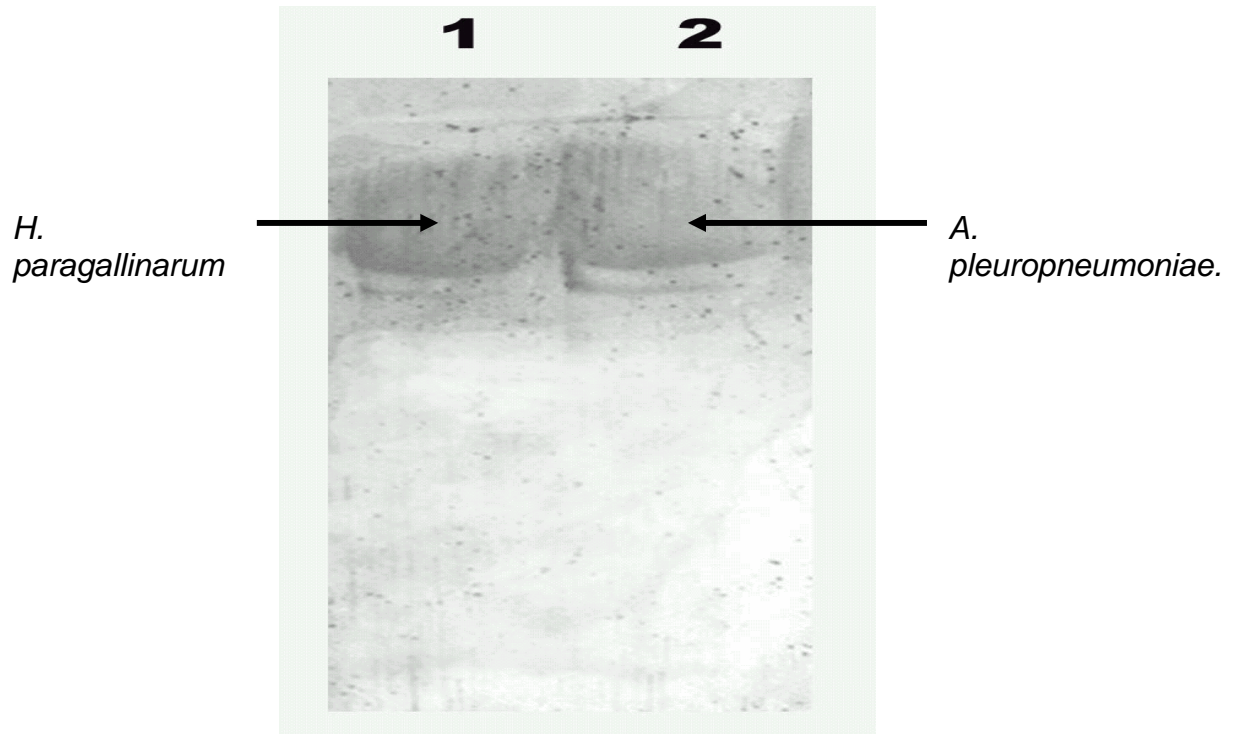


FIG. 9: Inmunoreconocimiento de proteínas secretadas por *H. paragallinarum* usando un anticuerpo contra una proteasa secretada por *A. pleuropneumoniae*. Carril 1, Proteínas secretadas de Hp; Carril 2, Proteínas secretadas de Ap.

## 8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se utilizaron diferentes medios de cultivo (TSB, BHI, y Casman), con la finalidad de obtener condiciones que favorecieran la expresión de las proteasas secretadas por *H. paragallinarum*; de esta forma se identificaron y caracterizaron proteasas secretadas al medio extracelular por esta bacteria.



*H. paragallinarum* fue capaz de crecer en los medios de cultivo empleados; sin embargo, BHI fue el medio de elección para la obtención de la actividad proteolítica. (Fig. 7). En el 2004 Mena y col. utilizaron medios de cultivos sin suero (BHI, TSB, LB, LBG, LBP, LBGP) para la caracterización de proteínas secretadas por *H. paragallinarum* con la finalidad de ver cual de estos medios era el más eficaz, obteniendo como resultado que los medios de cultivo TSB y BHI fueron los que permitieron el mejor crecimiento bacteriano, por lo que fueron elegidos como los medios más adecuados para la obtención de proteínas secretadas.

Se ha reportado que diferentes microorganismos patógenos secretan proteasas; por ejemplo, en 1998 Rao y col. reportaron que *Aeromonas sep.* puede secretar varias enzimas extracelulares y se ha sugerido que estas juegan un importante papel en la invasión y establecimiento de la infección.

En *H. influenzae* (Zinsser,1983.) se han descrito proteasas que degradan IgA1, pertenecientes a la familia de las serin proteasas con un peso molecular de 169 Kda, las cuales pueden ser elaboradas por la bacteria in vitro. Al degradar IgA, facilitan la colonización de mucosas por este microorganismo.

Negrete Abascal y col., en 1998 purificaron y caracterizaron una enzima proteolítica de alta masa molecular secretada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, un miembro de la familia *Pasteurellaceae* y también un patógeno de mucosas de vías respiratorias. Los resultados que obtuvieron mostraron que las proteasas podrían participar en el proceso infeccioso durante el desarrollo de la enfermedad y en la inmunorespuesta de los cerdos infectados con *A. pleuropneumoniae*.

Los sobrenadantes de los medios en los que se inoculó *H. paragallinarum* para detectar la presencia de proteasas secretadas se precipitaron con sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 70% y con metanol (MeOH) en frío. Las proteasas secretadas mostraron mejor degradación del sustrato cuando las proteínas se precipitaron con sulfato de amonio. Este resultado

puede deberse a que este agente precipitante no libera gran cantidad de calor, por lo que las proteínas no están expuestas a una posible desnaturalización, aunque una de las desventajas de la precipitación con sulfato de amonio es que la alta concentración de sales interfiere con el corrimiento electroforético (Deutscher,1990). Una de las desventajas del empleo de metanol para precipitar proteínas es que provoca una reacción exotérmica que podría desnaturalizar a las proteínas, razón por la que la precipitación debe realizarse en frío.

Los corrimientos electroforéticos de las proteasas secretadas por las cepas 0083 y Hpa6 de *H. paragallinarum* fueron realizados utilizando geles de poliacrilamida al 10% copolimerizados con 0.1% de gelatina o con caseína al 1%, mostrando mejor degradación en el gel con gelatina, sustrato altamente sensible e inespecífico utilizado para detectar fácilmente muchas actividades proteolíticas (Luna y col.2001). Los geles de sustrato permiten calcular el peso molecular aparente de las proteínas que contengan actividad proteolítica. La desventaja de este tipo de geles, es que cuando se agrega el SDS pueden no renaturalizarse las proteasas, y esto podría impedir la detección de la actividad proteolítica (Luna y col. 2001).

Diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae* son capaces de colonizar mucosas respiratorias. Esta colonización puede verse favorecida por la producción de proteasas, capaces de actuar en intervalos amplios de pH y temperatura, que degradan diferentes sustratos, entre ellos inmunoglobulinas.

Las proteasas secretadas por *H. paragallinarum* se clasificaron dentro de las metaloproteasas neutras debido a que fueron inactivadas por EDTA y tuvieron un pH óptimo de actividad de 7.5, (fig. 8). El EDTA es un agente quelante que secuestra iones metálicos del sitio catalítico de las metaloproteasas, inactivándolas. La actividad proteolítica de *H. paragallinarum* fue totalmente inhibida con EDTA pero no fue afectada por los inhibidores de serin y cistein proteasas. Con base a esto se determinó que se trata de una metaloproteasa, (Fig. 10). La actividad proteolítica fue restaurada por la adición de calcio. Así, *H. paragallinarum* secreta metaloproteasas similares a

las expresadas por diferentes especies bacterianas patógenas (Miyoshi, S, 2000, Negrete y col. 2003).

Se ha reportado que cepas de *P. multocida* aisladas de diferentes animales secretan proteasas al medio de cultivo. Todos los aislados produjeron proteasas en una amplia gama de peso molecular. La producción de proteasas pudo desempeñar un papel importante durante la colonización de tejidos en infecciones causadas por *P. multocida* (Negrete Abascal y col, 1999). El que las proteasas secretadas por *H. paragallinarum* descritas en este trabajo sean activas en un amplio rango de pH puede facilitar la sobrevivencia de la bacteria en las primeras fases de un proceso patológico en tejidos epiteliales con diferentes pHs. Se ha sugerido que proteasas activas en un amplio rango de pH le confieren ventaja al microorganismo para sobrevivir en distintas condiciones ambientales, que además le permitirían evadir la respuesta inmune si éstas son capaces de degradar inmunoglobulinas, lo que permitiría la invasión de los tejidos del hospedero. Proteasas activas en un amplio rango de pH y capaces de degradar inmunoglobulinas se han reportado también en otras especies de la familia *Pasteurellaceae*. (Negrete-Abascal y col.,1994,1999 y 2004).

La actividad proteolítica secretada por *H. paragallinarum* fue estable después de ser incubada a una temperatura menor o igual a 70°C, pero disminuyó cuando se calentó a 80°C y se inhibió totalmente a temperaturas mayores (fig. 9). Negrete-Abascal y col. han reportado resultados de estabilidad térmica muy similares en las proteasas secretadas por *A. suis* (2004) y por *A. pleuropneumoniae* (1998). Se ha reportado que las proteasas secretadas por *A. pleuropneumoniae* son resistentes al calor debido a que podrían anclarse a la membrana bacteriana, lo que permitiría que se asociaran con el LPS, adquiriendo termoresistencia. La resistencia al calor de las proteasas secretadas por *H. paragallinarum* podría deberse también a una asociación con el LPS.

Las inmunoglobulinas tienen una importante función en la protección contra la invasión por microorganismos patógenos ya que pueden neutralizar toxinas, bloquear la invasión de los virus, y han sido consideradas como parte

de los mecanismos de limpieza que ayudan a remover los residuos de células propias dañadas o envejecidas. Las inmunoglobulinas también facilitan la fagocitosis de algunas moléculas o microorganismos a los cuales se han unido. Cuando las inmunoglobulinas son degradadas por las proteasas bacterianas, el microorganismo, además de evadir la respuesta inmune puede obtener nutrientes para su crecimiento. Diversos trabajos han demostrado que las proteasas secretadas por bacterias patógenas pueden degradar inmunoglobulinas, tal es el caso de trabajo reportado por Killian y col. donde proteasas secretadas por diferentes especies de *Haemophilus* degradaron IgA; las proteasas de *A. (Haemophilus) pleuropneumoniae* degradaron IgA porcina pero no IgA de humano (Killian y col. 1979). *H. paragallinarum* degradó parcialmente IgG de pollo pero una degradación total no pudo observarse, esto podría deberse a que probablemente la enzima estaba a baja concentración lo cual no permitió una degradación total de la inmunoglobulina (Fig. 11). La degradación de inmunoglobulinas por *H. paragallinarum* además de permitirle evadir la respuesta inmune y de evitar ser fagocitada, podría también servirle como una fuente de aminoácidos.

Por Western Blot se observó que proteínas de alto peso molecular secretadas por *H. paragallinarum* presentaron reactividad cruzada al emplear un anticuerpo contra la proteasa de alto peso molecular purificada del sobrenadante del cultivo de *A. pleuropneumoniae* (Fig. 12). Diferentes bacterias patógenas de vías respiratorias, miembros de la familia *Pasteurellaceae*, también han mostrado una reactividad cruzada al usar el mismo anticuerpo (Negrete Abascal en 2004), sugiriendo que dichas proteínas poseen epitopos comunes y que comparten un origen común.

Las proteasas secretadas por *H. paragallinum* podrían jugar un importante papel en la invasión y establecimiento de una infección, ya que les permitirían obtener nutrientes por la degradación de sustratos de diferentes fuentes, así como modificar o evadir los sistemas defensivos de su hospedero.

## 9. CONCLUSIONES:

- *H. paragallinarum* secreta proteasas en los medios BHI, TSB y Casman, las cuales se tratan de metaloproteasas neutras de alta masa molecular.
- Las proteasas secretadas por *H. paragallinarum* resisten altas temperaturas.
- Las proteasas de *H. paragallinarum* son capaces de degradar inmunoglobulinas
- Las proteasas secretadas por *H. paragallinarum* presentan reactividad cruzada con proteasas secretadas por otros microorganismos.

## 10. APENDICE I

### **Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI).**

Disolver en 1000 ml de agua destilada 37 g de medio infusión cerebro corazón, se esteriliza a 121°C a 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 15 min.

### **Caldo de Soya Trypticaseína (TSB).**

Disolver en 1000ml de agua destilada 30g de medio de caldo de soya tripticaseína, esterilizar a 121°C a 15 lb/pulg<sup>2</sup> durante 15 min.

### **Caldo Casman**

Formula aproximada en g/L.

Nicotinamida	0.05
Polipeptona	10.00
Peptona Biotriptosa	10.00
Extracto de carne	3.00
Ac. P-amino Benzoico	0.05
Dextrosa	0.5
Almidon de Maíz	1.0
Cloruro de sodio	5.0
pH final 7.3 +/- 0.2	

### **Gel separador 10% (10 ml)**

H <sub>2</sub> O	4 ml
Acrilamida	3.3 ml
TRIS pH 8.8	2.5 ml
SDS 10%	0.1 ml
NaCl 20%	0.2 ml
Persulfato de amonio (PSA) 10%	0.04 ml
TEMED	0.01 ml

**Gel concentrador (5ml)**

H <sub>2</sub> O	3.4 ml
Acrilamida	0.83 ml
TRIS pH 6.8	0.63 ml
SDS 10%	0.05 ml
PSA 10%	0.15 ml
TEMED	0.15 ml

**Solución desteñidora.**

Metanol	200ml
Ácido acético	35ml
Agua destilada	500ml

**Buffer de transferencia**

Tris 25mM	6.05g
Glicina 192mM	28.85g
Metanol	400ml
Agua	2000ml

**Buffer de muestra.**

Azul de Bromofenol	0.02g
Glicerol	0.2ml
Agua	c.b.p.

**Colorante Azul de Coomasie**

Metanol	40%
Ácido acético	10%
Colorante azul brillante	0.25%
Agua	50%

### **Buffer de acetatos**

*Soluciones stock:*

A: Ácido acético 0.2 M (11.55 ml en 1000 ml)

B: Acetato de sodio 0.2 M (16.4 g en 1000 ml)

x ml de A + y ml de B, diluidos en un total de 100 ml

x	y	pH
46.3	3.7	3
41.0	9.0	4
14.8	35.2	5
4.8	45.2	6

### **Buffer TRIS pH 7 y 8**

*Soluciones stock:*

A: TRIS 0.2 M (24.2 g en 1000 ml)

B: HCl 0.2 M (en 1000 ml)

50 ml de A + x ml de B, diluidos en un total de 200 ml

x	pH
44.2	7
26.8	8

### **Buffer glicina-NaOH**

*Soluciones stock:*

A: Glicina 0.2 M (15.01 g en 1000 ml)

B: NaOH 0.2 M (en 1000 ml)

50 ml de A + x ml de B, diluidos en un total de 200 ml

x	pH
8.8	9
32.0	10



## 11. BIBLIOGRAFIA:

- 📖 **Blackall, P. J.** Antimicrobial drug resistance and the occurrence of plasmids in *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis.* 32: 742-747. 1998
- 📖 **Blackall P. J.** Infectious Coryza: Overview of the disease and new diagnostic options. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 627-632, 1999.
- 📖 **Blackall, P. J.** The avian Haemophili. *Clin. Microbiol. Rev* 2: 270-277, 1989.
- 📖 **Blackall P. J.** Vaccines against infectious coryza. *World's Poultry Science J.* 51: 17-26. 1995
- 📖 **Blackall P. J., Eaves L.E. and Roggers D. G.** Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. *J. Clin. Microbiol.* 28 (6): 1185-1187. 1990.
- 📖 **Blackall P. J. Matsumoto and M. Yamamoto R.** Infectious coryza. En: *Diseases of Poultry.* Calnek, B. W., Barnes, H. J., Beard, C. W., Mc Dougald, L. R., Saif, Y. M. (eds.), 10<sup>th</sup> ed., Iowa State University Press, Ames, Iowa. P. 179-190, 1997.
- 📖 **Blackall, P. J, Silva, E.N., Yamaguchi, Y.; Iritani, Y.** Characterization of isolates of avian haemophili from Brazil. *Avian Dis.* 38: 269-274, 1994.
- 📖 **Blackall, P. J. Terzolo, H. R.** Coriza Infecciosa: Revisión de métodos de diagnóstico y vacunas. *Rev. Arg. Microbiol.* 27: 156-174, 1995.
- 📖 **Blackall, P. J.; Yamamoto, R.** Infectious coryza. En: *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens.* Swayne, D. E. (ed.). 4<sup>a</sup> ed., American Association of Avian Pathologists, Philadelphia. P. 29-34, 1998.
- 📖 **Bragg R. R., Coetzee L. and Verschoor J. A.** Effects of growth conditions and incubation times on the expression of antigens of *Haemophilus paragallinarum* which are detected by monoclonal antibodies. *J. Vet. Res.* 64: 57-63. 1997
- 📖 **Bragg R. R., Coetzee L. and Vershoor J. A.** Plasmid encoded NAD independence in some South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 60: 147-152, 1993.
- 📖 **Bragg R. R.** Virulence of South African of *Haemophilus paragallinarum*. Part 1 NAD-dependent field isolates. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 69: 163-169. 2002.
- 📖 **Bragg R. R.** Virulence of South African of *Haemophilus paragallinarum* Part 2: Naturally occurring NAD-independent field isolates. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 69: 171-175. 2002.

📖 **Bragg R. R., Coetzee L. and Vershoor J. A.** Isolation and identification of NAD-independent bacteria from chickens with symptoms of infectious coryza. *Avian Pathol.* 26: 595-606. 1997.

📖 **Deutscher, M. P. (bis).** Guide to protein purification. Academic Press, inc. United Kingdom. (182) p 68-83. 1990.

📖 **Eaves L. E., Rogers G. D. And Blackall P. J.** Comparison of hemagglutinating and agglutinin schemes for the serological classification of *Haemophilus paragallinarum* and proposal of a new hemagglutinating serovar. *J. Clin. Microbiol* 27: (7) 1510-1513. 1989.

📖 **Garcia A. F., Blackall P. J., Angulo E.** Presencia de *Haemophilus paragallinarum* NAD-independiente en México. Laboratorios Avilab., Depart of Primary Industries Queensland Australia., Clinico de Campo. Aneca 2003.

📖 **Glisson, J. R.** Bacterial respiratory diseases of poultry. *Poultry Sci.* 77: 1139-1142. 1998.

📖 **Hofstad M. S. (bis).** Coriza infecciosa y enfermedad respiratoria crónica. In: H. E. Biester y L. H. Schawarte. (Eds) Enfermedad de las aves. Hispano Americana 1ra ed. México. P 320-324. 1964.

📖 **Holt, J. G., Kreing, N. R., Sneat, P. H. and Wiliam, S. T. (bis)** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (Eds) Williams and Wilkins. 9<sup>a</sup> ed. 215-217. 1994.

📖 **Iritani Y., Iwaki S. and Katagiri K.** Production of extracellular antigen in culture supernate by *Haemophilus paragallinarum*. *J. Comp. Path.* 88: 395-399. 1978

📖 **Iritani Y., Katagiri, K. and Arita H.** Purification and properties of *Haemophilus paragallinarum* hemagglutinin. *Am J Vet Res.* 41 (12): 2114-2118. 1980.

📖 **Jacques M. and Leonie G.M.** Virulence Factors of Pasteurellaceae Formidable Animal Pathogens *ASM News.* 68:174-179. 2002.

📖 **Jawetz M., Adelberg.** Microbiologia Medica. Edit. Manual Moderno. Ed. 17<sup>a</sup> pag. 303-311. 2002.

📖 **Kilian M, Mestecky. J. schrohenloher R.E.** Pathogenic species of the genus *Haemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobulin A1 protease. *Infect immun;* 26:143-149. 1979.

📖 **Luna R. N., Mena R. E., Serrano L. J. y Negrete A. E.** Proteasas microbianas y su identificación con el uso de zimogramas: una técnica sencilla y sencilla para identificar y caracterizar proteasas. (bis) In: Rocha G. R., Cedillo R. L. y López R: F. (Eds). Método de investigación en ambiente y salud. BUAP, México. 159-179. 2001.

📖 **Mena, E.; Negrete, E.; Cruz, C.; Vaca, S.; García, O.; Pérez, V.; de la Garza, M.** Antigenic secreted proteins from *Haemophilus paragallinarum*. A 110 kDa putative RTX protein. FEMS Microbiology Letters 11407: 1-5. 2004.

📖 **McNeil H. J., Shewen P. E., Lo R. Y., Conlon J. A., Millar M. W.** Novel protease produced by *Pasteurella trehalosi* serotype 10 isolate from a pneumonic bighorn sheep: Characteristic and potential relevant to protection. Vet. Microbiol. 93:145-152. 2003.

📖 **Miyoshi S. Shinoda S.** Microbial metalloproteases and patogénesis. Microbes Infect 2: 91- 98. 2000.

📖 **Negrete A. E., Vaca P. S., Paniagua, G. L., Perez, M. A. Ibarra, C, J., Perez, M. V. M., Tenorio V. R.** Metalloproteases secreted by *Actinobacillus suis*. Curr. Microbiol. 49: 55-58. 2004.

📖 **Negrete A. E., Tenorio V. R., García C, de la Garza.** Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolated. Curr. Microbiol. 38: 64-67. 1999.

📖 **Negrete A. E., Tenorio V. R., Guerrero A. L., García C, de la Garza.** Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin. A. Can. J. Vet. Res. 58: 83-86. 1994.

📖 **Negrete Abascal E, Tenorio V.R, Guerrero AL. García RM, Reyes ME, de la Garza M.** Purification and characterization of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an antigen common to all the serotypes. Can J Vet Res 62:183-190. 1998.

📖 **Negrete, A. E.** *Haemophilus paragallinarum*: Aislamiento, caracterización, clasificación, sensibilidad a antimicrobianos y patogenicidad. Tesis de Licenciatura. BUAP: 1989.

📖 **Rao B. M., Tanksale M., Ghatge M. S. and Deshpande V. V.** molecular and biotechnological aspects of microbial protease. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:(3) 597-635. 1998.

📖 **Sandoval V. E., Terzolo, H. R.,** Coriza Infecciosa. Segunda parte; Reproducción experimental y patogenicidad de las bacterias. Rev. Avicultura Profesional 15, 1: 29-32, 1996.

📖 **Sandoval V. E., Terzolo H. R. And Blackall, P. J.** Complicated infectious coryza outbreaks in Argentina. Avian Dis. 38: 672-678, 1994.

📖 **Sawata A., Kume K. and Nakase Y.** Hamagglutinin of *Haemophilus paragallinarum* serotype 2 organisms: Occurrence and immunologic properties of hemagglutinin. Am J Vet Res. 43(7): 1311-1314. 1982

📖 **Sawata A, Nakai T, Kume K, Yoshikawa H. and Yoshikawa T.** Intranasal inoculation of chickens with encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum* electron microscopic evaluation of the nasal mucosa. Am J. Vet. Res. 46(11):2346-2353. 1985.

📖 **Terzolo, H. R.; Paolicchi, F. A.; Sandoval, V. E.; Blackall, P. J.; Yamaguchi T.; Iritani, Y.** Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Argentina. Avian Dis. 37: 310-314. 1993

📖 **Terzolo, H. R., V. E. Sandoval, and F. González Pondal.** Coriza Infecciosa. 3ra parte: Ensayos con vacunas. Rev. Avicultura Profesional 15, 2: 35-39, 1997.

📖 **Terzolo, H. R., V. E. Sandoval, and F. González Pondal.** Evaluation of inactivated infectious coryza vaccines in chickens challenged by serovar B strains of *Haemophilus paragallinarum*. Avian Pathol. 26: 365-376, 1997.

📖 **Vandamme, P.; Segers, P.; Vancanneyt, M; Van Hove, K.; Mutters, M.; Homme, J.; Dewhirst, F.; Paster, B.; Kersters, K.; Falsen, E.; Devriese, L. A.; Bisgaard, M.; Hinz, K-H., Mannheim W.** *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov., isolated from the avian respiratory tract. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 24-37, 1994.

📖 **Yamaguchi, T., Blackall P. J., Takigami S., Iritani Y. And Hayashi Y.** Immunogenicity of *Haemophilus paragallinarum* mutant that lacks a hemagglutinating antigen. Avian Dis. 32: 308-312. 1988.

📖 **Yamaguchi, T., Blackall, P. J., Takigami, S., Iritani, Y. and Hayashi, Y.** pathogenicity and serovar-specific hemagglutinating antigens of *Haemophilus paragallinarum* serovar B strains. Avian Dis, 34:964-968. 1990.

📖 **Yamaguchi, T., Blackall P. J., Takigami S., Iritani Y.** Immunogenicity of *Haemophilus paragallinarum* serovar B strains. Avian Dis. 35: 965-968. 1991.

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

📖 **Yamamoto, R. (bis). infectius Coryza.** In: **S. B. Hitchner, C. Charles, D. H. Granham and J.E. Williams. (Eds).** Isolation and identification of avian pathogens. 2da ed. American association of avian pathologists. Texas. P.16-18. 1980.

📖 **Zinsser H. (bis).** Microbiología. Médica Panamericana. Buenos aires. P 511-516. 1983.