

59
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ADHERENCIA "IN VITRO" DE DOS CEPAS
DE Pasteurella multocida TIPOS A Y D,
A LINEA CELULAR VERO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A:
ROGELIO JAIME FRAGOSO SORIANO



México, D.F., Ciudad Universitaria

1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
I. <u>Pasteurella multocida</u> en conejos.....	5
II. <u>P. multocida</u>	5
A) Características generales.....	6
B) Caracterización Antigénica.....	8
III. Adherencia bacteriana.....	10
A) Fundamentos de la adherencia bacteriana	11
1.- Fenómenos Físicos.....	11
2.- El pili.....	13
3.- La cápsula.....	14
4.- Adhesinas bacterianas.....	14
5.- Glicocálix.....	16
6.- Alteración y daño a la superficie celular.....	17
7.- Adhesinas y endógenos.....	18
IV. Adherencia de <u>Pasteurella multocida</u>	18
OBJETIVOS	23
MATERIAL Y MÉTODOS	24
I. Cepas bacterianas.....	24
II. Cultivo de tejidos.....	25
III. Prueba de Adherencia.....	26
IV. Microscopía Electrónica de Transmisión.....	28
A) Inclusión en Epon.....	28
B) Tinción Negativa.....	30

RESULTADOS	31
I. Microscopia Electrónica de Transmisión.....	32
A) Inclusión en Epon.....	32
B) Tinción Negativa.....	32
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	38
LITERATURA CITADA	39

ADHERENCIA "IN VITRO" DE DOS CEPAS DE Pasteurella multocida TIPOS A Y D.

A LINEA CELULAR VERO

Rogelio J. Fragoso Soriano. 1992.

RESUMEN

La adherencia bacteriana a epitelios del hombre y animales es esencial para la colonización y posible patogénesis de enfermedades. Con la finalidad de establecer si la línea celular VERO es un modelo factible para futuras investigaciones sobre adherencia de Pasteurella multocida, se realizaron pruebas con dos cepas de P. multocida tipos capsulares A y D. Otro objetivo fue utilizar el Microscopio Electrónico de Transmisión para buscar alguna estructura externa involucrada en la adherencia de ésta bacteria. Sobre cubre objetos se hicieron crecer cultivos de las células VERO, que se cubrieron con una suspensión de las cepas de P. multocida de aproximadamente una concentración de 1×10^9 bacterias/ml, se fijaron y se tificaron con el colorante de GIEMSA, observándose al microscopio óptico y contándose el número total de bacterias adheridas en 50 células VERO por cada preparación. Cada réplica se hizo en tres ocasiones. Se hizo un análisis de varianza y se evaluaron los resultados los cuales señalaron que la adherencia de P. multocida tipo cápsular D es mayor (22 ± 14), que la adherencia de P. multocida tipo cápsular A (19 ± 8). ($p < 0.05$) y que las dos cepas de Pasteurella multocida poseen un mecanismo similar de adhesión por medio de fimbrias observadas por el Microscopio Electrónico de Transmisión. Finalmente la línea celular VERO mostró un porcentaje de adherencia muy bajo con P. multocida tipos capsulares A y D utilizadas en éste trabajo.

ADHERENCIA "IN VITRO" DE DOS CEPAS DE Pasteurella multocida TIPOS A Y D.
A LINEA CELULAR VERO.

INTRODUCCIÓN.

El conejo es uno de los animales de laboratorio más importantes para la investigación científica. Ha servido como modelo animal experimental en muchos experimentos de Bioquímica, Fisiología, Nutrición, Microbiología y en la obtención de posibles vacunas para muchas enfermedades, incluyendo trabajos de adherencia bacteriana para algunas enfermedades entéricas (11,25,30). Es también sin lugar a dudas una especie muy solicitada para consumo humano, de ahí la importancia para preservar su salud dentro de nuestra sociedad. Como muchos animales de laboratorio, el conejo no escapa a un sinnúmero de enfermedades infecciosas, que pueden en determinadas condiciones llegar a la mortalidad masiva de la especie.

Dentro de las enfermedades infecciosas que causan más problemas a la especie humana se encuentran las respiratorias sobre todo en las grandes ciudades como la Ciudad de México, donde los contaminantes atmosféricos en primer lugar, el polvo, la diseminación microbiana por aerosoles, los cambios de temperatura, el ruido y la tensión de la vida diaria contribuyen de una manera directa e indirecta a la implantación y diseminación de infecciones respiratorias que pueden, en determinadas condiciones, ser causa de mortalidad tanto en el hombre como en los animales.

Pasteurella multocida en conejos.

Entre los conejos la enfermedad infecciosa de vías respiratorias más importante es la pasteurelosis causada por Pasteurella spp. Esta enfermedad en el conejo se contagia por contacto directo o indirecto. Los conejos desarrollan poca inmunidad tras la infección, algunos quedan como portadores sanos y perpetúan la enfermedad en la colonia (72). La infección más común es un catarro que se puede convertir en una neumonía. Fundamentalmente es una rinitis y sinusitis paranasal con moco seroso o purulento. Las complicaciones pueden ser: neumonía fibrinosa con hepatización del pulmón, dificultad respiratoria, adelgazamiento, otitis media, meningitis, conjuntivitis, abscesos crónicos y septicemias que pueden ocasionar la muerte del animal (72,74). Otras bacterias asociadas al problema son Bordetella bronchiseptica y Staphylococcus aureus.

Steven y Weisbroth (74) mencionan que la pasteurelosis en el conejo es una enfermedad que se presenta cuando las condiciones de estrés debilitan la resistencia del animal, y se cita a la gestación como factor de estrés. Esto se ve apoyado por los trabajos de otros investigadores, como los de Tannok (76) quien demostró que el estrés por falta de agua y comida en ratones portadores asintomáticos de Salmonella provocaban el desarrollo de este microorganismo y la invasión del intestino. Rock (67) indica cuáles son los factores que producen estrés en los conejos que hacen disminuir su resistencia a las infecciones: 1.- ruido excesivo, 2.- escasez de agua, 3.- falta de alimento apropiado y 4.- manejo excesivo. Al mismo tiempo se enuncian los trastornos frecuentes provocados por estrés: 1.- problemas gastrointestinales 70%, 2.- trastornos respiratorios 29% y 3.- nerviosos

(agresión y peleas). Los gérmenes más comunes involucrados en estos casos son, en orden de importancia: Eimeria perforans, Escherichia coli, Pasteurella spp., otros coliformes y Pseudomonas spp.

Pasteurella multocida: Características generales.

El nombre de Pasteurella multocida fue introducido en homenaje a Louis Pasteur, por sus observaciones sobre cólera aviar. Pasteurella multocida fue aislada por M. Tossaint de una gallina (1879). El nombre actual de P. multocida fue acuñado por Rosebusch y Merchant (68). Las pasteurellas pertenecen a la familia III del grupo de bacilos gram negativos anaerobios facultativos, junto con Haemophilus, Actinobacillus, Calimantobacterium y Gardnerella (siendo las otras familias del grupo I enterobacteriaceas y del II Vibrionaceae) según clasificación del manual Bergey más reciente (47). Las cepas de P. multocida aisladas de animales que han perecido de la infección, al ser teñidos con el colorante de gram, se observan como bacilos gram negativos, ovoides, cortos, capsulados y de pequeño tamaño, midiendo aproximadamente de 0.3 a 1.0 micras de ancho por 1.0 a 2.5 micras de largo y una bipolaridad clásica. Aunque la morfología y características pueden variar, particularmente cuando se aíslan de tracto respiratorio superior y después de subcultivos repetidos en medios artificiales; en esas circunstancias deja de observarse la bipolaridad y pueden tomar forma de bacilos alargados, de hasta 5 X 1 micras con pérdida de la cápsula (10,17).

Estos microorganismos son inmóviles tanto a 22 ° C como a 37 ° C, no tienen flagelos, ni esporas, anaerobios facultativos y crecen bien en medios sintéticos enriquecidos con un 5% de sangre o suero.

Las colonias bacterianas crecen en medios sólidos como: Agar Infusión Cerebro Corazón. Agar sangre y Agar soya tripticosa. En Agar sangre forma pequeñas colonias no hemolíticas de color gris. Estas son de tamaño mediano, redondas, brillantes, grisáceas. Se han observado variantes coloniales lisas-iridiscentes, mucosas y rugosas azules (15). Se diferencia de otras especies (P. haemolitica, P. pneumotropica, P. ureae) por pruebas bioquímicas en las que el número mínimo de pruebas para la identificación, hasta especie, de Pasteurella debe incluir las siguientes: tinción de gram, oxidasa, catalasa, oxidación/fermentación, motilidad, crecimiento en agar Mac Conkey, hemólisis en agar sangre al 3%, indol, ureasa, producción de Ac. sulfhídrico, producción de ácido a partir de glucosa, sacarosa, manitol, rafinosa, trehalosa y arabinosa. Dándose también importancia a características menos objetivas como morfología colonial y olor al cultivo. Todas las pruebas anteriores se realizan según las técnicas descritas por Cowan y Steel (20).

En este trabajo se reconstituyeron y reidentificaron cepas de P. multocida, los coccobacilos gram negativos, bipolares, oxidasa y catalasa positivos, inmóviles, fermentadores de glucosa y sacarosa sin producción de gas, se consideraron pertenecientes al género Pasteurella, teniendo en cuenta lo publicado por Carter (15) y Cowan y Steel (20).

Caracterización Antigenica.

Se ha detectado la presencia de antígenos capsulares, los que han sido estudiados por distintos autores. Roberts (65), definió cuatro grupos: I, II, III, IV, mediante prueba de protección cruzada. En otros estudios, por hemaglutinación indirecta, procedimiento en el cual se absorben los polisacáridos a glóbulos rojos, se ratificó la existencia de cuatro tipos de cápsula: A, B, C, D. Más tarde el serogrupo C se descartó para establecer un nuevo tipo E (12,13). La clasificación de Carter se corresponde con la de Roberts del siguiente modo: B/I, A/II, E/III, D/IV.

La septicemia hemorrágica en ganado es causada por los tipos B y E, que producen una endotoxina que podría estar en las cápsulas relacionada con los polisacáridos. El cólera aviar es producido por el serotipo A. En la neumonía de diversos animales como el bovino, ovino, cerdo y conejo están involucrados los tipos A y D (18,38).

Posteriormente se encontraron dos métodos no serológicos y rápidos para la determinación de los tipos capsulares A y D. Un método de aglutinación rápida con acriflavina, para diferenciar las tipo D (14). Y otro donde se demuestra la sensibilidad de las bacterias tipo A a la descapsulación con hialuronidasa estafilocócica (16).

Además de los antígenos capsulares se han estudiado los antígenos somáticos de pared celular. Namioka y Murata (54), utilizando un método de aglutinación en tubo con bacterias descapsuladas por tratamiento ácido, observaron 15 tipos antigenicos. La aglutinación de las bacterias tipo A puede estudiarse tras la descapsulación con hialuronidasa testicular estafilocócica. Heddleston y cols. (36) Mediante una técnica de

inmuno-difusión en gel, para la detección del antígeno termoestable de la pared celular, reconocieron 16 diferentes antígenos, sin relación al tipo cápsular.

Los dos métodos para caracterizar antígenos somáticos producen resultados similares, y se considera que el mayor componente de la especificidad del antígeno somático reside en el lipopolisacárido (9).

Bhasin y Lapointe-Shaw (7) por inmuno-electroforesis cruzada, evidenciaron 55 antígenos citoplasmáticos y 19 de envoltura. Al comparar los distintos métodos de extracción de antígenos capsulares y somáticos, observaron que cada sistema de extracción posea un cierto número de proteínas diferentes y esto explicaría la falta de coincidencia en los métodos reportados de tipificación.

La complejidad antigenica de la bacteria permitiría explicar la débil inmunidad cruzada que se ha observado por inmunización experimental a ratón (66).

Normalmente P. multocida existe como comensal en la bucofaringe de muchas especies animales detectados como portadores del microorganismo como en corderos, perros, gatos y ratas; y causa enfermedades cuando hay ciertos factores predisponentes como infección por virus, hacinamiento, fatiga y exposición al frío (38). La mayoría de las cepas de P. multocida son sensibles *in vitro* a la penicilina, lo que constituye el fármaco de elección.

Esta sensibilidad puede servir para la rápida detección en el laboratorio, de P. multocida y su diferenciación con otros bacilos gram negativos. La tetraciclina resulta también efectiva.

Las pasteurelas que son patógenas para el hombre lo son también para una larga serie de animales y dan lugar a cuadros septicémicos en el hospedero (48).

El hombre siempre es un hospedero secundario pero que no deja de ser importante. Últimamente los casos de enfermedad humana producidos por P. multocida han aumentado. La mayoría de las infecciones adoptan uno de los tres aspectos clínicos siguientes: infección local de los tejidos blandos, e incluso osteomielitis como consecuencia de una mordedura por un animal (frecuentemente la de un gato); infección sistémica como una bacteremia o una meningitis, a veces sin que haya antecedentes de contactos con animales; infección del aparato respiratorio como sinusitis y bronquiectasias (24). Otras infecciones respiratorias y supurativas en el hombre son producidas por P. ureae.

Adherencia Bacteriana.

Se ha llegado a considerar que la adherencia bacteriana es el paso inicial necesario para que se produzca una enfermedad. Una vez que las bacterias han logrado pasar las primeras barreras de defensa del hospedero deben adherirse a las células epiteliales para colonizar y producir daño por algún mecanismo, como podría ser la producción de toxinas o invasión intracelular llegando a producir infecciones en diferentes grados hasta causar la enfermedad.

Es así que se han analizado diferentes problemas infecciosos como: La gonorrea producida por Neisseria gonorrhoeae (77), problemas diarreicos por Escherichia coli (11,30,52), por Salmonella (73), por Vibrio cholerae (21), estudios de colonización de la flora normal intestinal (29); Escherichia coli infectante del tracto urinario (75); problemas de vagina y útero causados por E. coli (56), adherencia a cultivo de tejidos principalmente a

diversas líneas celulares de fibroblastos como HeLa y Hep-2 (26,33). Por citar algunos problemas infecciosos más abordados en este campo.

Se ha observado que en la adherencia bacteriana existe especificidad de especie (la gonorrea ocurre sólo en humanos). E. coli K88 sólo en cerdos (1). Aly y colaboradores (2), encontraron que Streptococcus viridans se adhiere poco a la mucosa nasal humana pero S. pyogenes se adhiere bastante a ella. Anderson y cols. (3,4) estudiaron a Streptococcus pneumoniae y observaron que tenía una gran adherencia a células faríngeas humanas; no así las cepas provenientes de meningitis y septicemia. De estos fenómenos de especificidad y del estado del portador existen pocos trabajos al respecto sobre P. multocida. Uno de ellos por Bonilla (8) quien demostró que las cepas de P. multocida aisladas de conejo son más adherentes para éste que las que provienen de otros animales y que hay más adherencia de P. multocida a células del tracto respiratorio superior de conejo portador que al de no portador.

Fundamentos de la Adherencia Bacteriana.

1) Fenómenos físicos.- Se inició su estudio al observar la adherencia bacteriana a superficies sólidas inertes, y más tarde haciendo implantes de prótesis en animales de laboratorio. Se observaron dos tipos de interacciones entre bacterias y superficies sólidas:

a) Interacciones de rango largo: fuerzas mutuas con una función entre la distancia y la energía libre.

b) Interacciones de rango corto: importantes cuando las superficies están cerca y toman contacto físico, formando enlaces químicos, hidrofóbicos y dipolares (23).

Jyh-Ping Hsu (39) en su modelo estadístico, siendo puramente teórico, establece también la situación de que la adherencia se lleva a cabo en dos pasos: el primero es reversible, porque el vínculo de la bacteria con la superficie es débil. El segundo paso ya es una unión íntima y es irreversible. La varianza en los dos pasos va aumentando con el tiempo hasta llegar a determinado nivel y luego disminuye, todo en cuestión de unas horas. Esto ocurre en la suposición de que el número de sitios de contacto en el sustrato es mucho mayor que los sitios activos de las bacterias.

Entre las interacciones que puede haber en el primer paso de la adherencia está sin duda el efecto de la gravedad, que se muestra como un factor determinante inicial, anterior a la adherencia en sí. La acomodación bacteriana a las superficies está así determinada por la gravedad, uniéndose por fuerzas débiles de Vander Waals (80). También se han mencionado las condiciones hidrodinámicas a superficies sólidas (fenómenos de capilaridad, difusión, adhesividad) (23,81).

Se probó el efecto del cambio de pH in vivo e in vitro en boca y tráquea humanas con Pseudomonas aeruginosa, aumentando la adherencia a pH alcalino, lo que parece indicar que la carga superficial es un factor importante que modula la adherencia (57). En el caso de Pasteurella, como en otras bacterias del tracto respiratorio, el pH óptimo para la adherencia es de 7.4 (33).

Así que el primer paso para la adherencia es reversible e influido por la hidrofobicidad de la superficie celular y su potencial electrostático. La hidrofobicidad aumenta en la fase exponencial del crecimiento bacteriano, al llegar a la fase estacionaria disminuye y permanece constante por una semana (80). Se trata de una reacción química entre dos o más partículas en fase acuosa, con eliminación del agua asociada a ellas, ganando energía

libre. En las que intervienen factores como: tensión superficial baja, solubilidad en compuestos orgánicos y fuerzas atractivas de Vander Waals. La superficie bacteriana hidrófoba promueve su asociación con diferentes células animales, y se aumenta por glicocalix, fimbrias entre otros factores (57).

En estas reacciones influyen la hidrofobicidad y el potencial eléctrico, si la primera disminuye, el segundo aumenta. Las características de la superficie celular que determinan la adhesión están influenciadas por las condiciones del crecimiento: en alta tasa de crecimiento las bacterias se vuelven más hidrofobas y se adhieren más (80). Por ello se ha determinado siempre la fase exponencial como la ideal de las bacterias para hacer pruebas de adherencia. Aunque también influye el tipo de medio de cultivo que se emplee (23).

La carga negativa de la bacteria está en relación con su hidrofobicidad, y en bacterias patógenas está en relación con la cápsula (polisacárido acidificado) (23). La hidrofobicidad es el paso preliminar para la adherencia y puede ser factor patogénico, favorece el acercamiento al epitelio para que haya una adherencia específica irreversible (82).

II) El pili.— Se ha probado el valor del pili para la adherencia de Pseudomonas aeruginosa a células dañadas de boca (83) y a células dañadas de tráqueas humanas (62), y se ve que es importante el pili para las cepas no mucoides solamente. En el caso de cerdos se ha visto que Escherichia coli K-99 tiene un pili específico para el tejido intestinal y es un proceso saturable a 30 o 40 bacterias por célula (41). En otro estudio se buscaron factores de adhesión de E. coli mediante hemaglutinación de sus pili, y se encontró relación directa entre este factor de colonización y su

enterotoxigenidad (70). Otras bacterias diferentes como Haemophilus influenzae presentan también pili, y se prueba que las cepas que no tienen pili no se adhieren (34).

Cierto tipo de E. coli posee el pili adecuado que reconoce el receptor celular del epitelio del tracto urinario humano (un esfingolípido). Este pili está regido genéticamente, según la cepa, pues otros no reconocen este tipo de receptor (49).

En otros trabajos ya se reportan vacunas contra los componentes de la superficie bacteriana, principalmente el pili, como algunas vacunas antiK88, anti987, antitipo I (de pielonefritis), y antiK99, que son contra diferentes tipos de E. coli, la mayoría de ellos productores de diarreas en el ganado. Otros inmunógenos son el anti-pili de Bordetella pertussis que afecta al hombre y que se basan en preparados químicos de los pili específicos (5).

III) La cápsula.- La cápsula de E. coli coloniza el intestino delgado y aumenta su virulencia. Pero las cepas no capsuladas se adhieren mejor. Si pierden el pili se adhieren muy poco con cápsula o sin ella. El aumento de la patogenicidad es por otro mecanismo diferente de la adherencia (69).

En un trabajo hecho con Haemophilus influenzae y células faringéas humanas se prueba que las cepas no capsuladas se adhieren mucho mejor que las capsuladas, y solamente el serotipo B se adhiere bien a pesar de la cápsula (58). En un estudio reciente se estudiaron cepas de H. influenzae tipo B capsuladas y no capsuladas, observándose que no difieren significativamente en grado de adherencia (50).

IV) Adhesinas Bacterianas.- Las adhesinas son moléculas bacterianas, y los receptores las moléculas celulares del hospedero.

Se ha observado en la interacción entre células de mamíferos y bacterias gram negativas intervienen al menos tres tipos diferentes de lectinas de las bacterias involucradas en la sensibilidad adhesiva a las manosas: un grupo de lectinas asociadas al flagelo de E. coli y Serratia, otra al pili y un tercero a la membrana externa de la bacteria (84).

Los experimentos de Beuth y cols. (6) mostraron que la adhesión de Streptococcus pneumoniae a pulmón y riñón humanos está mediada por una lectina bacteriana: N-acetil-D-glucosamina o N-acetil-D-galactosa, y la de Pseudomonas aeruginosa a estos dos tejidos humanos fue el ácido N-acetilneuroamínico, porque la adherencia bacteriana se inhibía completamente cuando eran añadidas estas adhesinas a las mezclas de células-bacterias.

En un trabajo muy reciente, cepas de E. coli con pili I fueron tratadas con saliva, y aumentó la adherencia a epitelio bucal; se encontró que las moléculas salivales responsables de este fenómeno eran unas proteínas de 62,000 daltones, que sirven de receptores a la fimbria I y que son bloqueados con fibronectinas (35).

En otro estudio, Fusobacterium necrophorum se adhiere a células de rumen bovino, y se estableció un paralelismo entre la adherencia de este microorganismo y su habilidad de hemaglutinar eritrocitos. Se añadió hemaglutinina a las células de rumen y la bacteria ya no se pudo adherir (46).

Trabajos hechos con Bordetella pertussis determinaron que para que la bacteria se adhiere al epitelio respiratorio ciliar se requiere de la toxina pertussis y de la hemaglutinina filamentososa del germen (79). Otros experimentos demuestran que bacterias como Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae y Staphylococcus aureus tratadas con estas dos

adhesinas de Bordetella adquieren la habilidad de adherirse a los cilios respiratorios, tanto in vivo como in vitro, explicando así las superinfecciones que pueden aparecer durante la tosferina (79).

V) Glicocálix.- De acuerdo a Costerton (19), el glicocálix se define como todas aquellas estructuras bacterianas que contienen polisacáridos y que se encuentran por fuera de los elementos que constituyen a la membrana externa de la pared celular de las bacterias gram negativas.

La mayoría de los glicocálices son producidos a nivel de la membrana citoplásmica con la participación de precursores activados (azúcar-nucleótido) y lípidos acarreadores (poliisoprenol) en forma semejante a la síntesis del lipopolisacárido de las bacterias gram negativas (19).

La presencia de cationes divalentes parece jugar un papel crucial en la interacción de las cápsulas con la pared celular, sin embargo, el tipo de unión entre el glicocálix y la superficie celular no es siempre conocido. En algunas bacterias gram negativas parece haber fosfolípidos o proteínas membranales que fijan la cápsula a la membrana externa de la pared (19).

Una de las funciones más importantes del glicocálix es la de mediar la adherencia de las bacterias a los diferentes sustratos presentes en sus medios ambientes naturales. Esto influye sobre la adherencia que muestran muchas de las bacterias que forman parte de la flora normal del hombre y los animales. Las células de los animales también poseen un glicocálix propio. Las estructuras de los glicocálices bacterianos, que en su gran mayoría poseen cargas negativas, pueden formar enlaces iónicos con los polisacáridos de los glicocálices de las células animales por medio de cationes divalentes presentes en los tejidos (19).

El glicocálix es altamente hidrofílico lo cual facilita la unión entre la bacteria y la superficie de la célula blanco. Una bacteria productora de pili o fimbria puede poseer además glicocálix lo cual aumentará la capacidad de adherencia de ésta a la célula blanco.

Gran número de bacterias oportunistas poseen glicocálix que además de facilitar su adherencia a las células o superficie mucosa del hospedero las protege contra los sistemas inespecíficos de defensa, estas bacterias producen infecciones endógenas en organismos inmunosuprimidos (19).

VI) Alteración y daño en la superficie celular. - A veces las células se hacen susceptibles al ser infectadas por virus, o cuando sufren algún daño, parece que nuevos receptores aparecen aumentando la adherencia (23).

Cuando un paciente tiene virus de la Influenza A aumenta la adherencia de Staphylococcus, de Streptococcus pneumoniae tipo I y Haemophilus influenzae al epitelio respiratorio humano (28). El sarampión disminuye la adherencia de Staphylococcus, Streptococcus y Pneumococcus. Los adenovirus no tienen efecto, y los rinovirus aumentan la adherencia de Streptococcus y Staphylococcus (71).

En una serie de experimentos se muestra cómo el neumococo nunca se adhirió a células sanas, y en cambio a células infectadas con virus de la Influenza la adhesión aumentó significativamente al sexto día (60).

Pseudomonas aeruginosa se adhiere sólo a tráqueas infectadas con virus, que se descaman, y no a células normales la cual es llamada adherencia oportunista (62). En pacientes infectados con bacilos gram negativos en tracto respiratorio aumentó significativamente la adherencia de P. aeruginosa y K. pneumoniae. El tracto respiratorio tiene receptores para bacilos gram negativos, los factores asociados a un serio daño parecen aumentar la

disponibilidad de estos sitios de unión facilitando la colonización por bacterias gram negativas (44). Se piensa que los factores de estrés (falta de agua y alimento) provocaron que la flora normal del intestino de ratones se desprendiera de los receptores intestinales, dejándoselos libres a Salmonella quien los ocupó provocando que ratones portadores sanos enfermaran de diarrea (76).

VII).- Adhesinas y análogos .- Estudios de las adhesinas y receptores específicos han abierto nuevos aspectos en la terapéutica para la prevención de infecciones, por medio del estudio de la inhibición de la adherencia.

Se ha visto que aislando y obteniendo pili purificados añadidos a los epitelios, pueden bloquear los sitios de unión de las células, impidiendo la posterior unión de las bacterias a las células. De hecho se ha logrado inhibir la adherencia añadiendo a las células del hospedero los análogos de las adhesinas, como inhibidores competitivos (5). Streptococcus pneumoniae posee lectinas como adhesinas y se pudo inhibirlas añadiendo al tejido de pulmón un análogo: N-acetil-D-glucosamina (6). También se ha probado que pilis purificados bloquean la adherencia de P. aeruginosa a células epiteliales de la tráquea humana (62).

Adherencia de Pasteurella multocida.

Con respecto al campo de la adherencia este microorganismo se ha estudiado poco y sólo se encontró un trabajo con P. multocida provenientes de enfermedades de conejos. Glorioso y cols. (33) que trabajaron con células faríngeas de conejo, tanto in vivo como in vitro, y con células HeLa; establecieron que hay una adherencia diez veces mayor con la cápsula tipo A que con los tipos B, D y E. La adherencia del tipo A aumentó después de

extraer el ácido hialurónico capsular. La adhesividad se debe a un pili que es inhibido al añadirle N-acetil-glucosamina. Este autor también trabajó con células VERO obteniendo un promedio de 75 ± 36 bact/célula; a diferencia de las células HeLa que tuvieron 143 ± 59 bact/célula por lo que propone a esta línea como mejor modelo in vitro.

Los demás trabajos se han hecho en cerdos citando a continuación los siguientes: Frymus y cols. (31) demuestran que hay una pobre adherencia de P. multocida tipo D a células nasales porcinas (promedio 0.07 ± 0.03). Jaques (42) demostró que hay mayor adherencia del tipo A que del tipo D en células traqueales porcinas, y también 45 % más adherencia de las cepas provenientes de rinitis atrófica que las cepas que provenían de animales sanos. También observó que la adherencia decrecía con la edad del animal, siendo la mitad en adultos que en lechones recién nacidos, por ser una infección asociada a la falta de respuesta inmune.

Posteriormente este autor hizo estudios comparativos de la adherencia de Bordetella bronchiseptica y P. multocida a células epiteliales traqueales y nasales de cerdo: encontrando que B. bronchiseptica se adhiere bien a las células del tracto respiratorio superior. En contraste al número de organismos de P. multocida, los cuales fueron adheridos de 4 a 6 veces menos que el número de organismos adherentes de B. bronchiseptica. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.0001$). Ambos microorganismos se adhieren en mayor número a las células nasales que a células traqueales ($p < 0.005$). Este autor concluye que B. bronchiseptica posee una gran capacidad de adhesión con respecto a P. multocida a células del tracto respiratorio superior porcino (43).

Los estudios hechos por Nakai y cols. (53) también fueron comparativos entre P. multocida y B. bronchiseptica en la rinitis atrofica, usando células epiteliales de cerdo y aunque la media de la adherencia fue aproximadamente la misma para ambas bacterias, existe menos afinidad por parte de P. multocida, pues mientras ésta sólo se adhiere, B. bronchiseptica además coloniza, se multiplica y degenera células. El daño se debió a la producción de la toxina dermonecrotica (DNT) que B. bronchiseptica produce en gran cantidad, y P. multocida muy poca o nula, por lo tanto ésta última no pareció inducir la rinitis atrofica.

Pijoan y cols. (59) en un estudio hecho con P. multocida aislada de una rinitis atrofica porcina; mencionan que especies de B. bronchiseptica y B. pertusis tienen bien definidas sus adhesinas. La principal adhesina de B. bronchiseptica es la hemaglutinina de eritrocitos bovino. En ambas especies la presencia de fimbria no es tan importante para su adhesión. En contraste a cepas de P. multocida que producen rinitis atrofica colonizan pobremente la mucosa nasal del cerdo. Ellos hicieron pruebas in vitro usando superficies mucosas de cerdos recién nacidos con dos cepas toxigenicas de P. multocida (serotipo D fimbria + y serotipo A fimbria -) las cuales fueron vistos adherentes por Microscopia Electrónica de Barrido.

La inoculación intranasal tanto de recién nacidos como de seis semanas de edad, dió como resultado la colonización. La adhesión fue mejor lograda por las cepas toxigenicas, lo cual es independiente de la posesión de fimbria, hemaglutinina o serotipo cápsular. La colonización de tráquea y pulmón fue sólo observada con cepas de serotipo A. Los resultados muestran que P. multocida toxigenica puede colonizar el tracto respiratorio superior, especialmente las tonsilas de cerdos.

En otro estudio Chung y cols. (22) utilizando fragmentos de células epiteliales nasales de cerdo con B. bronchiseptica y P. multocida tipo D encontraron que la primera mostraba una marcada adherencia a células epiteliales nasales de cerdo, mientras que en P. multocida no había adherencia y que el número de bacterias adherentes por célula se incrementaba a los 0, 15, 30, y 60 min; sin embargo, el número de bacterias adherentes decrece después de 3 a 6 horas de incubación debido a la pérdida de cilios de las células. También encontró que B. bronchiseptica aglutina eritrocitos de ternero debido a una hemaglutinina contenida en su superficie y que si a B. bronchiseptica se le hacía un pretratamiento de 1 mg/ml ó 2 mg/ml de tripsina, significativamente inhibía su adherencia, sin embargo no inhibía su capacidad de aglutinar eritrocitos de ternero. De estos resultados ellos concluyen que la hemaglutinina y otros componentes proteínicos sensibles a 2 mg/ml de tripsina existentes en la superficie de B. bronchiseptica virulenta son sugeridos de ser las adhesinas para la adherencia de B. bronchiseptica a células epiteliales ciliadas nasales de cerdo .

En base a lo anterior es importante el uso de células de cultivo de tejidos puesto que en éstas se trata de mantener las condiciones naturales que *in vivo* presentan las células. Finalmente y coincidiendo con una revisión hecha por Nicolet (55). Para que se presente la patogenicidad de Pasteurella multocida requiere primero de colonización a superficies mucosas, invasión a tejidos del hospedero, sobrevivencia y multiplicación, interferencia con las defensas del hospedero y daño. Para estos propósitos la bacteria posee estructuras de adherencia, polisacáridos capsulares, estructuras de superficie tales como proteínas de membrana externas y lipopolisacáridos, además de secretar productos extracelulares incluyendo exotoxinas.

Debido a que existen pocos trabajos sobre adherencia bacteriana de P. multocida y más aún sobre adherencia a cultivos de tejidos visualizados con ayuda del Microscopio Electrónico de Transmisión; con este trabajo se trata de abordar la problemática de la enfermedad que es la pasteurelosis en conejo y aclarar algunos factores que están interviniendo para que se manifieste dicha enfermedad.

En la medida que conozcamos mejor los factores determinantes, para que se lleve a cabo la adherencia bacteriana de cualquier enfermedad, se tendrán mayores opciones de poder combatir enfermedades, ya sea por inactivación de antígenos conociendo sus estructuras responsables de la infección, o tomando diversas medidas de prevención y control eficaces.

Una vez que se realicen más trabajos al respecto y ayudándonos de la infraestructura moderna de nuevos y sofisticados aparatos de laboratorio para diagnóstico, estaremos más en posibilidades de conocer este patógeno para así poder combatir dicha enfermedad; para el beneficio de la especie y en general del hombre mismo.

Objetivos:

Determinar si la línea celular VERO puede utilizarse como modelo "IN VITRO" para estudios de adherencia de Pasteurella multocida.

Determinar si los tipos capsulares A y D de Pasteurella multocida presentan diferencias en cuanto a número de bacterias adheridas por célula VERO.

Determinar por Microscopía Electrónica de Transmisión si existe una estructura externa de adherencia en las cepas de P. multocida tipos capsulares A y D.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas Bacterianas:

Inicialmente se trabajó con 14 cepas de Pasteurella multocida aisladas de conejo, liofilizadas en el cepario del Departamento de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia U.N.A.M. Las ampollitas liofilizadas con las cepas se colocaron en fenol durante 30 minutos y se procedía a romperlas. Con una pipeta Pasteur estéril se le agregó 0.5 ml de medio líquido de propagación caldo infusión cerebro corazón (CICC), resuspendiendo el contenido de la ampollita.

Las porciones del medio líquido con rehidratado se colocaron alternadamente en dos tubos con CICC y ambos se incubaron durante 24 a 48 hrs a 37 °C. En este paso también se tomaron uno o dos asadas y se sembró en cajas de petri con Agar Sangre, incubando 24 hrs a 37°C.

Trascurrido el tiempo de incubación se observaron las colonias, para ver si había posibles contaminantes y se aislaron las colonias con características de Pasteurella multocida. Posteriormente el cultivo aislado y comprobada su pureza en Agar-Sangre se sometió a las siguientes pruebas bioquímicas: glucosa, lactosa, manitol, rafinosa, sucrosa, trehalosa, SIM, urea, prueba de catalasa y prueba de oxidasa. Las cepas determinadas como Pasteurella multocida fueron tipificadas buscando los tipos capsulares A y D. El tipo A se tipificó usando la hialuronidasa estafilocócica mediante cepas de Staphylococcus aureus productoras de ella, según método descrito por Carter (16). El tipo D se tipificó mediante la prueba de acriflavina, descrita por Carter (14).

Las cepas de Pasteurella multocida que se usaron para las pruebas de adherencia fueron las que tenían tipos capsulares A y D respectivamente.

Cultivo de tejidos:

Se utilizó la línea celular VERO (riñón de mono verde africano: Cercophitecus aethiops), procedentes de la clona 120 de células VERO del laboratorio de Virología de la F.M.V.Z. U.N.A.M.

Las células se hicieron crecer en medio mínimo esencial Eagle (MEM) conteniendo 10% de suero fetal bovino con 100 U de penicilina y 100 mcg de estreptomycin por ml. El medio se preparó con agua tridestilada con 1% de L-glutamina y sin bicarbonato de sodio. El bicarbonato se agregó en cada ocasión que se hizo transferencia o "pase".

Las sales balanceadas de fosfatos (PBS) utilizadas para preparar tripsina y antibiótico fueron las siguientes:

NaCl (cloruro de sodio)	8.0 grs.
KCl (cloruro de potasio)	0.2 grs.
K HPO _{2 4} (fosfato monobásico de potasio)	0.2 grs.
KH PO _{2 4} (fosfato dibásico anhídrido de potasio).	1.17grs.

Disuelto en 1000 ml de agua tridestilada a pH 7.2 - 7.4

La tripsina utilizada como agente dispersor celular fue al 0.3 % del modo siguiente:

Tripsina 1.5 grs
EDTA (ácido etilen diaminotetracético) 0.25 grs.

Disuelto en 500 ml de PBS y se filtró con una membrana millipore de 0.45 micras. Almacenando ésta en congelación a -20 oC.

El antibiótico utilizado fue una mezcla de penicilina y estreptomina en una solución. En 100 ml de solución (PBS) se disolvieron una megaunidad de penicilina más 1 gr de estreptomina. Se filtró con filtros millipore de 0.45 micras y se distribuyeron en alícuotas de 1 ml y se almacenó a -20 oC. Al agregar 1 ml de ésta solución a 100 ml de medio de cultivo, resulta una concentración final de 100 U de penicilina y 100 microgramos de estreptomina por ml.

Prueba de adherencia:

Se siguió la metodología de Glorioso y cols. (33) que consiste en que las bacterias se hacen crecer rutinariamente como cultivo estático en caldo infusión cerebro corazón (CICC) a 37oC por 18 hrs. colectadas por centrifugación (4,500 rpm) y con la modificación de suspender en CICC en lugar de sales balanceadas de Hank. Se hicieron 3 lavados con CICC centrifugando a 4,500 rpm.

Las bacterias fueron resuspendidas con el mismo medio de cultivo conteniendo 10 % de suero fetal bovino (FCS). Mediante el uso de un nefelómetro de McFarland, se ajustaron el número de bacterias a aproximadamente 1×10^9 bacterias/ml coincidiendo con el tubo número 3 de dicho método.

Se utilizó la línea celular VERO para hacer pruebas de adherencia bacteriana de acuerdo al siguiente procedimiento:

Las células se hicieron crecer en MEM conteniendo 10 % de suero fetal bovino y 100 U de penicilina y 100 mcg de estreptomycinina por ml y bicarbonato de sodio. Las monocapas no confluentes (aprox. 3×10^5 células por monocapa) crecidas sobre cubreobjetos en tubos Leighton durante 72 horas y a una temperatura de 37 °C. fueron lavadas con solución de sales balanceadas de Hank con pH de 7.2 a 7.4. (elaborado por Labs. IN VITRO, S.A. clave SSH-013)

El lavado con solución de Hank se hace con la finalidad de evitar cualquier residuo del antibiótico o productos tóxicos propios del metabolismo celular. Una vez realizado esto se procedió a incubar las células con 1 ml de suspensión de bacterias (1×10^9 /ml) por 30 minutos a 37 °C. Las bacterias no adherentes fueron extraídas de la monocapa con 3 enjuagues de 2 ml cada uno de sales balanceadas de Hank. Seguidamente se fijaron las monocapas con metanol absoluto por un minuto. Posteriormente las monocapas se tificaron con colorante de GIEMSA. Se estimó la media y desviación estándar del número de bacterias adheridas por célula, de un tamaño de muestra de 150 células en total por cepa seleccionadas aleatoriamente. Los resultados obtenidos fueron analizados con el siguiente modelo estadístico.

$$Y_{ijk} = u + T_i + L_j + (TL)_{ij} + e_{ijk}$$

donde : Y_{ijk} = Número de bacterias adheridas
ijk (observación en el *i*-ésimo tipo cápsular en la *j*-ésima medición).

u = efecto medio

T_i = efecto del *i*-ésimo tipo cápsular.

L_j = Tipo cápsular A y D.

L_j = efecto de la j -ésima medición
 (TL) ij = efecto de interacción.
 e_{ijk} = error aleatorio NID.

Se realizó un análisis de varianza y la comparación de medias de los tratamientos se hizo con la prueba de Tukey. El análisis de la información se realizó con el procedimiento de modelos libres generalizados (glm) del paquete estadístico SAS.

Microscopía Electrónica de Transmisión: -

En botellas Falcon se hicieron crecer células de la línea celular VERO con medio de crecimiento que está compuesto de 5 a 10% de suero fetal bovino, medio mínimo esencial Eagle (MEM) preparado con antibiótico, L-glutamina y con bicarbonato de sodio.

La botella de plástico Falcon se dejó incubar a 37°C durante 72 hrs. El desarrollo y condiciones del cultivo se observaron utilizando un microscopio invertido. El cultivo celular de 72 hrs se lavó con sales balanceadas de Hank a pH 7.2 y se inoculó con 1 ml de bacterias, en el que el número de bacterias fue aproximadamente 1×10^9 bacterias/ml, según el nefelómetro de McFarland, se dejó incubar por 30 minutos. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 2 ml cada uno con sales balanceadas Hank y se fijó el cultivo celular en glutaraldehído al 3% durante un periodo de 2 horas a una temperatura de 4°C. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 20 minutos cada uno con solución lavadora (solución de fosfatos más sacarosa); se postfijó en tetróxido de osmio al 1% por una hora a 4°C, repitiéndose la operación de lavado como en el paso anterior.

La deshidratación se llevó a cabo con etanol en solución acuosa a diferentes concentraciones (50%, 60%, 70%, 80%, 90% y absoluto), por tiempos de 5 minutos cada uno y 2 periodos de 15 minutos en absoluto. Para la infiltración se utilizó mezcla final de Epon 812 preparado de acuerdo a una modificación a la técnica de Luft (1961) y alcohol absoluto en una proporción de 1 : 2 respectivamente por 30 minutos. Posteriormente en una proporción 1 : 1 (resina-alcohol) por una hora y finalmente en una proporción 2 : 1 (resina-alcohol) durante toda la noche y tapada.

La inclusión se realizó retirando el tapón de la botella y se dejó volatilizar el solvente por 2 horas a temperatura ambiente. Se incluyó el cultivo en una mezcla final de Epon 812, teniendo cuidado que el medio de inclusión cubriera perfectamente la superficie del cultivo sin rebasar una altura máxima de 2 mm. Se polimerizó durante un periodo de 24 horas a 60 °C. después la botella se cortó con una sierra obteniéndose pequeños bloques de aproximadamente 1 cm de ancho por 1 cm de largo y 4 mm de espesor. Cabe mencionar que al momento de hacer el corte se desprendía la resina del plástico de la botella junto con las células del cultivo.

Para saber si se tenía incluido el cultivo se tificaron los bloques con azul de toluidina y se seleccionaron las áreas donde había bacterias.

Una vez localizadas las áreas con bacterias y células se cortaron secciones pequeñas de 1.5 mm aproximadamente y se pegaron a bloques polimerizados; quedando la parte con cultivo celular hacia arriba. De tal manera que se hicieron los cortes ultrafinos de 60 a 90 nanómetros sin hacer cortes semifinos.

Posteriormente se contrastaron los cortes con acetato de uranilo según Huxley (40) durante 15 - 20 minutos y citrato de plomo Reynolds (64) durante 5 - 10 minutos y se observaron al Microscopio Electrónico de Transmisión M-109 Carl Zeiss.

Una vez localizadas las bacterias junto a las células VERO se tomaron micrografías en varios aumentos.

Tinción Negativa:

Las bacterias fueron crecidas en CICC durante 18 horas a 37°C. Se hicieron dos lavados con el mismo medio centrifugando a 4,500 rpm. en la última centrifugación se resuspendió el sedimento en una gota de solución de Hank. con el auxilio de una micropipeta o capilar se colocó una gota de la muestra en una rejilla de cobre cubierta de carbón y película de formvar de 200 mallas, dejando la muestra por dos minutos. Posteriormente con un papel filtro se secó la rejilla donde se le agregó una gota de ácido fosfotúngstico al 1% dejando la tinción durante dos minutos. Finalmente se secó la rejilla con papel filtro y se observó en el Microscopio Electrónico de Transmisión M - 109 Carl Zeiss, de la Unidad de Investigación en Salud Infantil del Instituto Nacional de Pediatría. Toda la metodología experimental se resume en el diagrama 1.

DIAGRAMA 1.

CROMOLOGÍA EXPERIMENTAL.

GLORIOSO, 1982.

OBTENCIÓN DE LÍNEA CELULAR VERO
Y SUS MEDIOS.

CRECIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR
VERO EN MEDIO CON 10% DE SUERO FETAL
BOVINO CON 100 U DE PENICILINA Y
ESTREPTOMICINA.

LAS MONOCAPAS NO CONFLUYENTES (3 X 10⁵
CELULAS POR MONOCAPA) SE HICIERON CRE-
CER SOBRE CUADERNOSJETOS.

LAS CELULAS FUERON LAVADAS CON BICAR-
BONATO DE SODIO HESS-H (HANO).

PRUEBA DE ADHERENCIA

INCUBARAS A 37°C CON 1 ml DE SUSPEN-
SION DE BACTERIAS POR 30 MINUTOS.

LAS BACTERIAS NO ADHERENTES SE LAVARON
CON TRES ENJUAGUES DE 2 ml C/U DE
HSS-H.

PORTAOBJETOS. FIJACIÓN EN METANOL ABS.

TINCIÓN POR GIESSA.

CONTRO DE BACTERIAS ADHERIDAS DE 50 CELULAS
POR MUESTRA. OBTENCIÓN DE MEDIOS.

APLICACIÓN DE VARIOS ESTADÍSTICOS PARA
VALORACIÓN DE TODOS LOS DATOS.

FRAGOSO, 1992.

OBTENCIÓN DE CEPAS DE Pasteurella
multocida.

AISLAMIENTO DE LAS CEPAS (EN AGAR
SANGRE).

IDENTIFICACIÓN DE CULTIVOS.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS (GLUCOSA, LAC-
TOSA, INDOLO, AMINÍVAL, SORBITOL,
SACAROSA, SIM, UREA, OXIDASA Y CATA-
LASA.

TIPIFICACIÓN DE CEPAS A O D.

CONSERVACIÓN EN AGAR SANGRE Y
REFRIGERACIÓN A 4 °C.

CULTIVO DE 18 HORAS EN CALDO INFUSIÓN
CERERO-CORAZÓN (CICC) A 37 °C.

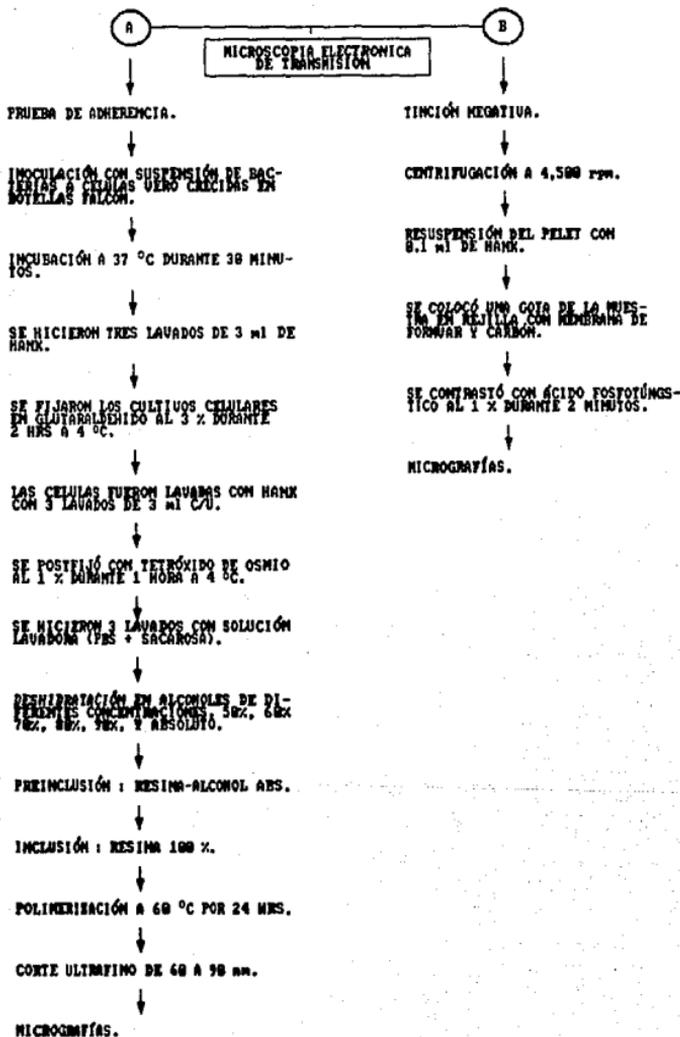
CENTRIFUGACIÓN A 4,500 RPM DURANTE
18 MINUTOS.

DOS LAVADOS EN CICC POR CENTRIFUGACIÓN
A 4,500 RPM DURANTE 18 MINUTOS C/U.

RESUSPENSIÓN EN MEDIO CICC. AJUSTANDO
EL NÚMERO BACTERIANO A 1 X 10⁸ BACT./ml
POR EL MÉTODO DE NACHTZBLAND, TUBO No.3.

A

B



RESULTADOS

De las cepas originalmente reconstituidas que se utilizaron, se encontraron únicamente dos cepas adherentes para la línea celular VERO las cuales correspondieron a los números de cepario 1252 y 1289 tipos capsulares A y D respectivamente provenientes de conejo con neumonía. (Cuadro.1) Los liofilizados restantes no fueron viables o estuvieron contaminados.

Los resultados muestran que hubo poca adherencia de las dos cepas, puesto que ninguna cepa llegó a la saturación de la superficie celular, lo cual sugiere que este modelo es poco factible para hacer pruebas de adherencia de Pasteurella multocida.

El promedio y desviación estándar obtenidos para el tipo capsular A fue de 19 ± 8 bacterias adheridas por célula. Para el tipo capsular D fue de 22 ± 14 bacterias adheridas por célula (Cuadro. 2). El análisis de varianza mostró que hay mayor adherencia de P. multocida tipo cápsular D que la adherencia del tipo cápsular A. ($p < 0.05$).

En la gráfica 1 se observa que el promedio se encuentra en el rango de mayor adherencia para el tipo capsular A.

En la gráfica 2 se observan dos rangos donde predomina la adherencia para el tipo capsular D. En esta gráfica también se aprecia el promedio dentro del rango de mayor adherencia.

Las observaciones de la adherencia de los dos tipos capsulares se llevó a cabo con GIEMSA en las que se puede apreciar en algunas la cápsula y su coloración bipolar (Figs. 1, 2, 3 y 4). Los aumentos utilizados con el microscopio óptico fueron de 40X y 100X.

CUADRO 1. CEPAS DE *E. multocida* UTILIZADAS EN LAS PRUEBAS DE ADHERENCIA IN VITRO.

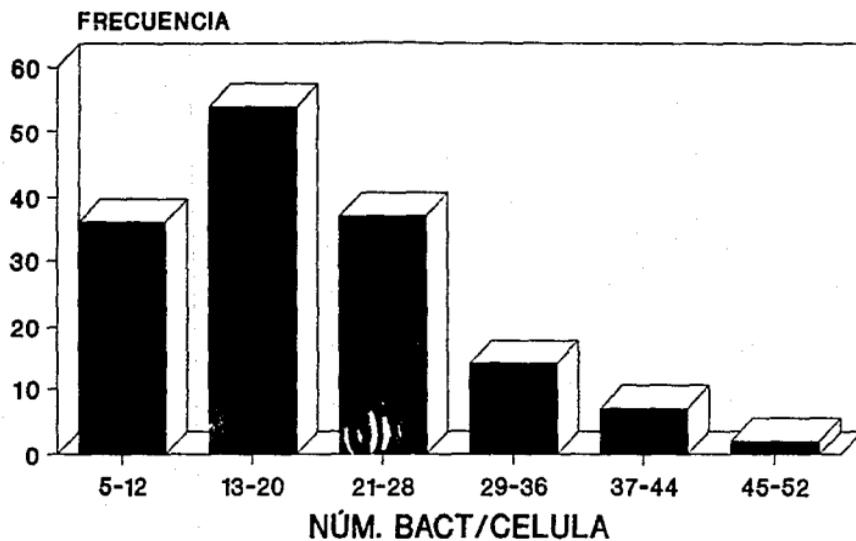
NÚMERO DE CEPA	ESPECIE DE PROCEDENCIA	ANTIÉGENO CAPSULAR	ESTADO DEL ANIMAL DE PROCEDENCIA
1252	CONEJO	A	NEUMONIA CON <u><i>E. multocida</i></u>
1289	CONEJO	D	DEBILIDAD EXTREMA RESULTADA DE INFECCIÓN EN APARATO RESPIRATORIO CON <u><i>E. multocida</i></u> Y <u><i>Staphylococcus sp.</i></u>

CUDRO 2. ADHERENCIA DE *E. multicauda* TIPOS A Y D A CULTIVO DE TEJIDOS IN VITRO.

LÍNEA CELULAR	OBSERVACIONES	TIPO CAPSULAR	PROMEDIO DE ADHERENCIA (BACT. POR CEL. +/- SD)
VERO	150	A	19 +/- 8 ^a
VERO	150	D	22 +/- 14 ^b

^{a, b} MEDIOS EN DIFERENTE LÍNEA SON ESTADÍSTICAMENTE DIFERENTES (P < 0.05).

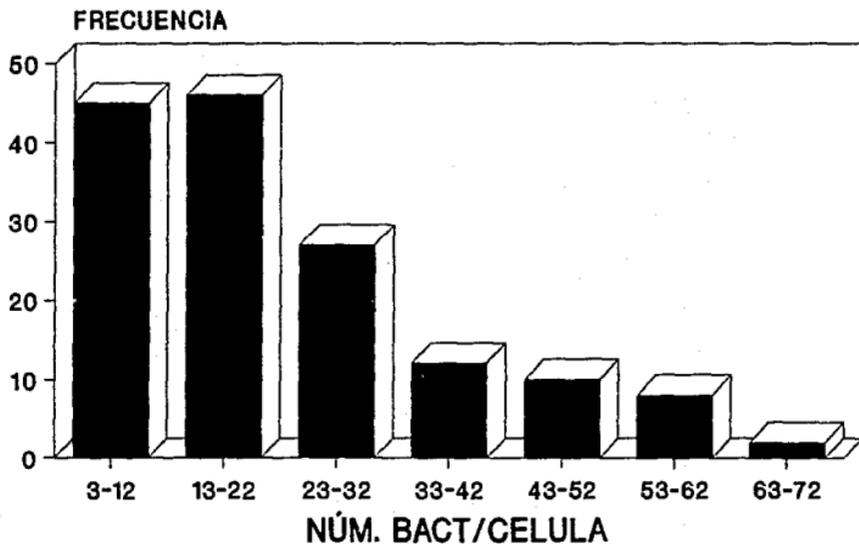
ADHERENCIA DE Pasteurella multocida TIPO CAPSULAR A
EN CULTIVO DE TEJIDOS VERO.



GRÁFICA 1.

■ TIPO A

ADHERENCIA DE Pasteurella multocida TIPO CAPSULAR D
EN CULTIVO DE TEJIDOS VERO.



GRÁFICA 2.

■ TIPO D



FIG. 1. Adherencia de *P. multocida* tipo capsular A a células VERO. Tinción con GIEMSA, se observa la coloración bipolar y en algunas su cápsula. 100X.



FIG. 2. Adherencia de *P. multocida* tipo capsular A a células VERO. Tinción con GIEMSA, se pueden observar las bacterias unidas por parejas. 100X.



FIG. 3. Adherencia de P. multocida tipo capsular D a células VERO. Tinción con GIEMSA. 40X.



FIG. 4. Adherencia de P. multocida tipo capsular D a células VERO. Tinción con GIEMSA, se observa la absorcion bipolar de la bacteria. 100X.

Otras observaciones que se realizaron fueron que tanto el medio de crecimiento de la línea celular, la fase de crecimiento y condiciones de los cultivos, no tuvieron algún efecto en la adherencia de P. multocida. Puesto que en promedio al momento de contar las bacterias adheridas no había diferencias relevantes, es decir, que tenían un patrón de adherencia similar en cada fase de crecimiento celular.

Microscopía Electrónica de Transmisión.

Al realizar la técnica de Microscopía Electrónica en Epon se hicieron cortes ultrafinos en las que se observaron filamentos o proyecciones sobre la superficie de las bacterias en el tipo capsular A, los cuales se trata de fimbrias de 5-6 nanómetros de diámetro que al momento de observarlos se encontraron cortadas; dando una apariencia de "rasurado". Sin embargo si se aprecia la relación que pudiera tener con su adherencia, por la posición horizontal que tiene la bacteria con respecto a la célula VERO y que es determinada por el efecto de la gravedad como primer paso de la adherencia, lo que da como resultado captar mayor cantidad de receptores de la línea celular (Figs. 5, 6 y 7).

Tinción Negativa.

En cuanto a la técnica por tinción negativa, en la que no nos muestra mucho sobre su estructura; se observan fimbrias parecidas a las obtenidas por la técnica anterior, a diferencia que en ésta se observan las fimbrias alrededor de toda la superficie bacteriana, el largo de las fimbrias no fue posible medirlo; puesto que la técnica limita mucho en cuanto a contraste del fondo donde se encuentra (Fig. 8). Estas observaciones se hicieron en el tipo capsular D.



FIG. 5. Micrografía electrónica de Transmisión de P. multocida tipo capsular A + línea celular VERO. Se observa la adherencia de la bacteria y algunas proyecciones parecidas a fimbrias, también se observan prolongaciones citoplásmicas de la línea celular adherirse al sustrato. 74,000 X.

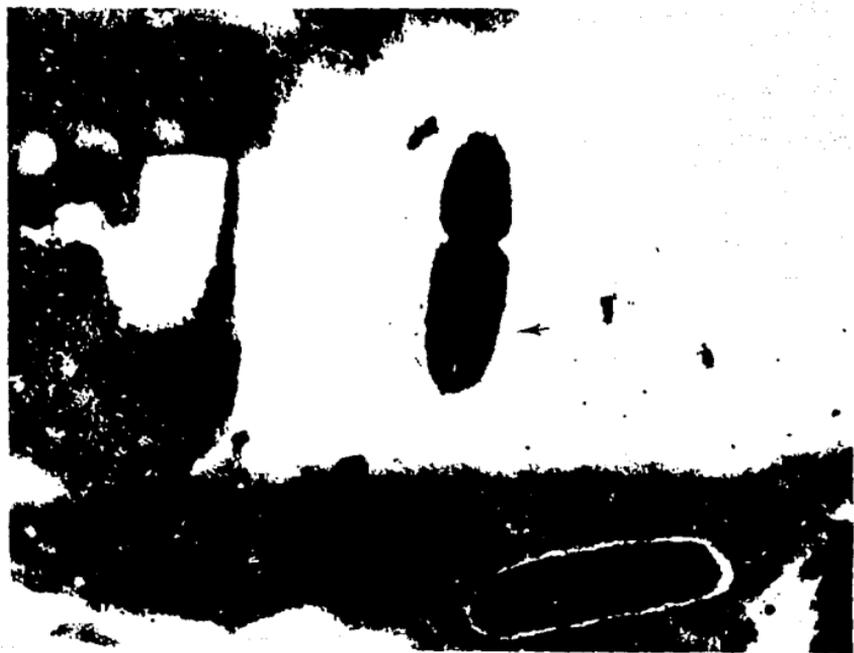


FIG. 6. Micrografía electrónica de transmisión de *P. multocida* tipo A a células VERO. Se observa la apariencia de "rasurado" y las proyecciones parecidas a fimbrias. 25,900 X.



FIG. 7. Micrografía electrónica de Transmisión de P. multocida tipo capsular A. Se observan las proyecciones parecidas a fimbrias salir de la superficie de la célula bacteriana. 111,000 X.



FIG. 8. Micrografía electrónica de P. multocida tipo capsular D teñida con Ac. fosfotúngstico (Tinción negativa). Las flechas indican las proyecciones parecidas a fimbrias sobre la superficie celular de la bacteria. 175,000 X.

DISCUSIÓN

La adherencia de bacterias a superficies de tejidos tienen recientemente una gran importancia, como evento inicial en la patogénesis de infecciones bacterianas (57).

En este campo, los estudios *IN VITRO* han demostrado ser una alternativa más para estudiar una enfermedad, efectos de varias condiciones de incubación o de varias sustancias, fármacos entre otras cosas. Es así que uno de los objetivos preliminares a la realización de esta investigación, fue el utilizar un método alternativo a las investigaciones *IN VIVO*, que nos pudiera contestar algunas dudas sobre los factores que intervienen para que se lleve a cabo una infección o enfermedad.

Con las técnicas de cultivo celular se trata de mantener las condiciones y microambientes que presentan las células naturalmente, para así poder evaluar en la medida que nos sea posible la interacción de la bacteria patógena con la célula hospedera.

Los resultados obtenidos con el uso del cultivo celular VERO muestran que probablemente no sea un modelo ideal *IN VITRO* para pruebas de adherencia de Pasteurella multocida, sin embargo otros autores como Glorioso y cols. (33), encontraron que para las cepas de P. multocida que ellos utilizaron la línea celular VERO ocupa el segundo mejor cultivo celular para pruebas de adherencia de esta bacteria. Por lo cual se sugiere hacer más pruebas de adherencia con un mayor número de cepas adherentes de P. multocida, tomando en cuenta las características especiales que pudiera presentar cada cepa en prueba. Puesto que por un lado unas presentan mayor adherencia como el caso del tipo capsular D (22 ± 14) y otras presentan menor adherencia como el tipo

capsular A (19 ± 8); resultados similares a los obtenidos por Bonilla (8) al trabajar con células del tracto respiratorio superior de conejos portadores de P. multocida indican que esto puede estar relacionado con el tipo de cápsula. También otros autores han hecho notar que la cápsula tipo A reduce su adherencia, quizás por su alta densidad de cargas que repele más a la bacteria de la célula animal, o la cápsula puede enmascarar parcialmente la adhesina o ambas cosas (45). La cápsula de ácido hialurónico (tipo A) no parece jugar ningún papel en la adherencia a la mucosa, pero sí aumenta la resistencia contra mecanismos de defensa del hospedero (51).

A diferencia de los resultados citados anteriormente, Glorioso y cols. (33) encuentran que P. multocida tipo capsular A se adhiere 10 veces más que el tipo capsular D en cultivo celular HeLa (33).

Una de las explicaciones a estos resultados pudiera ser a la diferencia de cepas utilizadas (diferencias genómicas), la cantidad de pruebas realizadas, así como el modelo IN VITRO y a la técnica misma de prueba de adherencia. Se menciona esto en base en que al principio de esta investigación no se obtenían resultados satisfactorios que nos pudiera demostrar que sí había adherencia. Es por eso que se hicieron algunas modificaciones a la técnica presentada por Glorioso y cols (33). La más importante fue en no modificar el medio de cultivo en el cual P. multocida crecía bien y el tratamiento previo a la prueba de adherencia se hizo con el mismo medio de crecimiento (caldo infusión cerebro corazón) CICC. No se utilizaron soluciones de sales balanceadas como Hank ó PBS, ya que al momento de hacer la prueba se observaron algunos efectos de aglutinación sobre las bacterias. Una posible explicación pudiera ser que, como la bacteria se encontraba liofilizada y su metabolismo se reduce al mínimo, al momento de reconstituirla tiene que

adaptarse al medio de crecimiento y empezar a dividirse y si se le cambia a otra solución en el que tenga diferente pH, las bacterias tienen que volver a adaptarse lo cual se expresa en la forma que se presentaron al momento de observarlas (23).

Entre los principales factores de adhesividad que presentan las superficies bacterianas se encuentran la carga eléctrica negativa, la hidrofobicidad, el potencial eléctrico, las condiciones del crecimiento que en alta tasa de crecimiento se adhieren más (80) y finalmente las fimbrias (pili), la cápsula y adhesinas bacterianas (6.50,62).

En la cepa 1252 del tipo casular A utilizada en este trabajo se observaron fimbrias, por lo que se cree que pudiera tener relación con su adherencia a la línea celular VERO (Microcopia Electrónica con inclusión en Epon) por lo cual se llega a la misma conclusión, que señala Glorioso, de que las cepas de P. multocida que son adherentes poseen fimbrias y las cepas que no son adherentes no las poseen lo que sugiere que las fimbrias pudieran ser el organelo de adherencia de la bacteria (33,37).

Estas observaciones también las encontraron con diferentes bacterias, Isaccson (41) en Escherichia coli K99 para el tejido intestinal porcino y Guerina (34) con Haemophilus influenzae a células de faringe humana.

En la cepa 1289 tipo capsular D, se observaron estructuras semejantes a fimbrias de pequeño diametro de aproximadamente 5 nm, vistos por Microcopia Electrónica de Transmisión y por la técnica de tinción negativa.

Recientemente Trigo y Pijoan (59) mencionan la existencia de estructuras parecidas a pilis en P. multocida tipo D aisladas de cerdos y concluyen que la rinitis atrófica fue asociada con las cepas piliadas toxigénicas que pertenecían principalmente al serotipo D, mientras que la neumonía es

producida por cepas no piliadas, no toxigénicas, el cual son principalmente del serotipo A. Rebers (63) encontró estructuras parecidas a pili por Microscopía Electrónica de Transmisión de P. multocida cepa P-1059 tipo capsular A de origen aviar, y menciona que la expresión de estas estructuras dependen de la temperatura de una manera similar a las reportadas para Escherichia coli.

Pyliotis (61) no encontró pili en P. multocida tipo capsular A de origen bovino.

La adherencia de P. multocida a la línea celular VERO se debe a la interacción de las fimbrias con N-acetil glucosamina del receptor de la célula hospedera (33,37).

Cabe mencionar que un factor importante es el glicocáliz de la bacteria, aunque éste no fue el objetivo del trabajo, con las técnicas utilizadas no se pudo observar, ya que hubiera sido interesante el visualizar el glicocáliz y fimbrias tal como lo demostró Douglas (27) para Pasteurella haemolytica proveniente de Pasteurelisis en bovinos.

P. multocida es una bacteria oportunista por lo tanto posee glicocáliz lo cual junto con las fimbrias facilita su adherencia a las células además de protegerla contra los sistemas inespecíficos de defensa del hospedero (19).

En las observaciones realizadas por Microscopía Electrónica de Transmisión se encontraron muy pocas bacterias adheridas al cultivo celular VERO, por esto fue difícil obtener mejores campos que nos demostraran una interacción íntima de la bacteria con la célula hospedera. Una explicación de esto pudiera ser que dadas las características de la metodología utilizada en la Microscopía Electrónica de Transmisión se perdieron las bacterias, puesto como menciona Jyh-Ping Hsu (39) en su modelo de adherencia bacteriana, que el

primer paso es una interacción reversible, porque el vínculo de la bacteria es débil; aunado a los reactivos empleados en la técnica permitieron la observación de pocas bacterias adheridas. Es importante mencionar que diversos autores (32,59,63) que han hecho Microscopia Electrónica sobre Pasteurella multocida, lo han llevado a cabo utilizando tinciones negativas y contrastando algunos con ácido fosfotúngstico, rojo de rutenio, ferritina entre otros, pero casi no se ha efectuado sobre cultivo de tejidos utilizando el proceso normal o de rutina con inclusión en resina y contrastando con acetato de uranilo y plomo. Se menciona esto porque es difícil obtener cortes finos donde exactamente esté la bacteria interaccionando con la célula hospedera, además de que generalmente se tienen problemas de que quede bien incluido el cultivo celular en la resina, con base en esto se han desarrollado técnicas, cortando el plástico de la botella, el cultivo celular y la resina al mismo tiempo (32). En este trabajo se encontró que al desprender el plástico de la botella, quedaba únicamente el cultivo incluido en la resina y sin ninguna alteración.

La técnica de tinción negativa se hizo precisamente para confirmar la presencia de las fimbrias en la bacteria, evitando con esto la apariencia de "rasurado" que se obtuvo con la técnica anterior. Aquí sí se observaron las fimbrias alrededor de la célula bacteriana, sólo que esta técnica se empleó para el tipo capsular D y para encontrar si en realidad este tipo capsular tenía un mecanismo de adherencia similar al tipo A, lo que dió como resultado que efectivamente podrían ser fimbrias debido al diámetro y posición de las mismas en la célula bacteriana.

CONCLUSIONES

- 1.- Las cepas de Pasteurella multocida tipos A y D aisladas del tracto respiratorio superior del conejo muestran poca adherencia a la línea celular VERO.
- 2.- La cepa de P. multocida tipo capsular D tiene mayor adherencia que el tipo capsular A a la línea celular VERO.
- 3.- Las cepas de P. multocida tipos A y D tienen estructuras externas semejantes a fimbrias, vistas por microscopía electrónica.
- 4.- Las fimbrias observadas de P. multocida tipos A y D podrían ser el mecanismo de adherencia para la línea celular VERO.

LITERATURA CITADA

- 1.- Alkan M., Ofek I. and Beachey E. M. Adherence of pharyngeal and skin strains of group A streptococci to human skin and oral epithelial cells. Infect Immun 18 : 555-557 (1977).
- 2.- Aly R., Shinefield M. I., Straus W. G. Bacterial adherence to nasal mucosal cells. Infect Immun 17 (3): 546-549 (1977).
- 3.- Anderson B., Eriksson B., Falsen E., Fogh A., Hanson L. A. Adhesion of Streptococcus pneumoniae to human pharyngeal epithelial cells in vitro: differences in adhesive capacity among strains isolated from subjects with otitis media, septicemia or meningitis or from healthy carriers. Infect Immun 22 (1): 311-317 (1981).
- 4.- Anderson B., Svanvarg-Eden C., Hanson L. A. Pneumococcal adhesion to human pharyngeal cells. Scand J Infect Dis. Suppl 33 : 96-97 (1982).
- 5.- Beachey E. H. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces (Review). J Infect Dis 143 (3): 325-345 (1981).
- 6.- Beuth J., Ko H. L., Uhlebruck G. Lectin-mediated bacterial adhesion to human tissue. Eur J Clin Microbiol 6 (5): 591-593 (1987).
- 7.- Bhasin J. L., Lapoint-Shaw L. Antigenic analysis of Pasteurella multocida (Serotype 1) by crossed immunoelectrophoresis: characterization of cytoplasmic and cell envelope associated antigens. Can. J. Microbiol. 26: 676-689 (1980).

- 8.- Bonilla R. Adherencia específica "in Vitro" de cepas de Pasteurella multocida a células del tracto respiratorio superior del conejo. Tesis de maestría en Ciencias Veterinarias. F.M.V.Z. Universidad Nacional Autónoma de México: 62-70 (1989).
- 9.- Brogden K. A., Packer R. A. Comparison of Pasteurella multocida serotyping systems. Am. J. Vet. Res. 39: 1680-1682 (1978).
- 10.- Buxton A., Fraser G. Animal microbiology. Blackwell Oxford, (1977).
- 11.- Cantey J. R. and Blake R. K. Diarrhea due to Escherichia coli in the rabbit : a novel mechanism. J Infect Dis 135 (3): 454-462 (1977).
- 12.- Carter G. R. : A new serological type of Pasteurella multocida from central africa. Vet. Rec. 73: 1052 (1961).
- 13.- Carter G. R. : Proposed modification of the serological classification of Pasteurella multocida Vet. Res. 75: 1264 (1963).
- 14.- Carter G. R., Subronto P. : Identification of type D strain of Pasteurella multocida with acriflavina. Am. J. Vet. Res. 34: 293-294 (1973).
- 15.- Carter G. R. : Pasteurellosis. In : Disease of swine, H. W. Dunne and A. D. Leman (eds). 4 th. ed. Iowa State Univ. Press. Ames Iowa. : 621-629 (1975).
- 16.- Carter G. R., Rundell S. W. : Identification of type A strain of Pasteurella multocida using staphylococcal hyaluronidase. Vet. Rec. 12: 243 (1975).

- 17.- Carter G. R. : Pasteurella, Yersinia, and Francisella. In: Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology, 3 th. ed. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois: 99-107 (1978).
- 18.-Carter G. R. Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology. 3 rd. Ed. Charles C. Thomas, Springfield, III. 1979.
- 19.- Costerton J. W., G. G. Geesey and K. J. Cheng. How bacteria stick. Sci. Am. 238: 86-95 (1978).
- 20.- Cowan S. T., Steel's K. J. : Manual for the identification of medical bacteria. 2th. ed Cambridge Univ. Press. cd : 137-142. (1974).
- 21.- Chintnis D. S., Sharma K. D. and Kamat R. S. Role of somatic antigen of Vibrio cholerae in adhesion to intestinal mucosa. J Med Microbiol 15: 53-61 (1982).
- 22.-Chung WB., Collins Mt., Backstrom LR. Adherence of Bordetella bronchiseptica and Pasteurella multocida to swine nasal ciliated epithelial cells in vitro. APMIS: 98 (5): 453-61. (1990).
- 23.- Dankert J., Hogt A. H., Feigen J. Biomedical polimers: bacterial adhesion, colonization and infection. CRC Critical Reviews in Biocompatibility 2: 219-301. CRC press (1986).
- 24.- Davis. Dulbecco. Tratado de Microbiología 2da Ed. Salvat Barcelona España p. 835 (1978).

- 25.- Demierre G., Rivier D., Hilpert H. Adherence of pathogenic Escherichia coli to epithelial cells isolated from the intestinal mucosa of the rabbit. Path Microbiol 42: 137-146 (1975).
- 26.- Denis M., Mathieu L. G., Lecomte J. Adherence of gram-positive and gram-negative bacterial strains to human lung fibroblasts "in vitro" . Exp Biol 45: 323-334 (1986).
- 27.- Douglas W Morck., Merle E. Olson., Stephen D. Acres. Presence of Bacterial Glycocalyx and Fimbriae on Pasteurella haemolytica in Feedlot Cattle with Pneumonic Pasteurellosis. Can J Vet Res 53: 167-171 (1989).
- 28.- Fainstein V., Musher D. M. and Cate T. R. Bacterial adherence to pharyngeal cells during viral infection. J Infect Dis 141 (2): 172-176 (1980).
- 29.- Freter R., Stauffer e., Cleven D. Continuous-flow cultures as "in vitro". models of the ecology of large intestinal flora. Infect Immun 39 (2): 666-675 (1983).
- 30.- Freter R., Brickner H., Fekete J. Survival and implantation of Escherichia coli in the intestinal tract. Infect Immun 39 (2): 686-703 (1983).
- 31.-Frymus T., Wittenbrink M. M., Petzoldt K. Failure to demonstrate adherence of Pasteurella multocida involved in the atrophic rhinitis to swine nasal epithelial cells. J Vet Med (B) 33: 140-144 (1986).
- 32.- Garcia Alba P. Técnica para la observación de cultivo de tejidos. Tesis Licenciatura, F.M.V.Z. Universidad Nacional Autónoma de México: 18-29 (1986).

- 33.- Glorioso J. C., Garth W. J., Rush H. G., Pentler L. J.
Adhesion of type A Pasteurella multocida to rabbit pharyngeal cells and this role in rabbit respiratory tract infections. Infect Immun 35 (3): 1103-1109 (1982).
- 34.- Guerina N. G., Langermann S., Clegg H. W. Adherence of piliated Haemophilus influenzae type B to human oropharyngeal cells. J Infect Dis 146 (4): 564 (1982).
- 35.- Hasty D. L. and Simpson A. Effects of fibronectin and other salivary macromolecules on the adherence of Escherichia coli to buccal epithelial cells. Infect Immun 55 (9): 2103-2109 (1987).
- 36.- Heddleston K. L., Gallegher J. E., Rebers P. A. Fowl cholera. Gel Difusion Precipitin Test for Serotyping Pasteurella multocida from avian species. Avian Dis 16: 925-936 (1972).
- 37.- Henriksen S. D., Froholm L.O. A Fimbriated Strain of Pasteurella multocida with spreading and corroding colonies. Acta Path. Microbiol Scand. 83: 129-132 (1975).
- 38.- Howard J. G., Timoney J. F., Hagan and Bruner's infectious diseases of domestic animals. 7th edition Cornell University Press: 106-108 Ithaca. N. Y. (1981).
- 39.- Hsu J. P. Stochastic Modeling of bacterial adhesion: a two step mechanism with nonlinear adhesion rate. J Theor Biol 124:495-504 (1987).
- 40.- Huxley H. E. Proc. of First European Regional Conference on Electron Microscopy Stockholm, p. 260. Stockholm. (1956).

- 41.- Isaacson R. E., Nagy B. and Moon H. W. Colonization of porcine small intestine by Escherichia coli : Colonization and adhesion factors of pig enteropathogens that lack K88. J Infect Dis 135 (4): 531-539 (1977).
- 42.- Jacques M. Adherence of Pasteurella multocida to porcine upper respiratory tract cells. Current Microbiol 15: 115-119 (1987).
- 43.- Jacques M., Parent N., Foiry B. Adherence of Bordetella bronchiseptica and Pasteurella multocida to porcine nasal and tracheal epithelial cells. Can J Vet Res. 52 (2): 283-5 (1988).
- 44.- Johanson W. G., Woods D. E. Jr., Chaudhuri T. Association of respiratory tract colonization with adherence of gram-negative bacilli to epithelial cells. J. Infect Dis 139 (6): 667-673 (1979).
- 45.- Jones G. W. The attachment of bacteria to the surfaces of animal cells. In: J. L. Reissing (ed), Microbial interactions. Chapman Hall London p. 139-176 (1977).
- 46.- Kanoe M. and Iwaki K. Adherence of Fusobacterium necrophorum to bovine ruminal cells. J. Med Microbiol 23: 69-73 (1987).
- 47.- Krieg N. P., Holt J. G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore/London: 550-558 (1984).
- 48.- Krieg N. P., Holt J. G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. I Williams and Wilkins, Baltimore/London: 408-575 (1984).

- 49.- Leffler H., Lomberg H., Gotschlich E., Hagberg L., Jodal V.
Chemical and clinical studies on the interaction of
Escherichia coli with host glycolipid receptor in urinary
tract infection. Scand J Infect Dis Suppl 33: 46-51 (1982).
- 50.- Lipuma J. J. and Gilsdorf J. R. Role of capsule in adherence
of Haemophilus influenzae type B to human epithelial
cells. Infect Immun 55 (9): 2308-2310 (1987).
- 51.- Maheswaran S. K. and Thies E. S. Influence of encapsulation
on phagocytosis of Pasteurella multocida by bovine
neutro-phils. Infect Immun 26: 76-81 (1979).
- 52.- Nagy B., Moon H. W. and Isaacson R. E. Colonization of
porcine small intestine by Escherichia coli : Ileal
colonization and adhesion by pig enteropathogens that lack
K88 antigen and by some acapsular mutants. Infect Immun 13
(4): 1214-1220 (1976).
- 53.- Nakai.. Kume K., Yoshikawa H., Oyamada T., Yoshikawa T.
Adherence of Pasteurella multocida or Bordetella
bronchiceptica to the swine nasal epithelial cells in vitro
Infect Immun. 56 (1) p 234-240 (1988).
- 54.- Namioka S., Murata M. : Serological studies on
Pasteurella multocida. II Characteristics of (o) antigen of
the organism. Cornell Vet. 51: 507-521 (1961).
- 55.- Nicolet J. Overview of the virulence attributes of the HAP-
group of bacteria Can J Vet Res. 55 suppl p S12-5 (1990).
- 56.- Nishikawa Y. Adherence of Escherichia coli in pathogenesis
of endometritis and effects of estradiol examined by
scanning electron microscopy Infect Immun 47 (1): 318-321 (1985).

- 57.- Palmer L. P., Merrill W. W., Niederman M. S. Bacterial adherence to respiratory tract cells. Am Rev Respir Dis 133: 784-788 (1986).
- 58.- Pichichero M. E. adherence Haemophilus influenzae to human buccal and pharyngeal epithelial cells: relationship to piliation. J. Med Microbiol 18: 107-116 (1984).
- 59.- Pijoan C., Trigo F. Bacterial Adhesion to mucosal surfaces with special reference to Pasteurella multocida isolates from atrophic rhinitis. Can J Vet Res. 54 Suppl p S16-21 (1990).
- 60.- Plotkowski M. C., Puchelle E., Beck G. Adherence of type I Streptococcus pneumoniae to tracheal epithelium of mice infected with influenza A/PR8 virus. Am Rev Respir Dis 134: 1040-1094 (1986).
- 61.- Pyliotis N. A. Ultrastructural observations on Pasteurella multocida type A (bovine origin) Research in Veterinary Science: 31: 87-89 (1981).
- 62.- Ramphal R., Sadoff J. C., Pyle M. Role of pili in the adherence of Pseudomonas aeruginosa to injured tracheal epithelium. Infect Immun 44 (1): 38-40 (1984).
- 63.- Rebers P. A. and Jensen A. E. Expression of pili and capsule by the avian strain P-1059 of Pasteurella multocida. Avian Diseases 32: 313-318 (1988).
64. - Reynolds E. S. Lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy J. Cell Biol 17: 208 (1963).

- 65.- Roberts R. S. An Immunological study of Pasteurella septica.
J. Comp. Path 57: 261-276 (1947).
- 66.- Rimler R. B., Boycott, B. R. Cross-protection between avian, porcine and bovine strains of Pasteurella multocida in the mouse J. Comp. Path 89: 89-98 (1979).
- 67.- Rock A. M. Factores de estrés y mortalidad en conejos Especialidades Veterinarias 1 (1): 12-14 (1978).
- 68.- Rosembusch C.T., Merchant I. A. (1939). Citado por Iglesias, G. en: Estudio sobre sustancias bactericidas presentes en secreción traqueal de cerdo embrionarios. Tesis maestría, FES-Cuautitlan, UNAM, México (1981).
- 69.- Runnels P. C., Moon H. W. Capsule reduces adherence of enterotoxigenic Escherichia coli to isolated intestinal epithelial cells in pigs Infect Immun 45 (3):737-740 (1984).
- 70.- Saab O. A., de Allori C. G., de Fernández N. P. Factores de adhesión en Escherichia coli enterotoxigénica. Rev Latinoamer Microbiol 29: 23-28 (1986).
- 71.- Selinger P. S., Reed W. P. and McLaren L. C. Model for studying bacterial adherence to epithelial cells infected with viruses. Infect Immun 32 (2): 941-944 (1981).
- 72.- Siegmund O. H. ed. The Merck Veterinary Manual. 5th Ed. pp. 1177-1178. Rahway, N. J., U.S.A. (1979).
- 73.- Snoeyenbos G. H., Soerjadi A.S. and Weinack O.M. Gastrointestinal colonization by Salmonellae and pathogenic Escherichia coli in monoxenic and holoxenic chick and poults. Avian Dis 26 (3): 565-575 (1982).

- 74.- Steven H. Weisbroth, Platt R. E., Kraus A. L. The biology of the laboratory rabbit. Academic Press: 194-205, London. (1974).
- 75.- Svanborg E. C., Marild S., Korhonen T. K. Adhesion an inhibition by antibodies. Scand J. Infect Dis Suppl 33: 72-78 (1982).
- 76.- Tannok G. W. and Smith J. M. B. The effect of food and water deprivation (stress) on Salmonella carrier mice. J. Med Microbiol 5: 283-289 (1972).
- 77.- Tramont E. C. Specificity of inhibition of epithelial cell adhesion of Neisseria gonorrhoeae. Infect Immun 14 (2): 593-595 (1976).
- 78.- Trigo E., Pijoan. Presence of pili in Pasteurella multocida strains associated with atrophic rhinitis Vet Rec 122: 19 (1988).
- 79.- Tuomanen E. Piracy of adhesins: attachment of superinfecting pathogens to respiratory cilia by secreted adhesins of Bordetella pertussis Infect Immun 54 (3): 905-908 (1986).
- 80.- Van Loosdrecht., Norde W. and Zehnder A. J. B. Influence of cell surface characteristics on bacterial adhesion to solid supports. Proc. 4th European Congress on Biotechnology 4: 575-580 (1987).
- 81.-Walt D. R., Smulow J. B., Turesky S. S. The effect of gravity on initial microbial adhesion. J. Colloid Interf Sci 107 (2): 334-336 (1985).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 82.- Wood Helice S. J., Dalton h. p., Shadomy S. Hydrophobic and adherence properties of Clostridium difficile. Eur J. Clin Microbiol. 5 (4): 441-445 (1986).
- 83.- Woods D. E., Atraus D. C., Waldemar G: J. Jr. Role of pili in adherence of Pseudomonas aeruginosa to mammalian buccal epithelial cells Infect Immun 29 (3): 1146-1151 (1980).
- 84.- Yuval E. and Nathan L. Recognitory bacterial surface lectins which mediated its mannose-specific adherence to eukariotic cells. Biol Cell 51: 259-266 (1984).