



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL**

**ANÁLISIS DE PROTEÍNAS INMUNOGÉNICAS SECRETADAS POR
*Histophilus somni***

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

CARLOS ADÁN SÁNCHEZ ESPINOSA

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. SERGIO VACA PACHECO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

COMITÉ TUTORAL:

**DR. FRANCISCO AGUILAR ROMERO
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES AGRICOLAS Y PECUARIAS**

**DRA. ALMA LUCILA NÚÑEZ DEL ARCO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

CUAUTITLÁN, EDO. MÉX.

ENERO DEL 2013



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.

**Esta Tesis fue realizada con apoyo del PAPIIT Proyecto IN216010,
PAPIIT IN222313 y PAPCA FES I – UNAM 2011-2012**

El presente trabajo se realizó en el
Laboratorio de Genética en la
Unidad de Morfofisiología y Función de la
Facultad de Estudios Superiores Iztacala
de la Universidad Nacional Autónoma
de México

Bajo la dirección de:

Dr. Sergio Vaca Pacheco

Agradecimientos

Al Dr. Sergio Vaca y al Dr. Erasmo Negrete por permitirme la realización de este proyecto, por su guía, por su enorme paciencia, invaluable ayuda, la confianza y los consejos que me brindaron.

Al Dr. Francisco Aguilar y a la Dra. Alma Núñez por compartirme sus conocimientos, por sus consejos y apoyo en cada uno de los tutorales.

A los Doctores: Enrique Salas, Edgardo Soriano, Efrén Díaz, Victor Tenorio, por el tiempo dedicado a la revisión de mi tesis y las múltiples observaciones que me realizaron, por todo el apoyo y orientación para la culminación de este proyecto.

A mis compañeros y equipo de laboratorio, por brindarme su amistad, por la ayuda que me brindaron y por todos os amenos momentos.

Dedicatorias

To Sripad Bhaktivedanta Damodara Maharaja

To Gurudeva

With all my love, affection and respect.

A mis padres y hermanas por ser mi fuente de inspiración, por todo su gran cariño y todo su apoyo, por creer en mí y por ser un gran ejemplo a seguir, no tengo manera de agradecer todo cuanto han hecho por mí.

A mis entrañables amigos, por su valiosa amistad, su apoyo incondicional, por compartir su tiempo, por todas las gratas vivencias que hemos compartido y todo lo que he aprendido de ustedes.

A la familia Pinto Carmona, gracias por guiarme, por todo su cariño y por permitirme ser parte de su familia, los quiero mucho!

A Karina, por acompañarme a lo largo de esta trayectoria, por ser un motivo de felicidad y alegría constante y por todos los buenos momentos que he pasado a tu lado.

Índice	Página
Índice de Figuras	VIII
Índice de tablas	IX
Resumen /Abstract.....	X/XI
1 Introducción.....	1
Familia <i>Pasteurellaceae</i>	
Descripción del organismo	
Etiología	
Epidemiología	
Patogénesis	
Factores de virulencia en miembros de la familia <i>Pasteurellaceae</i>	
Secreción de proteínas	
Proteasas	
Metaloproteasas	
2 Antecedentes	17
3 Justificación	19
4 Objetivos	21
5 Diagrama de trabajo	22
6 Materiales y Métodos	23

Cepas

Cultivo de *H. somni*

Obtención de las proteínas secretadas

Patrón de Proteínas

Actividad proteolítica

Determinación del tipo de proteasa

Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica

Efecto de diferentes pHs en la actividad proteolítica

Identificación de una posible hemaglutinina

Degradación de fibrinógeno

Inmunoreconocimiento

7 Resultados	29
8 Discusión	47
9 Conclusiones	52
10 Perspectivas	53
12 Bibliografía	54

Índice de Figuras

Número	Título	Página
1	Micrografía electrónica de barrido	2
2	Crecimiento de <i>H. somni</i> en placas de agar chocolate	3
3	El principal reservorio de <i>H. somni</i>	6
4	Algunas especies comerciales susceptibles a ser infectadas por <i>H. somni</i>	8
5	Muestra de tejido pulmonar de bovino con lesiones neumónicas	9
6	Sistemas de secreción	14
7	Mecanismo catalítico de las metaloproteasas	16
8	SDS PAGE 10%. Electroforesis de proteínas secretadas por <i>H. somni</i> cepa 16	30
9	Patrones de extractos totales y proteínas secretadas	31
10	Determinación de la actividad proteolítica de las cepas ATCC 700025 y 16 de <i>H. somni</i>	33
11	Gel SDS Page 10% copolimerizado con 0.01% de gelatina de porcino	34
12	Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de <i>H. somni</i>	35
13	Efecto del pH en la actividad proteolítica de <i>H. somni</i>	36
14	Efecto de diferentes inhibidores en la actividad proteolítica de <i>H. somni</i>	37
15	Efecto de diferentes concentraciones de EDTA sobre la actividad proteolítica de <i>H. somni</i>	38
16	Gel SDS-PAGE al 10% copolimerizado con 0.1% de caseína	40

Número	Título	Página
17	Gel SDS-PAGE al 10% copolimerizado con 0.05% de hemoglobina de equino	41
18	Gel SDS-PAGE al 10% copolimerizado con 0.05% de hemoglobina de bovino	
19	Degradación de fibrinógeno	43
20	Posible Hemaglutinina secretada por <i>H. somni</i>	44
21	Western blot empleando diferentes concentraciones de anticuerpo	45
22	Western blot empleando diferentes concentraciones de proteínas	46

Índice de tablas

Número	Título	Página
1	Clasificación de la familia <i>Pasteurellaceae</i>	1
2	Principales funciones de las proteínas secretadas	12
3	Proteínas secretadas por algunas bacterias Gram negativas	13
4	Amortiguadores de activación	25
5	Agentes Inhibidores de proteasas	25
6	Anticuerpos empleados	28

Resumen

Histophilus somni es un cocobacilo Gram negativo perteneciente a la familia Pasteurellaceae; está asociado a enfermedades del tracto respiratorio y del aparato reproductor de ovinos y bovinos. Investigaciones anteriores han demostrado la importancia de las proteínas secretadas en procesos tales como: adhesión, colonización, evasión de la respuesta inmune, entre otros. Sin embargo, no se han reportado aún las proteínas secretadas por *H. somni*. El propósito de este trabajo fue detectar proteasas y proteínas antigénicas secretadas de *H. somni*. Se determinaron las condiciones óptimas de crecimiento de la cepa de referencia ATCC 700025 y de una cepa de campo (16) proveniente de una infección respiratoria de bovino. Se estandarizaron las condiciones óptimas de crecimiento: Medio BHI suplementado con 0.01% de tiamina monofosfatada, 0.1% de Trisma-base y 0.5% de extracto de levadura y las condiciones de precipitación de las proteínas secretadas: Sulfato de amonio al 70% y centrifugación a 13,663 g/10 min. Las proteínas secretadas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE), observándose proteínas en el intervalo de 25 a 250 kDa, sin diferencias entre ambas cepas. Un grupo de proteínas de 60 kDa fue reconocido por sueros anti-hemaglutinina, por lo tanto se propone es una posible hemaglutinina. Se determinó la inmunogenicidad de las proteínas por Western Blot utilizando suero de borregos sanos ó enfermos, múltiples bandas fueron reconocidas, siendo inmunodominantes las de 25, 30, 100, 150 y 250 kDa. Las proteínas secretadas por *H. somni* 16 son capaces de degradar fibrinógeno luego de 12h de incubación a 37° C. Además estas proteínas tuvieron la capacidad de degradar diferentes sustratos (gelatina de porcino 0.1%, caseína 1%, hemoglobina de bovino 0.05% y en menor grado hemoglobina de equino 0.05%) se demostró que la proteasa es termoestable desde los 40 hasta los 70 °C y presenta actividad en un rango de pH de 6 a 9, es estable en presencia de inhibidores de serín y cisteín proteasa, pero disminuye en presencia de 10 mM EDTA y se inactiva completamente con 30 mM EDTA, lo que sugiere que se trata de una metaloproteasa.

Palabras clave: *Histophilus somni*, proteínas secretadas, proteasas

Abstract

Histophilus somni is a Gram- negative coccobacillus, associated with respiratory and reproductive diseases in cattle and sheep. Previous investigations had shown the importance of the secreted proteins in: adhesion, colonization and evasion of the immune response. Nevertheless, the secreted proteins by *H. somni* has not been reported yet. The main aim of this study was to detect proteases and antigenic proteins from *H. somni*. The conditions set for the optimal growth of both the reference (ATCC 700025) and field strain (16) were: BHI media enriched with 0.01%, thiamine monophosphate, 0.1% of trizma-base and yeast extract 0.5% and its precipitation with 70% of Ammonium sulfate. Secreted proteins of molecular mass from 25 to 250 kDa were observed in 10% polyacrylamide gels (SDS-PAGE), without differences between the two strains. A group of 60 kDa proteins cross-reacted with polyclonal antibody against hemmaglutinine. The antigenic capability of the secreted proteins of *H. somni* was determined by the Western-Blot technique employing sera from healthy and ill sheeps, multiple proteins were recognized by sera, especially those corresponding to 25,30,100,150,250 kDa. Secreted proteins from the field isolated strain partially degraded fibrinógeno after 12h of incubation at 37° C. In addition Proteins showing proteolytic activity were observed in 10% polyacrylamide gels copolymerized with 1% bovine casein, 0.1% porcine gelatin or 0.05% of bovine hemoglobine and 0.05% equine hemoglobine. Their activity was stable at 40 degrees C, but partially inhibited at 70 degrees C. They were active at alkaline pH, and inhibited by 30 mM ethylenediamine tetraacetic acid. (EDTA). Since these secreted proteases were all inhibited with EDTA, they are most likely metalloproteases.

Introducción

Familia *Pasteurellaceae*

La familia *Pasteurellaceae* está compuesta por bacterias Gram negativas, generalmente de formas cocoides o bacilares, anaerobias facultativas, con tamaños de entre 0.2 – 0.4 μm de diámetro, normalmente son oxidasa positivas y con requerimientos nutricionales de varios tipos (Mannheim, 1979). Los miembros de esta familia son conocidos por las enfermedades que causan tanto en humanos como en animales. Actualmente dicha familia comprende 65 especies agrupadas en 13 géneros (Tabla 1) (Bonaventura *et al.*, 2010).

NÚMERO	GÉNERO
1	<i>Pasteurella</i>
2	<i>Actinobacillus</i>
3	<i>Haemophilus</i>
4	<i>Lonepinella</i>
5	<i>Mannheimia</i>
6	<i>Phocoenobacter</i>
7	<i>Gallibacterium</i>
8	<i>Histophilus</i>
9	<i>Volucribacter</i>
10	<i>Avibacterium</i>
11	<i>Nicoletella</i>
12	<i>Aggregatibacter</i>
13	<i>Bibersteinia</i>

Tabla 1. Clasificación de la familia *Pasteurellaceae*.

Descripción del organismo

Histophilus somni es un cocobacilo Gram negativo, altamente pleomórfico (Figura 1), no motil, anaeróbico facultativo; no encapsulado, no esporulado y no se ha descrito pilus o flagelo en este microorganismo. Fermenta D-glucosa, manosa y trealosa, produce ácido pero no gas, es oxidasa e indol positivo y resulta negativo a la producción de catalasa, arginina deshidrogenasa, lisina descarboxilasa y ureasa (Kilian y Biberstein, 1984); es independiente del factor V (dinucleótido de nicotinamida adenina) y del factor X (hemina), a diferencia de otros miembros de la misma familia (Merino y Biberstein, 1982; Inzana y Corbeil, 1987).

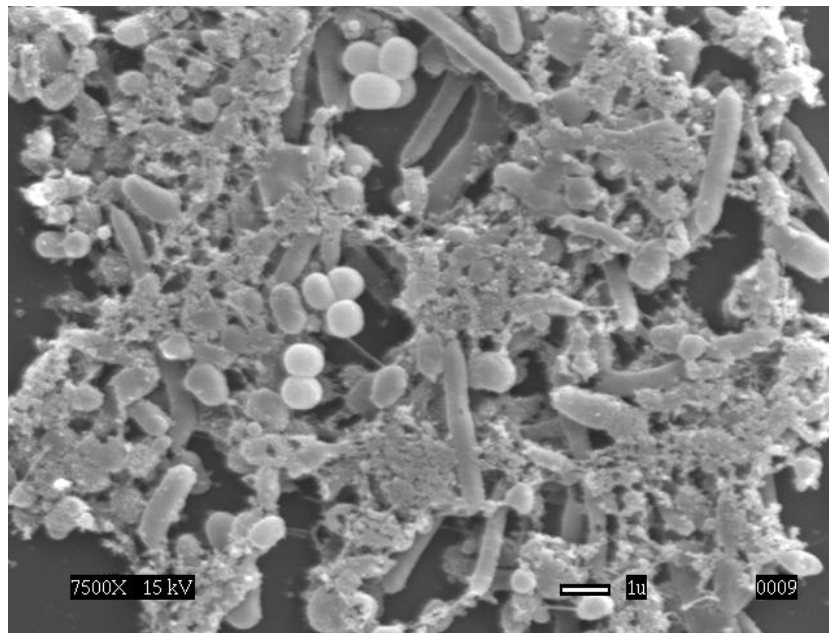


Figura 1. Micrografía electrónica de barrido de *H. somni* con un aumento de 7500 X, en la cual se observa la formación de biofilm y el pleomorfismo de la bacteria.

Para su crecimiento se requiere de agar sangre o agar chocolate y una incubación en presencia del 5 –10% de CO₂. Las colonias de esta bacteria alcanzan un diámetro de aproximadamente 1-2 mm en 48 h, son redondas y convexas y con una consistencia mantequillosa en placas de agar chocolate adquieren una coloración amarillenta-grisácea muy característica (Figura 2), en ocasiones suele presentar una actividad hemolítica débil (Humphrey y Stephens, 1983). Para su

cultivo en medios líquidos no es necesaria una incubación en presencia de dióxido de carbono (Inzana y Corbeil, 1987).



Figura 2. Crecimiento de *H. somni* en placas de agar chocolate.

Este microorganismo presenta una coloración amarillenta y una consistencia butirosa (Aguilar, 2006).

Experimentalmente se ha demostrado que permanece viable a 23.5° C en mucosa nasal o sangre por al menos 70 días y en moco vaginal no más de 5 días (Stephens *et al.*, 1981, Harris y Janzen 1989).

En el medio ambiente no es capaz de sobrevivir por más de 2 h, sin embargo la orina es una de las rutas de trasmisión más importante, así como también lo es el aerosol. *H. somni* puede sobrevivir grandes periodos de tiempo a -70°C (Harris y Janzen, 1989).

Etiología

A mediados de 1950 en Colorado, USA se reportó un organismo perteneciente al género *Haemophilus*, el cual fue aislado a partir de casos clínicos de encefalitis en bovinos y de septicemia en corderos. Este microorganismo fue clasificado con el nombre de *Haemophilus agni* y se le consideró responsable de enfermedades como meningitis, hemorragias en las membranas de los tejidos subcutáneos y de músculos, entre otras (Angen *et al.*, 2003)

En 1960 se identificó un organismo similar a *H. agni* al cual se le consideró como el agente causante de infecciones en ganado, este microorganismo fue nombrado posteriormente *Haemophilus somnus* y se le atribuyeron diversas enfermedades, incluidas infecciones de las vías respiratorias y del aparato reproductor (Angen *et al.*, 2003).

Finalmente, en Australia a partir de borregos enfermos de mastitis, epididimitis, metritis, septicemia, meningoencefalitis, neumonía y poliartritis se aisló y caracterizó posteriormente un microorganismo al que llamaron *Haemophilus ovis* (Philbey *et al.*, 1991).

A través de trabajos realizados con estos 3 microorganismos se demostró que presentaban ciertas características en común: morfología, reacciones bioquímicas, antígenos similares; sin embargo, *H. somnus*, presentaba un mejor crecimiento cuando se incrementaban los niveles de CO₂ (Biberstein, 1981), por lo cual se sugirió su reacomodo en un solo taxón dentro de la familia *Pasteurellaceae*.

Con resultados obtenidos por estudios de hibridación de ADN (Walker, 1985), se concluyó que dichos organismos deberían ser considerados como una sola especie. Sin embargo no fue sino hasta el 2003 que los estudios realizados por Angen, basados en secuencias de 16S rRNA y genes *rpoB*, arrojaron como resultado que *H. agni*, *H. somnus* y *H. ovis*, eran el mismo organismo, sugiriendo que estos se reagruparan como una sola especie *Histophilus somni*. A pesar de

contar con estos estudios no se ha aceptado por completo y se le continua llamando con su nombre mas común *H. somnus*.

Reportes previos han relacionado a *H. somni* con enfermedades en corderos y borregos, sin embargo este organismo ha sido aislado también del aparato reproductor de bisontes americanos, no obstante, no se ha estudiado el potencial de este organismo para infectar especies endémicas Norteamericanas.

Se ha informado de casos clínicos en bovinos producidos por *H. somni* en diversos países como Estados Unidos de América, Canadá, Alemania, Italia, Suiza, Rusia, Rumania, (Stephens 1981) Reino Unido, Bulgaria, República Checa, Egipto, Japón, Nueva Zelanda, Sudáfrica (Humphrey y Stephens 1983, Siddaramppa *et al.*, 2004), Argentina (Descarga, 2002), Australia (Stephens *et al.*, 1986) y México (Aguilar, 1986).

Epidemiología

El hábitat natural de este microorganismo es el tracto reproductor (Bisgaard, 1993, Corbeil *et al.*, 1995), se ha aislado de toros y novillos clínicamente sanos a partir de prepucio, semen, vejiga, testículos, glándulas sexuales accesorias y ámpula, (Figura 3), (Humphrey *et al.*, 1982, Humphrey y Stephens, 1983). En vacas se han reportado casos de vaginitis, cervicitis, endometritis, etc. (Stephens *et al.*, 1986). Este microorganismo también ha sido aislado del tracto respiratorio superior (Humphrey y Stephens, 1983), donde se le puede encontrar formando parte de la flora normal del hospedero, por esta razón puede ser considerado como comensal; aunque también ha sido clasificado como un patógeno primario o patógeno oportunista (Sandal e Inzana, 2009).

Las cepas aisladas de casos clínicos son comúnmente llamadas “patogénicas”, mientras que las cepas encontradas normalmente en el prepucio o la vagina, son llamadas “comensales” (Zekarias *et al.*, 2010) y carecen de algunos factores de virulencia. Pocas cepas aisladas de prepucio son altamente susceptibles a la muerte por suero (Corbeil *et al.*, 1985).

La prevalencia de *H. somni* como productor de enfermedad es más frecuente en explotaciones intensivas debido a las condiciones de estrés a las que el ganado es sometido por prácticas de manejo y transporte, o debido a infecciones con agentes primarios como los virus o micoplasmas; sin embargo el modo de diseminación aún no se conoce totalmente, por lo que se deduce que es por inhalación, ingestión de fluidos corporales o transmitido de forma venérea (Humphrey y Stephens, 1983).

Las técnicas empleadas en la producción pecuaria generan condiciones favorables para la presentación de la enfermedad, debido a que provocan estrés en el animal. Este estrés provoca una reacción neuroendócrina que induce la liberación de esteroides, principalmente cortisol, el cual compromete la capacidad inmunológica del hospedero en respuesta a los agentes infecciosos, debido a que inhibe la liberación de factores quimiotácticos por los macrófagos alveolares, provocando un bloqueo en la unión de estos factores a los granulocitos e inhibiendo la capacidad de migración del macrófago alveolar (Binkhorst *et al.*, 1990).

Los casos reportados de neumonía varían dependiendo del país de procedencia, los tipos de explotación, la edad de los animales y la época del año en que se realice el estudio; sin embargo, la tasa promedio de incidencia en corderos varía del 10 al 40% en México y en el extranjero (Trigo y Romero, 1986). En bovinos, las enfermedades respiratorias representan más del 66% de las enfermedades diagnosticadas por necropsia en hatos de manejo intensivo (Trigo, 1995).

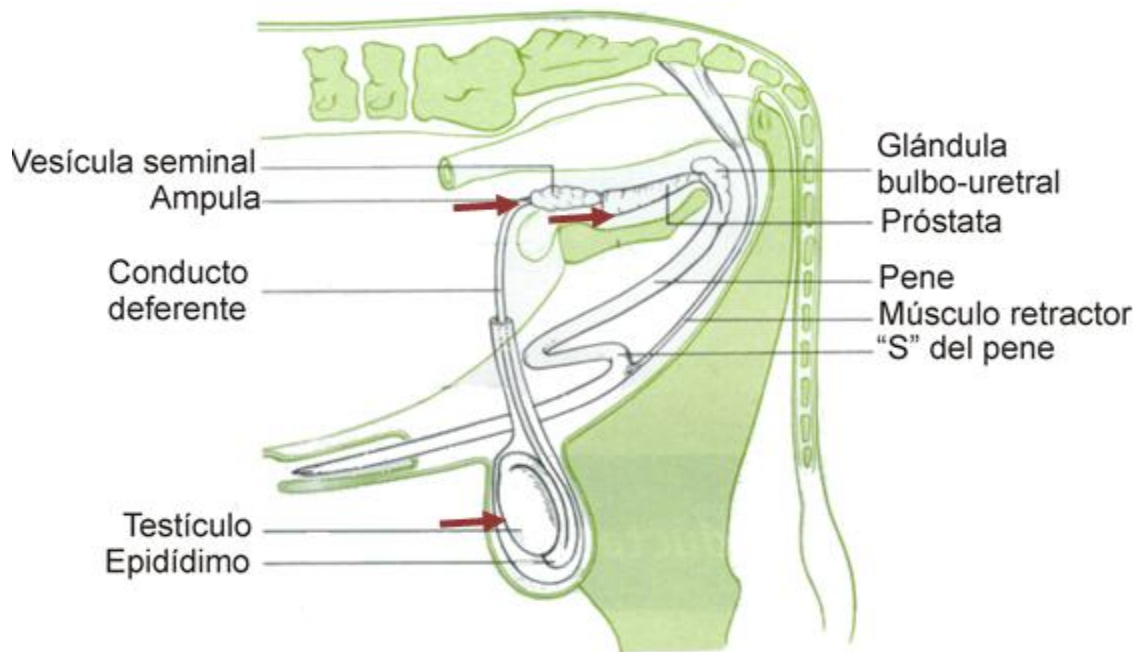


Figura 3. El principal reservorio de *H. somni* es el aparato reproductor, se señalan con flechas los órganos de donde se ha aislado este microorganismo.

Patogénesis

H. somni es considerado como uno de los agentes causales del “complejo de enfermedades respiratorias” o “complejo respiratorio infeccioso” (Humphrey y Stephens, 1983; Trigo, 1987) de bovinos y borregos (Figura 4), aunque también se han reportado casos clínicos en cabras (Janosi *et al.*, 2009), bisontes (Ward *et al.*, 1999; Dyer, 2001) y borregos cimarrones (Ward *et al.*, 2006). Además de esto, se ha reportado a este microorganismo en enfermedades del aparato reproductor (Bisgaard, 1993; Corbeil *et al.*, 1995).

En la presentación del complejo respiratorio intervienen agentes infecciosos primarios (inician la infección, principalmente virus) y secundarios (patógenos oportunistas).



Figura 4. Algunas especies comerciales susceptibles a ser infectadas por *H. somni*.

Comunmente son los virus los que actúan como agentes primarios, facilitando la infección bacteriana, ya que provocan un efecto citopático directo en el aparato respiratorio, reduciendo así la eliminación bacteriana por la carpeta mucociliar, facilitando la adhesión y la colonización por parte de estos microorganismos. Además disminuyen la capacidad fagocítica del macrófago alveolar dada por alteraciones en la quimiotaxis, la adhesión de partículas, la ingestión, la formación del complejo fagosoma-lisosoma, la acción lítica y la degradación intracelular, entre otros mecanismos (Jaramillo, 1998).

Las infecciones por *H. somni* se presentan principalmente en tres formas clínicas definidas:

1. La forma septicémica, cuya manifestación más importante es la meningoencefalomielitis tromboembólica (TEME).

2. La forma respiratoria, que afecta al tracto respiratorio superior (traqueitis, laringitis, otitis) y al tracto respiratorio inferior (bronconeumonía). Estas enfermedades se caracterizan por disnea, fiebre y descarga nasal.
3. La forma reproductiva, caracterizada por la presencia de vaginitis, cervicitis, infertilidad y aborto (Zielinski, 2000).

Las enfermedades causadas por *H. somni* se caracterizan por vasculitis, formación de trombos y hemorragias multifocales, la mayoría de las cuales son consecuencia de la respuesta inflamatoria del hospedero (Jansen, 1989). Aunados a estos síntomas se presentan cuadros neumónicos (Figura 5); la mortalidad por neumonía es sólo una de las causas de las pérdidas económicas causadas por *H. somni*, a estas se deben sumar los gastos por tratamiento, pérdidas de peso, decomisos en rastros y la reducción en la producción de carne.

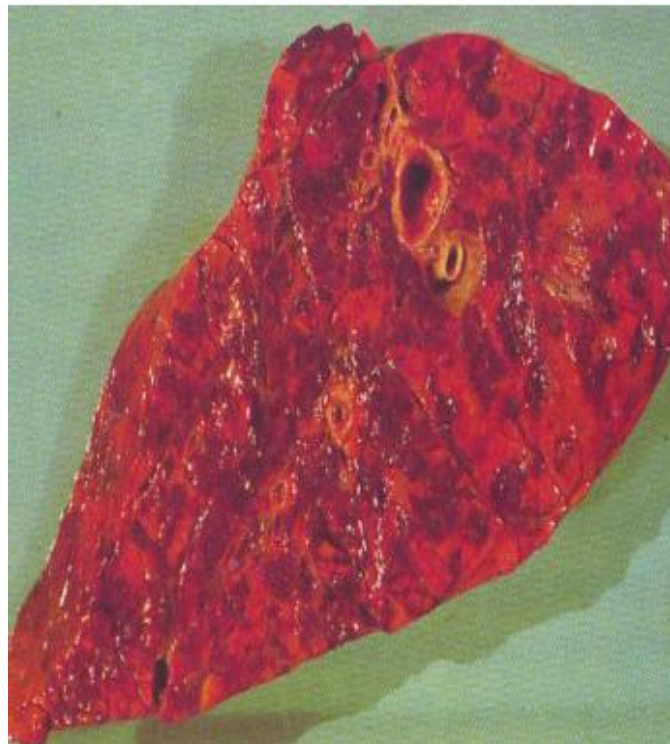


Figura 5. Muestra de tejido pulmonar de bovino con lesiones neumónicas.

Dependiendo del órgano involucrado, la edad del individuo y el patrón de la enfermedad se puede presentar un caso de infección agudo y fatal o crónico y

subletal (Inzana *et al.*, 1999). Sólo las infecciones agudas involucran el sistema nervioso (Ames, 1987).

Factores de virulencia descritos en diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae*.

La patogenicidad bacteriana depende en gran medida de los factores de virulencia presentes en la bacteria, los cuales pueden ser desplegados sobre su superficie, secretados al medio extracelular o inyectados directamente en la célula del hospedero (Finlay y Falkow, 1997).

Dentro de los factores de virulencia descritos en la familia *Pasteurellaceae* se encuentran, por ejemplo: la cápsula, proteasas y exotoxinas (Enriquez *et al.*, 2003) las cuales se han reportado para *Actinobacillus pleuropneumoniae*, un cocobacilo que coloniza el tracto respiratorio de ganado porcino (Biberstein y Hirsh, 1999).

En *Gallibacterium anatis* (anteriormente *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus salpingitis* ó *Pasteurella anatis*) se han reportado metaloproteasas capaces de degradar IgG de pollo (García *et al.*, 2005), toxinas tipo RTX (Kristensen *et al.*, 2010), y la capacidad de hemaglutinar eritrocitos de pollo, codornices, cerdos y conejos (Zepeda *et al.*, 2009) descritas para el patógeno aviar (Christensen *et al.*, 2003), mismos que le han permitido ser el agente causal de múltiples enfermedades entre las que destacan la salpingitis, peritonitis y septicemia, entre otras (Christensen y Bisgard, 2008).

Por su parte para *Avibacterium paragallinarum*, una bacteria cocobacilar, que coloniza el tracto respiratorio de las aves de corral y es el agente causal de la coriza infecciosa, se ha reportado la presencia de hemaglutininas como principales factores de virulencia, éstas median la adhesión a las células epiteliales de la tráquea y han sido utilizadas para la clasificación serológica de este microorganismo. Además *A. paragallinarum* presenta también cápsula (Sawata *et al.*, 1985), hemocína (una bacteriocina que inhibe el crecimiento de otros

microorganismos) (Terry *et al.*, 2004) y una posible RTX (Mena *et al.*, 2004), proteasas con la capacidad hidrolizar total o parcial a inmunoglobulinas tipo G de pollo (Rivero *et al.*, 2005).

Mientras que para *Actinobacillus suis*, microorganismo relacionado a varias condiciones clínicas en cerdos, tales como la neumonía, artritis y septicemia fatal (Jeannotte *et al.*, 2002), se ha reportado la presencia de cápsula, toxinas formadoras de poros relacionadas con las toxinas ApxI y Apx II de *A. pleuropneumoniae* (Jeannotte *et al.*, 2002). Este microorganismo es también capaz de adquirir hierro mediante receptores de transferrina (Bahrami *et al.*, 2003).

De igual manera en *Pasteurella multocida* se han descrito: la presencia de cápsula (Boyce y Adler, 2000), una dermatoxina (toxina con función de mitógeno de fibroblastos y células osteoblásticas) (Busch *et al.*, 2001), la neuraminidasa, la cual altera los mecanismos de depuración mucociliar y permite la colonización pulmonar (White *et al.*, 1995), y la porina H (Bosch *et al.*, 2001). En estudios recientes realizados con estos cuatro microorganismos ha sido reportada la presencia de proteínas secretadas de aproximadamente 21 y 60 kDa capaces de unir y de degradar fibrinógeno (López, 2011).

Secreción de proteínas.

Las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en diferentes aspectos del ciclo de vida bacteriano, como por ejemplo, en la biogénesis de organelos, la adquisición de nutrientes y la expresión de factores de virulencia (Tabla 2), (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003).

Tabla 2. Principales funciones principales de las Proteínas Secretadas

Principales funciones de las Proteínas Secretadas
Proteólisis
Hemólisis
Citotoxicidad
Reacciones de fosforilación
Degradación
Inactivación de complemento
Evasión de respuesta inmune
Adhesión
Comunicación
Obtención de nutrientes

En bacterias Gram negativas se ha descrito una gran cantidad de proteínas secretadas que han sido consideradas como factores de virulencia (Tabla 3).

Tabla 3. Ejemplos de proteínas secretadas por algunas bacterias Gram negativas.

PROTEÍNAS SECRETADAS POR GRAM NEGATIVAS		
Bacteria	Proteína secretada	Función
<i>Shigella flexneri</i>	IpaA	Motilidad intracelular basada en actina
	IpaB	Apoptosis de la célula blanco
	IpaC	Insertadas en el huésped
<i>Salmonella typhimurium</i>	SipA	Plegamiento de la membrana
	SopB	Secreción de fluidos y respuesta inflamatoria (Diarreas)
	SopE	Entrada a células no fagocíticas
	SopE2	Invasión celular
	AvrA	Respuesta tipo-hipersensitiva y Apoptosis
	TE	(Termoestable) Invasión
	TL	(Termolábil) Daño a su célula huésped
<i>Escherichia coli</i> <i>enteropatogénica (EPEC)</i>	EspA	Puente bacteria-célula
	Tir	Unión a la intimina
	EspB	Señalamiento de reacomodo de actina Lesión de unión y destrucción Formación de poros
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aerolisina	Lisis celular
<i>Aeromonas sp.</i>	α -hemolisina	Citotoxicidad Lisis incompleta de eritrocitos
	β -hemolisina	Formación de poros
<i>Actinobacillus</i> <i>actinomycetemcomitans</i>	Leucotoxina	Citotoxicidad Formación de poros

La secreción de dichas proteínas en Gram negativas es compleja, debido a que las proteínas que serán translocadas deben atravesar por dos barreras lipídicas

separadas por el espacio periplásmico y la capa de peptidoglicano: la membrana citosólica o membrana interna y la membrana externa (Abdallah *et al.*, 2007).

Las vías de secreción en las bacterias Gram-negativas han sido clasificadas en seis grupos principales; secreción tipo I, II, III, IV, V y los autotransportadores, este sistema de clasificación está basado en la naturaleza molecular de las maquinarias de transporte y las reacciones que éstas catalizan (Figura 6) (Lee and Schneewind, 2001). Sin embargo, de manera general estos grupos pueden subdividirse en dos grandes clases: las vías Sec-dependientes, que utilizan el sistema de secreción denominado Sec, en el que las proteínas a secretarse presentan una secuencia señal o péptido líder en el extremo amino terminal; y las Sec-independientes en las que las proteínas pueden ser translocadas directamente desde el citosol hasta el exterior celular sin que exista un intermediario periplásmico, ni una secuencia señal en el amino terminal (Koster *et al.*, 2000, Thanassi *et al.*, 2000).

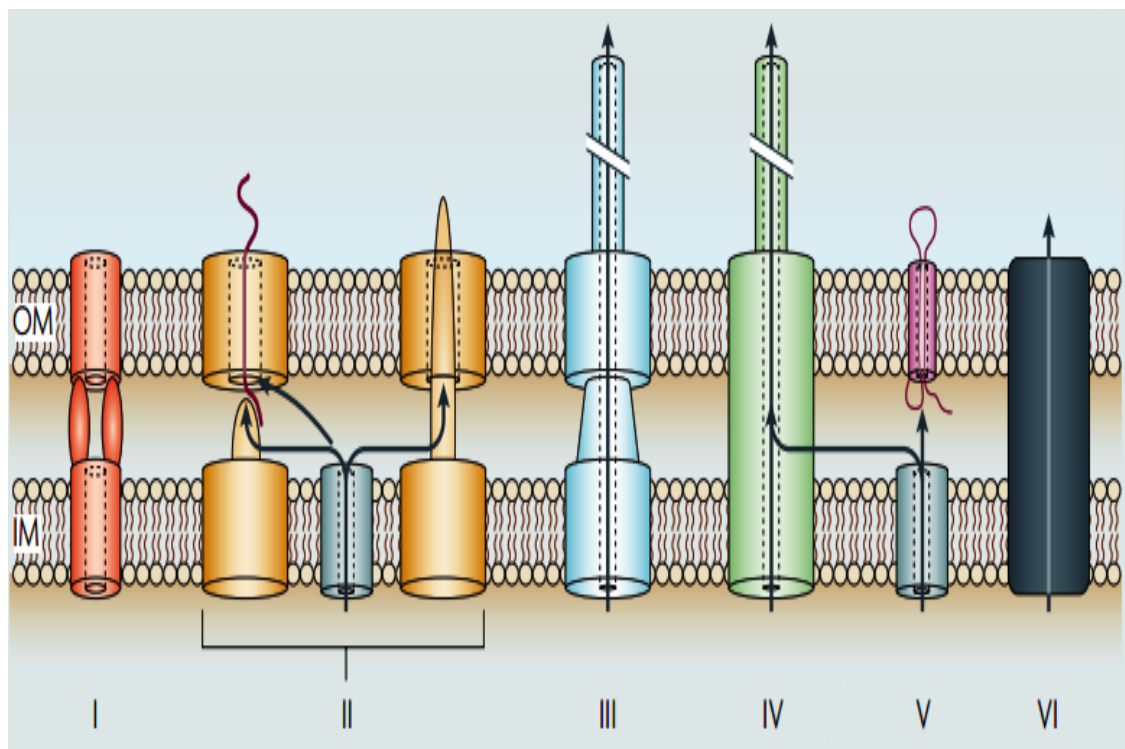


Figura 6. Sistemas de secreción empleados por bacterias Gram negativas.

En *H. somni* se ha descrito la presencia de algunas proteínas que pudieran estar involucradas en su virulencia y ser capaces de inducir inmunidad protectora (Corbeil *et al.*, 1995). En este microorganismo ha sido reportada la presencia de

proteínas de unión a inmunoglobulinas (IgBPs), las cuales incluyen proteínas de 41 kDa aproximadamente (con baja afinidad por varias clases de inmunoglobulinas (Ig) y proteínas de alto peso molecular con pesos de 120, 270 y 350 kDa con una fuerte afinidad por IgG2 (Bastida-Corcuera *et al.*, 1999; Widders *et al.*, 1998; Yarnall *et al.*, 1988).

Proteasas.

Las proteasas, peptidasas, proteinasas o enzimas proteolíticas son hidrolasas que poseen la capacidad de romper enlaces peptídicos (Mala *et al.*, 1998). Las proteasas son una clase de enzimas que ocupan una posición fundamental por sus aplicaciones en los campos fisiológicos, biotecnológicos y comerciales.

Se ha demostrado que estas son capaces de realizar modificaciones muy específicas y selectivas de las proteínas como la activación de formas zimógenas por proteólisis limitada: por ejemplo, la coagulación de la sangre y la lisis de coágulos de fibrina, así como también el procesamiento y transporte de proteínas secretoras a través de la membrana (Mala *et al.*, 1998). Las proteasas se clasifican de acuerdo a su sitio de acción y con base en su mecanismo catalítico. Según su sitio de acción tenemos endopeptidasas o exopeptidasas. Las endopeptidasas rompen puentes amino intermedios o dentro las proteínas, mientras que las exopeptidasas rompen los puentes peptídicos localizados en las terminales amino (aminopeptidasas) o carboxilo (carboxilpeptidasas) de la proteína (<http://www.genomemalaysia.gov.my/prolyses/>).

De acuerdo a su mecanismo catalítico se pueden clasificar en cuatro grandes grupos: 1) serin proteasas, comprende enzimas tales como la quimotripsina y la subtilisina, y se caracterizan por la presencia de un grupo serina en su sitio catalítico,

2) cisteín proteasas, como la papaína y la clostripaína que dependen del complejo catalítico histidina-cisteína,

3) aspartato proteasas, las cuales requieren de la presencia de dos residuos de ácido aspártico para su actividad catalítica, ejemplo de estas es la pepsina,

4) metaloproteasas, que emplean un ion metálico divalente para su funcionamiento (comúnmente zinc). De estos grupos las metaloproteasas parecen ser una característica presente en la mayoría de los patógenos bacterianos.

Metaloproteasas.

Son el grupo más diverso de proteasas, son parte de las bacterias, hongos así como también de organismos superiores. A pesar de que difieren ampliamente en sus secuencias y sus estructuras contienen un átomo de zinc, el cual es catalíticamente activo (Figura 7). En algunos casos, el zinc puede estar remplazado por otros metales como el cobalto o níquel sin que se pierda su actividad (Mala *et al.*, 1998).

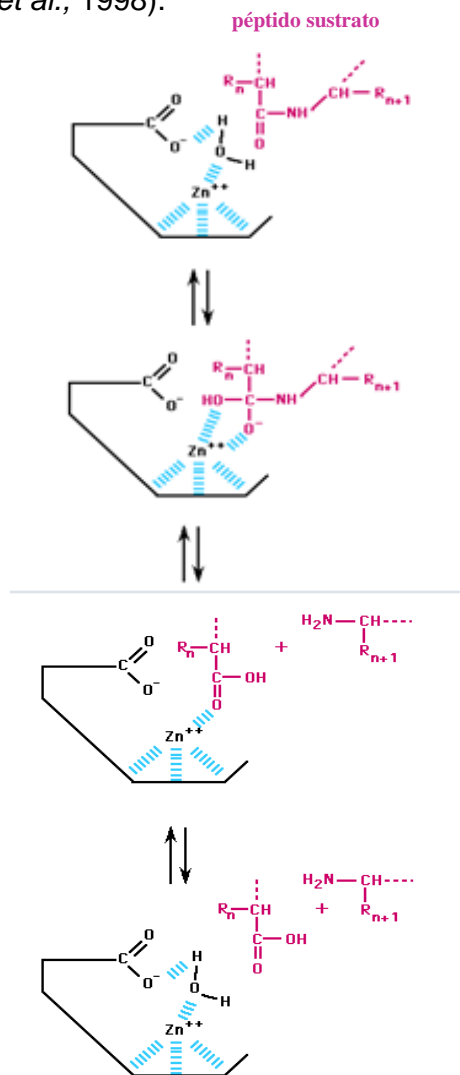


Figura 7. Mecanismo catalítico de las metaloproteasas (<http://www.genomemalaysia.gov.my/prolyses/>)

Antecedentes.

H. somni cuenta con diversos factores de virulencia que han sido objeto de estudio, entre estos se encuentran: la adhesión, que le permite a la bacteria colonizar la superficie de las membranas mucosas y unirse a las células no epiteliales (Corbeil *et al.*, 1985), las proteínas principales de la membrana externa (OMP) (Tagawa *et al.*, 2000), proteínas que unen inmunoglobulinas (IgBPs) (Ekins *et al.*, 2004; Tremblay *et al.*, 2006). Entre estas destacan las proteínas que unen inmunoglobulinas A (IgBPAs) las cuales poseen un motivo citotóxico en el amino terminal, que presenta homología con hemaglutininas filamentosas (Tagawa *et al.*, 2000), transferrina (Tbps) (Corbeil *et al.*, 1995), lipooligosacáridos (LOS) capaces de experimentar una fase antigénica variable *in vitro* e *in vivo*, lo que le permite a la bacteria evadir la respuesta inmune del hospedero y/o colonizar y diseminarse (Michael *et al.*, 2000). Esta variabilidad puede contribuir a la evasión inmune, mientras que los antígenos conservados, por su parte, son necesarios en ensayos de diagnóstico y en el desarrollo de vacunas.

H. somni cuenta además con proteínas de unión a transferrina que le permiten a la bacteria la obtención de hierro *in vivo* (Cornelissen y Sparling, 1994), debido a que éste no se encuentra disponible en el huésped, y podrían ser en parte responsables de la especificidad patógeno-hospedero de *H. somni* (Corbeil *et al.*, 1995).

En anaerobiosis y altas concentraciones de sales, este microorganismo produce un exopolisacárido formado por manosa y galactosa, el cual se encuentra en los sobrenadantes del cultivo (Inzana *et al.*, 2002). Se ha sugerido que la síntesis de este exopolisacárido es una respuesta al estrés.

En cuanto a los factores que facultan a esta bacteria para la evasión de la respuesta inmune, han sido estudiados: la Fosforilcolina (Chop), componente de fase variable de los LOS de *H. somni*, cuya función es la agregación de las plaquetas bovinas, a través de su unión al receptor del factor de activación plaquetaria (Kuckleburg *et al.*, 2007), la sialilación de los {LOS} que inhibe la unión

de los anticuerpos a los epitopos específicos, tal como el epitopo LacNAc (Estabrook *et al.*, 1997; Moran *et al.*, 1996; Vimr y Lichtensteiger, 2002; Vimr *et al.*, 2004). Se ha demostrado que los anticuerpos contra las proteínas de membrana externa (OMPs) de 40 kDa protegen pasivamente a la bacteria en experimentos con bovinos retados con *H. somni* (Corbeil, 2007).

Uno de los principales mecanismos de defensa del hospedero son los neutrófilos, capaces de fagocitar a microorganismos extraños (Andrews *et al.*, 1985), *H. somni* sin embargo es capaz de sobrevivir a éstos, e incluso sobrevivir dentro de ellos. (Czuprynski y Sample, 1990). Una vez dentro de los neutrófilos, *H. somni* se encuentra protegido de las defensas del huésped, consiguiendo así invadir los diferentes tejidos (Pfeifer *et al.*, 1992). Esto podría explicar las dificultades que existen para aislar a este organismo de los tejidos infectados durante la bacteremia (Pfeifer *et al.*, 1992).

En estudios realizados por Tagawa en el año 2000 se reportó la presencia de dos proteínas de membrana externa (OMPs), la primera de 41 kDa que presenta variabilidad dentro de las diferentes cepas y produce una respuesta inmune débil; ésta podría estar asociada a cepas patógenas resistentes al suero, ya que no se encuentra presente en cepas sensibles al suero provenientes de aislados no patogénicos.

Recientemente se ha descrito que *H. somni* es capaz de formar biofilm en placas de poliestireno y en vidrio (Inzana *et al.*, 2003), demostrándose que las cepas aisladas de casos clínicos forman una cantidad significativamente mayor de biofilm que las aisladas de prepucio de bovinos sanos. El biofilm le permite a la bacteria colonizar y persistir en un órgano particular, a través de la evasión del sistema inmune (Donlan y Costerton, 2002).

A la fecha no han sido reportados trabajos en los cuales se estudien las proteínas secretadas por *H. somni*.

Justificación.

H. somni es reconocido como el agente causal de diversas enfermedades en el tracto respiratorio superior y el aparato reproductor de bovinos y ovinos. Esta bacteria se ha distribuido ampliamente alrededor del mundo causando grandes pérdidas económicas a la industria pecuaria debido a la mortalidad que provoca a los hospederos. No obstante su importancia, no se han estudiado sus posibles factores de virulencia secretados al medio extracelular.

En las bacterias, la expresión oportuna de proteínas es esencial para el crecimiento y sobrevivencia, estos organismos son capaces de secretar diversos tipos de proteínas incluyendo toxinas, adhesinas y varias enzimas hidrolíticas (González y Dreyfus, 2003) que se requieren en diferentes etapas de su ciclo de vida, por ejemplo, durante la expresión de ciertos factores de virulencia.

A través de un gran número de mecanismos, las toxinas bacterianas alteran los procesos metabólicos críticos de la célula huésped; dañan su membrana o modifican proteínas que son importantes para mantener la fisiología celular.

Ya que la interacción de patógenos con sus células hospederas es mediada por factores secretados a los espacios extracelulares o bien localizados en la superficie bacteriana, es de particular relevancia el estudio de las proteínas secretadas.

La carencia de protección adecuada conferida por las vacunas disponibles es en parte debida al insuficiente entendimiento de los factores de virulencia y de la respuesta inmune durante el proceso de infección (Michael *et al.*, 2000).

Debido a la carencia de conocimiento que se tiene sobre las proteínas expresadas por *H. somni*, este trabajo tiene la finalidad de identificar proteínas secretadas que pudieran participar en la patogénesis o en el desarrollo de la respuesta inmunológica del hospedero; lo cual podrá ampliar nuestro entendimiento sobre los factores de virulencia de esta bacteria.

La determinación de dichas proteínas y el estudio de su conservación en las diferentes cepas, es necesaria para el diseño de vacunas y la creación de candidatos moleculares para diagnóstico.

Hipótesis

Si se determina la presencia de proteínas secretadas con actividad inmunogénica o proteolítica en *Histophilus somni*, entonces éstas proteínas podrían estar involucradas en procesos de patogénesis dentro del hospedero.

Objetivos:

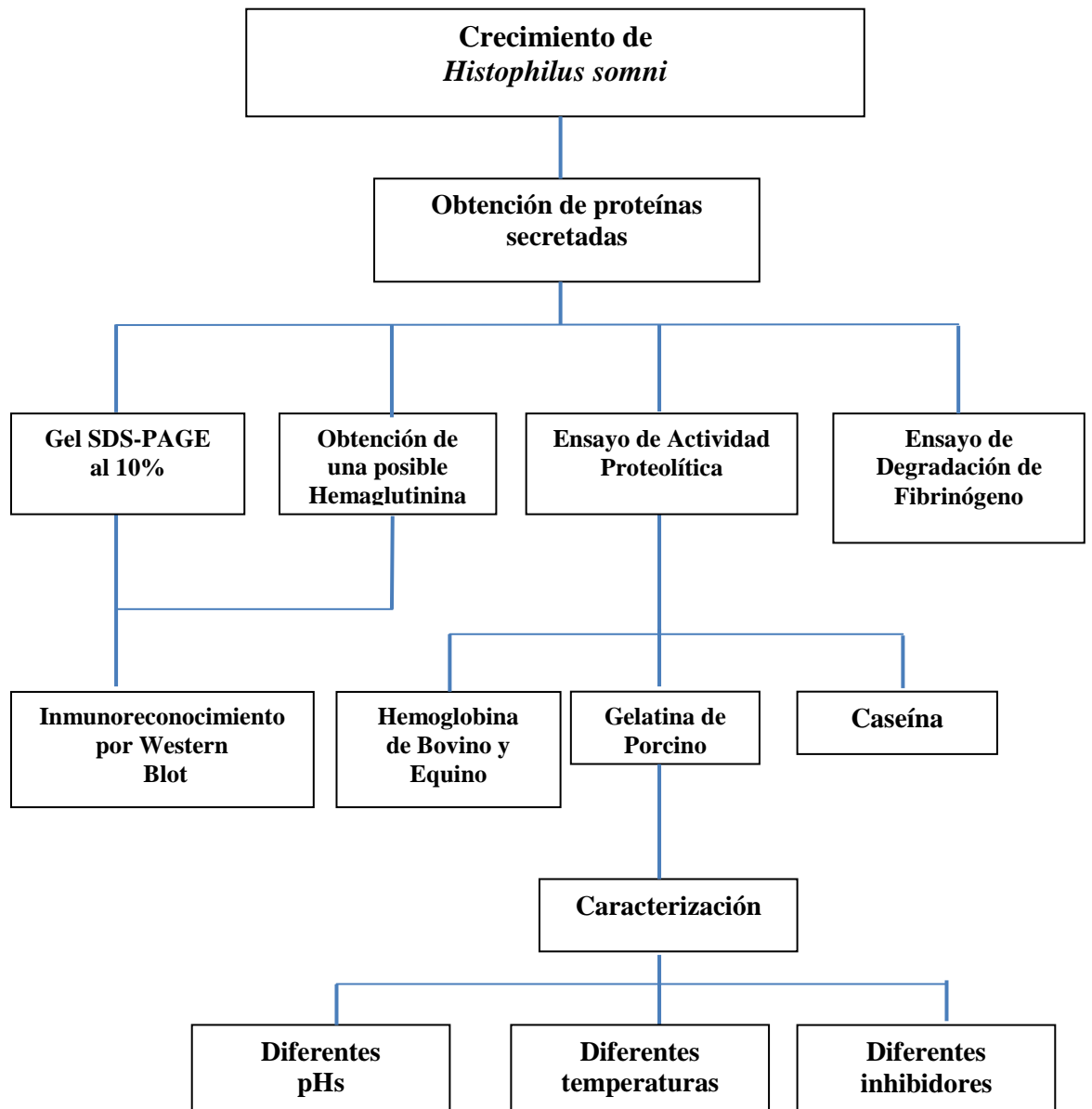
Objetivo general:

Identificar proteínas secretadas por *H. somni* que posiblemente participen en el proceso de infección del hospedero

Objetivos particulares:

- a) Estandarizar las condiciones para la obtención de proteínas secretadas por *H. somni*, empleando diferentes medios de cultivo (BHI, TSB, Brucella) así como también diferentes agentes precipitantes; Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Ácido Tricloroacético (TCA) y Metanol (MeOH).
- b) Identificar alguna(s) proteína(s) secretada(s)
- c) Identificar posible actividad proteolítica en las proteínas secretadas.
- d) Establecer si las proteínas secretadas por *H. somni* son capaces de degradar fibrinógeno de bovino.
- e) Demostrar si las proteínas secretadas de 60 kDa son reconocidas por sueros anti-hemaglutinina.
- f) Determinar si alguna (s) de estas proteínas es reconocida por sueros de animales infectados experimentalmente con *H. somni*.

Diagrama de Trabajo.



Materiales y Métodos:

Cepas.

Para la realización del presente trabajo se utilizaron las cepas de referencia *Histophilus somni* (ATCC 700025) aislada de bovino y una cepa de campo aislada en México (Baja California Norte) de un caso clínico de infección respiratoria de bovino. Esta cepa fue caracterizada con PCR especie específica (Angen, 2003) y posteriormente catalogada con el número 16.

Cultivo de *H. somni*.

Para el cultivo de las cepas en medio líquido se emplearon los medios; Infusión de Cerebro y Corazón (BHI), Caldo de Soya y Trypticaseína (TSB) y Caldo Brucella, suplementados con suero; en su ausencia el medio fue suplementado con 0.01% de tiamina monofosfatada, 0.1% de Trisma-base y 0.5% de extracto de levadura (Inzana y Corbeil, 1987). Para su mantenimiento se utilizaron placas de Agar chocolate. Los medios de cultivo fueron inoculados con 1% de precultivo e incubados en agitación a temperatura constante (175 rpm, 37°C) por 48 h, una vez pasadas las primeras 24 h se realizaron pruebas de pureza sobre placas de agar chocolate y estas fueron incubadas a 37°C durante 24 h en presencia de 10% de dióxido de carbono o bien en un frasco con vela (Corbeil *et al.*, 1985, Cole *et al.*, 1992).

Obtención de las proteínas secretadas.

Los cultivos crecidos en los diferentes medios fueron centrifugados a 13,663 g (Kendro, Sorvall Legend RT) 5°C durante 30 min; la técnica de precipitación de las proteínas presentes en el sobrenadante libre de células se estandarizó tras evaluar, 10% de (TCA), (Mena Rojas *et al.*, 2004), (MeOH) 2v/1v y (NH₄)₂SO₄ al 70% a 4°C durante toda la noche. Las proteínas precipitadas se colectaron por centrifugación bajo las mismas condiciones y la pastilla obtenida fue resuspendida

en un volumen mínimo de Tris 20mM, pH 7.5. (Negrete-Abascal *et al.*, 1998). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Patrón de proteínas.

Con el objetivo de determinar los patrones de proteínas secretadas por *H.somni* se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. Previo a ser cargadas en el gel, a las muestras les fue adicionado 20% de buffer de carga 6X y 5% de β -mercaptoetanol (β -ME) (Laemmli, 1970). Fueron cargados 15 μ g de proteína por carril. Los geles se corrieron a 90V durante 120 min. Posteriormente, fueron teñidos con azul de Coomassie durante 15 min. El exceso de colorante se eliminó con ácido acético al 10%.

Actividad Proteolítica.

Para evaluar la actividad proteolítica de las proteínas obtenidas, se realizaron electroforesis en geles SDS-PAGE al 10% copolimerizados con caseína 1%, gelatina de porcino al 0.1% (Merck), hemoglobina de equino y hemoglobina de bovino (Sigma) 0.05%, cargando 15 μ g de proteína y adicionando 5% de amortiguador de carga 6X. Los geles fueron corridos a 100 V durante 2 h. Las muestras no se trataron con β -ME ni se hirvieron. Los geles se dejaron en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente, con Tritón X100 al 2.5% para retirar el exceso de SDS que pudiera interferir con la actividad proteolítica. Posteriormente los geles fueron activados con amortiguador de activación (tabla 4) y CaCl_2 , a 37 °C por 12 horas. Por último los geles se tiñeron con azul de Coomassie. El exceso de colorante se eliminó con ácido acético al 10%. La actividad proteolítica se demuestra con zonas claras en el gel (Negrete, 1998).

Tabla 4 Amortiguador de activación

Reactivo	Concentracion	pH
Tris-HCl	50mM	7-10
Acetato- Ac. Acético	0.1M	3-6
CaCl ₂	10mM	

Determinación del tipo de proteasa.

Con el objetivo de determinar el tipo de proteasa secretada por *H. somni* se realizó un ensayo empleando diferentes inhibidores de proteasas, los cuales se enlistan en la tabla 5. Previo a la adición del amortiguador de carga 6X, las muestras fueron incubadas con diferentes inhibidores durante 30 minutos a temperatura ambiente posterior al corrimiento electroforético, la misma concentración de inhibidores fue añadida al amortiguador de activación pH 7.0. Finalmente los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie R250 y desteñidos con ácido acético al 10%.

Tabla 5 Agentes Inhibidores de proteasas

Inhibidor	Concentración	Descripción
Ácido etilendiamino tetraacético (EDTA)	10, 20, 30 mM	Quelante de iones de metal Inhibidor reversible de amplio espectro de metaloproteasas
N-etilmaleimida (NEM)	0.2mM	Modificador covalente de residuos de cisteína en proteínas Inhibidor irreversible de las cisteín proteasas
p-hidroxy mercuribenzoato (PMSF)	0.5mM	Inhibidor irreversible de serin proteasas por sulfonilación del residuo de serina en el sitio activo de la proteasa

Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica.

Con el objetivo de determinar la termoestabilidad de la proteasa secretada por *H. somni* las muestras se incubaron por 10 minutos a diferentes temperaturas 40, 50, 60, 70 y 80°C previo al corrimiento electroforético en geles SDS-PAGE al 10% copolimerizados con gelatina de porcino 0.1%, posteriormente se siguió el resto del procedimiento antes descrito.

Efecto de diferentes pHs en la actividad proteolítica.

Para determinar el pH óptimo de la proteasa, se corrió un gel SDS-PAGE al 10% copolimerizado con gelatina de porcino, después de una hora en agitación con Tritón X100 al 2.5%, se separó el gel por carriles, cada uno fue incubado por 12 horas en presencia de amortiguador de activación a diferentes pHs (3-10) tabla 4. Finalmente el gel fue teñido con Azul de Coomassie.

Identificación de una posible hemaglutinina secretada por *H. somni* a través de cromatografía de intercambio iónico

La resina de intercambio iónico (DEAE-celulosa) se activó tratándola con NaOH 1M, enseguida se lavó con abundante agua, posteriormente se trató con HCl 0.5M y el exceso de ácido se eliminó con lavados con agua destilada. Posteriormente se trató nuevamente con NaOH 1M, y el exceso de NaOH se eliminó con agua destilada, finalmente la resina fue equilibrada con Tris-HCl 20 mM NaCl 25 mM y se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

Para preparar la columna cromatográfica, se colocó papel filtro en el fondo de una jeringa de 5 ml y se le agregaron 3 ml de resina. Dicha columna se equilibró con Tris-HCl 20 mM con NaCl 25 mM. Posteriormente se aplicó 500µl de la muestra de proteínas y se lavó con el mismo buffer para eluir las proteínas que no interaccionaron con la resina. Las proteínas que fueron retenidas en la columna se eluyeron utilizando Tris-HCl con diferentes concentraciones de NaCl (0.05M, 0.1M, 0.2M, 0.3M, 0.5M y 1M), obteniendo dos fracciones por cada cambio de NaCl .

Las fracciones obtenidas se corrieron electroforéticamente y los geles se tiñieron con azul de Comassie.

Degradación de fibrinógeno.

Se evaluó la capacidad de las proteínas secretadas por *H. somni* de degradar fibrinógeno. Para ello se incubaron 15 µg de muestra durante 12, 24 o 48 horas a 37 °C con 15µg de fibrinógeno de borrego (Sigma).

Como control negativo se usó únicamente Tris-HCl 20 mM con el fibrinógeno. Con estas muestras se realizó un corrimiento electroforético SDS-PAGE al 10% para observar la degradación.

Inmunoreconocimiento.

Para observar si las proteínas eran reconocidas por sueros de animales infectados con *H. somni* se empleó la técnica de Western-Blot. Las proteínas se separaron electroforéticamente en geles SDS-PAGE al 10%, enseguida fueron transferidas por 2h a 250A a membranas de Polyvinylidene fluoride (PVDF) previamente activadas (Negrete-Abascal et al., 1998 y 1999).

Con el objetivo de bloquear los sitios de unión inespecíficos, la membrana se dejó bloqueando con leche al 5% por 2 h en agitación. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0.05% en intervalos de 10 min. Los anticuerpos empleados así como las concentraciones se enlistan en la tabla 6.

Tabla 6 Anticuerpos empleados.			
	PRIMARIO	SECUNDARIO	CONCENTRACIÓN
Sueros de animales infectados con <i>Histophilus somni</i>	Suero de borrego joven 2 semanas postinfección con <i>H. somni</i> (723)	Conejo a-Borrego*	1:5000 1:2000
	Suero de borrego joven al día 0 de la infección con <i>H. somni</i>	Conejo a-Borrego*	1:5000
Suero contra proteína específica	Suero contra hemaglutinina de <i>Avibacterium paragallinarum</i>	Conejo a-Borrego*	1:1000

* Sueros conjugados con peroxidasa

Para observar la reacción se preparó una solución reveladora que constaba de: H₂PO₄ pH 7.4, Diaminobencidina, CoCl₂ y NiCl₂, y se añadió a esta solución peróxido de hidrógeno como sustrato. (Negrete- Abascal *et al.*, 1998 y 1999).

Resultados.

Comparación de medios de cultivo y agentes precipitantes.

Con el objetivo de determinar el medio de cultivo que permitiera un óptimo crecimiento de la bacteria, así como para encontrar el mejor agente precipitante de las proteínas, se obtuvo un patrón de las proteínas secretadas de *H. somni* cepa 16 al ser crecida en diferentes medios de cultivo, esto mediante el corrimiento electroforético de las muestras en un gel SDS-PAGE al 10% .

Como se observa en la figura 8, las proteínas secretadas se encuentran distribuidas en un intervalo que abarca desde los 20 hasta los 250 kDa en todos los casos, obteniéndose un patrón muy similar. No obstante hay algunas diferencias debidas aparentemente al agente de precipitación empleado no así al medio de crecimiento utilizado.

Al emplear $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como agente precipitante (carriles 1, 4 y 7), el patrón de proteínas observado es prácticamente el mismo, sugiriendo con ello que la diferencia de medios no genera una expresión diferencial de proteínas secretadas. En el caso de las proteínas secretadas obtenidas con TCA (carriles 2, 5, 8) se observaron algunas diferencias, entre ellas, la ausencia de la banda de aproximadamente 250 kDa (flecha verde) en el carril 2 que corresponde a la muestra de la bacteria cultivada en medio Brucella. Las proteínas de bajo peso molecular, de aproximadamente 20 kDa presentaron poca visibilidad, al igual que las obtenidas de la cepa que fue crecida en BHI (carril 8, flecha negra). Por otro lado cuando las proteínas fueron precipitadas con MeOH (carriles 3, 6, 9) se observó la mayor cantidad de diferencias en los patrones correspondientes. Destaca la ausencia de proteínas de bajo peso molecular (20 a 25 kDa) y la disminución de las proteínas que se encuentran entre los 50 y los 75 kDa.

Los patrones de proteínas mejor definidos fueron los obtenidos a partir de la muestra de la cepa crecida en BHI (7, 8 y 9) siendo el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ el mejor precipitante.

No obstante que la cepa presentó crecimiento en los tres medios empleados en este estudio, se optó en lo siguiente por el uso de BHI debido a que se observó un crecimiento más rápido de la bacteria, así como también por que los patrones de proteínas obtenidos al ser cultivada *H. somni* en este medio presentaron una mejor definición de las proteínas.

En todas las muestras obtenidas se observa que las proteínas más abundantes son las de 75, 30 y 25 kDa aproximadamente (flechas rojas).

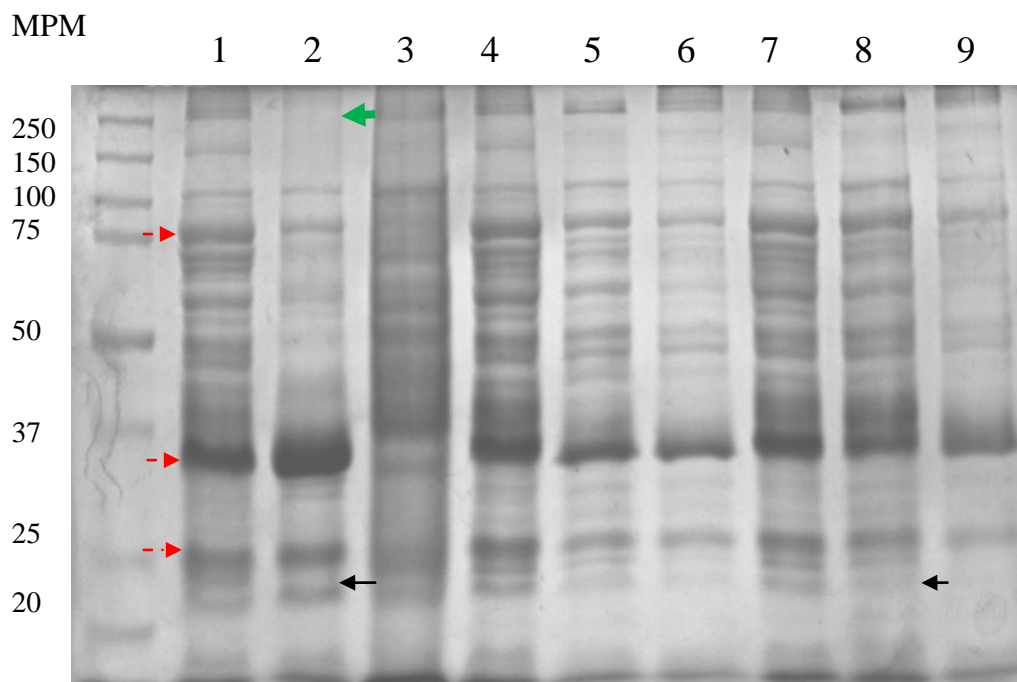


Figura 8. SDS PAGE 10%. Electroforesis de proteínas secretadas por *H. somni* cepa 16 al ser crecida en medio Brucella (carriles 1,2 y 3); TSB (carriles 4, 5 y 6) y BHI (carriles 7,8 y 9), empleando diferentes agentes precipitantes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (carriles 1,4 y 7); TCA (carriles 2,5 y 8) y MeOH (carriles 3,6 y 9). Todos los pozos fueron cargados con 15 μg de proteína.

Comparación de extractos totales y proteínas secretadas de *H. somni* cepa ATCC 700025 y cepa 16.

Con la finalidad de determinar si existían diferencias entre los patrones de extractos totales y proteínas secretadas, se corrieron geles SDS-PAGE al 10% con muestras de las cepas *H. somni* 16 y la cepa de referencia ATCC 700025, crecidas en BHI enriquecido con Tiamina monofosfatada, extracto de levadura y trisma base, para el caso de las proteínas secretadas se empleó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como agente precipitante (Fig. 9).

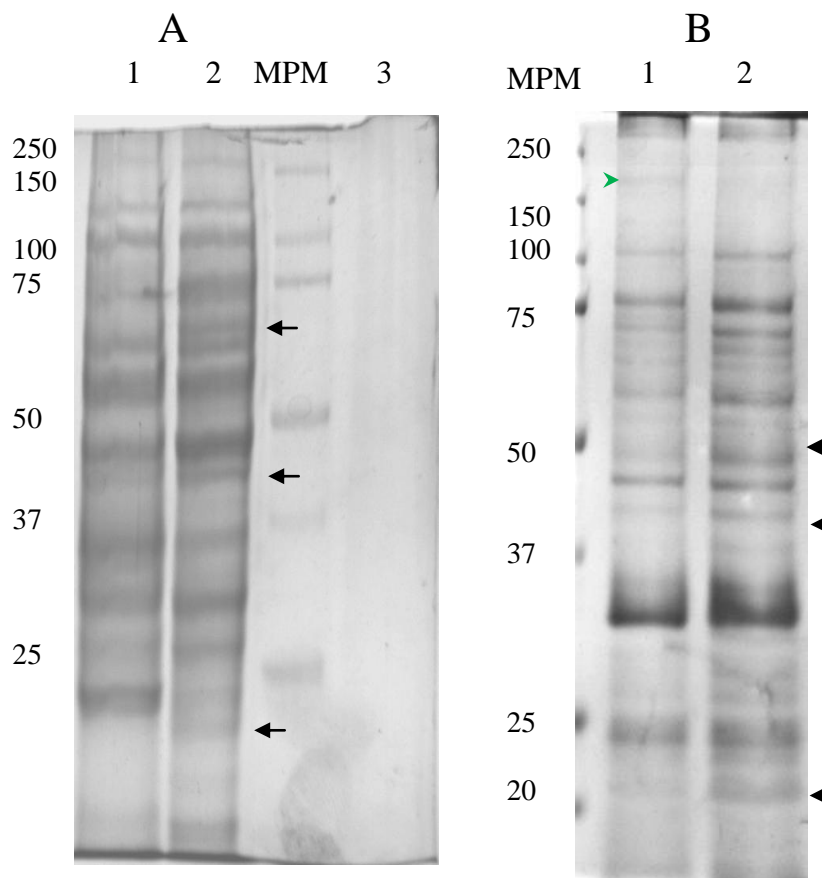


Figura 9. Patrones de extractos totales y proteínas secretadas.

A) Patrón de proteínas totales obtenidas de las cepas ATCC 700025 (carril 1) y la cepa 16 (carril 2); como control se empleó medio enriquecido sin inocular (carril 3). B) Proteínas secretadas por *H. somni* ATCC 700025 (carril 1) y por la cepa 16 (carril 2). La expresión diferencial de proteínas se señala mediante flechas negras. Todos los pozos fueron cargados con 15 μg de proteínas.

La cantidad de proteínas obtenidas en los extractos totales (Panel A) fue mayor que la de proteínas secretadas (Panel B). Se observan mínimas diferencias en la expresión de proteínas de ambas cepas.

Se observaron bandas de 20 y 65 kDa (flechas), así como también la sobreexpresión de una proteína de aproximadamente 40 kDa (Panel A), únicamente en la cepa aislada de caso clínico, mientras que el control negativo no presentó bandas, descartándose por ello la presencia de proteínas en el medio enriquecido (carril 3).

Únicamente se observó una sobreexpresión de proteínas en la cepa 16 (Panel B, carril 2), esto es proteínas secretadas de 20, 40 y 50 kDa aproximadamente (cabezas de flecha). Para la cepa de referencia (carril 1), solamente se presentó una expresión diferencial de una proteína menor a los 250 kDa (flecha verde).

Ensayos de Actividad Proteolítica.

Se evaluó la posible actividad proteolítica de las dos cepas de *H. somni*. Tanto la cepa ATCC 700025 como la cepa 16, mostraron una proteasa de un peso aproximado de 60 kDa; sin embargo, la cepa de caso clínico presentó una actividad proteolítica de mayor intensidad (figura 10).



Figura 10. Determinación de la actividad proteolítica de las cepas ATCC 700025 y 16 de *H. somni*.

Gel SDS Page 10% copolimerizado con 0.01% de gelatina de porcino.

La cepa ATCC 700025 de *H. somni* (carril 1), y la cepa 16 (carril 2) fueron crecidas en BHI. En ambos casos se utilizó 70% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como agente precipitante. En cada pozo se cargaron 15 μg de proteína.

Debido a las mínimas diferencias en los patrones de proteínas de ambas cepas y al hecho de que las dos poseen actividad proteolítica, decidimos trabajar únicamente con la cepa 16 que presentó una actividad proteolítica más evidente.

Degradación de Gelatina de Porcino.

La actividad proteolítica de las proteínas secretadas por *H. somni*, se evidenció mediante el corrimiento electroforético de las muestras en un gel SDS-PAGE 10% copolimerizado con gelatina de porcino al 0.01%, en el que se observó que las proteasas secretadas por este microorganismo en los diferentes medios de cultivo (BHI, Brucella y TSB) y precipitadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, poseían la capacidad de degradar el sustrato. En los tres medios se obtuvo una banda única de 60 kDa aproximadamente (figura 11).

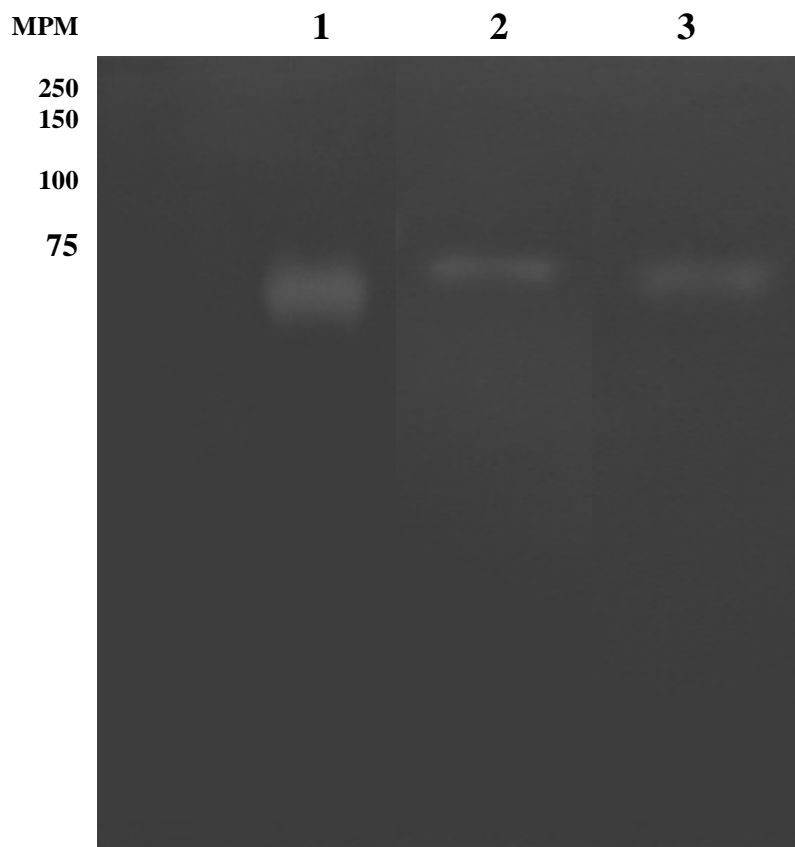


Figura 11. Gel SDS Page 10% copolimerizado con 0.01% de gelatina de porcino. *H. somni* 16 crecida en BHI (carril 1), Brucella (carril 2) o TSB (carril 3). Las proteínas secretadas se precipitaron con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70%. Todos los pozos fueron cargados con 15 μg de proteína.

La actividad proteolítica es más evidente en la muestra proveniente del medio BHI (carril 1), por esta razón, las proteínas secretadas utilizadas en la caracterización

de esta proteasa, se obtuvieron a partir de cultivos de *H. somni* crecidos en este medio.

Efectos de la Temperatura en la actividad de la Proteasa.

Para determinar la termoestabilidad de la proteasa, las muestras de *H. somni* fueron sometidas a diferentes temperaturas de incubación (40, 50, 60, 70 y 80°C) durante 10 minutos antes del corrimiento electroforético en un gel SDS-PAGE copolimerizado con gelatina de porcino al 0.01% (figura 12).

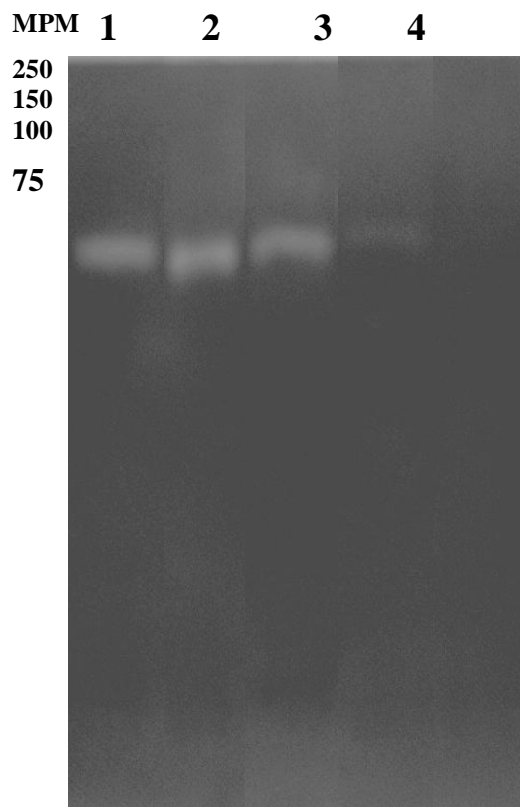


Figura 12. Efecto de la temperatura en la actividad proteolítica de *H. somni*.

Gel SDS-PAGE al 10% copolimerizado con gelatina de porcino al 0.01%. Las muestras fueron incubadas a diferentes temperaturas; 40°C (carril 1), 50°C (carril 2), 60°C (carril 3), 70°C (carril 4), 80 °C (carril 5) durante 10 minutos. El gel se incubó con Tris-HCl pH 7.0. Todos los pozos fueron cargados con 15 µg de proteína.

En el gel se observó que la proteasa permanece estable desde los 40 hasta los 60°C (carriles 1-3), disminuyendo su actividad a los 70 °C (carril 4) e inhibiéndose por completo a los 80°C (carril 5).

Efecto de diferentes pHs en la actividad proteolítica.

Para determinar el efecto del pH sobre la actividad proteolítica, se realizó un ensayo de degradación de sustrato en un gel SDS-PAGE al 10% copolimerizado con gelatina de porcino, después del corrimiento electroforético el gel se incubó durante 12 horas con amortiguador de activación a diferentes pHs (Tabla 4).

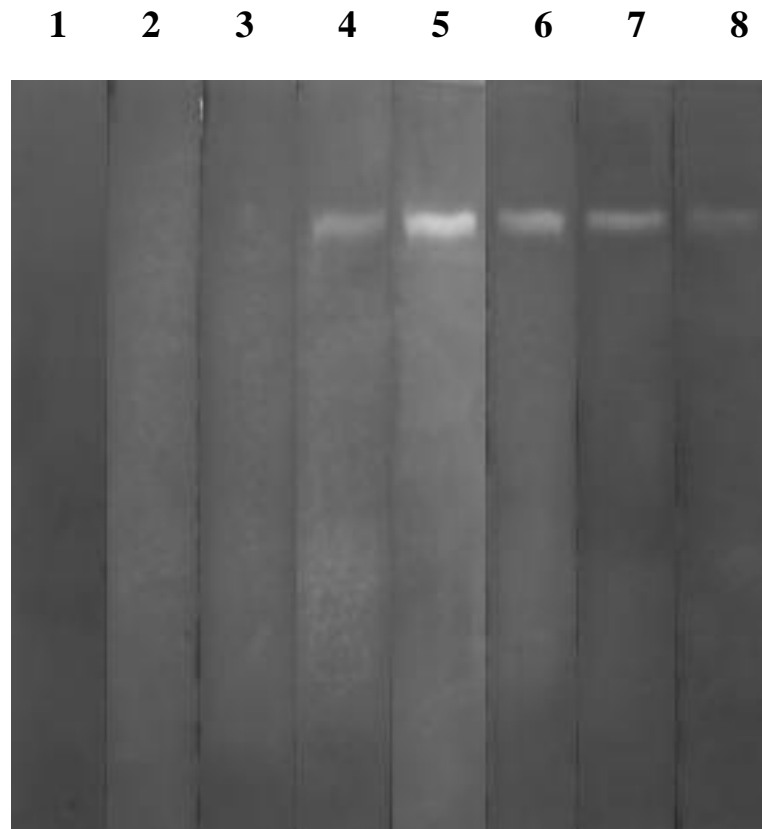


Figura 13. Efecto del pH en la actividad proteolítica de *H. somni*.
Gel SDS-PAGE al 10% copolimerizado con gelatina de porcino al 0.01%. Las muestras fueron incubadas en presencia de buffer de activación acetato-ácido acético (carriles 1, 2, 3, 4) o Tris-HCl (carriles 5, 6, 7, 8) durante 12 horas. Se muestra la actividad proteolítica de las muestras a pH 3 (carril1); 4 (carril 2); 5 (carril 3); 6 (carril 4); 7 (carril 5); 8 (carril 6); 9 (carril 7); 10 (carril 8). Todos los pozos fueron cargados con 15 µg de proteína.

Las proteínas secretadas por la cepa 16 degradaron el sustrato en un amplio rango de pH (Figura 13), desde 6 (carril 4), hasta 9 (carril 7), observándose una óptima actividad proteolítica a pH 7 (carril 5). Se observó una disminución considerable a pH de 10 (carril 8).

Determinación del Tipo de proteasa.

Con el objetivo de identificar el tipo de proteasa secretada por *H. somni*, se realizó un ensayo de inhibición de la actividad proteolítica empleando diferentes inhibidores de proteasas.

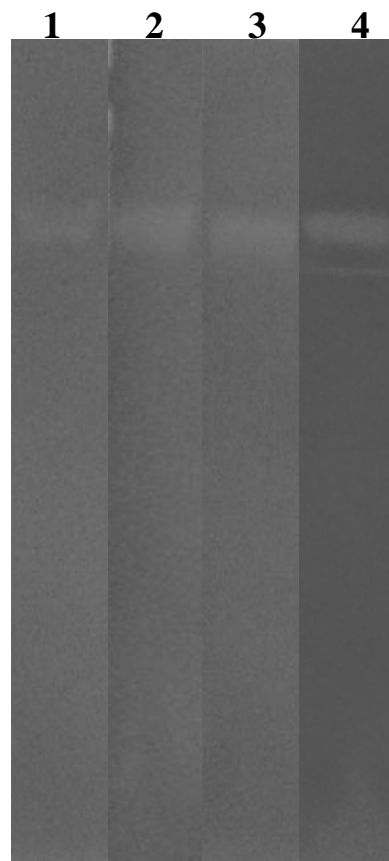


Figura 14. Efecto de diferentes inhibidores en la actividad proteolítica de *H. somni*.

Gel SDS-PAGE al 10% copolimerizado con gelatina de porcino al 0.01%. El gel fue incubado con Tris-HCl pH 7.0 en presencia de diferentes inhibidores de proteasas: **(1)** EDTA 10mM **(2)** NEM 5mM, **(3)** PMSF 2mM, **(4)** Control sin inhibidor. Todos los pozos fueron cargados con 15 μ g de proteína.

La actividad proteolítica disminuyó sólo cuando la muestra fue incubada en presencia de 10 mM de EDTA (figura 14, carril 1), los 2 inhibidores restantes (serin y cisteín proteasa, carril 2 y 3 respectivamente), no afectaron la actividad de la peptidasa. Estos resultados sugieren que la actividad proteolítica es producida por una metaloproteasa secretada al medio por esta bacteria.

Diferentes concentraciones de EDTA.

Debido a que la actividad proteolítica de *H. somni* disminuyó al incubar la muestra con EDTA, se realizó una prueba empleando diferentes concentraciones de este inhibidor: 10 mM, 20 mM y 30mM (figura 15).

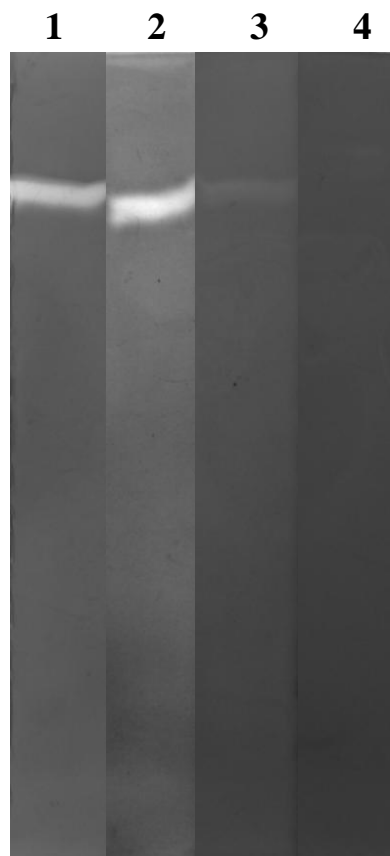


Figura 15. Efecto de diferentes concentraciones de EDTA sobre la actividad proteolítica de *H. somni*. Gel SDS-PAGE al 10% copolimerizado con gelatina de porcino al 0.01. Las muestras fueron incubadas 30 minutos antes del corrimiento electroforético con Tris-HCl pH 7.0 en presencia de concentraciones de EDTA: 10mM (carril 2), 20mM (carril 3), 30 mM (carril 4) y control sin inhibidor (carril 1). Todos los pozos fueron cargados con 15 µg de proteína.

Como se observa en la figura 15, la actividad proteolítica se expresa en ausencia de EDTA (carril 1), sin embargo esta actividad se ve disminuida en una concentración de 10 mM (carril 2), es poco visible cuando la proteína es incubada con 20 mM de EDTA y se inhibe completamente cuando la proteína es incubada con 30 mM del mismo inhibidor (carril 3).

Degradación de Caseína como Sustrato.

Luego de realizar la caracterización bioquímica de la metaloproteasa secretada por *H. somni*, se evaluó su capacidad de degradar diferentes sustratos, para ello se utilizaron nuevamente muestras precipitadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, provenientes de diferentes medios de cultivo (BHI, Brucella, TSB).

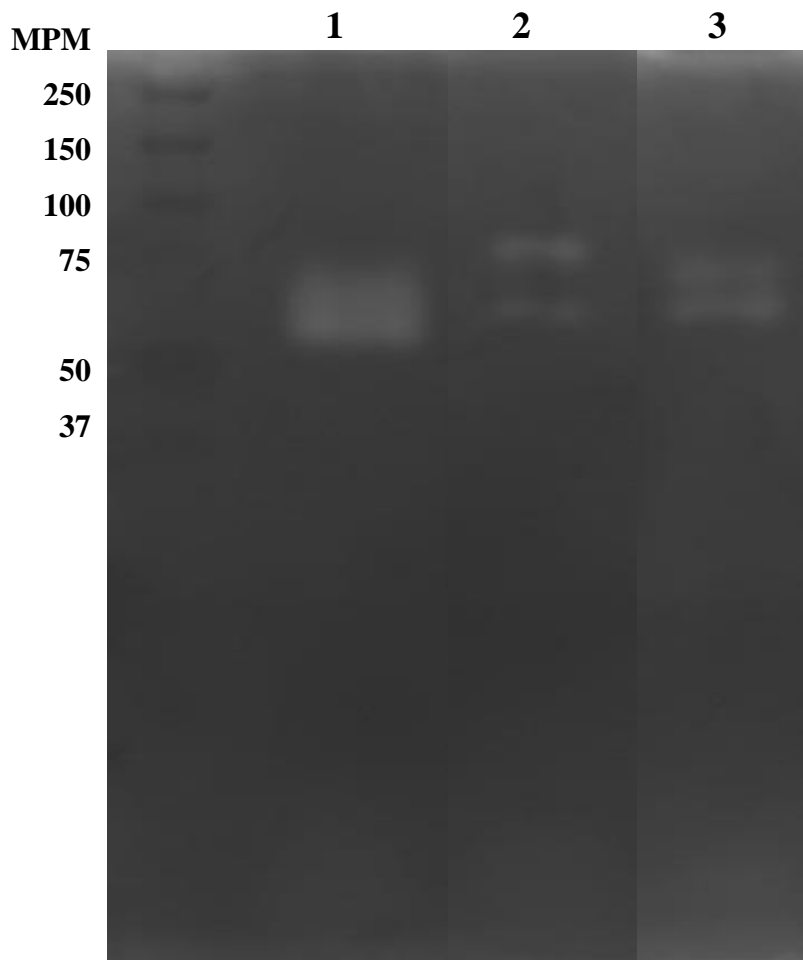


Figura 16. Gel SDS-PAGE al 10% copolimerizado con 0.1% de caseína.

H. somni fue crecida en diferentes medios; BHI (carril 1), Brucella (carril 2) y TSB (carril 3). Todos los pozos fueron cargados con 15 μg de proteína.

Como se observa en la figura 16, la peptidasa secretada por este microorganismo fue capaz de degradar caseína; sin embargo, a diferencia de los resultados anteriores, se presentaron dos bandas de un peso de entre 60 y 75 kDa, estas bandas fueron más evidentes en las muestras provenientes del medio Brucella (carril 2).

Degradación de hemoglobina de equino.

Por otro lado, cuando el gel SDS - PAGE fue copolimerizado con hemoglobina de equino (Figura 17) la actividad proteolítica fue poco visible, observándose nuevamente un par de bandas (flechas) cuyo peso molecular fue menor a los 50 kDa, lo cual difiere con los resultados obtenidos en los ensayos previos en los que se usó caseína como sustrato.

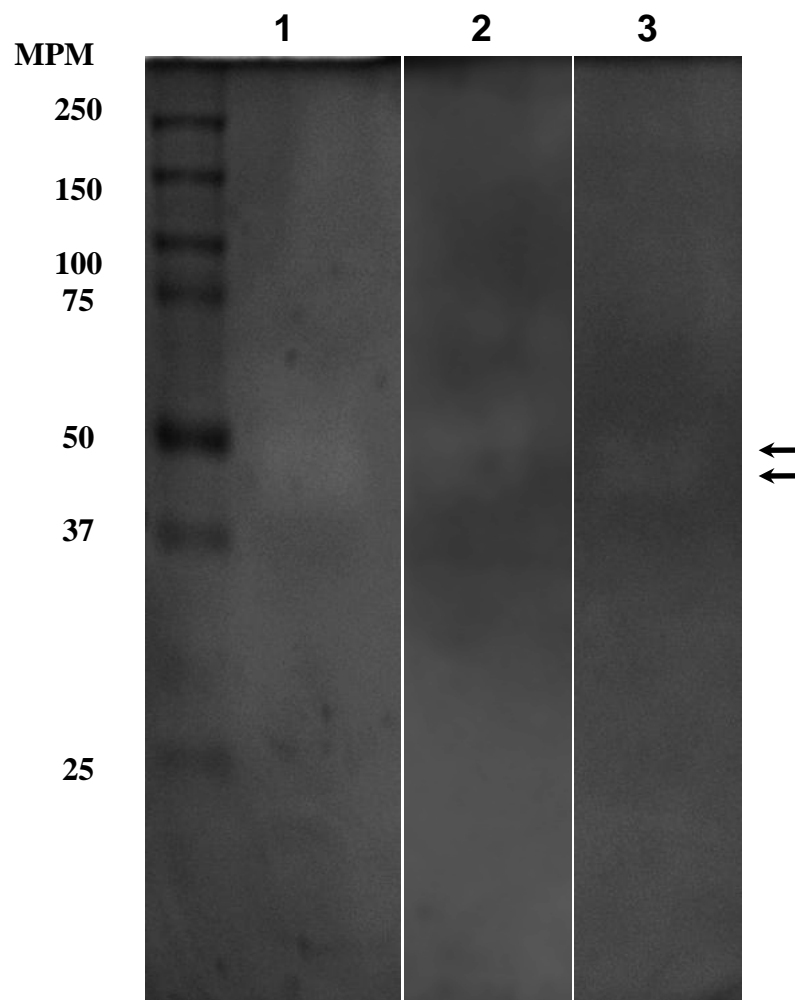


Figura 17. Gel SDS-PAGE al 10% copolimerizado con 0.05% de hemoglobina de equino. *H. somni* fue crecido en diferentes medios de cultivo BHI (carril 1), Brucella (carril 2) y TSB (carril 3). Todos los pozos fueron cargados con 15 µg de proteína.

Nuevamente la degradación del sustrato se hizo más evidente en la muestra proveniente del medio Brucella.

Degradación de hemoglobina de bovino.

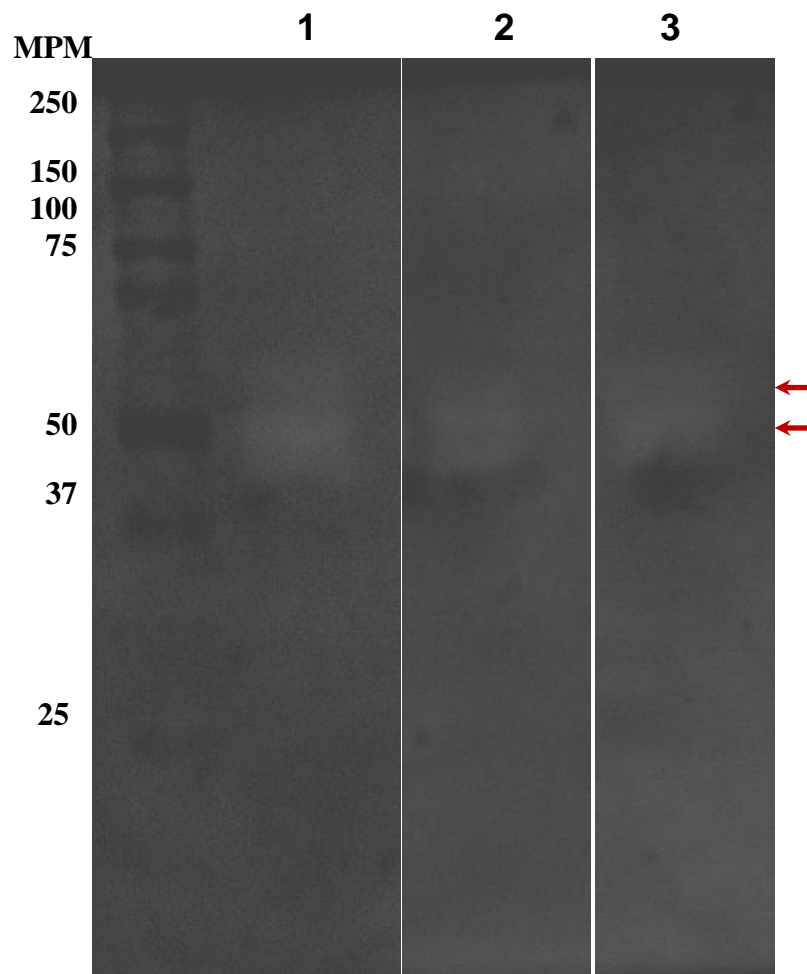


Figura 18. Gel SDS-PAGE al 10% copolimerizado con 0.05% de hemoglobina de bovino. *H. somni* fue crecido en diferentes medios de cultivo BHI (carril 1), Brucella (carril 2) y TSB (carril 3). Todos los pozos fueron cargados con 15 μ g de proteína

Resultados semejantes a los anteriores (figura 17) fueron obtenidos al emplear hemoglobina de equino como sustrato; sin embargo la actividad proteolítica fue más evidente. Se observa la presencia de un par de bandas (flechas), de un peso molecular próximo a los 50 kDa. Las proteínas secretadas provenientes de medio BHI y TSB fueron menos evidentes.

Degradación de Fibrinógeno.

Se realizó un ensayo para determinar la capacidad de las proteínas secretadas por *H. somni* para degradar fibrinógeno mediante un gel SDS-PAGE al 10%.

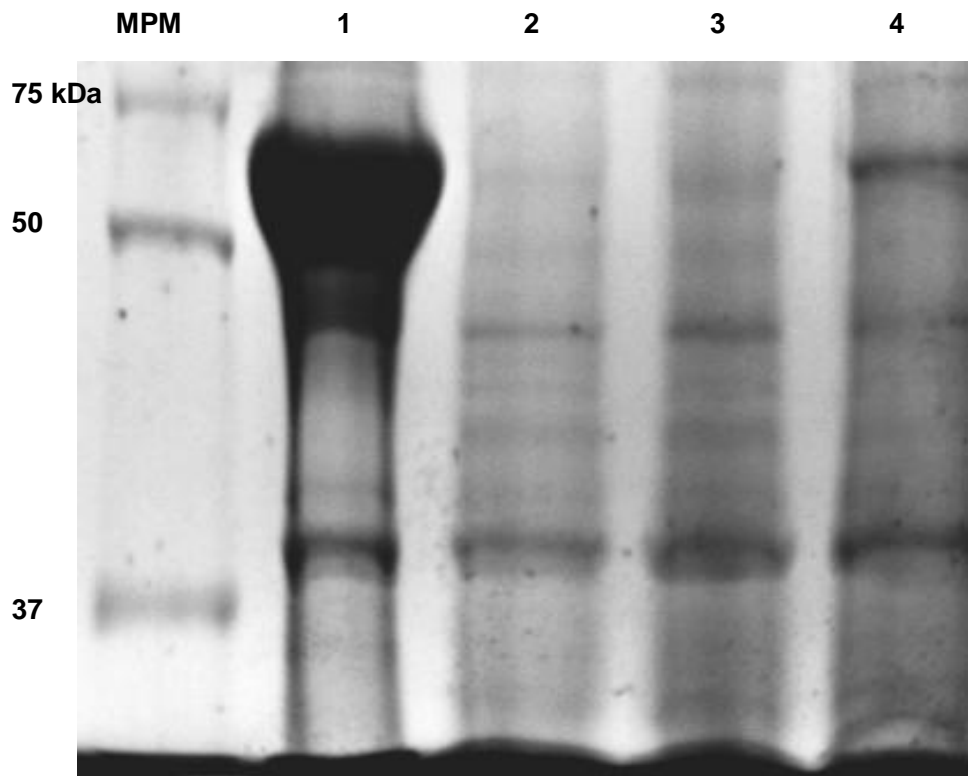


Figura 19. Degradación de fibrinógeno.

Gel SDS-PAGE al 10%. Las proteínas secretadas por la cepa 16 crecida en medio BHI, fueron obtenidas empleando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como agente precipitante, posteriormente fueron incubadas (15 μg de proteína) a 37 °C con 15 μg de fibrinógeno, durante 12 h (carril 2), 24 h (carril 3), 48 h (carril 4). Como control se empleó fibrinógeno (carril 1) (15 μg) 48 h después de haber sido incubado a 37 °C.

Como se observa en la figura 19, las proteínas extracelulares tienen la capacidad de degradar fibrinógeno después de 12, 24 y 48 horas de incubación a 37°C.

Los productos de esta degradación se observan en un peso molecular menor a los 50 kDa, a partir de las 12 horas (carril 2), mismos que se intensifican luego de 24 horas (carril 3), y son menos evidentes a las 48 horas (carril 4).

Posible hemaglutinina secretada por *H. somni*.

Tras someter las proteínas secretadas de *H. somni* a una cromatografía de intercambio iónico se obtuvieron diferentes fracciones, las cuales fueron sometidas a electroforesis en geles SDS-PAGE al 10%; la fracción obtenida en una concentración de 0.3 M de NaCl mostró una mejor resolución de dos bandas de aproximadamente 60 kDa (Figura 20 panel A) las cuales fueron reconocidas por un anticuerpo anti hemaglutinina de *A. paragallinarum*, un miembro de la familia *Pasteurellaceae* (Figura 20 panel B).

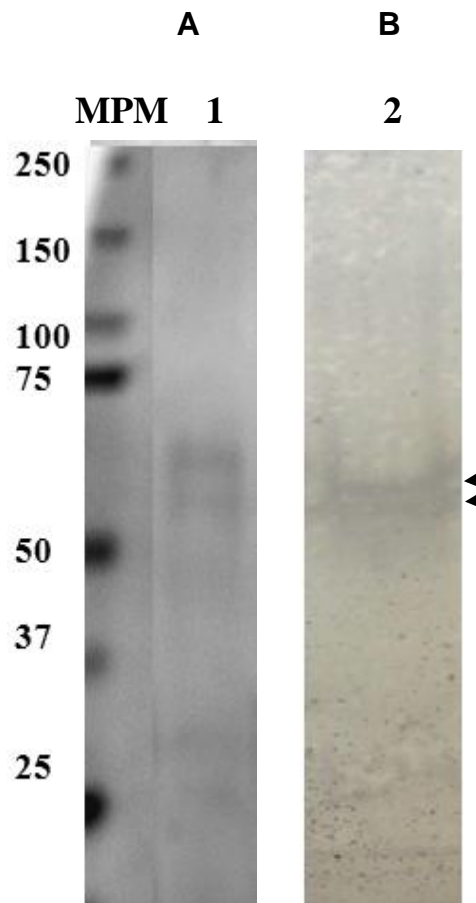


Figura 20. Posible Hemaglutinina secretada por *H. somni*.

A) Gel SDS-PAGE al 10% de la fracción obtenida en una concentración de 0.3 M de NaCl en una columna de intercambio iónico. B) Inmunoreconocimiento empleando un suero anti-hemaglutinina de *A. paragallinarum*.

Ensayos de inmunoreconocimiento.

Se determinó la concentración de anticuerpo con la que se obtenía un mejor inmunoreconocimiento. Para ello, un gel SDS-PAGE al 10% fue transferido a una membrana PVDF y posteriormente incubado con un suero de borrego inmunizado experimentalmente con *H. somni* y un suero del mismo borrego pre inmunizado a dos diluciones (1:2000, 1:5000) suplementados o no con leche para evaluar si ésta disminuía la presencia de falsos positivos. Los resultados se muestran en la figura 21.

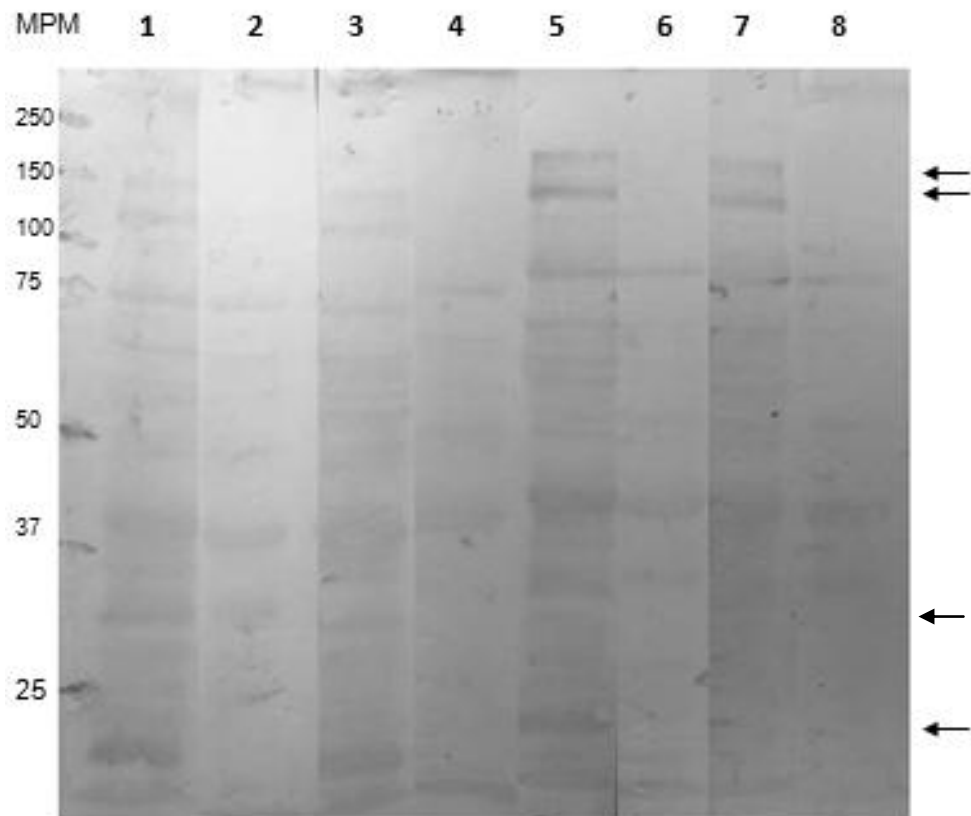


Figura 21. Western blot empleando diferentes concentraciones de anticuerpo.

Inmunoreconocimiento de proteínas secretadas por *H. somni* cepa 16 al ser incubadas con suero de borrego 1:2000 (carriles 1 y 2); 1:2000 suplementado con leche al 5% (carriles 3 y 4); 1:5000 (carriles 5 y 6) y 1:5000 suplementado con leche (carriles 7 y 8). En todos los casos los carriles pares corresponden a sueros de borregos inmunes, mientras que los pares corresponden a animales preinmunes.

Como se observa en la imagen, no existió diferencia en el inmunoreconocimiento al emplear suero suplementado con 5% de leche y suero sin suplemento; sin embargo, al emplear el suero a una concentración 1:5000 la intensidad de las

proteínas reconocidas fue mayor. Se observaron bandas de aproximadamente 150, 130, 30 y 25 kDa únicamente en el suero proveniente del borrego inmunizado con *H. somni* (flechas); sin embargo, el suero de borrego preinmune reconoció múltiples bandas en el rango de 25 a 75 kDa.

Se corrió un gel SDS PAGE al 10%, el cual fue posteriormente transferido a una membrana PVDF e incubado con suero de borrego inmune y preinmune, cargando 10 o 12 μg de proteína. Como se observa en la imagen 22, existen algunas diferencias (flechas) en el inmunoreconocimiento de ambos sueros, las cuales son similares a las observadas en la figura 21, no así entre las dos concentraciones de proteínas. Las principales diferencias se observan en las bandas de un peso molecular aproximado a los 250, 150, 130, 30 y 25 kDa (flechas).

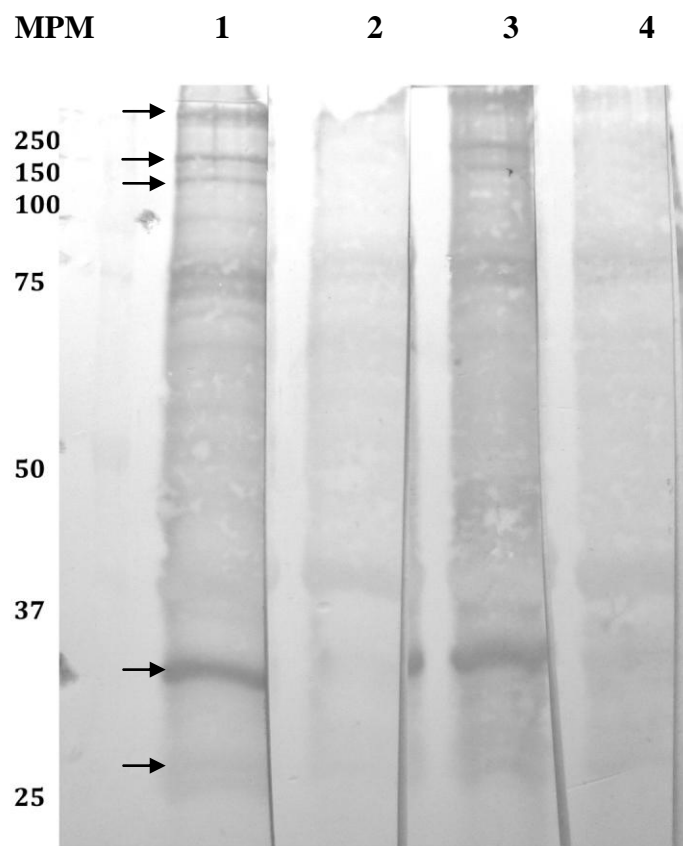


Figura 22. Western Blot empleando diferentes concentraciones de proteínas secretadas.

Inmunoreconocimiento de proteínas secretadas por *H. somni* cepa 16, tras ser incubadas en presencia de sueros de borrego inmunizados con *H. somni* (carriles nones) y preinmunizado (carriles pares). Se cargaron 10 μg (carriles 1 y 2) o 12 μg (carriles 3 y 4) de proteína. Las flechas indican las principales diferencias.

Discusión.

Las bacterias secretan sustancias al medio extracelular que cumplen numerosas funciones por ejemplo: pueden actuar como sustancias tóxicas (bacteriocinas), participar en la proteólisis de péptidos (proteasas), generar citotoxicidad (citotoxinas) o bien funcionar como señales en la comunicación bacteriana (autoinductores), entre otras (Komoriya *et al.*, 1999).

Se compararon las condiciones de obtención de proteínas secretadas por *H. somni* al ser crecida en distintos medios, mediante el uso de diferentes agentes precipitantes. Se observaron múltiples bandas de entre 20 y 250 kDa, presentándose una mayor definición de las proteínas secretadas al utilizar el medio BHI. Estos resultados son similares a los obtenidos por Mena en el 2004, quien al emplear los medios TSB y BHI para el crecimiento de *Haemophilus paragallinarum* y usando como agente precipitante $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70%, MeOH y Etanol, no encontró diferencias aparentes en el patrón de proteínas secretadas por este microorganismo.

Se observó que las proteínas secretadas por *H. somni* presentaron actividad proteolítica en diferentes pesos moleculares, dependiendo del sustrato utilizado. Esto puede deberse a que *H. somni* es capaz de producir más de una proteasa o bien, que estas bandas forman parte de un oligómero de mayor peso molecular, como se describió para *A. pleuropneumoniae* (Negrete-Abascal *et al.*, 1998, García-González *et al.*, 2004) y *Gallibacterium anatis* (García-Gómez *et al.*, 2005).

Tanto la cepa de *H. somni* 16 como la cepa ATCC 700025 fueron proteasas capaces de degradar gelatina de porcino. Se observó una diferencia en la intensidad de la degradación, siendo la cepa 16 la que degradó el sustrato de forma más eficiente (Figura 10). La disminución de la actividad proteolítica de la cepa ATCC 700025 puede deberse a sus múltiples resiembras en el laboratorio, como ha sido descrito para las proteasas secretadas por *A. pleuropneumoniae* (Negrete- Abascal *et al.*, 1994, Negrete- Abascal *et al.*, 1999). Esta diferencia

puede atribuirse también a la composición del medio de cultivo y/o a las condiciones de crecimiento (Fedorka-Cray *et al.*, 1990).

En el presente estudio se demostró la capacidad de las proteínas secretadas por *H. somni* de degradar diferentes sustratos, siendo mínima la degradación al emplear hemoglobina, lo cual coincide con los resultados obtenidos en 1994 por Negrete - Abascal *et al.*, para el serotipo 1 de *A. Pleuropneumoniae*, cuyas proteínas secretadas también tuvieron la capacidad de degradar distintos sustratos, sin embargo, esta degradación disminuyó al emplear hemoglobina de porcino, humano y bovino tal como lo reportado para *H. somni* en este trabajo.

El amplio rango de pH (6-9) en el que se mantiene activa la proteasa secretada por *H. somni*, es comparable a lo referido para la proteasa de *P. multocida* clonada en *E. coli*, (pH 5-10) (Luna, 2003), la metaloproteasa secretada por *A. suis* (pH 5-9) (Negrete-Abascal *et al.*, 2004) la metaloproteasa de *G. anatis* (pH 6-10) (García-Gómez *et al.*, 2005) y las identificadas en *A. pleuropneumoniae* (pH 5-9) (Negrete-Abascal *et al.*, 1998) y *H. paragallinarum* (*A. paragallinarum*) (pH 4-9) (Rivero *et al.*, 2005), todos miembros de la familia *Pasteurellaceae*.

La actividad de la metaloproteasa a diferentes valores de pH podría proporcionar al microorganismo la habilidad de sobrevivir en diferentes condiciones ambientales; debido a que la proteasa secretada por *H. somni* se mantiene activa en un amplio rango de pH, podemos sugerir que esta constituye un factor de virulencia secretado para sobrevivir evadiendo la respuesta inmune y posiblemente invadir tejidos del hospedero, como ocurre con otros microorganismos.

Dado que la actividad proteolítica fue inhibida por EDTA y se mantuvo activa en presencia de inhibidores de serín y cisteín proteasas, y ya que el EDTA es un agente quelante que secuestra el ión metálico del sitio catalítico, este resultado sugiere que la enzima secretada es una metaloproteasa.

La actividad de la metaloproteasa caracterizada en este estudio permaneció estable a una concentración de 10 mM de EDTA, disminuyó en a 20 mM, y fue inhibida totalmente a una concentración de 30 mM. Esto es consistente con lo reportado para la cepa 249101 de *G. anatis*, un miembro de la familia *Pasteurellaceae*, cuya metaloproteasa fue inhibida únicamente a concentraciones de 20 y 30 mM de EDTA (García- Gómez *et al.*, 2005).

El hecho de que la metaloproteasa secretada por *H. somni* requiera de una concentración mayor de inhibidor para su inactivación, puede deberse a una estrecha asociación entre la proteasa y los iones metálicos, a diferencia de otras metaloproteasas bacterianas que son inhibidas a bajas concentraciones de EDTA; por ejemplo, la metaloproteasa de la cepa 250900 de *G. anatis*, cuya inactivación se presenta con 10 mM del agente quelante (García-Gómez *et al* 2005).

En cuanto a la estabilidad térmica, las pruebas de temperatura realizadas mostraron que la actividad proteolítica se mantuvo estable después de calentar las muestras por 10 minutos a 40°, 50° o 60°C, disminuyendo a 70°C e inhibiéndose por completo a los 80°C. Este comportamiento es idéntico al de la metaloproteasa secretada por *H. paragallinarum* (Rivero *et al.*, 2005) y guarda similitud con la termoestabilidad reportada para la proteasa de *A. pleuropneumoniae* (Negrete-Abascal *et al.*, 1998).

En este trabajo se reporta la presencia de un grupo de bandas de aproximadamente, 60 kDa, obtenidas mediante cromatografía de intercambio iónico podrían corresponder a una hemaglutinina secretada. Özcengiz *et al.*, en el 2004 purificaron mediante la misma técnica una hemaglutinina filamentosa de *Bordetella pertusis*. Esta adhesina secretada es responsable de la unión de la bacteria a varios tipos de células huésped *in vitro* (Locht, 2007) así como de la formación de agregados bacterianos por relaciones homotípicas (Menotzzi *et al.*, 1994). También en la bacteria *Xylella fastidiosa* (un patógeno de plantas), se ha descrito una hemaglutinina secretada. No existen reportes semejantes en la familia

Pasteurellaceae, ya que los estudios efectuados únicamente describen la presencia de hemaglutininas asociadas a membrana, tal es el caso de la reportada para *H. paragallinarum*, una proteína de aproximadamente 39 kDa con capacidad de hemaglutinar eritrocitos de pollo. También se ha mostrado que diferentes cepas de *G. anatis* poseen la capacidad de hemaglutinar eritrocitos de pollos de engorda, gallinas de postura, codorniz, conejo y cerdo.

Las hemaglutininas son de gran importancia para los patógenos bacterianos, tal es el caso de *H. paragallinarum* cuya hemaglutinina media la adhesión a las células epiteliales de la tráquea, facilitando la colonización e infección (Yamaguchi *et al.*, 1993). Dicha proteína además se utiliza para su serotipificación (Soriano-Vargas, 2000).

Las proteínas de aproximadamente 60 kDa obtenidas en este trabajo fueron reconocidas por un anticuerpo anti hemaglutinina de *A. paragallinarum*, esto sugiere que dichas proteínas podrían ser hemaglutininas, sin embargo la identidad de estas no fue determinada en este estudio.

El fibrinógeno es la principal proteína estructural de la sangre, responsable de la formación de coágulos (Bello. 2000), es sintetizado principalmente en el hígado bajo condiciones normales: sin embargo, también se sintetiza bajo condiciones inflamatorias y de estrés en el pulmón y en el intestino, como en el caso de las infecciones sistémicas. Esta regulación de la expresión del fibrinógeno indica que esta proteína participa en la defensa del hospedero contra las infecciones (Rivera *et al.*, 2007). Las proteínas secretadas por *H. somni* tiene la capacidad de degradar fibrinógeno después de ser incubadas por 12, 24 y 48 h a 37 °C. Estudios realizados con *A. paragallinarum*, *G. anatis*, y *A. suis*, miembros de la familia *Pasteurellaceae*, demostraron que todas estas bacterias tienen esta misma actividad degradativa después de 24 horas (López, 2011).

El reconocimiento por sueros de borrego inmunizado con *H. somni* de múltiples proteínas secretadas podría sugerir la capacidad de estas proteínas de producir una respuesta inmune en el hospedero. El reconocimiento de varias bandas por el

suero de borrego preinmune puede deberse a que el animal posiblemente estuvo en contacto con otros microorganismos de la familia *Pasteurellaceae*. Datos similares fueron reportados por Negrete-Abascal en 1999, al emplear sueros preinmunes contra *P. multocida* o *A. pleuropneumoniae*.

En *H. somni* las proteínas secretadas así como su capacidad de producir enfermedad, no están totalmente comprendidas. Los resultados obtenidos en este estudio, permiten una mayor comprensión sobre los mecanismos de patogenicidad y evasión de la respuesta inmune por parte de este microorganismo, los cuales podrían estar relacionados con su capacidad de colonizar diferentes tejidos y hospederos.

Conclusiones.

El medio BHI suplementado con 0.01% de tiamina monofosfatada, 0.1% de Trisma-base y 0.5% de extracto de levadura, fue la mejor opción para el óptimo crecimiento de *H. somni* y el Sulfato de Amonio al 70% fue el mejor agente precipitante para la obtención de proteínas secretadas de este microorganismo.

Los patrones de extractos totales y proteínas secretadas de las cepas de *H. somni* ATCC 700025 y 16 no presentaron diferencias al ser corridos en geles SDS-PAGE al 10%.

Se observaron en *H. somni* cinco proteínas antigénicas de 25,30, 100, 150 y 250 kDa, las cuales fueron reconocidas por sueros de borregos inmunes, no así por sueros de animales pre-inmunes.

Las proteínas secretadas por *H. somni* son capaces de degradar fibrinógeno luego de 12h de incubación a 37° C.

Las cepas de *H. somni* ATCC 700025 y 16 presentaron actividad proteolítica, siendo ésta más evidente en la cepa aislada de caso clínico.

La proteasa secretada por *H. somni* es capaz de degradar gelatina de porcino, caseína, hemoglobina de bovino y en menor grado hemoglobina de equino; es termoestable desde los 40 hasta los 70 °C y presenta actividad en un rango de pH de 6 a 9.

La actividad proteolítica es estable en presencia de inhibidores de serín y cisteín proteasa, pero disminuye en presencia de 10 mM EDTA y se inactiva completamente con 30 mM EDTA, lo que sugiere que se trata de una metaloproteasa.

Un grupo de proteínas de aproximadamente 60 kDa fue reconocido por anticuerpos anti hemaglutinina de *A. paragallinarum*, lo que sugiere que podría ser una hemaglutinina.

Perspectivas.

Determinar si las proteínas secretadas tienen la capacidad de captar fibrinógeno.

Determinar la capacidad de hemaglutinación

Comprobar la identidad de la posible hemaglutinina secretada, mediante secuenciación.

Determinar la identidad de la metaloproteasa mediante análisis MALDI-TOF.

Identificar la función e identidad de las proteínas reconocidas por sueros de borrego inmune.

Bibliografía:

- Abdallah A., Di Giuseppe P., Cox J., Luirink J., Vandebroucke-Grauls C., Appelmek B. and W. Bitter. 2007. Type VII secretion- mycobacteria show the way. *Nature Rev Microbiol.* 5:883-891.
- Aguilar F. 2006 Estudio de los perfiles de proteínas totales en aislamientos de *Histophilus somni* y su reconocimiento antigénico. Tesis. Doctorado en Ciencias Biológicas UNAM, Facultad de Ciencias.
- Aguilar RF., Trigo TE., Jaramillo ML., and PH. Sanchez-Mejorada. 1986. Aislamiento de *Haemophilus somnus* a partir de pulmones neumónicos de bovinos. *Tec Pec Méx.* 52:67-73.
- Ames T.R. 1987. Neurologic disease caused by *Haemophilus somnus*. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 3:61-73.
- Angen O., Ahrens P., Kuhnert P., Christensen H. and R. Mutters. 2003. Proposal of *Histophilus somni* gen. nov., sp. nov for the three species incertae sedis '*Haemophilus somnus*', '*Haemophilus agni*' and '*Histophilus ovis*'. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53: 1449–1456.
- Andrews, JJ, Anderson, TD, Slife, LN and Stevenson, GW (1985). Microscopic lesions associated with the isolation of *Haemophilus somnus* from pneumonic bovine lungs. *Vet Pathol.* 22: 131–136.
- Bahrami F., Ekins A. and D. Niven. 2003. Iron acquisition by *Actinobacillus suis*: Identification and characterization of transferrin receptor proteins and encoding genes. *Vet Microbiol.* 94: 79-92.

- Bastida-Corcuera F. D., Nielsen K. H. and L. B. Corbeil. 1999. Binding of bovine IgG2a and IgG2b allotypes to protein A, protein G, and *Haemophilus somnus* IgBPs. *Vet Immunol Immunopathol.* 71: 143–149.

- Bello A. 2000. *Hematología básica.* Prado 3 ed. Mexico, D.F. p. 377.

- Biberstein EL. 1981. “*Haemophilus somnus*” and “*Haemophilus agni*”
In: Kilian M, Frederiksen W, Biberstein EL, eds. *Haemophilus, Pasteurella*
and *Actinobacillus.* San Diego, California: Academic Press, 125–132.

- Biberstein, E and D. Hirsh. 1999. *Actinobacillus* In: *Veterinary microbiology.* D. Hirsh and Y. Zee. Blackwell Science. EUA.

- Binkhorst G.J., Henricks P.A.J., Ingh T.S.G.A.M., and R. F.P. Hajer. 1990. The effect of stress on host defense system on lung damage in calves experimentally infected with *Pasteurella haemolytica* type A1. *J Vet Med Ass.* 37: 525-536

- Bisgaard M. 1993. Ecology and significance of *Pasteurellaceae* in animals. *Zentralbl Bakteriol.* 279: 7–26

- Bonaventura M., Lee E., De Salle R and P. Planet. 2010. A whole-genome phylogeny of the family *Pasteurellaceae.* *Mol Phylogenet Evol.* 54(3):950-956.

- Bosch M., Tarragó R., Garrido M.E., Campoy S., Fernández A.R., Pérez A.M., Badiola I., and Barbé J, 2001 Expression of the *Pasteurella multocida* ompH gene is negatively regulated by the Fur protein. *FEMS Microbiol Lett.* 35-40.

- Boyce D. J., and Adler B. 2000 The capsule is a virulent determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infect Immun.* 68: 3463-3468.

- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Busch C., Orth J., Djouder N., and K. Aktories. 2001. Biological activity of a C-terminal fragment of *Pasteurella multocida* toxin. *Infect Immun.* 69: 3628-3643.
- Christensen H., Bisgaard M., Bojesen A.M., Mutters R. and J.E. Olsen. 2003. Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus salpingitidis* or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53: 275-287.
- Cole S.P., Guiney D.G., and L.B. Corbeil. 1992. Two linked genes for outer membrane proteins are absent in four non-disease strain of *Haemophilus somnus*. *Mol Microbiol.* 6: 1895-1902.
- Corbeil L. B., Woodward W., Ward A.C., Mickelsen W.D., and L. Paisley. 1985. Bacterial interactions in bovine respiratory and reproductive infections. *J Clin Microbiol.* 21(5):803-807.
- Corbeil L. B., Gogolewski R. P., Stephens L. R. and T. J. Inzana 1995. *Haemophilus somnus*: Antigen analysis and immune responses. In: Donachie W, F. A Lainson and J. C Hodgson (eds) *Haemophilus, Actinobacillus, and Pasteurella*. New York, NY: Plenum Press, pp. 63–73.
- Corbeil L. B. 2007. *Histophilus somni* host–parasite relationships. *An Health Res Rev.* 8(2): 151–160.
- Cornelissen C.N. and P.F. Sparling .1994. Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. *Mol Microbiol.* 14: 843–850.

- Czuprynski C.J. and K. Sample. 1990. Interactions of *Haemophilus-Actinobacillus-Pasteurella* bacteria with phagocytic cells. Can J Vet Res. 54:S36-S40.

- Descarga CO., Piscitelli HG., Zielinski GC. and AL. Cipolla. 2002 Thromboembolic meningoencephalitis due to *Haemophilus somnus* in feedlot cattle in Argentina, Vet Rec. 150: 817.

- Donlan RM. and JW. Costerton. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 15:167-93.

- Doolittle R. 2010. Fibrinogen and Fibrin. In: *Enciclopedia of life science* Jhon Wiley and Sons, Ltd: Chichester.

- Dyer N. W, 2001. *Haemophilus somnus* bronchopneumonia in American bison (*Bison bison*). J Vet Diagn Invest. 13, 419-421.

- Ekins A., Bahrami F., Sijercic A., Maret D. and D. F. Niven. 2004. *Haemophilus somnus* possess two systems for acquisition of transferrin-bound iron. J Bacteriol. 186: 4407-4411.

- Enríquez I., Godínez R., Martínez J., de la Garza M., Hamer R. y A. Guerrero. 2003. Adhesión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a componentes de matriz extracelular de cerdo. Cienc Vet. 9: 269-293.

- Estabrook M.M., Griffiss J.M., and G.A. Jarvis. 1997. Sialylation of *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide inhibits serum bactericidal activity by masking lacto-N-neotetraose. Infect Immun. 65: 4436–4444

- Fedorka-Cray PJ. and P. Srikumaran.1990. Comparison of eight growth media for cytotoxin and haemolysin production by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, 5 and 7. 90 the Annu Meet Amc Soc Microbiol. 38.

- Finlay B.B. and S. Falcow. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiol Mol Biol Rev 61: 136-169.

- García-Gómez E., Vaca S., Pérez-Méndez A., Ibarra-Caballero J., Pérez-Márquez V., Tenorio V.R. and E. Negrete-Abascal. 2005. *Gallibacterium anatis*-secreted metallo proteases degrade chicken IgG. Avian Pathol. 34: 426-429.
- García-González, O., García R.M., de la Garza M., Vaca S., Paniagua G.L., Mejía, R., Tenorio V.R. and E. Negrete Abascal. 2004. *Actinobacillus pleuropneumoniae* metalloprotease: cloning and in vivo expression. FEMS Microbiol Lett. 234:81-86.
- González-Pedrajo B. and G. Dreyfus. 2003. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. En Mensaje Bioquímico. Vol. XXVII. Flores H. O., R. H Riveros, P. A Sosa, C. E. Vázquez (eds). México.
- Harris W., and D. Janzen. 1989. The *Haemophilus somnus* disease complex (Hemophilosis): A review. Can Vet J. 30: 816-822.
- Hubbard R.D., Kaeberle M. L., Roth J.A. and Y.W. Chiang. 1986. *Haemophilus somnus*-induced interference with bovine neutrophils function. Vet Microbiol. 12:77-85.
- Humphrey J. D., Little P. B., Barnum D. A., Doig P. A., Stephens L R. and J. Thorsen. 1982. Occurrence of *Haemophilus somnus* in bovine semen and in the prepuce of bulls and steers. Can J Comp Med. 46: 215-217.
- Humphrey JD., Little PB., Stephens LR., Barnum DA., Doig PA., Thorsen J. 1982. Prevalence and distribution of *Haemophilus somnus* in the male bovine reproductive tract. Am J Vet Res. 43:792–795.
- Humphrey J. D., Stephens L. R. 1983. *Haemophilus somnus*: a review. Vet Bull. (53):987–1004.
- Inzana T. J. and L. B. Corbeil. 1987. Development of a defined medium for *Haemophilus somnus* isolated from cattle. Am J Vet Res 48: 366–369.

- Inzana T.J., Glindemann G., Cox A.D., Wakarchuk W. and M.D. Howard. 2002. Incorporation of N-acetylneuraminic acid into *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide (LOS): enhancement of resistance to serum and reduction of LOS antibody binding. *Infect and Immun.* 70: 4870–4879.
- Inzana T.J., Glindemann G., Larson J. and S. Siddaramappa. 2003. Biofilm formation by *Haemophilus somnus*. In: Proceedings of the 84th Annual Meeting of The Conference of Research Workers in Animal Diseases, Chicago, IL. Oxford: Blackwell Publishing. Abstract 12.
- Inzana T.J. 1999. The *Haemophilus somnus* complex. In current veterinary therapy 4: food animal practice. J. L. Howard and R. A. Smith (eds). Philadelphia, PA: W. B. Saunders Co., pp 358-361.
- Janosi K., Hajtos I., Makrai L., Gyuranecz M., Varga J. and L. Fodor. 2009. First Isolation of *Histophilus somni* from goats. *Vet Microbiol.* 133: 383-386.
- Jansen E. D. 1989. The *Haemophilus somnus* disease complex: a review. *Can Vet J.* 30: 816-822.
- Jaramillo L. 1998. Aislamiento de una hemaglutinina de *Pasteurella haemolytica* A1 y el estudio de su especificidad por carbohidratos. Tesis de Licenciatura. UNAM. Facultad de Medicina.
- Jeannotte M., Slavic D., Frey J., Kuhnert P. and J. Macinnes. 2002. Analysis of non-porcine isolates of *Actinobacillus suis*. *Vet Microbiol.* 85: 83-93.
- Kilian M. and E. L. Biberstein. 1984. Genus II. *Haemophilus*, In: Krieg NR, editor. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, pp. 558–569.
- Komoriya K., Shibamo N., Higani T., Azuma N., Yamaguchi S. and S. Aizawa 1999. Flagellar Proteins and type III exported virulence factors are the predominant proteins secreted into the cultura media of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol.* 34 (4): 767-779.

- Koster M., Bitter W. and J. Tommassen. 2000. Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int J Med Microbiol.* 290:325-331.
- Kristensen M.B., Frees D. and A.M. Bojesen. 2010. GtxA from *Gallibacterium anatis*, a cytolytic RTX-toxin with a novel domain organization. *Vet Res.* 4:1-25.
- Kuckleburg C. J., Elswaifi S. F., Inzana T. J. and C. J. Czuprynski. 2007. Expression of phosphorylcholine by *Histophilus somni* induces bovine platelet aggregation. *Infect Immun.* 75: 1045–1049.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lederer J.A., Brown J.F. and C.J. Czuprynski 1987. *Haemophilus somnus*, a facultative intracellular pathogen of bovine mononuclear phagocytes. *Infect Immun.* 55:381-387.
- Lee VT. and O. Schneewind. 2001. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes and Develop.* 15:1725-1752
- López B. A. 2011. Identificación de proteínas que unen fibrinógeno en diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae*. Tesis Licenciatura. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
- Luna Rivero, M. J. N. 2003. Clonación del gen y caracterización parcial de una proteasa de *Pasteurella multocida*. Maestría en Ciencias Microbiológicas. BUAP. Instituto de Ciencias.
- Maeda H. 1996. Role of microbial proteases in pathogenesis. *Microbiol Immunol.* 40:685-699.
- Mala B., Aparna M., Mohini S., and V. Vasanti. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microb Mol Biol Rev* 62: 597-635.

- Mannheim W. 1979. Family *Pasteurellaceae*. In: Systematic Bacteriology. N. Krieg and J. Holt. Board. EUA. pp. 550-575.

- Mena-Rojas E., Vázquez C., Vaca S., García O., Pérez-Márquez V., Pérez-Méndez A., Ibarra J, de la Garza M, Zenteno E. and E. Negrete-Abascal. 2004. Antigenic secreted proteins from *Haemophilus paragallinarum*. A 110 kDa putative RTX-protein. FEMS Microbiol Lett. 232:83-87.

- Merino M. and E.L. Biberstein. 1982. Growth requirements of *Haemophilus somnus*. J Clin Microbiol. 16:798-802.

- Michael D. Howard A. D., Cox J. N., Weiser Schurig G. G. and T.J. Inzana. 2000. Antigenic Diversity of *Haemophilus somnus* Lipooligosaccharide: Phase-Variable Accessibility of the Phosphorylcholine Epitope. J Clin Microbiol. 38 (12): 4412-4419.

- Moran A.P., Prendergast M.M. and B.J. Appelmelk. 1996. Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease FEMS.q Immunol Med Microbiol. 16: 105–115.

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

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

- Negrete-Abascal E., Tenorio V. R. and M. De la Garza. 1999. Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolates. Curr Microbiol. 38:64-67.

- Negrete-Abascal E., Vaca S., Paniagua G. L. , Pérez A., Ibarra-Caballero J. Pérez-Márquez V. and V. R. Tenorio. 2004. Metalloprotease secreted by *Actinobacillus suis*. Curr Microbiol. 49:55-58.

- Özcengiz E., Kilinc K., Büyüknair O. and A. Günlap 2004 Rapid Purification of pertussis toxin (PT) and filamentous hemagglutinin (FHA) by cation – exchange chromatography. *Vaccine*. 22: 1570-1575
- Pfeifer C.G., Campos M., Beskorwayne T., Babiuk L.A. and A.A. Potter. 1992. Effect of *Haemophilus somnus* on phagocytosis and hydrogen peroxide production by bovine polymorphonuclear leukocytes. *Microb Pathogenesis*.13:191–202.
- Philbey A. W., Glastonbury J. RW., Rothwell J. T., Links I. J. and J. E Searson. 1991. Meningoencephalitis and other conditions associated with *Histophilus ovis* infection in sheep. *Aust Vet J*. 68:387–390.
- Rivera J., Vannakambadi G., Höök and P. Speziale . 2007. Fibrinogen-binding proteins of Gram positive bacteria. *J Thromb Haemost*. 98:503-511.
- Rivero García P.C., Vázquez Cruz C., Sánchez Alonso S., Vaca S. y Negrete Abascal E. 2005.*Haemophilus paragallinarum* secretes metalloproteases. *Can J Microbiol*. 51: 893-896.
- Sandal I, and T. J. Inzana. 2009. A genomic window into the virulence of *Histophilus somni*. *Trends Microbiol*. 18 (2): 90-99.
- Soriano E. 2000. Serotipificación de Aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* Bajo un Esquema de Hemaglutininas. Tesis. Maestría en Ciencias de la Produccion y Salud Animal UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Sawata A., Nakai T., Kume K., Yoshikawa H. and T. Yoshikawa. 1985. Lesions induced in the respiratory tract of chickens by encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*. *Am J Vet Res*. 46:1185-1190.
- Siddaramppa S. and TJ. Inzana. 2004. *Haemophilus somnus* virulence factors and resistance to host immunity. *Anim Health Res Rev*. 5(1): 79-93.

- Stephens LR., and PB. Little. 1981. Ultrastructure of *Haemophilus somnus*, causative agent of bovine infectious thromboembolic meningoencephalitis. Am J Vet Res. 42:1638-1640

- Stephens LR, Little PB, Wilkie N, Barnum DA. 1981. Infectious thromboembolic meningoencephalitis in cattle: A review. J Am Vet Med Assoc. 178:378–384.

- Stephens LR., Little PB., Slee P., Poullton P., Lancombe M., Kosior E. 1986. Investigation of purulent vaginal discharge in cows with particular reference to *Haemophilus somnus*. Aust Vet J. 63:182–185.

- Tagawa Y., Bastida-Corcuera F. and L. B. Corbeil. 2000. Immunological characterization of the major outer membrane protein of *Haemophilus somnus*. Vet Microbiol 71: 245–254.

- Tagawa Y., Sanders J.D., Uchida I., Bastida-Corcuera F.D., Kawashima K., and L.B. Corbeil. 2005 Genetic and functional analysis of *Haemophilus somnus* high molecular weight-immunoglobulin binding proteins. Microb Pathog. 39: 159–170.

- Terry T. D., Zalucki Y. M, Walsh S. L., Blackall P. J. and M. P. Jennings. 2003. Genetic analysis of plasmid encoding haemocin production in *Haemophilus paragallinarum*. Microbiol. 147:3177-3184.

- Thanassi D.G. and S.J. Hultgren. 2000. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. Curr Op Cell Biol. 12:420-430.

- .

- Tremblay Y. D., Bahrami F. and D. F. Niven. 2006. Acquisition of haemoglobin - bound iron by *Histophilus somni*. Vet Microbiol. 114: 104 -114.

- Trigo F.J. y J. Romero. 1986. La relevancia de las neumonías como causa de mortalidad en corderos. Vet Méx. 17:116- 119

- Trigo F. J. 1987. El Complejo Respiratorio Infeccioso de los Bovinos y Ovinos. Cienc Vet. 4: 1-36
- Trigo F. J. 1995. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos. Memorias del Seminario Pasteurelisis Neumónica del Ganado Bovino. Monterrey, N.L. México. 18-22.
- Vimr E. and C. Lichtensteiger 2002. To sialylate, or not to sialylate: that is the question. Trends Microbiol.10:254–257.
- Vimr E, Kalivoda K.A., Deszo E.L., and S.M. Steenbergen. 2004. Diversity of microbial sialic acid metabolism. Microbiol Mol Biol Rev. 68: 132–153.
- Walker R. L., Biberstein E. L., Pritchett R. F. and C. Kirkham.1985. Deoxyribonucleic acid relatedness among “*Haemophilus somnus*,” “*Haemophilus agni*,” “*Histophilus ovis*,” “*Actinobacillus seminis*,” and “*Haemophilus influenzae*.” Int J Syst Bacteriol 35:46–49.
- Ward A. C., Dyer N. W. and L. B. Corbeil. 1999. Characterization of putative *Haemophilus somnus* isolates from tonsils of America bison (*Bison bison*). Can J Vet Res. 63:166-169.
- Ward A. C., Weiser, G. C, Anderson B. C, Cummings P.J, Arnold K. F. and L. B. Corbeil, 2006. *Haemophilus somnus*(*Histophilus somni*) in bighorn sheep. Can J Vet Res. 70: 34–42.
- White D.J., Jolley W.L., Purdy C.W. and Straus D.C., 1995. Extracellular neuraminidase production by a *Pasteurella multocida* A:3 strain associated with bovine pneumonia. *Infect Immun.* 63: 1703-1709.
- Widders P. R., Smith J. W., Yarnall M., McGuire T. C. and L. B. Corbeil. 1988. Non-immune immunoglobulin binding of *Haemophilus somnus*. *J Med Microbiol.* 26: 307–311.
- Yamaguchi T., Kobayashi M., Masaki S. and Y. Iritani. 1993. Isolation and characterization of a *Haemophilus paragallinarum* mutant that lacks a hemagglutinating antigen. Avian Dis 37:970-976.

- Yarnall M., Widders P. R. and L. B. Corbeil. 1988. Isolation and characterization of Fc receptors from *Haemophilus somnus*. Scand J Immunol 28: 129–137.
- Zielinski G. C. 2000. *Haemophilus somnus*: etioepidemiología, patogenia, cuadros clínicos, prevención y control. Jornada sobre enfermedades emergentes del bovino, F.A.V. UNRC, Río Cuarto.
- Zekarias B., Toole D. B., Lehmann J. And L. B. Corbeil. 2011. *Histophilus somni* IbpA Fic cytotoxin is conserved in disease strains and most carrier strains from cattle, sheep and bison. Vet Microbiol. 149: 177-185.
- Zepeda A., Ramírez S., Vega V., Morales V., Talavera M., Salgado C., Simon J Bojensen A. and E. Soriano. 2009. Hemagglutinating activity of *Gallibacterium* strains. Avian Dis. 53:115-118

<http://www.genomemalaysia.gov.my/prolyses/>).