

11261



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina

15  
23.

AISLAMIENTO DE UNA HEMAGLUTININA DE *Pasteurella haemolytica* AI Y EL ESTUDIO DE SU ESPECIFICIDAD POR CARBOHIDRATOS

T E S I S  
Que para obtener el grado de  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
p r e s e n t a

LAURA JARAMILLO MEZA

Director de Tesis: DR. EDGAR ZENTENO GALINDO

Coasesor: DR. FRANCISCO TRIGO TAVERA



México D. F.

266995

1998

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

## DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ING. LEOPOLDO SILVA  
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION  
ESCOLAR DE LA UNAM.  
PRESENTE.

Me permito informarle que el Subcomité Académico del Doctorado en Ciencias Biomédicas acordó designar el siguiente Jurado para examen de grado como Maestra en Ciencias Biomédicas, área Inmunología, de la QFB. LAURA JARAMILLO MEZA quien defenderá la tesis: "AISLAMIENTO DE UNA HEMAGLUTININA DE PASTEURELLA HAEMOLYTICA Y EL ESTUDIO DE SU ESPECIFICIDAD POR CARBOHIDRATOS".

PRESIDENTE: DR. FRANCISCO J. TRIGO  
SECRETARIO: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO  
PRIMER VOCAL: DR. EDGAR ZENTENO GALINDO  
SUPLENTE: DR. MARIO CALCAGNO  
SUPLENTE: DRA. LUZ MARIA LOPEZ MARIN

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 8 de junio de 1998.

Dr. René Drucker Colín  
Responsable  
Facultad de Medicina.

Dr. Juan Pedro Laclette San Román  
Coordinador  
Doctorado en Ciencias Biomédicas.

C.c.p. Dr. Edgar Zenteno Galindo.-Tutor.-Presente.  
QFB. Laura Jaramillo Meza.-Alumna.-Presente

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bacteriología del Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología Veterinaria ( CENID-Microbiología) del INIFAP-SAGAR, como parte de las investigaciones que se llevan acabo en el proyecto " Complejos Neumónicos de Rumiantes". En colaboración con el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Trabajo parcialmente financiado por CONACyT (27609 M), DGAPA-UNAM (PAPIIT-IN224598) y por el Programa ECOS México-Francia (M97B05)

## **DEDICATORIAS**

**A ti Padre**, como un humilde homenaje al hombre firme y sabio que ha fomentado en mi el espíritu de lucha y superación, no con la palabra sino con el ejemplo. Gracias por tu apoyo y protectora presencia.

**A ti Madre**, por que has sido siempre mi punto de apoyo, sin ti no hubiera sido fácil lograr lo que juntas hemos alcanzado. Gracias por tu comprensión y enorme sacrificio.

**A Fernando**, con profundo amor y respeto, por todos los momentos de alegría y angustia compartidos. Por tu comprensión y sobre todo por tu paciencia. Hemos dado un paso más.

**A Perlita y al Joven Fernando Rodrigo**, porque son mi fuente de animación y mi mayor alegría. Gracias por su ternura e inocencia.

**A mis Hermanos**, Gina, Susy, Amparo, Lupita, Felipe, Rosario, Fernando, Martín, Mario, Jaime, Gilberto y Verónica con quienes he compartido sueños, esperanzas, alegrías y tristezas. Porque las enseñanzas y buenos propósitos de nuestros padres nos mantengan siempre unidos.

**A mis Amigos**, Francisco Aguilar, Francisco Morales, Laura, Efrén y Elisa, Por su apoyo, amistad y palabras de aliento brindadas.

**Al Ing. Francisco Velázquez Quezada**, por su fortaleza y enorme espíritu de superación dignos de ejemplo.

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Dr. Edgar Zenteno Galindo,** por el animo infundido para lograr esta etapa de preparación. Gracias también por su comprensión, apoyo y paciencia que lo convierten de un buen asesor en un gran amigo.

**Al Dr. Francisco Trigo Tavera,** por su orientación, apoyo e interés manifestados durante la realización de esta tarea formativa.

**A Los Honorables Miembros del Jurado,** Dra. Luz María López Marín, Dr. Mario Calcagno, Dr. Enrique Ortega Soto, Dr. Francisco Trigo Tavera y Dr. Edgar Zenteno Galindo, por su inapreciable tiempo invertido en la revisión y análisis de este trabajo, así como por sus atinadas observaciones, sugerencias y críticas que hicieron posible mejorar la calidad del manuscrito.

**Al Dr. Diódoro Batalla Campero,** quién con su anuencia y apoyo pude realizar estos estudios. Gracias por su preocupación e interés.

**Al Dr. Juan García García,** por su paciencia y consideración mostradas al permitirme concluir esta fase de mi desarrollo profesional.

**Al Ing. Gilberto Jaramillo Meza,** Por tu apoyo incondicional e inapreciable ayuda. Porque se que la culminación de este trabajo te llenará también de satisfacción y alegría. Gracias hermano.

<b>INDICE DE MATERIAS</b>	<b>Pagina</b>
I. RESUMEN	6
II. ANTECEDENTES	8
II.1. <i>Pasteurella haemolytica</i>	10
II.2. Patogenia de la Pasteurelisis Neumónica	10
II. 3. Mecanismos de Adherencia Bacteriana	19
III. JUSTIFICACION	26
IV. HIPOTESIS	26
V. OBJETIVO	26
VI. MATERIAL Y METODOS	27
VI. 1. Cepas de <i>Pasteurella haemolytica</i> y Condiciones de Crecimiento.	27
VI. 2. Obtención de Extractos Solubles Bacterianos	27
VI. 3. Determinación de Carbohidratos por Cromatografía de Gases	28
VI. 4. Análisis Electroforéticos en Geles de Poliacrilamida-SDS	29
VI. 5. Determinación de Actividad Hemaglutinante	29
VI. 6. Estudio de la Especificidad Aglutinante por Carbohidratos	30
VI. 7. Purificación de la Hemaglutinina por Cromatografía de Afinidad	31
VI. 8. Determinación de la Composición de Aminoácidos de la Hemaglutinina	32
VI. 9. Adherencia de <i>Pasteurella haemolytica</i> A1 en Células Epiteliales de Tráquea Bovina	32
VI. 10. Estudio de la Especificidad de Unión de la Bacteria a Células Epiteliales de Tráquea Bovina	34

<b>VII. RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>VII. 1. Caracterización Bioquímica de las Cepas de <i>Pasteurella haemolytica</i></b>	<b>35</b>
<b>VII. 2. Caracterización del Material Soluble de los Extractos Bacterianos</b>	<b>37</b>
<b>VII. 2.1. Análisis Electroforéticos</b>	<b>37</b>
<b>VII. 3. Composición de Carbohidratos de Extractos de Diferentes Serotipos de <i>Pasteurella haemolytica</i></b>	<b>38</b>
<b>VII. 4. Actividad Hemaglutinante de Extractos Solubles</b>	<b>40</b>
<b>VII. 5. Especificidad de Extractos por Carbohidratos</b>	<b>41</b>
<b>VII. 6. Purificación de la Hemaglutinina</b>	<b>43</b>
<b>VII. 7. Caracterización de la Hemaglutinina</b>	<b>45</b>
<b>VII. 7.1. Peso Molecular</b>	<b>45</b>
<b>VII. 7.2. Caracterización Química</b>	<b>46</b>
<b>VII. 8. Especificidad de la Hemaglutinina por Carbohidratos</b>	<b>47</b>
<b>VII. 9. Adherencia de <i>Pasteurella haemolytica</i> A1 a Células Epiteliales de Tráquea Bovina</b>	<b>48</b>
<b>VII. 10. Inhibición de la Adherencia por azúcares y Glicoproteínas</b>	<b>49</b>
<b>VIII. DISCUSION</b>	<b>50</b>
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	<b>66</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>67</b>



## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

## Pagina

Tabla 1.	Estructuras de las cadenas O-Polisacáridos de <i>Pasteurella haemolytica</i> .	14
Tabla 2.	Composición de monosacáridos de lipopolisacáridos de <i>Pasteurella haemolytica</i> .	15
Tabla 3.	Composición de monosacáridos de la región Core de los lipopolisacáridos de <i>Pasteurella haemolytica</i> .	15
Tabla 4.	Estructuras de los polisacáridos capsulares de <i>Pasteurella haemolytica</i> .	17
Tabla 5.	Características bioquímicas de aislamientos de <i>Pasteurella haemolytica</i> A1.	35
Tabla 6.	Características bioquímicas de cepas de referencia de <i>Pasteurella haemolytica</i> .	36
Figura 1.	Perfil proteico de extractos solubles de aislamientos de <i>Pasteurella haemolytica</i> A1 en SDS-PAGE.	37
Figura 2.	Perfil proteico de extractos solubles de diferentes biotipos y serotipos de <i>Pasteurella haemolytica</i> .	38
Tabla 7	Composición de azúcares de extractos solubles obtenidos de diferentes serotipos de <i>Pasteurella haemolytica</i> .	39
Tabla 8	Actividad hemaglutinante de los diferentes serotipos de <i>Pasteurella haemolytica</i> para eritrocitos de conejo y efecto de las enzimas tripsina, pronasa y neuraminidasa.	40

Tabla 9	Efecto de azúcares, glicósidos, y glicoproteínas sobre la actividad hemaglutinante en extractos solubles de diferentes serotipos de <i>Pasteurella haemolytica</i> .	41
Tabla 10.	Efecto de azúcares y glicósidos sobre la actividad hemaglutinante de un extracto soluble de <i>Pasteurella haemolytica</i> A1.	42
Tabla 11.	Efecto de glicósidos y glicoproteínas sobre la actividad hemaglutinante de un extracto de <i>Pasteurella haemolytica</i> A1.	42
Figura 3.	Aislamiento de la hemaglutinina de <i>Pasteurella haemolytica</i> A1 por cromatografía de afinidad en una columna de estroma de eritrocitos de conejo.	43
Tabla 12	Proceso de purificación de la hemaglutinina de <i>Pasteurella haemolytica</i> A1 por cromatografía de afinidad en una columna de estroma de eritrocitos de conejo.	44
Figura 4	Elución de la hemaglutinina de <i>Pasteurella haemolytica</i> A1 por cromatografía de afinidad en columna de agarosa unida a <i>N</i> -acetilglucosamina.	44
Figura 5	Análisis electroforético en SDS-PAGE de una proteína de 70 kDa aislada por cromatografía de afinidad en una columna de GlcNAc.	45

Tabla 13	Composición de aminoácidos de la proteína de 70 kDa con actividad hemaglutinante.	46
Tabla 14.	Efecto de azúcares, glicósidos y glicoproteínas sobre la actividad aglutinante de la hemaglutinina de <i>Pasteurella haemolytica</i> A1.	47
Figura 6.	Microfotografía de células ciliadas de tráquea bovina con bacterias capsuladas de <i>Pasteurella haemolytica</i> A1.	48
Figura 7.	Microfotografía de células ciliadas de tráquea bovina con bacterias no capsuladas de <i>Pasteurella haemolytica</i> A1, cepa Lau (X 1000).	48
Tabla 15.	Adherencia de bacterias de <i>Pasteurella haemolytica</i> A1 en células ciliadas de tráquea bovina.	49
Tabla 16.	Inhibición de la adherencia de <i>Pasteurella haemolytica</i> A1 por azúcares y glicoproteínas.	50

## I RESUMEN

*Pasteurella haemolytica* es una de las bacterias que se aísla en alta frecuencia de los procesos neumónicos de los rumiantes y varios de los mecanismos y factores involucrados en la patogénesis están ampliamente documentados; sin embargo, las fases tempranas de colonización no han sido completamente aclaradas, debido a ello el propósito de este trabajo fue identificar y caracterizar una proteína de la bacteria, con base en su posible propiedad hemaglutinante, para posteriormente determinar su participación en el mecanismo de adherencia.

Para tal fin se obtuvieron extractos salinos de los diferentes serotipos de la bacteria, los cuales se sometieron a una precipitación diferencial con sulfato de amonio para eliminar la mayor cantidad posible de polisacáridos capsulares. Los extractos solubles precipitados se ensayaron con diferentes especies de eritrocitos para determinar sus propiedades hemaglutinantes y también fueron analizados tanto electroforéticamente como en su composición de carbohidratos. Se encontró actividad hemaglutinante para eritrocitos de conejo en los diferentes extractos de ambos biotipos y no se observó aglutinación con otras especies de eritrocitos ni en condiciones nativas, ni después del tratamiento con enzimas. La actividad fue similar entre los serotipos del biotipo A, a diferencia de los del serotipo del biotipo T que mostraron una actividad específica superior. El estudio de la especificidad hemaglutinante, indicó el reconocimiento de GlcNAc y de ácido siálico sobre la superficie del eritrocito, la participación de residuos de ácido siálico se sugirió también por la falta de reconocimiento después del tratamiento de los eritrocitos con neuraminidasa. El análisis electroforético de los extractos de ambos biotipos, mostró similitudes en los perfiles proteicos de los serotipos del biotipo A, presentando de 8 a 9 bandas principales y diversas proteínas menores comprendidas entre los 14 a 220 kDa. Las bandas principales tienen pesos moleculares aparentes de 220, 205, 100, 96, 70, 55, 42, 35 y 30 kDa; mientras que el perfil de los extractos del biotipo T fueron significativamente diferentes, se observó un menor número de bandas comprendidas en el rango de los 30 a 200 kDa, apreciándose con mayor intensidad bandas de 100, 70, 55, 40 y 30 kDa.

En relación a la caracterización de azúcares en los extractos solubles, se encontraron diferencias en la cantidad y composición. Sin embargo, en todos se observó una proporción alta de galactosa, glucosa y GlcNAc. Los azúcares muestran también diferencias en cuanto a composición, presencia y cantidad con la mayoría de los polisacáridos y lipopolisacáridos descritos en la bacteria, lo cual indica la existencia de otros componentes glicosilados sobre la superficie bacteriana.

Debido a que el serotipo A1 de *P. haemolytica* es el que se aísla con más frecuencia de pasteurellosis neumónica bovina, el estudio se centró a identificar y caracterizar la hemaglutinina a partir de extractos de este serotipo. La proteína se aisló por cromatografía de afinidad utilizando columnas de agarosa unida a GlcNAc o por columnas conteniendo estroma de eritrocito de conejo; hubo una mayor eficiencia en el aislamiento empleando este último procedimiento. El análisis químico practicado a la hemaglutinina, indica que es una proteína de 70 kDa que carece de fracción oligosacárida y es rica en residuos de glicina, serina, ácido glutámico y alanina; al igual que el extracto la proteína muestra reconocimiento para GlcNAc y ácido siálico. Se investigó la posible participación de la proteína en el mecanismo de adhesión de la bacteria empleando células ciliadas de tráquea bovina y aislamientos de la bacteria cuyos extractos presentaban actividad hemaglutinante, al mismo tiempo fue posible comparar la capacidad adherente de estas bacterias con una cepa carente de actividad. Las bacterias capsuladas se adhirieron pobremente a las células de tráquea, en promedio 2.9 bacterias por célula, mientras que la cepa no capsulada se adhirió en mayor número y en un mayor porcentaje de células. Estas observaciones indican la participación de diferentes componentes con propiedades adhesivas para ambos tipos de bacterias, que al parecer en las bacterias capsuladas se encuentra localizado en la superficie bacteriana, mientras que para la variante no capsulada la interacción está determinada por algún componente cubierto por la cápsula. En los ensayos de inhibición de la adherencia se observó que al igual que la hemaglutinina purificada, la interacción de la bacteria se inhibió con GlcNAc y ácido siálico, lo cual sugiere que la proteína participa en el mecanismo de adhesión de la bacteria.

## II ANTECEDENTES

Los procesos neumónicos son considerados de suma importancia en la industria pecuaria, debido a que afectan directamente el proceso productivo de las explotaciones comerciales. Las pérdidas económicas se deben al retraso en el crecimiento de los animales afectados crónicamente por baja conversión alimenticia, al alto costo de los tratamientos y a los altos índices de mortalidad que se presentan en las poblaciones susceptibles a las infecciones.<sup>125, 141</sup>

Los datos sobre prevalencia de neumonías varían según el país de procedencia, tipos de explotación, edad de los animales y época del año en que se realiza el estudio. Las tasas promedio de incidencia en corderos varían del 10 al 40%, tanto en México como en el extranjero, sin embargo, los valores obtenidos a nivel de rastro son más bajos que los de Centros de Diagnóstico.<sup>127</sup> En bovinos, las enfermedades respiratorias representan más del 66% de las enfermedades diagnosticadas por necropsias en hatos manejados intensivamente. Un estudio, sobre la presencia de neumonías en rastros indicó que existe una prevalencia del 8.7 % en becerros.<sup>124,126</sup>

Dentro de los procesos neumónicos de estos animales *Pasteurella haemolytica* y *Pasteurella multocida* son los agentes bacterianos que se aíslan con alta frecuencia, la enfermedad producida por ellas se conoce como Pasteurelisis neumónica. En Estados Unidos se estima que la Pasteurelisis neumónica ocasiona pérdidas anuales por 800 millones de dólares; en nuestro país, a pesar de que no existen aún evaluaciones al respecto, las pérdidas se estiman igualmente considerables.<sup>29, 125, 141</sup> Las especies de *Pasteurella* forman parte de la flora normal de la cavidad nasofaríngea de los rumiantes, pero bajo situaciones que alteran los mecanismos de defensa pulmonares del hospedero logran establecerse en el aparato respiratorio bajo y causar daño al tejido pulmonar. Debido a que en la presentación de la enfermedad intervienen diversos factores y pueden estar

involucrados varios agentes infecciosos, la enfermedad es propiamente denominada como Complejo Respiratorio.<sup>29, 128</sup>

En relación al concepto multifactorial de Complejo Respiratorio se menciona que los factores propios de la tecnificación en la producción pecuaria, constituyen condiciones favorables para la presentación de la enfermedad, debido a que provocan estrés en el animal. Esta situación de estrés es 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, bloqueo en la unión de estos factores a los granulocitos e inhibición de la capacidad de migración del macrófago alveolar; en ocasiones cuando se añade una higiene deficiente y una humedad relativa alta en el medio ambiente (80 %), se incrementa la posibilidad de que se presente la enfermedad.<sup>19,55</sup>

En la presentación del Complejo Respiratorio intervienen agentes infecciosos primarios y secundarios; es decir, aquellos que intervienen originalmente y los oportunistas, que se establecen después de que se ha desarrollado la infección inicial; generalmente, los virus actúan como agentes primarios y facilitan la infección bacteriana debido a que provocan un efecto citopático directo en el aparato respiratorio, reducen la eliminación bacteriana por la carpeta mucociliar facilitando la adhesión y colonización por estos microorganismos, disminuyen la capacidad fagocítica del macrófago alveolar 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.<sup>30, 122, 142</sup>

La bacteria más patógena y frecuente en el complejo respiratorio de los bovinos es *Pasteurella haemolytica* biotipo A serotipo 1, de este síndrome pueden aislarse también, aunque en menor frecuencia, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus somnus*.<sup>125</sup>

## **II.1. *Pasteurella haemolytica***

Los microorganismos de *Pasteurella haemolytica* son cocobacilos pleomórficos que muestran coloración bipolar, anaerobios facultativos, gram-negativos, inmóviles no esporulados y capsulados. Catalasa y oxidasa positivos, fermentan glucosa y otros carbohidratos, produciendo ácido pero no gas, son negativos a las pruebas de rojo de metilo, gelatinasa, Voges-Proskauer e indol. *Pasteurella haemolytica* produce una pequeña zona de  $\beta$  hemólisis en placas de agar sangre, en este medio sus colonias son grisáceas, lisas, de apariencia mucóide, por lo general entre 2 y 3 mm de diámetro.<sup>16, 43</sup>

Existen dos biotipos de *Pasteurella haemolytica* clasificados de acuerdo con su capacidad para fermentar los azúcares arabinosa y trealosa; se designan como biotipo A a las cepas que fermentan arabinosa y como biotipo T a las que fermentan trealosa. Debido a diferencias en sus antígenos capsulares se reconocen 16 serotipos; los serotipos 3,4, 10 y 15 pertenecen al biotipo T y los otros restantes al biotipo A.<sup>15, 16</sup> Por diferencias en el contenido de GC entre ambos biotipos y a sus características fenotípicas el biotipo T se designó como *Pasteurella trehalosi*. Los serotipos predominantes de esta bacteria en nuestro país, son: A1, A2, A5 y A9 en corderos y los serotipos A1 y A2 en bovinos.<sup>39</sup>

## **II.2. Patogenia de la pasteurelosis neumónica**

La neumonía producida por *Pasteurella haemolytica* se caracteriza por ser una pleurobronconeumonía aguda o sobreaguda que puede manifestarse como septicemia en animales jóvenes. Los períodos de incubación fluctúan desde los 2 hasta los 14 días después de la aparición del factor predisponente; la morbilidad es del 5 al 40%, mientras que la mortalidad varía del 5 al 20%.<sup>126</sup>



Las lesiones que se observan son áreas de consolidación con necrosis central y hemorragia en la periferia de estas áreas, hay depósitos de fibrina sobre la pleura. Los estudios histopatológicos muestran inflamación severa con áreas multifocales de bronconeumonía fibrino-purulenta aguda con necrosis coagulativa, pleuritis fibrinosa, y congestión capilar.<sup>29</sup>

Varios productos bacterianos de *Pasteurella haemolytica* se consideran importantes en la inducción del daño al tejido pulmonar, dentro de éstos la cápsula, el lipopolisacárido y la leucotoxina son los mejor estudiados. Otros factores de virulencia cuyo papel en la patogénesis no está bien documentado incluyen: proteínas de membrana externa, proteínas reguladas por hierro, glicocálix, fimbrias y enzimas como la neuraminidasa y sialo-glicoproteasa neutra.<sup>3, 92, 94, 102</sup>

Las bacterias del género *Pasteurella* son comensales de las mucosas del aparato respiratorio alto de los rumiantes, donde pueden permanecer sin causar daño. Esta colonización inofensiva resulta de un equilibrio entre el crecimiento bacteriano y la respuesta del hospedero que evita una colonización profunda por mecanismos inmunes a nivel local.<sup>112</sup>

Las células con actividad fagocítica representan la primera línea de defensa celular contra *Pasteurella haemolytica*, pero como resultado de un comensalismo evolutivo, la bacteria ha desarrollado estrategias que le permiten evitar los efectos antibacterianos de estas células; uno de estos mecanismos es la liberación de una exotoxina o leucotoxina que altera y destruye a los diferentes tipos de leucocitos, como macrófagos alveolares, monocitos, neutrófilos, linfocitos, células cebadas y plaquetas.<sup>34, 37, 111</sup> Los genes de la leucotoxina poseen alta homología con las hemolisinas de *Escherichia coli* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, estas toxinas contienen una serie de nonapéptidos ricos en ácido aspártico y glicina, localizados a partir del tercer residuo en el carboxilo terminal de la toxina, debido a esta característica se agrupan dentro de la familia de las toxinas de secuencias repetitivas (RTX)<sup>48, 80, 81</sup>

La toxina es una citolisina productora de poros, compuesta por dos o más subunidades protéicas, que daña a la célula insertándose a la membrana y forma poros transmembranales, lo que provoca la salida de potasio y la entrada de sodio, agua y calcio extracelular, con el subsecuente hinchamiento y lisis celular.<sup>36</sup>

La leucotoxina posee especificidad por los leucocitos de rumiante sugiriendo que debe existir un receptor, presente únicamente en la superficie de la membrana de estas células a diferencia de otras citolisinas RTX que han mostrado un mayor amplio de especificidad.

La lisis y degranulación de los neutrófilos por la leucotoxina se considera como la causa primaria del proceso inflamatorio agudo característico de las pasteurelosis neumónica, debido a la liberación de mediadores inflamatorios como leucotrienos, histamina y ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico.<sup>62, 72, 102</sup>

Estudios realizados *in vitro* ponen de manifiesto que la leucotoxina además de su efecto citotóxico sobre neutrófilos de bovino, también estimula el estallido respiratorio y la degranulación de los lisosomas, estos eventos son evidentes por la generación de radicales libres, como: el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La liberación de estos radicales de oxígeno, es un evento inmediato, mientras que la citolisis y liberación de proteasas por la degranulación ocurre posteriormente; estos cambios amplifican la respuesta inflamatoria, que dan como resultado lesiones más severas.<sup>83, 102</sup>

La leucotoxina inhibe la expresión de moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad en monocitos y macrófagos, reduciendo su capacidad para presentar antígenos al linfocito T cooperador; además, concentraciones sublétricas de leucotoxina inhiben la transformación blastoide de linfocitos.<sup>65</sup> Los efectos que la leucotoxina induce por la activación y destrucción de células inmunes competentes guardan más relación con la sobrevivencia de la bacteria en el sitio de infección, que

con el daño al endotelio vascular donde su efecto no es directo, sino que es consecuencia de esta activación.<sup>63, 136</sup>

Los diferentes serotipos de *Pasteurella haemolytica* producen leucotoxinas de tamaño similar a la del serotipo A1, y son reconocidas al utilizar antisueros policlonales contra la leucotoxina de dicho serotipo en análisis de inmunotransferencia, indicando con ello que están inmunológicamente relacionadas; pero, por análisis de Southern blot y secuencia nucleotídica se demostró que no son idénticas.<sup>31</sup>

El lipopolisacárido (LPS) de *Pasteurella haemolytica* A1 comprende del 10-25% del peso seco de la bacteria, presenta lípido A, una región central compuesta de Hex -Hep-ac2-ceto-3-deoxioctulosónico y un polisacárido sómatico o unidades trisacáridas repetitivas de dos residuos de D-galactosa y un residuo de N-acetil-D-galactosamina.<sup>109</sup> El LPS se encuentra generalmente asociado a la célula bacteriana, pero en las infecciones ha podido detectarse en forma libre de las lesiones pulmonares.<sup>22</sup> Se considera uno de los componentes de la bacteria con alta capacidad para inducir una respuesta inflamatoria; las lesiones que induce, constan de grandes áreas de hiperemia y edema que abarcan el área de deposición y parte de los lóbulos adyacentes, pueden observarse también áreas de hemorragia y adhesiones fibrosas.<sup>29</sup>

Microscópicamente se observa influjo de neutrófilos, exudación de fibrina, edema en los espacios alveolares y agregación de plaquetas y neutrófilos en los capilares; estos eventos son consecuencia del daño al endotelio vascular inducidos por el macrófago activado y a la liberación de mediadores proinflamatorios, como el factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1), leucotrienos y ácido araquidónico.<sup>22, 23, 53, 98, 110, 143</sup> Las citocinas mencionadas aumentan la expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos y células endoteliales, favoreciendo el reclutamiento de los neutrófilos; en ocasiones la presencia excesiva de estas células daña el endotelio vascular por la liberación de enzimas lisosomales y metabolitos del

oxígeno, durante los procesos de adhesión y activación.<sup>24, 25, 41, 102</sup> Se sugiere, entonces que estas células juegan un papel central en la conducción de la cascada inflamatoria inducida por este componente bacteriano.

En muchas ocasiones los eventos fisiopatológicos mencionados pueden llevar al choque letal, que se caracteriza por fallas funcionales de órganos vitales como los riñones y tracto gastrointestinal, además del pulmón, debidas a una sobreproducción de mediadores endógenos del sistema inmune, de los cuales el TNF es el más importante.<sup>18</sup>

Lacroix y cols.,<sup>75</sup> realizaron la caracterización de los lipopolisacáridos de los 16 diferentes serotipos de la bacteria; el análisis mostró que los serotipos 2 y 8 carecen de la cadena O-polisacáridica, indicando con ello que el lipopolisacárido de estos serotipos es de tipo rugoso, mientras que los otros 14 serotipos presentan un patrón característico de lipopolisacárido tipo liso. Por espectroscopía de resonancia magnética nuclear se reveló que el polisacárido de la cadena-O, de los serotipos 1, 6 y 9 es idéntico y por análisis de inmunotransferencia se encontró que muchos de los serotipos del biotipo A, portan epitopos comunes en su cadena-O; además; se demostró que los polisacáridos de la cadena O de los serotipos 3 y 15 del biotipo T, así como aquellos de los serotipos 4 y 10 son idénticos (Tabla 1).

**TABLA 1. ESTRUCTURAS DE LAS CADENAS O-POLISACARIDOS DE *Pasteurella haemolytica*.**

Serotipos	Unidad Repetitiva	Referencia
1,6,9	→4)- β-D-Gal <sub>p</sub> -(1→3)-β-D-Gal <sub>p</sub> -(1→3)- β-D-Gal <sub>p</sub> -Nac-(1→	(75, 109)
3,15	→3)- β-D-Gal <sub>p</sub> /Nac(1→4)-α-L-Ram <sub>p</sub> -1(→	(77)
4,10	→3)-α-D-Gal <sub>p</sub> -(1→3)-β-D-Gal <sub>f</sub> -1→	(99, 106)

En cuanto a la composición de los monosacáridos de la región core, es muy similar en los serotipos 1, 6, 8, 9 y 12 de biotipo A, los oligosacáridos contienen cantidades molares iguales de D-glucosa, D-glicero-D-mano-heptosa y L-glicero-D-mano-heptosa; la composición de los monosacáridos de esta región en los serotipos del biotipo T difiere a la de los del biotipo A, ya que éstos contienen L-ramnosa, D-glucosa, D-galactosa, D- y L-glicero-D-mano-heptosa (Tablas 2 y 3).

**TABLA 2. COMPOSICION DE MONOSACARIDOS DE LIPOPOLISACARIDOS DE *Pasteurella haemolytica*.**

AZUCARES	RELACIÓN MOLAR*												
	SEROTIPO DEL BIOTIPO A									SEROTIPO DEL BIOTIPO T			
	1	2	6	7	8	9	11	12	16	3	4	10	15
RAMNOSA										1.8	0.5	0.4	2.6
GLUCOSA	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
GALACTOSA	0.7	0.5	1.2	0.6	0.2	1.0	0.8	0.8	0.7	0.1	18	5.5	0.1
GLUCOSAMINA	0.7	0.6	0.7	0.6	0.6	1.0	0.2	0.8	0.8	2.3	0.8	0.9	3.5
D-GLICERO-D-MANO-HEPTOSA	1.3	0.6	1.4	0.7	0.6	0.8	0.1	1.2	1.0	1.2	0.5	0.6	0.7
L-GLICERO-D-MANO-HEPTOSA	1.5	0.8	1.4	1.1	0.7	0.6	0.1	1.4	1.3	1.5	0.9	1.6	1.2

\* RAZON MOLAR EN RELACION CON LA GLUCOSA ( CONSIDERADA COMO 1.0)  
LACROIX, R. P. Y COL. Infect. Immun. 61 (1) 1993

**TABLA 3. COMPOSICION DE MONOSACARIDOS DE LA REGION CORE DE LOS LIPOPOLISACARIDOS DE *Pasteurella haemolytica*.**

AZUCARES	RELACIÓN MOLAR*								
	SEROTIPO DEL BIOTIPO A					SEROTIPO DEL BIOTIPO T			
	1	6	8	9	12	4	10	15	
RAMNOSA						1.0	0.7	1.3	
GLUCOSA	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	
GALACTOSA	0.8	0.9		0.2	1.0	12.0	2.0	0.9	
D-GLICERO-D-MANO-HEPTOSA	2.0	2.0	2.1	2.0	2.0	1.1	0.9	1.6	
L-GLICERO-D-MANO-HEPTOSA	2.2	2.3	2.3	2.6	1.9	2.3	2.2	2.3	

\* RAZON MOLAR EN RELACION CON LA GLUCOSA ( CONSIDERADA COMO 2.0)  
LACROIX, R. P. Y COL. Infect. Immun. 61 (1) 1993

El lipopolisacárido y la cápsula de *Pasteurella* desempeñan un papel crítico como interfases principales, entre el microorganismo y la célula huésped, razón por la cual muchas investigaciones tienen el propósito de estudiar las interacciones que se establecen entre la bacteria y su ambiente a un nivel estructural y funcional, por ejemplo Brogden y cols.,<sup>27</sup> observaron que el polisacárido capsular del serotipo A1 interactúa con el surfactante alveolar *in vitro* causando una reacción de precipitación en la que intervienen azúcares *N*-acetilados; cuando trataron de identificar la especificidad de esta interacción, encontraron que el surfactante reaccionaba fuertemente con *N*-acetil-glucosamina y en menor grado con *N*-acetil-galactosamina, pero no presentaba ningún efecto con *N*-acetil-manosamina uno de los constituyentes del polisacárido capsular. La interacción de este componente bacteriano con el surfactante *in vivo* no produce cambios fisiopatológicos importantes que conduzcan a daño del tejido pulmonar, pero se cree puede ser una interacción tipo receptor-adhesina involucrada en la adhesión de la bacterias al epitelio alveolar.

La cápsula protege a la bacteria de la fagocitosis y de la actividad bactericida mediada por el complemento; una posible explicación a este último fenómeno es que el material capsular forma una barrera entre el complejo de ataque a la membrana, formado por los componentes del complemento de C5 hasta C9, y la superficie bacteriana, previniendo el efecto lítico, aun en presencia de anticuerpos; Sin embargo, la presencia de anticuerpos específicos al material capsular facilitan la fagocitosis de la bacteria y pueden ser de particular importancia en la resistencia a la pasteurelosis.<sup>33, 46, 47</sup>

La diversidad estructural y consecuentemente de las características antigénicas de los polisacáridos capsulares (Tabla 4), puede estar relacionada con la especificidad al hospedero; así como, en diferencias en el potencial patogénico entre cepas e inmunidad conferida por las vacunas.<sup>5, 6, 7, 8, 9</sup>

**TABLA 4. ESTRUCTURAS DE LOS POLISACARIDOS CAPSULARES DE *Pasteurella haemolytica*.**

Serotipos	Unidad Repetitiva	*Referencia
1	→3)-O-(2-acetamido-2-deoxi-4-O-acetil-β-D-ácido manopiranosil-urónico)-(1→4)-O-(2-acetamido-2-deoxi-β-D-manopiranososa)-(1→	(5)
2	(poli-2,-8-N-acetilneuraminico)	(9)
4	→(2-glicerol-1)→(fosfato)→(6-α-D-galactopiranososa-1)→	(6)
7	→3)-β-2-acetamido-2-deoxigalactopiranososa-(1→3)-α-2-acetamido-2-deoxi-6-O-acetil-glucopiranososa-(fosfato→	(8)
15	→(2-glicerol-3)→(fosfato)→(4-α-D-galactopiranososa-1)→	(7)

En la actualidad a pesar de conocer algunos de los principales mecanismos de virulencia de la bacteria se desconoce que estructuras le permiten colonizar el aparato respiratorio y ejercer sus efectos patogénicos. Morck y cols.,<sup>92</sup> sugieren que la colonización de los alveolos pulmonares por *Pasteurella haemolytica* es una importante etapa inicial en la patogénesis de la pasteurelisis en la que puede estar involucrada el glicocálix capsular y/o fimbrias. Estas estructuras se identificaron en *P. haemolytica* serotipo A1 por estudios de microscopía electrónica tanto en condiciones *in vitro* como en el fluido broncoalveolar de animales experimentalmente infectados en los cuales se observaron estructuras fimbriales adheridas al epitelio de la tráquea.<sup>93</sup> Estas observaciones apoyan la sugerencia de Morck sobre la posible participación de las fimbrias en la colonización del aparato respiratorio alto; curiosamente el glicocálix bacteriano o material de superficie de esta bacteria es mayor en la fase de crecimiento logarítmico, al igual que la producción de leucotoxina, sugiriéndose que esta estructura podría participar en la adherencia de la bacteria a los leucocitos y ejercer su efecto citolítico.<sup>92, 111.</sup>

Aunque Potter y col.,<sup>101</sup> tratando de apoyar la presencia de fimbrias en la bacteria, lograron la purificación de subunidades fimbriales de 35 kDa, carentes de actividad hemaglutinante, varios laboratorios han tenido dificultades para demostrar la presencia de estas estructuras en aislamientos recientes, utilizando los mismos procedimientos.

Dentro de los exoproductos de la bacteria se ha identificado y caracterizado una neuraminidasa. La producción de esta enzima se considera un importante factor de virulencia para muchas bacterias como *Streptococcus agalactiae*, *S. pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Vibrio cholerae*, el papel sugerido para la enzima es la remoción de ácido siálico de las glicoproteínas de la superficie celular o del moco, facilitando la adherencia de dichos microorganismos.<sup>56, 97, 118</sup>

En un estudio sobre la producción de esta enzima en los diferentes serotipos de *Pasteurella haemolytica* mostró que solo el serotipo 11 no la produce; los pesos moleculares de las neuraminidasas producidas varían entre serotipos y comprenden de los 150 a 200 kDa, presentan especificidad hacia substratos similares que presentan enlaces cetosídicos como: *N*-acetilneuraminil-lactosa, fetuina, ácido colomínico y son menos activas hacia la mucina submaxilar bovina.<sup>118</sup>

Además de la neuraminidasa, la bacteria secreta una glicoproteasa específica para *O*-sialoglicoproteínas; la enzima es una metaloproteasa neutra de 35 kDa con un sitio de unión al zinc y un punto isoeléctrico de 5.2, presenta actividad hacia residuos *O*-sialoglicopéptidos.<sup>35, 95</sup> Un examen sobre la distribución de esta enzima entre los diferentes serotipos reveló que todos los serotipos del biotipo A contienen el gen *gcp* que la codifica, a excepción del serotipo 11, que mostró una organización genética diferente y no presenta actividad proteolítica. El biotipo T carece del gen y de actividad proteolítica; esto último puede tener relevancia en la patogenicidad diferencial entre ambos biotipos.<sup>1, 2, 3</sup> De los procesos neumónicos se ha aislado con mayor frecuencia el serotipo A1. Aparentemente existe relación entre su capacidad de inducir neumonía y la cantidad de producción de las enzimas neuraminidasa y



sialoglicoproteasa, debido a que se ha encontrado que aislamientos recientes de este serotipo producen altos niveles de neuraminidasa. Este hecho indica la activa participación de estas enzimas en el proceso invasivo de *Pasteurella haemolytica* A1  
3, 62, 102

### **II.3. Mecanismos de adherencia bacteriana.**

La adherencia o unión de las bacterias a las superficies epiteliales representa la etapa crítica e inicial para la colonización e infección; esta capacidad está relacionada con el reconocimiento de estructuras relevantes sobre las superficies de las células, tanto hospedera como bacteriana e involucra interacciones fisicoquímicas específicas como no específicas. Algunos microorganismos se multiplican y permanecen en estrecha asociación sobre la superficie donde ejercen sus efectos patógenos; para otros, la unión es una etapa que precede a la invasión celular y penetración a tejidos más profundos.<sup>56, 60</sup> En muchos casos las interacciones que se establecen entre el hospedero y la bacteria han podido caracterizarse experimentalmente, permitiendo su análisis y estudio<sup>49, 86, 103</sup>

Las bacterias se adhieren a la superficie epitelial vía receptores específicos para grupos de bacterias, y los factores bacterianos involucrados en las interacciones bacteria-célula son diversos, lo cual indica que estos microorganismos pueden expresar formas alternativas de adhesión celular.<sup>11, 89</sup> La expresión o represión de los diferentes mecanismos de adherencia bacteriana, están regulados aparentemente, por las condiciones microambientales y por la superficie celular dentro del mismo hospedero.<sup>114, 117, 140</sup> En su forma más simple, la adherencia microbiana requiere la participación de una adhesina y su receptor, las interacciones que se establecen entre estos componentes son el resultado de enlaces complementarios específicos que permiten a la bacteria adherirse y evitar los mecanismos de defensa del hospedero.<sup>13, 104</sup>

Las estructuras bacterianas hasta ahora conocidas responsables de la adhesión incluyen fimbrias, adhesinas no fimbriales, adhesinas proteináceas parecidas a la cápsula, el glicocálix, el lipopolisacárido, ácidos lipoteicóicos, proteínas de membrana externa y la misma cápsula tiene aparentemente capacidad para desempeñar esta función; en general se asume que cualquier antígeno de la superficie bacteriana que tenga una conformación estereoquímica, perfil hidrofóbico y carga neta electrostática complementaria con las estructuras de membrana de su célula blanco pueden funcionar como adhesinas.<sup>56</sup> La presencia de receptores celulares para adhesinas bacterianas está determinada genéticamente, se relaciona con la edad del hospedero y varía en los diferentes niveles de los tractos mucosales; lo cual explica las diferencias en grado de colonización y la susceptibilidad o resistencia a la infección.<sup>38</sup>

Los receptores mejor conocidos son las cadenas oligosacarídicas de glicoproteínas y glicolípidos de la superficie celular, los más importantes son las glicoproteínas, que además de localizarse en la superficie de la membrana, se secretan dentro del moco que cubre el epitelio de los tractos digestivos y respiratorios.

Las glicoproteínas tipo mucinas son macromoléculas constituidas por un péptido central, que representa del 10 al 30% de su peso y por cadenas oligosacáridas de residuos de galactosa, fucosa, ácido *N*-acetil-neuramínico, ácido *N*-glicolil-neuramínico y *N*-acetil-glucosamina unidas al péptido por enlaces *O*-glicosídicos o *N*-glicosídicos. Los enlaces *O*-glicosídicos, conocidos como tipo mucina, se forman entre el residuo *N*-acetil-galactosamina de la cadena oligosacárida y el grupo hidroxilo de los aminoácidos serina o treonina de la proteína. Los enlaces *N*-glicosídicos se establecen entre el grupo amino de la asparagina del péptido y los residuos de *N*-acetil-glucosamina.<sup>131, 133</sup>

La secreción de mucina previene la adherencia a células epiteliales del hospedero, bloqueando los sitios de unión bacterianos y facilita su eliminación por el movimiento ciliar; sin embargo, si el sistema mucociliar se daña, el moco puede formar una matriz donde quedan atrapados los microorganismos debido a su consistencia pegajosa o a interacciones específicas entre receptores de la mucina y las adhesinas de la bacteria. Este evento y el hecho de que diferentes organismos colonizan e infectan diferentes superficies mucosales determinan los patrones de colonización, patológicos y fisiológicos en estas superficies; como ha sido demostrado en cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas que se unen a la mucina de las secreciones del tracto gastrointestinal; asimismo la adherencia de *Pseudomonas aeruginosa* se incrementa por la presencia en el moco de receptores específicos para esta bacteria en personas que padecen de fibrosis quística.<sup>103, 140</sup> En algunos casos las interacciones específicas de la bacteria con la mucina pueden ser similares a las interacciones célula-bacteria.<sup>135</sup>

Algunas bacterias muestran capacidad para interactuar con las fibronectinas,<sup>4,107, 113</sup> las cuales son una familia de glicoproteínas que se encuentran en forma soluble en los líquidos corporales y de manera insoluble como componente de las superficies celulares, membrana basal y matriz extracelular. *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* son bacterias que se adhieren a esta proteína a través de diferentes componentes; en el caso del *Streptococcus* la estructura responsable es el ácido lipoteicoico que se une al grupo amino terminal de la fibronectina por su componente glicolípido. *S. aureus* también se une al extremo amino terminal pero lo hace por medio de una proteína de unión presente en la superficie de la bacteria. En ambos casos las bacterias se unen al mismo receptor pero por diferentes mecanismos.<sup>56, 97,119</sup>

Las integrinas son un grupo de moléculas de la superficie de los mamíferos, que facilitan la unión o invasión de bacterias intracelulares; son heterodímeros constituidos de dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  unidas no covalentemente. Las subunidades  $\beta$  de todas las integrinas presentan una homología del 40-48 %; mientras que, las

subunidades  $\alpha$  son más heterogéneas en composición pero similares en estructura. La unión de las integrinas a sus ligandos es un proceso de baja afinidad, dependiente de cationes y ocurre en la región amino terminal de la subunidad.<sup>10</sup> Las integrinas reconocen secuencias específicas de aminoácidos en sus ligandos; una de las secuencias más frecuente de reconocimiento y estudiada es RGD (arg-gly-asp), así que los parásitos intracelulares que tengan estas secuencias expuestas pueden emplear cualquiera de las integrinas como mecanismo específico de entrada celular. Por ejemplo, se ha observado que la invasina, una proteína de la pared celular de *Yersinia pseudotuberculosis* se une a receptores de la familia de las integrinas sobre la superficie de sus células blanco promoviendo su entrada y penetración.<sup>66</sup>

CR3 (receptor del complemento tipo 3, CD11b/ CD18, Mac-1), molécula perteneciente a las integrinas, es un receptor específico para el fragmento iC3b que facilita la fagocitosis de partículas cubiertas por dicho componente por macrófagos y neutrófilos;<sup>10</sup> tiene capacidad de unirse a otros ligandos dentro de los cuales se incluye la hemaglutinina de *Bordetella pertussis* vía RGD, secuencia presente en la proteína de la bacteria; CR3 funciona también como receptor para *Mycobacterium leprae* y *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>105, 108</sup> *Brucella abortus* es otra bacteria intracelular que también posee una proteína de membrana externa con estas características, que le permite unirse a fagocitos mononucleares.<sup>32, 54</sup>

Las colectinas (lectinas parecidas a la colagénica) es un subgrupo de la lectinas tipo-C de los animales (dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ ) que se caracterizan por presentar secuencias o tripletes de aminoácidos ( Gly-Xaa-Yaa) característicos de las colagénicas. A este grupo de lectinas pertenecen algunas proteínas del suero como, la proteína de unión a la manosa (MPB), la conglutinina bovina y la colectina bovina CL-43, así como dos proteínas del surfactante pulmonar (SP-A y SP-D). Se caracterizan por su estructura tridimensional que contiene una región amino terminal rica en residuos de cisteína, seguida por una secuencia tipo colagénica, una región de unión corta y por último un dominio globular C-terminal que reconoce

carbohidratos (CRD). Las colectinas contienen de 3 a 6 unidades estructurales idénticas que se enlazan entre sí a manera de ramillete de flores o formando tetrámeros, proveyendo múltiples sitios de unión (CRDs) dentro de cada molécula. Este tipo de proteínas pueden actuar como opsoninas a través del reconocimiento de carbohidratos sobre la superficie de los microorganismos y activan el complemento promoviendo la fagocitosis y actividad bactericida

La adhesina o estructura que interactúa con el receptor generalmente se encuentra localizada en la superficie de la célula bacteriana. Las típicas adhesinas bacterianas son las fimbrias o pilis que han sido ampliamente estudiadas por su capacidad para unirse a eritrocitos de manera específica, la unión o interacción entre la adhesina y los eritrocitos es casi idéntica a la que se establece entre esta estructura y su célula blanco.

Muchas especies de la familia *Enterobacteriaceae* presentan apéndices fimbriales que se unen a residuos de D-manosa sobre las células epiteliales, y son denominadas fimbrias de tipo 1. El sitio de unión a este azúcar no se encuentra en la proteína principal, sino en una proteína de 28-31 kDa localizada en la punta o a lo largo de la fimbria.<sup>90</sup> La proteína principal exhibe gran variación entre diferentes especies entéricas, a diferencia de la proteína menor que se encuentra más conservada entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.<sup>56</sup>

Los pili de tipo *N*-metil fenilalanina son otros tipos de pili que se encuentran en diversas bacterias gram negativas, se caracterizan porque la proteína estructural presenta una fenilalanina metilada en su amino terminal, seguida de una región de 25-30 aminoácidos hidrofóbicos altamente conservada e involucrada en la interacción subunidad-subunidad, el resto de la proteína presenta gran variabilidad entre especies y es en estas regiones donde se localiza la especificidad de unión. Este tipo de pilis se han encontrado en especies de *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Bacteroides* y *Vibrio*.<sup>57, 84, 88, 96, 120</sup>

*Escherichia coli* presenta diferentes tipos de fimbrias que operan de manera similar al sistema de fimbrias tipo 1. Esto significa que son proteínas conservadas localizadas en los apéndices fimbriales y que son codificadas en distintas regiones del cromosoma o bien por plásmidos. Esta diversidad genética permite a la bacteria adaptarse a cambios ambientales e interactuar con las diferentes superficies celulares del hospedero.<sup>56, 130</sup> Muchas de las adhesinas fimbriales de *E. coli* han evolucionado a partir de un ancestro común como lo indica la elevada homología que existe entre los aminoácidos de las subunidades de pilina, incluyendo tanto las codificadas por los genes del cromosoma como las mediadas por plásmidos. La unidad estructural principal de la fimbria funciona como un armazón donde la proteína menor con actividad de adhesina se entrelaza, o bien puede existir un dominio de esta proteína estructural que tiene la capacidad de unirse al receptor.<sup>130</sup>

Las bacterias y en particular las gram negativas pueden presentar diversas estructuras de superficie que les permiten adherirse; se ha observado que una bacteria con numerosas adhesinas que se unen a diferentes sitios receptores muestra mayor avidez hacia la célula blanco que una bacteria con menos adhesinas que se une a un solo sitio receptor, por ejemplo *Campylobacter jejuni*, se une a células epiteliales mediante el flagelo, el LPS y proteínas de membrana externa.<sup>49, 86, 116</sup>

En las bacterias miembros de la familia *Pasteurellaceae* se ha identificado que el LPS permite la adhesión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* tanto a células epiteliales de traquea de cerdo como a tejido pulmonar.<sup>14, 70</sup> La adherencia de *Haemophilus influenzae*, otro miembro de la familia, puede establecerse de manera dependiente de fimbrias o independientemente, involucrando proteínas de alto peso molecular. Las fimbrias se unen al gangliósido GM2 el cual forma parte del antígeno del grupo sanguíneo AnWj. Estas estructuras están constituidas por polímeros de una proteína de 23 kDa, y la síntesis de la proteína está sujeta a variación de fase durante el crecimiento bacteriano.<sup>129</sup>

En el caso de *Pasteurella multocida* se han realizado estudios principalmente con cepas aisladas de conejos y de cerdos; Glorioso y cols.,<sup>59</sup> utilizando células faríngeas de conejo y células Hela, observaron que existe una adherencia diez veces mayor para *P. multocida* tipo A que para el tipo capsular D y que la adherencia se inhibía con *N*-acetil-glucosamina. En cerdos se encontró que la presencia de fimbrias en *P. multocida* no es relevante para la colonización de las superficies mucosas y es independiente del serotipo capsular; sin embargo, las cepas toxigénicas tanto A como D tienen mayor capacidad adherente a las mucosas del aparato respiratorio superior.<sup>69, 100, 122</sup> Se ha sugerido que estructuras como el LPS y una proteína de membrana externa de 35 kDa pueden participar como adhesinas para la bacteria, como lo indican estudios de adherencia de cepas capsuladas y no capsuladas a anillos traqueales y ensayos de adherencia al moco *in vitro*.<sup>52, 71, 79</sup>

Para *P. haemolytica*, sin embargo, se desconocen qué estructuras le permiten adherirse al epitelio mucosal; aunque han sido sugeridos en este mecanismo el LPS, las fimbrias y el glicocálix, su papel no ha sido confirmado.

### **III JUSTIFICACION**

*Pasteurella haemolytica*, es una de las principales bacterias causantes de neumonía en bovinos y ovinos; varios de sus factores de virulencia y mecanismos que le permiten dañar al hospedero son ampliamente conocidos; pero la manera por la cual se adhiere y coloniza el aparato respiratorio no ha sido plenamente identificada.

### **IV HIPOTESIS**

Existen estructuras en la superficie de *Pasteurella haemolytica* con actividad hemaglutinante, que le permiten adherirse a células epiteliales permitiendo con ello su establecimiento y colonización.

### **V OBJETIVO**

El serotipo A1 de *Pasteurella haemolytica* se aísla con mayor frecuencia de las neumonías de los rumiantes, por esta razón pretendemos identificar y caracterizar la hemaglutinina de la bacteria e investigar su posible participación en la adherencia a células epiteliales de tráquea bovina.

#### **V.1. Objetivos particulares**

- Caracterizar la composición de azúcares y analizar electroforéticamente extractos solubles con actividad hemaglutinante obtenidos de diferentes serotipos de la bacteria.
- Purificar y caracterizar la proteína con actividad hemaglutinante, de *Pasteurella haemolytica* serotipo A1.
- Determinar la especificidad hemaglutinante de los extractos obtenidos de los diferentes serotipos capsulares de *Pasteurella haemolytica*.
- Identificar y caracterizar la propiedad de adherencia de *P. haemolytica* A1; así como conocer su especificidad de unión con las células blanco.
- Determinar si la especificidad de unión de la bacteria a las células sugiere la participación de la hemaglutinina en el mecanismo de adhesión.



### **III JUSTIFICACION**

*Pasteurella haemolytica*, es una de las principales bacterias causantes de neumonía en bovinos y ovinos; varios de sus factores de virulencia y mecanismos que le permiten dañar al hospedero son ampliamente conocidos; pero la manera por la cual se adhiere y coloniza el aparato respiratorio no ha sido plenamente identificada.

### **IV HIPOTESIS**

Existen estructuras en la superficie de *Pasteurella haemolytica* con actividad hemaglutinante, que le permiten adherirse a células epiteliales permitiendo con ello su establecimiento y colonización.

### **V OBJETIVO**

El serotipo A1 de *Pasteurella haemolytica* se aísla con mayor frecuencia de las neumonías de los rumiantes, por esta razón pretendemos identificar y caracterizar la hemaglutinina de la bacteria e investigar su posible participación en la adherencia a células epiteliales de tráquea bovina.

#### **V.1. Objetivos particulares**

- Caracterizar la composición de azúcares y analizar electroforéticamente extractos solubles con actividad hemaglutinante obtenidos de diferentes serotipos de la bacteria.
- Purificar y caracterizar la proteína con actividad hemaglutinante, de *Pasteurella haemolytica* serotipo A1.
- Determinar la especificidad hemaglutinante de los extractos obtenidos de los diferentes serotipos capsulares de *Pasteurella haemolytica*.
- Identificar y caracterizar la propiedad de adherencia de *P. haemolytica* A1; así como conocer su especificidad de unión con las células blanco.
- Determinar si la especificidad de unión de la bacteria a las células sugiere la participación de la hemaglutinina en el mecanismo de adhesión.

### **III JUSTIFICACION**

*Pasteurella haemolytica*, es una de las principales bacterias causantes de neumonía en bovinos y ovinos; varios de sus factores de virulencia y mecanismos que le permiten dañar al hospedero son ampliamente conocidos; pero la manera por la cual se adhiere y coloniza el aparato respiratorio no ha sido plenamente identificada.

### **IV HIPOTESIS**

Existen estructuras en la superficie de *Pasteurella haemolytica* con actividad hemaglutinante, que le permiten adherirse a células epiteliales permitiendo con ello su establecimiento y colonización.

### **V OBJETIVO**

El serotipo A1 de *Pasteurella haemolytica* se aísla con mayor frecuencia de las neumonías de los rumiantes, por esta razón pretendemos identificar y caracterizar la hemaglutinina de la bacteria e investigar su posible participación en la adherencia a células epiteliales de tráquea bovina.

#### **V.1. Objetivos particulares**

- Caracterizar la composición de azúcares y analizar electroforéticamente extractos solubles con actividad hemaglutinante obtenidos de diferentes serotipos de la bacteria.
- Purificar y caracterizar la proteína con actividad hemaglutinante, de *Pasteurella haemolytica* serotipo A1.
- Determinar la especificidad hemaglutinante de los extractos obtenidos de los diferentes serotipos capsulares de *Pasteurella haemolytica*.
- Identificar y caracterizar la propiedad de adherencia de *P. haemolytica* A1; así como conocer su especificidad de unión con las células blanco.
- Determinar si la especificidad de unión de la bacteria a las células sugiere la participación de la hemaglutinina en el mecanismo de adhesión.

## **VI MATERIAL Y MÉTODOS**

### **VI.1. Cepas de *Pasteurella haemolytica* y Condiciones de Crecimiento.**

Se trabajó con diez aislamientos de *P. haemolytica* A1 obtenidos de procesos neumónicos de bovino, los cuales fueron identificados bioquímicamente de acuerdo a los procedimientos descritos por Cowan & Steel<sup>43</sup> y serotipificados por hemaglutinación indirecta, utilizando antisueros específicos donados por el Animal Diseases Center, Ames Iowa. También se utilizaron cepas de referencia de los serotipos 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 11 y 12 pertenecientes al biotipo A y los serotipos 3, 4 y 10 del biotipo T donadas por el mismo Centro.

Las cepas y aislamientos se mantuvieron en congelación a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  en leche descremada al 20 %, hasta que se recuperaron cultivándolas en medio de agar sangre; en este medio las colonias presentaron apariencia lisa y mucoide, características coloniales de cepas capsuladas. La presencia de ésta estructura se confirmó por medio de la tinción de Maneval.

### **VI.2. Obtención de Extractos Solubles Bacterianos**

Se obtuvieron extractos solubles de los diferentes serotipos y aislamientos de la bacteria por el método de extracción salina desarrollado por Gentry;<sup>58</sup> con el fin de buscar en ellos, actividad hemaglutinante para algunos eritrocitos de las diferentes especies a ensayar. Las bacterias se cultivaron en placas de agar sangre y/o en medio de agar de infusión cerebro corazón (ICC), por 18-24 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , posteriormente de estos cultivos se sembraron alrededor de 40 cajas por cepa y se incubaron por 18 h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La masa bacteriana se cosechó en 35 a 40 ml de PBS 0.2 M pH 7.2, se lavó con el mismo amortiguador centrifugando a 6,000 g por 30 min y se resuspendió en el volumen original. Las suspensiones bacterianas se

calentaron a 41 °C por una h con agitación constante, se centrifugaron a 6,000 g durante 30 min y posteriormente se colectaron los sobrenadantes. El sobrenadante representa el material salino extraíble por el método de Gentry y contiene principalmente polisacáridos capsulares, proteínas solubles de la superficie bacteriana y bajas concentraciones de lipopolisacárido.<sup>12, 58, 78</sup> Los sobrenadantes se precipitaron con sulfato de amonio a una concentración final del 60 %, con el objeto de eliminar polisacáridos capsulares y recuperar las proteínas presentes, la precipitación se realizó por 48 h a 4 °C. Los precipitados se centrifugaron a 10 000 g por 1 h, se eliminaron los sobrenadantes y el material precipitado fue solubilizado en PBS, dializado contra agua desionizada y posteriormente contra SSI (NaCl 0.15 M). Se determinó actividad hemaglutinante de los extractos antes y después de haber efectuado el proceso de precipitación; así como, su contenido proteico por el método de Bradford.<sup>20</sup>

### **VI.3. Determinación de Carbohidratos por Cromatografía de Gases**

La composición de carbohidratos se realizó por metanolisis, solubilizando 100 µg de cada muestra en metanol-HCl 0.1 M durante 24 h a 100 °C en tubos sellados, posteriormente, el pH se neutralizó (pH 5-6) con carbonato de plata; las muestras fueron N-reacetiladas, agregando 25 µl de anhídrido acético (Sigma, Chem., St. Louis MO); los metil glicósidos fueron transformados en derivados volátiles utilizando ácido trifluoroacético y analizados en un cromatógrafo de gases VARIAN 2100 (Orsay, Francia), usando una columna capilar (0.32 mm x 25 m) conteniendo silicona OV 210 al 5% (Applied Sc., Buffalo NY., USA), el gas vector fue helio a una presión de 0.6 bar, la temperatura de calentamiento varió de 150 a 250 °C, incrementándose un grado cada minuto. Se utilizaron como estándares internos el mesoinositol y manitol, como describen Montreuil y cols.<sup>91</sup>

#### **VI.4. Análisis Electroforéticos en Geles de Poliacrilamida-SDS**

Las proteínas presentes en los extractos salinos de los diferentes serotipos y cepas de *Pasteurella haemolytica* A1 fueron separadas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS al 0.1% de acuerdo al método descrito por Laemmli,<sup>76</sup> se utilizó un gel concentrador al 5% y un gel separador al 12.5% de acrilamida; se colocaron 10 µg de cada uno de los extractos bacterianos en los carriles correspondientes y proteínas con peso molecular conocido como estándares; los corrimientos se efectuaron a 20 mA usando una solución buffer de Tris-glicina pH 8.3 con SDS al 0.1%. Los geles se tiñeron con azul de Coomasie al 0.2% y se destiñeron con una mezcla de ácido acético/ metanol, algunos geles también se tiñeron con nitrato de plata según el método de Merril, y cols.

#### **VI.5. Determinación de Actividad Hemaglutinante**

La actividad hemaglutinante de los extractos se determinó utilizando eritrocitos de diferentes especies animales: ratón, cobayo, jerbo, conejo, bovino, ovino, cabra y caballo (obtenidos del Bioterio y corrales del CENID-Microbiología del INIFAP SAGAR); así como en eritrocitos humanos de los tipos A, B y O (obtenidos de donadores voluntarios). Se empleó solución de Alsever como anticoagulante mezclando el mismo volumen de sangre que de solución para la obtención de eritrocitos de bovino, ovino, cabra y caballo; para las otras especies mencionadas se utilizaron tubos tipo vacutainer con EDTA. Los eritrocitos se lavaron tres veces con SSI y centrifugación a 2500 g por 10 min y se ajustaron a una suspensión del 1 %. La actividad hemaglutinante de los extractos se determinó en placas de microtitulación con fondo en U, efectuando diluciones dobles seriadas utilizando 25 µl de cada uno de los extractos en SSI y agregando el mismo volumen de eritrocitos. Los eritrocitos fueron utilizados en condiciones naturales y también se probaron después del tratamiento con las enzimas pronasa (0.1 mg/0.5 ml de paquete de eritrocitos a 37 °C/30 min), tripsina (0.1 mg/0.5 ml de paquete de eritrocitos a 37 °C/30 min) y neuraminidasa (0.1 U/0.5 ml de paquete de eritrocitos a 37°C/30 min).

El título hemaglutinante se considera como la inversa de la última dilución que presenta actividad aglutinante, la actividad específica de los diferentes extractos se determinó al dividir el título hemaglutinante por ml/ contenido proteico en mg.

## **VI.6. Estudio de la Especificidad de la Actividad Aglutinante por Carbohidratos**

Se determinó la especificidad de la interacción hemaglutinina-eritrocito por ensayos de inhibición competitiva tanto con azúcares sencillos como con glicoproteínas y polisacáridos. Los azúcares ensayados en concentración de 0.2 M fueron: L-fucosa, D-melezitosa, D-melibiosa, D-galactosamina, D-glucosamina, ácido *N*-acetil-neuramínico (ácido siálico), *N*-acetil-glucosamina, *N*-acetil-galactosamina, D-maltosa, D- manosa y D-glucosa; las glicoproteínas y polisacáridos probados fueron: mucina, mucina desializada, fetuina, fetuina desializada, transferrina, sulfato de condroitin, heparina, ácido colomínico (polímero de  $\alpha$  2-8 ácido siálico), metil glicósido de ácido neuramínico, lacto-*N*-tetraosa, *N*-acetil-lactosamina, *N,N'*-diacetilquitobiosa, *N,N',N''*-triacetilquitotriosa, protamina, orosomucoide y dextrán a una concentración de 2 mg/ml.

Los ensayos de inhibición se realizaron en placas de microtitulación colocando 25  $\mu$ l de cada uno de los diferentes azúcares disueltos en SSI como diluyente, en los primeros pozos se colocaron 25  $\mu$ l de los extractos a probar, los cuales se ajustaron para rendir 32 unidades hemaglutinantes, después de efectuar diluciones dobles seriadas; posteriormente las placas se incubaron a temperatura ambiente por 1 h, después se adicionaron 25  $\mu$ l de eritrocitos de conejo al 1 % y nuevamente se incubaron por 2 h, al termino de este tiempo se identificaron los títulos de aglutinación. El efecto de los carbohidratos en la actividad aglutinante se determinó comparando los títulos de actividad con una fracción control, a la cual se le adicionó únicamente SSI.

Para los ensayos de inhibición con glicoproteínas y polisacáridos se colocaron como diluyentes en la placa 25  $\mu$ l de los extractos a una concentración inicial de 4 unidades hemaglutinantes (el extracto se diluyó con SSI hasta que el título fue de 4), posteriormente se diluyeron 25  $\mu$ l de cada glicoproteína, se incubó por 2 h a temperatura ambiente y por último se agregaron 25  $\mu$ l de eritrocitos de conejo al 1%. Los resultados se expresan como la concentración mínima de azúcares, glicoproteínas y polisacáridos que inhiben la actividad hemaglutinante.

## **VI.7. Purificación de la Hemaglutinina por Cromatografía de Afinidad**

Para el aislamiento de componentes con actividad hemaglutinante se aplicaron extractos salinos de *Pasteurella haemolytica* A1, que exhibían alta actividad a columnas cromatográficas de afinidad que se seleccionaron de acuerdo con la actividad hemaglutinante específica mostrada por ellos. Las columnas cromatográficas que se utilizaron fueron de N-acetil-glucosamina (GlcNAc) acoplada a una columna de agarosa activada con bromuro de cianógeno (Sigma A2278) y otra columna conteniendo estroma de eritrocitos de conejo tratados previamente con glutaraldehído al 1%, inmovilizada físicamente en Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech., Uppsala, Suecia).

La columna de agarosa-GlcNAc de 8 x 1.4 cm, se equilibró con un amortiguador de acetatos 0.05 M pH 4.5, se aplicaron a la columna 1.5 mg del extracto proteico, con actividad aglutinante, con una velocidad de flujo de 15 ml/h, se colectaron fracciones de 1.5 ml y su contenido protéico se determinó espectrofotométricamente a 280 nm. Cuando la densidad óptica fue menor a 0.01, se eluyó el material retenido por la columna con la adición de GlcNAc 0.2 M en el mismo amortiguador. Las fracciones obtenidas fueron dializadas contra amortiguador de acetatos y se determinó la actividad aglutinante de cada fracción.

Los estromas de eritrocitos de conejo fueron obtenidos por choque hiposmótico, la membranas fueron lavadas por centrifugación 16,000 *g* con SSI y posteriormente tratadas con glutaraldehído al 1%. El estroma fue mezclado con Sephadex G-25 y montado en una columna, de acuerdo con Vázquez y cols.<sup>134</sup> La columna de estroma de eritrocitos de conejo 12 x 2.8 cm se equilibró con SSI, se aplicaron 1.5 mg del extracto a una velocidad de flujo de 10 ml/h, la elución de la adhesina se efectuó con la adición de ácido acético al 3 %, posteriormente el pH de las fracciones eluidas se neutralizó con NaOH 0.2 M, para finalmente determinar su actividad aglutinante utilizando eritrocitos de conejo. Ensayos comparativos de elución nos permitieron identificar que eluyendo con *N*-acetil-glucosamina obteníamos el mismo rendimiento que la disminución del pH del medio cromatográfico.

## **VI.8. Composición de Aminoácidos de la Hemaglutinina**

A 100  $\mu$ g de adhesina purificada por cromatografía de afinidad se le agregó una gota de fenol al 0.3 % para prevenir la degradación de residuos de tirosina. La hidrólisis de la muestra se efectuó en tubos sellados conteniendo 2 ml de HCl 6N a 110° C durante 72 h. Las muestras fueron analizadas en un analizador automático Durrum (Inst. Pasteur, Lille, Francia), usando nor-leucina como estándar interno, según Bidlingmeyer y cols.<sup>17</sup>

## **VI.9. Adherencia de *Pasteurella haemolytica* A1 a células epiteliales de tráquea bovina**

### **VI.9.1. Obtención de Células Epiteliales**

Para evaluar la capacidad de adherencia de *Pasteurella haemolytica* a células epiteliales de tráquea bovina e identificar el mecanismo de interacción con éstas células, se colectaron tráqueas completas unidas a ambos pulmones de becerros sanos de 1 a 2 días de nacidos sacrificados en el rastro. Los órganos se



transportaron al laboratorio en cajas de unicel conteniendo bolsas refrigerantes, para la obtención de las células dentro de las dos primeras horas de haberse colectado. Las tráqueas se lavaron con PBS estéril para eliminar moco y restos celulares, se cortaron longitudinalmente y con un escalpelo se raspó la pared interna en un solo sentido, las células se depositaron en tubos de 50 ml conteniendo 35 ml de PBS estéril, se lavaron tres veces centrifugando a 2500 g por 10 minutos, finalmente las células se contaron en un hemocitómetro y se ajustó su concentración a  $1 \times 10^6$  cels/ml en medio RPMI

### VI.9.2. Estandarización Bacteriana

Para los estudios de adherencia se emplearon nueve cepas de *Pasteurella haemolytica* A1 con apariencia mucoide y cuyos extractos salinos presentaron actividad aglutinante para eritrocitos de conejo, cepas I 29, 4, 25, 46, 67, 255, 259 y 261; y una cepa del mismo serotipo no mucoide carente de actividad aglutinante, cepa Lau. Las bacterias se cultivaron en placas de agar sangre por 18 h a 37°C. Después de este tiempo de incubación se tomaron con un asa bacteriológica 1 o 2 colonias bacterianas que se suspendieron con agitación suave en 2 ml de SSI cada suspensión se ajustó por comparación de turbidez al tubo 0.5 de Mc Farland, que corresponde a  $5 \times 10^8$  UFC.

### VI.9.3. Ensayos de Adherencia

Para evaluar la adherencia bacteriana a células epiteliales de tráquea se colocaron 500  $\mu$ l de la suspensión de células ( $1 \times 10^6$  cel/ml) en tubos y se adicionaron 20  $\mu$ l de la suspensión de bacterias ( $5 \times 10^8$  bacterias/ml), se mezcló suavemente e incubó a 37 °C por 1 h, posteriormente la mezcla se centrifugó a 1,200 g por 5 minutos se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en el mismo volumen de RPMI. Se efectuaron tres lavados bajo las mismas condiciones de centrifugación con la finalidad de eliminar bacterias no adheridas, después del

último lavado se tomaron 15  $\mu$ l del paquete celular y este volumen se extendió sobre un portaobjetos previamente desengrasado, los frotis se realizaron por duplicado y se tiñeron por tinción de Gram o por la tinción de May-Grünwald Giemsa. Los ensayos de adherencia se efectuaron por triplicado. Se contó el número de bacterias adheridas a cilios y al cuerpo de las células, examinando 30-50 células por observación microscópica a 100 X, para determinar el porcentaje de células que presentaban bacterias adheridas así como el número de bacterias presentes por célula.

#### **VI.10. Estudio de la Especificidad de Unión de *Pasteurella haemolytica* A1 a células Epiteliales de Tráquea Bovina**

Se estudió la especificidad de la interacción de las bacterias capsuladas y de la no capsulada con células epiteliales de tráquea bovina por inhibición de la adhesión mediante la adición de azúcares y glicoproteínas. Se utilizaron las cepas I 29, 4, 25 y Lau, las tres primeras capsuladas. Los azúcares que se probaron fueron GalNAc, GlcNAc, *N*-acetil-neuramínico y manosa; las glicoproteínas y polisacáridos utilizados fueron fetuina, mucina, ácido colomínico y ácido hialurónico.

Para estos ensayos se incubaron 20  $\mu$ l de una suspensión bacteriana estandarizada al tubo 0.5 de Mc Farland más 20  $\mu$ l del azúcar 0.2M o 5  $\mu$ l de glicoproteínas o polisacáridos (2mg/ml) a 37 °C por 30 min, posteriormente se adicionaron 500  $\mu$ l de células ciliadas de tráquea ( $1 \times 10^6$  cel/ ml ) y se incubó a 37 °C por 1 h, después de este tiempo de incubación las células se lavaron 3 veces por centrifugación a 1200 g/ 5 min con RPMI para remover bacterias no adheridas; se tomaron alícuotas de 15  $\mu$ l del paquete celular, que se extendieron en portaobjetos, se dejaron secar y posteriormente se tiñeron y contaron como se describió previamente.

## VII RESULTADOS

### VII.1. Caracterización Bioquímica de las Cepas de *Pasteurella haemolytica*

Los aislamientos de *Pasteurella haemolytica* obtenidos de lesiones neumónicas y de fosas nasales de becerros se identificaron por su morfología colonial en placas de agar sangre. En estas condiciones se desarrollaron colonias blanco grisáceas lisas y mucoides rodeadas de una pequeña zona de  $\beta$  hemólisis, que son características de esta especie. Microscópicamente se observaron cocobacilos gram negativos pequeños, la presencia de cápsula fue evidente por la tinción de Maneval en las cepas en estudio. Su identificación se basó en su comportamiento a pruebas bioquímicas establecidas para este género y en los resultados de hemaglutinación indirecta con antisueros específicos. Los diferentes aislamientos reaccionaron de manera similar a las pruebas de catalasa, oxidasa, urea, glucosa, TSI y SIM (Tabla 5).

**TABLA 5. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE AISLAMIENTOS DE *Pasteurella haemolytica* A-1, AISLADAS EN MEXICO**

CEPA	PROCEDENCIA	$\beta$ -hemolisis	TSI*	SIM	UREA	CATALASA	OXIDASA	GLUCOSA
25	NEUMONIA	+	6	-	-	+	+	+
4	CAVIDAD NASAL	+	6	-	-	+	+	+
Lau	NEUMONIA	+	6	-	-	+	+	+
265	NEUMONIA	+	6	-	-	+	+	+
67	CAVIDAD NASAL	+	6	-	-	+	+	+
255	NEUMONIA	+	6	-	-	+	+	+
261	NEUMONIA	+	6	-	-	+	+	+
259	NEUMONIA	+	6	-	-	+	+	+
46	CAVIDAD NASAL	+	6	-	-	+	+	+

\* REACCION 6 ACIDO EN EL FONDO/ACIDO EN LA SUPERFICIE

Independientemente del origen del aislamiento bacteriano, el comportamiento metabólico en las pruebas realizadas fue igual al que se observó en las cepas de referencia (Tabla 6). El material capsular, de estos aislamientos, cuando fue adsorbido a eritrocitos de bovino reaccionó únicamente con el antisuero que identifica al serotipo A1 en las pruebas de hemaglutinación indirecta.

**TABLA 6. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE CEPAS DE REFERENCIA DE *Pasteurella haemolytica*, DONADAS POR N.A.D.C., AMES IOWA, E.U.A.**

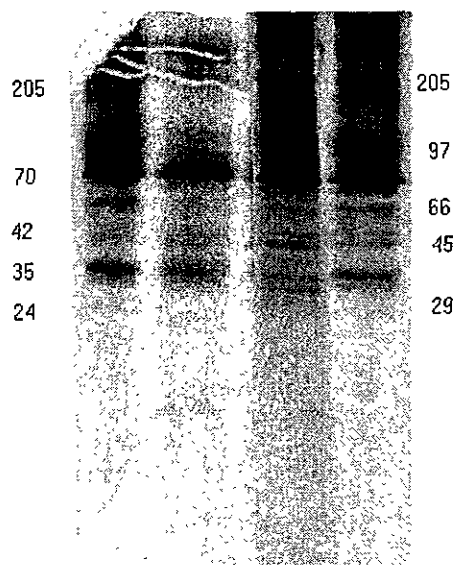
CEPA	SEROTIPO	$\beta$ -hemolisis	TSI*	SIM	UREA	CATALASA	OXIDASA	GLUCOSA
I29	1	+	6	-	-	+	+	+
J28	2	+	6	-	-	+	+	+
863	3	+	6	-	-	+	+	+
S	4	+	6	-	-	+	+	+
G13	5	+	6	-	-	+	+	+
A30	6	+	6	-	-	+	+	+
H1	7	+	6	-	-	+	+	+
H21	8	+	6	-	-	+	+	+
B1	9	+	6	-	-	+	+	+
JF2	10	+	6	-	-	+	+	+
KC282	11	+	6	-	-	+	+	+
S209	12	+	6	-	-	+	+	+

\* REACCION 6    ACIDO EN EL FONDO/ACIDO EN LA SUPERFICIE

## VII.2. Caracterización del Material Soluble de los Extractos Bacterianos

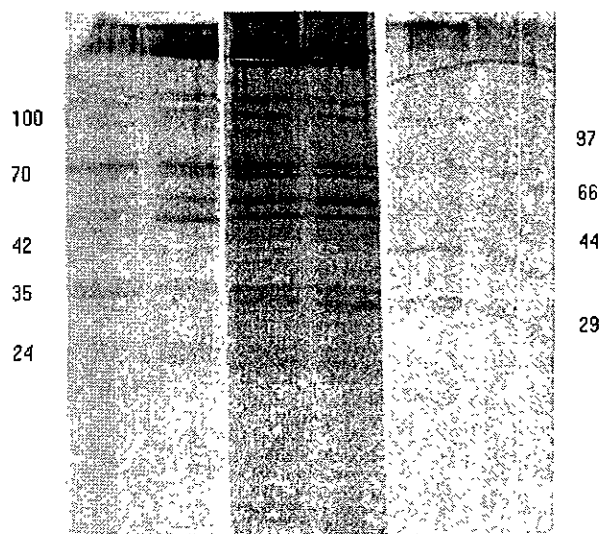
### VII.2.1. Análisis Electroforético

El material soluble extraíble con PBS, de cada uno de los serotipos, se precipitó con sulfato de amonio, con la intención de eliminar la mayor cantidad posible de carbohidratos capsulares y concentrar las proteínas presentes. Los perfiles o patrones electroforéticos de estas proteínas obtenidas de los diferentes aislamientos del serotipo A1 en SDS-PAGE muestran ser muy similares entre sí, presentan de 7 a 9 bandas proteicas principales y una gran diversidad de proteínas menores comprendidas entre los 220 y 14 kDa; las bandas principales tienen pesos moleculares aparentes de 220, 205, 100, 96, 70, 55, 42, 35 y 30 kDa. De este grupo de proteínas la banda que corresponde a 70 kDa se observa con mayor intensidad en todas las preparaciones de este serotipo (**Figura 1**).



**Figura 1.** Perfil proteico de extractos solubles de aislamientos de *P. haemolytica* en SDS- PAGE al 12.5 %. Carriles 1→3 cepas 4, 197 y 25; carril 4 cepa de referencia I 29.

El perfil de las proteínas presentes en los extractos de los serotipos 2, 6 y 9 del biotipo A es parecido al del serotipo A1, se observan igualmente bandas comprendidas, entre los 220 y 14 kDa. En estos perfiles son evidentes las bandas proteicas de 205, 100, 96, 55, 42, 35, 30 y 26 kDa, respectivamente. Estos patrones son bastante diferentes de los observados en los extractos del biotipo T, que presentan un menor número de bandas protéicas comprendidas en el rango de los 200 a 30 kDa, distinguiéndose las bandas protéicas de 100, 70, 55, 40 y 30 kDa, respectivamente (**Figura 2**).



**Figura 2.** Perfil proteico de extractos solubles de diferentes biotipos y serotipos de *P. haemolytica* en SDS-PAGE al 11.5 %. Carriles 1→ 4, serotipos A1, A2, A6 y A9; Carriles 5 y 6, serotipos T3 y T10

### VII.3. Composición de Carbohidratos de los Extractos de Diferentes Serotipos de *Pasteurella haemolytica*

La composición y presencia de azúcares en los extractos de diferentes serotipos se analizó por cromatografía de gases, los resultados de este análisis muestran que existen diferencias en la cantidad y composición de algunos azúcares;

sin embargo, se encuentran como unidades principales la glucosa, galactosa y GlcNAc en los extractos de los diferentes serotipos y biotipos estudiados (Tabla 7). El biotipo T3 presenta ramnosa y xilosa en cantidades significativas, además de los azúcares antes mencionados. Estos azúcares están prácticamente ausentes en los serotipos del biotipo A, a excepción de los serotipos A5 y A12 que los presentan en porcentajes bajos. El serotipo A1 presenta de manera interesante ácido *N*-acetil-neuramínico en cantidad significativa, este residuo está presente, pero en porcentajes bajos en los serotipos A6 y A9. La GlcNAc representa más del 50 % de los diferentes azúcares presentes en los extractos de los serotipos A6, A7 y A9; para los serotipos A5 y A12 alrededor del 30 % y para el serotipo A1 y T3 el 10 % (Tabla 7).

TABLA 7. COMPOSICION DE AZUCARES DE EXTRACTOS SOLUBLES OBTENIDOS DE DIFERENTES SEROTIPOS DE *Pasteurella haemolytica*

AZUCAR (%)	SEROTIPOS						
	A1	T3	A5	A6	A7	A9	A12
ARA	0.91	4.10	5.84	2.27		0.89	4.60
MAN	0.63	0.83	6.80	1.95	1.40	0.50	4.80
GAL	28.02	46.20	41.30	12.43	7.53	27.20	28.00
GLU	44.70	10.00	8.66	14.67	8.93	11.50	28.00
GalNAc	3.46	NI	NI	NI	3.16	1.74	3.13
GlcNAc	10.90	10.38	32.14	58.19	78.95	57.60	30.21
FUC	1.07	0.98	2.97	1.11	NI	NI	NI
RIB	0.90	NI	0.85	NI	NI	NI	0.70
XIL	NI	11.82	1.44	NI	NI	NI	0.40
NANA	7.44	NI	NI	1.32	NI	0.65	NI
RAM	NI	16.43	NI	NI	NI	NI	0.20

NI - NO IDENTIFICADO

La composición, presencia, y cantidad de azúcares presentes en los extractos proteicos exhibe diferencias en la composición de azúcares de los polisacáridos capsulares y cadena O de los lipopolisacáridos hasta ahora estudiados (Tablas 1, 2 y 3).

#### VII.4. Actividad Hemaglutinante.

Los extractos solubles de los diferentes serotipos y biotipos de *Pasteurella haemolytica* presentaron actividad hemaglutinante para eritrocitos de conejo, y no aglutinaron eritrocitos de otras especies ensayados ni en condiciones nativas ni después del tratamiento con tripsina, pronasa y neuraminidasa. El título de actividad aglutinante de eritrocitos de conejo fue similar entre los serotipos del biotipo A, a diferencia de la de los serotipos del biotipo T los cuales mostraron una mayor actividad aglutinante y una actividad específica superior en relación con la de los serotipos del biotipo A (Tabla 8). La actividad pudo determinarse solo con eritrocitos frescos, porque después de 1 a 2 semanas que fueron colectados no eran aglutinados; esto se debe a que durante la maduración de las células se pierden componentes de la superficie del eritrocito, que son importantes aparentemente, para la interacción con la aglutinina de *P. haemolytica*. El tratamiento de los eritrocitos de conejo con las enzimas pronasa, tripsina y neuraminidasa, también provocó la pérdida total de reconocimiento por la hemaglutinina (Tabla 8).

**TABLA 8. ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LOS DIFERENTES SEROTIPOS DE *Pasteurella haemolytica* PARA ERITROCITOS DE CONEJO Y EFECTO DE LAS ENZIMAS TRIPSINA, PRONASA Y NEURAMINIDASA**

SEROTIPO	UNIDADES HEMAGLUTINANTES (UHA)	CONCENTRACION DE PROTEINA (mg/ml)	ACT. ESPECIFICA UHA/mg PROTEINA	TRIPSINA	PRONASA	NEURAMINIDASA
1	2580	0.78	3282	-	-	-
2	1280	0.6	2133	-	-	-
3	10240	0.58	17855	-	-	-
4	10240	0.51	20078	-	-	-
5	1280	0.55	2327	-	-	-
6	2560	0.72	3555	-	-	-
7	1280	0.65	1969	-	-	-
8	1280	0.69	1855	-	-	-
9	2560	0.75	3413	-	-	-
10	5120	0.55	9309	-	-	-
11	2560	0.73	3506	-	-	-
12	1280	0.63	2031	-	-	-



## VII.5. Especificidad de los Extractos por Carbohidratos

La actividad hemaglutinante en los extractos de los diferentes serotipos muestra el reconocimiento por azúcares *N*-acetilados, como GlcNAc y la interacción con azúcares iónicos, como NeuAc, ácido colomínico y sulfato de condroitín (Tabla 9).

**Tabla 9. EFECTO DE AZUCARES, GLICÓSIDOS Y GLICOPROTEÍNAS, SOBRE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE EXTRACTOS SOLUBLES DE DIFERENTES SEROTIPOS DE *Pasteurella haemolytica*.**

Serotipo <sup>a</sup>	heparina <sup>b</sup>	mucina <sup>b</sup>	ác. colomínico	condroitín <sup>b</sup> sulfato	GlcNAc <sup>c</sup>	GalNAc <sup>c</sup>	manosa <sup>c</sup>
(Unidades hemaglutinantes)							
1	2	4	4	2	4	16	16
2	4	2	4	4	2	32	32
3	0	2	2	2	4	32	32
4	0	2	4	4	4	32	32
5	2	4	2	2	0	32	32
6	4	2	4	2	2	16	16
7	0	2	2	4	0	32	32
8	0	4	2	2	4	32	32
9	2	4	2	4	4	16	16
10	0	2	4	2	8	32	32
11	4	2	2	2	2	16	32
12	2	2	2	4	4	32	32

<sup>a</sup> Los extractos se probaron a 32 Unidades hemaglutinantes.

<sup>b</sup> Los glicósidos y glicoproteínas se ensayaron a una concentración de 2 mg/ml.

<sup>c</sup> Los azúcares se ensayaron a una concentración de 200 mM.

El serotipo A1 es el principal serotipo aislado de neumonías de bovinos y uno de los más frecuentes de la misma condición en ovinos; por esa razón, consideramos de particular importancia intentar el aislamiento de la aglutinina de este serotipo para posteriormente determinar su posible participación en el mecanismo de adhesión de la bacteria, para lo cual se investigó mayormente la especificidad de extractos de este serotipo con azúcares y glicósidos. Se observó efecto inhibitorio principalmente con GlcNAc y ácido *N*-acetil-neuramínico; así como con glicósidos y glicoproteínas que presentan ácido siálico (Tablas 10 y 11).

**TABLA 10. EFECTO DE AZÚCARES Y GLICÓSIDOS SOBRE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE UN EXTRACTO SOLUBLE DE *Pasteurella haemolytica* A1.**

Compuesto <sup>a</sup>	Unidades <sup>b</sup> Hemaglutinantes
Control	32
L- fucosa	32
D-melezitosa	32
D-melibiosa	32
D-galactosamina	32
D-glucosamina	32
NeuNAc	16
GlcNAc	4
GalNAc	16
D-maltosa	32
D-manosa	16
D-glucosa	32
Acido hialurónico	4
Acido colomínico	4
Ac. $\beta$ -metil-neuramínico	8
Ac. $\alpha$ -metil-neuramínico	4

<sup>a</sup> Los azúcares se ensayaron a una concentración de 200 mM

<sup>b</sup> El extracto se probó con eritrocitos de conejo al 1%.

**Tabla 11. EFECTO DE GLICÓSIDOS Y GLICOPROTEÍNAS SOBRE LA ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE UN EXTRACTO DE *Pasteurella haemolytica* A1.**

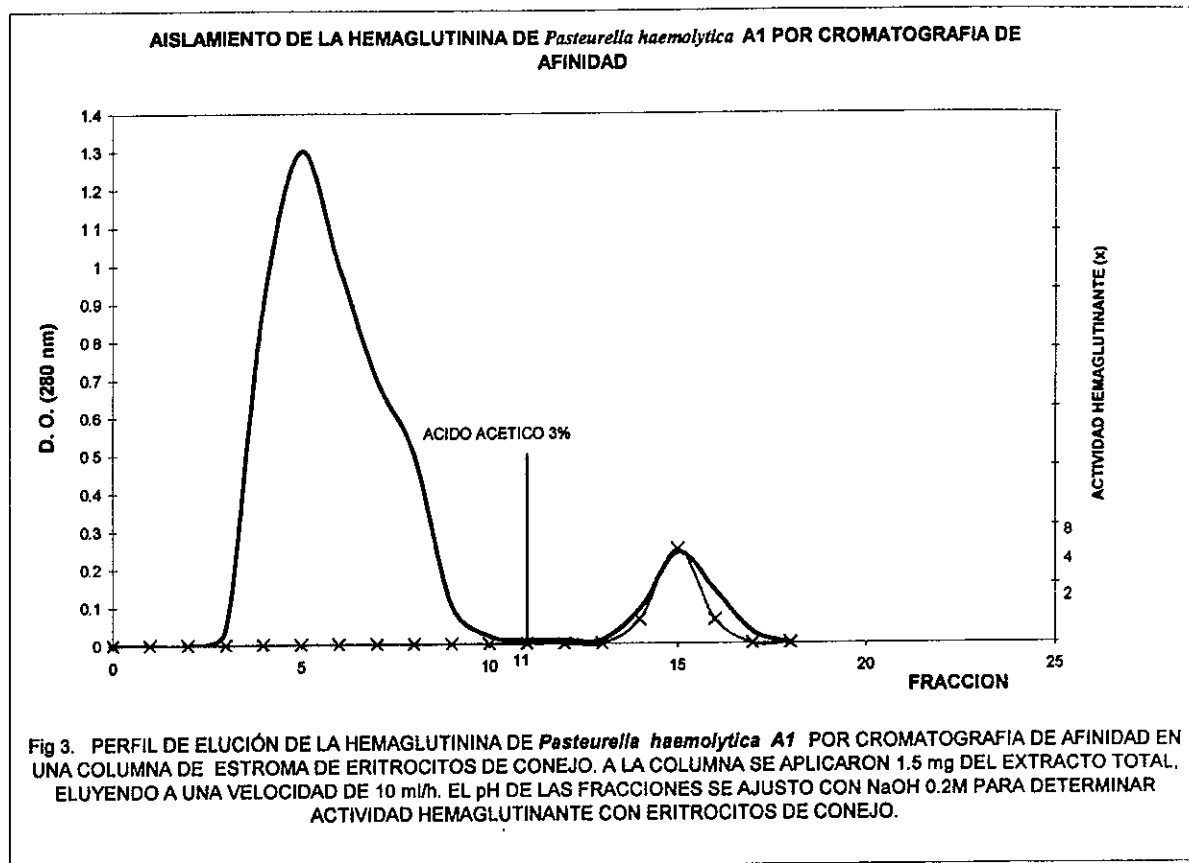
Compuestos <sup>a</sup>	Unidades hemaglutinantes <sup>b</sup>
Mucina	0
Mucina desializada	4
Fetaina	0
Fetaina desializada	4
Transferrina	4
Condroitín sulfato	0
Heparina	0
Orosomucoide	4
Dextran	4
Protamina	4
Lacto-N-tetraosa	0
N-acetil lactosamina	0
N,N'-diacetilquitobiosa	4
N,N',N'-triacetilquitotriosa	4

<sup>a</sup> Los glicósidos y glicoproteínas se ensayaron a una concentración de 2 mg/ml.

<sup>b</sup> El extracto se probó a 4 Unidades hemaglutinantes.

## VII.6. Purificación de la Hemaglutinina

El proceso de purificación se efectuó por cromatografía de afinidad empleando una columna conteniendo estroma de eritrocitos de conejo, que son los únicos reconocidos y aglutinados por el extracto soluble de casi todos los serotipos de *P. haemolytica*; la actividad hemaglutinante se recuperó disminuyendo el pH del medio cromatográfico con ácido acético (Figura 3).

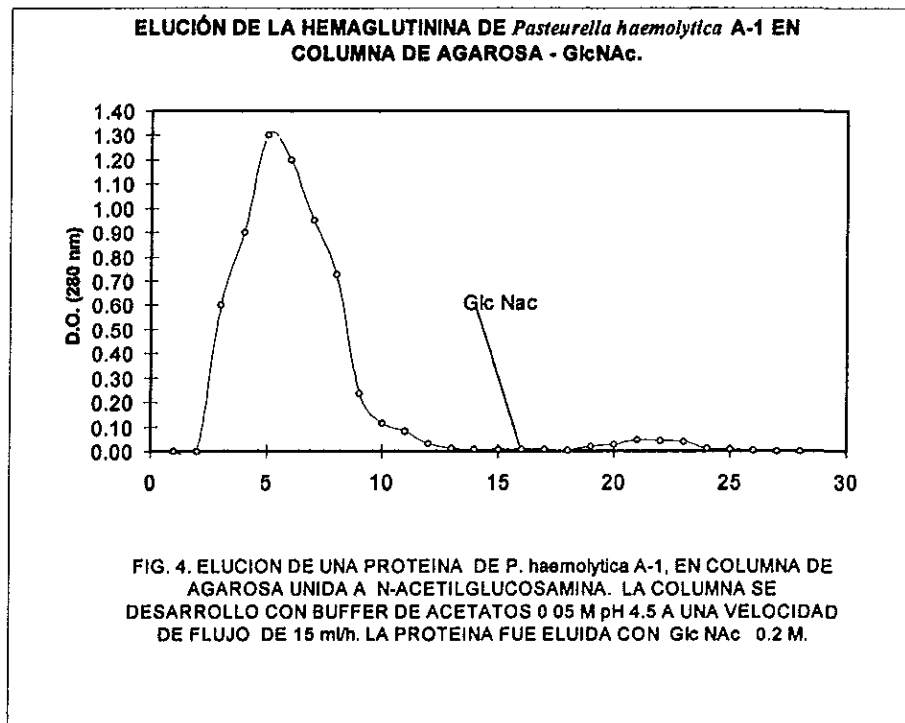


Las fracciones no retenidas carecían de actividad aglutinante; la proteína así aislada corresponde al 0.07 % de las proteínas presentes en el extracto y presenta un incremento en la actividad específica (unidades hemaglutinantes/concentración de proteína) de 851.5 veces más alta que el extracto total de *Pasteurella haemolytica* (Tabla 12). Cuantitativamente la concentración de proteína eluida de la columna con GlcNAc, fue la misma que se obtuvo con ácido acético.

**TABLA 12. PROCESO DE PURIFICACION DE LA HEMAGLUTININA DE *Pasteurella haemolytica* A1 POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN UNA COLUMNA DE ESTROMA DE ERITROCITOS DE CONEJO.**

FRACCION	CONCENTRACION DE PROTEINA (mg)	UNIDADES HEMAGLUTINANTES (UHA)	ACT. ESPECIFICA UHA/mg PROTEINA
EXTRACTO TOTAL	1.5	5120	3368
NO RETENIDO (NR)	1.3	S/AH	S/AH
FRACCION RETENIDA (FR)	0.01	1200	120000

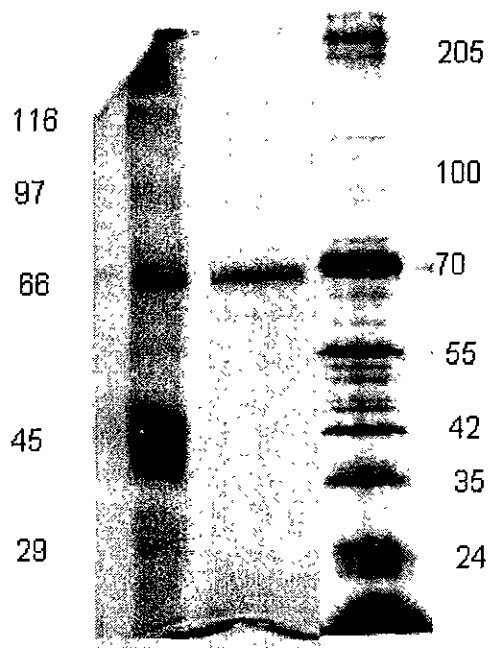
La proteína con actividad hemaglutinante, se purificó también empleando una columna de agarosa unida a *N*-acetil-glucosamina, de esta columna también se obtuvo a la hemaglutinina mediante la elución con el azúcar (Figura 4). La capacidad de retención por esta columna para la hemaglutinina fue muy baja, pues la columna era saturada con bajas concentraciones de extracto de *P. haemolytica*, identificándose por la presencia de actividad aglutinante en la fracción no retenida, las fracciones colectadas después de adicionar el azúcar se mezclaron, dializaron y concentraron; después de esto se observó actividad aglutinante.



## VII.7. Caracterización de la Hemaglutinina

### VII.7.1. Peso Molecular.

Las fracciones eluidas de las columnas de afinidad y que presentaron actividad hemaglutinante fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, se observó una sola banda protéica con un peso molecular aparente de 70 kDa bajo condiciones no reductoras (**Figura 5**). La movilidad relativa de la proteína corresponde con una de las bandas teñidas con más intensidad en el perfil electroforético observado en el extracto total.



**Figura 5.** Análisis electroforético en SDS-PAGE al 11.5 % de una proteína de 70 kDa aislada por cromatografía de afinidad en una columna de GlcNAc. Carril 1, estándares de peso molecular; Carril 2, proteína de 70 kDa; Carril 3, extracto soluble de *P. haemolytica* A1. Teñido con nitrato de plata.

### VII.7.2. Caracterización química

El análisis químico practicado a la proteína aislada indica que carece de cualquier componente carbohidrato, de acuerdo con los resultados obtenidos por cromatografía de gases. La composición de aminoácidos muestra que es rica en residuos de glicina, serina, ácido glutámico, alanina y ácido aspártico, y pobre en cisteína, metionina y tirosina. La presencia de cisteína indica la posible existencia de un puente disulfuro en esta proteína (Tabla 13).

**TABLA 13. COMPOSICIÓN DE AMINOACIDOS DE LA PROTEÍNA DE 70 kDa CON ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE.**

Residuo	Residuo %	Residuo por molécula *
ASP	7.8	44.2
GLU	13.7	77.6
SER	15.8	86.5
GLI	17.1	97
HIS	2.6	14.7
ARG	2.2	12.5
TREO	5.1	28.9
ALA	11.4	77.6
PRO	3.9	22.1
TIR	0.6	3.4
VAL	4.0	22.7
MET	0.6	3.4
CIS	0.3	1.7
ILE	3.0	17
LEU	4.8	27.2
FEN	3.1	17.6
LIS	4.0	22.7
		576.8 Residuos

\* Considerando 70 kDa de peso.

## VII.8. Especificidad de la hemaglutinina por carbohidratos

Al igual que el extracto bacteriano, la proteína purificada posee capacidad para aglutinar únicamente eritrocitos de conejo; otro tipo de eritrocitos al igual que los eritrocitos de conejo tratados con proteasas y por neuraminidasa, no son reconocidos. El análisis de la especificidad de la aglutinina por carbohidratos, determinado por la capacidad de los carbohidratos para inhibir la actividad aglutinante para eritrocitos de conejo, muestra que existe reconocimiento para residuos *N*-acetilados, como lo indica el decremento en el título de la actividad aglutinante con los azúcares GlcNAc y ácido *N*-acetil-neuráminico. La actividad también se inhibió con algunos glicósidos y glicoproteínas como la mucina submaxilar bovina, la fetuina, ácido colomínico, ácido hialurónico, heparina, sulfato de condroitín, ácido  $\beta$  metil-glicósido neuráminico. Pero no hubo efecto inhibitorio con azúcares neutros, ni con dextran, protamina, transferrina, *N,N'*- diacetilquitobiosa y *N,N,N''*-triacetilquitotriosa (Tabla 14 ).

**TABLA 14. EFECTO DE AZÚCARES, GLICÓSIDOS Y GLICOPROTEÍNAS, SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA HEMAGLUTININA DE *Pasteurella haemolytica* A1.**

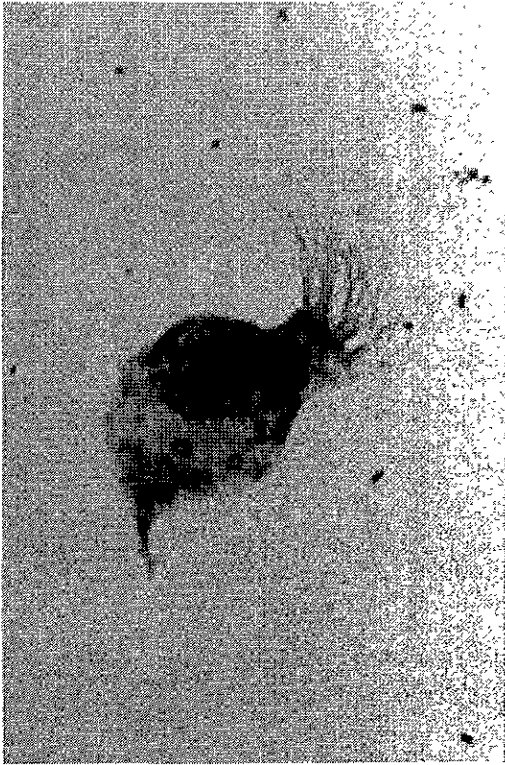
Compuesto	Concentración <sup>a</sup> ( $\mu$ m)	Potencia inhibitoria relativa <sup>b</sup>
GlcNAc	25	1
NeuNAc	50	0.5
<i>N</i> -acetil-lactosamina	6.25	4
Acido hialurónico	12.5	2
Acido colomínico	12.5	2
Acido $\beta$ -metil-neuráminico	12.5	2
Heparina	1.5	16.6
Condroitín sulfato	1.5	16.6
Mucina	0.025	1000
Fetuina	0.05	500
Mucina desializada	0.1	250
Fetuina desializada	1.0	25

<sup>a</sup> concentración mínima para inhibir 4 Unidades hemaglutinantes de la hemaglutinina de *P. haemolytica*.

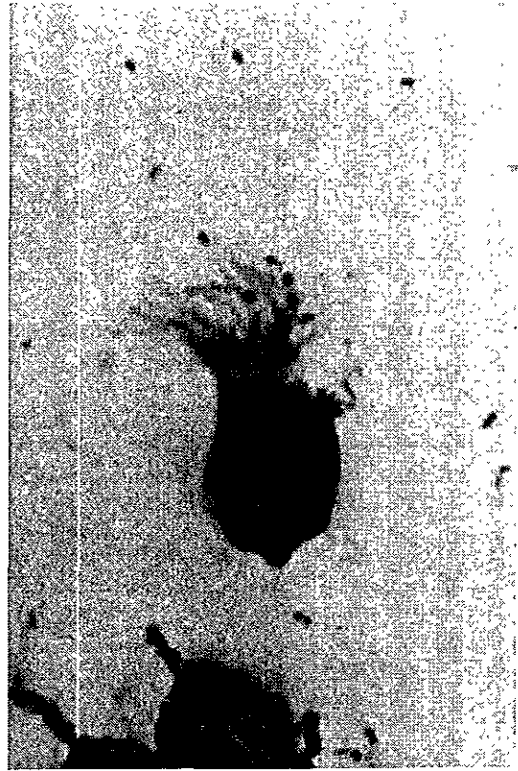
<sup>b</sup> potencia inhibitoria es el valor comparativo de la concentración del inhibidor con GlcNAc. Otros azúcares sin actividad inhibitoria a 100  $\mu$ M, fueron D-glucosa, D-manosa, D-fucosa, GalNAc, D-galactosa, D-galactosamina, D-glucosamina y melezitosa.

## VII.9. Adherencia de *Pasteurella haemolytica* A1 a células epiteliales de tráquea bovina

La adherencia de 9 aislamientos de *Pasteurella haemolytica* capsulados y cuyos extractos de superficie presentaban actividad hemaglutinante fue comparada con una variante no capsulada carente de actividad. Se encontró que las bacterias capsuladas se unen pobremente a estas células, alrededor de tres bacterias por célula y lo hacen preferentemente a los cilios y no al cuerpo celular (**Figura 6**); no se observaron diferencias en el número de bacterias adheridas entre aislamientos capsulados, pero sí hubo diferencias entre éstos y la variante no capsulada que se adhirió en mayor número, seis bacterias por célula y en un porcentaje mayor de células (**Figura 7, Tabla 15**)



**Figura 6.** Microfotografía de células ciliadas de tráquea bovina con bacterias capsuladas de *P. haemolytica* A1 (X 1000)



**Figura 7.** Microfotografía de células ciliadas de tráquea bovina con bacterias no capsuladas de *P. haemolytica* A1, cepa Lau (X 1000)



**TABLA 15. ADHERENCIA DE BACTERIAS DE *Pasteurella haemolytica* A1 A CELULAS CILIADAS DE TRAQUEA BOVINA.**

CEPA BACTERIANA	ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE	BACTERIAS POR CELULA $\pm$ D.S.	PORCENTAJE DE CELULAS CON BACTERIAS
I 29 <sup>a</sup>	+	2.89 $\pm$ 1.75	44.20
4	+	3.23 $\pm$ 1.89	50.60
25	+	2.88 $\pm$ 2.06	50.80
46	+	2.23 $\pm$ 1.31	33.30
67	+	2.43 $\pm$ 1.09	25.50
255	+	2.94 $\pm$ 1.93	39.20
259	+	3.00 $\pm$ 1.76	27.80
261	+	2.93 $\pm$ 1.53	44.10
Lau <sup>b</sup>	-	6.13 $\pm$ 3.87	75.00

<sup>a</sup> Cepa de referencia

<sup>b</sup> Cepa no capsulada

### VII.10. Inhibición de la adherencia por azúcares y glicoproteínas

Se estudio la especificidad de la adherencia de la bacteria a las células ciliadas por ensayos de inhibición con azúcares y glicoproteínas. Se observó que existe reconocimiento por residuos *N*-acetilados, como la GlcNAc y ácido siálico de acuerdo a la disminución en el número de bacterias adheridas por célula con estos azúcares. Este efecto inhibitorio se observa para ambos tipos de bacterias capsuladas y no capsulada; en esta última hubo inhibición también con el azúcar neutro manosa, pero dicho azúcar no inhibió la adherencia de las bacterias capsuladas. La GalNAc no inhibió significativamente la adherencia de las bacterias lo cual indica que la especificidad esta dirigida al reconocimiento del grupo acetilo presente en el carbono 2 de la GlcNAc y del ácido siálico. La adherencia también se inhibió con glicósidos y glicoproteínas como la mucina submaxilar bovina, fetuína, ácido colomínico y ácido hialurónico, compuestos que presenta GlcNAc y ácido siálico entre otros azúcares (Tabla 16).

**TABLA 16. INHIBICIÓN DE LA ADHERENCIA DE *Pasteurella haemolytica* A1 POR AZUCARES Y GLICOPROTEÍNAS.**

Compuestos	Cepas bacterianas			
	Lau	25	I69	4
	(número de bacterias / célula $\pm$ D. S.) <sup>a</sup>			
Control	6.13 $\pm$ 3.87	2.88 $\pm$ 2.06	2.89 $\pm$ 1.75	3.23 $\pm$ 1.89
Mucina <sup>b</sup>	1.35 $\pm$ 0.71	1.37 $\pm$ 0.63	1.23 $\pm$ 0.43	1.32 $\pm$ 0.57
Hialurónico	4.48 $\pm$ 1.93	1.64 $\pm$ 0.86	1.68 $\pm$ 0.85	1.95 $\pm$ 0.83
Fetuina	3.74 $\pm$ 1.29	1.43 $\pm$ 0.65	1.65 $\pm$ 0.81	1.86 $\pm$ 0.86
Colomínico	4.46 $\pm$ 1.64	1.87 $\pm$ 0.92	2.01 $\pm$ 1.22	1.82 $\pm$ 0.87
GlcNAc <sup>c</sup>	4.51 $\pm$ 1.72	1.73 $\pm$ 0.97	1.62 $\pm$ 0.95	1.85 $\pm$ 0.89
GalNAc	4.20 $\pm$ 1.68	3.15 $\pm$ 1.64	2.97 $\pm$ 1.42	2.88 $\pm$ 1.05
Manosa	2.51 $\pm$ 1.37	3.4 $\pm$ 1.68	2.78 $\pm$ 1.22	2.8 $\pm$ 1.1
Ac. siálico	3.05 $\pm$ 1.35	1.81 $\pm$ 1.16	1.59 $\pm$ 0.96	1.81 $\pm$ 0.91

<sup>a</sup> Los resultados se expresan como el promedio de tres repeticiones  $\pm$  la desviación estándar.

<sup>b</sup> Las glicoproteínas se probaron a una concentración final de 10  $\mu$ g.

<sup>c</sup> Los azúcares se probaron a una concentración final de 5  $\mu$ M.

## VIII DISCUSION

Los diferentes aislamientos de *Pasteurella haemolytica*, empleados en el presente estudio fueron comparados, para fines de confirmación, con cepas de referencia tanto en sus características morfológicas microscópicas y coloniales como en su comportamiento en las pruebas bioquímicas realizadas. Los aspectos microscópicos, coloniales y el comportamiento metabólico de las bacterias aisladas de becerros enfermos fueron similares a las cepas de referencia; de acuerdo con estos criterios, confirmamos que los aislamientos realizados eran *Pasteurella haemolytica*. La identificación de los serotipos correspondientes se determinó por hemaglutinación indirecta empleando antisueros de referencia. Determinadas sus particularidades, se procedió a efectuar extracciones salinas de los aislamientos y cepas de referencia, de acuerdo al método establecido por Gentry.<sup>58</sup> Este método de extracción se escogió porque es un procedimiento que libera constituyentes débilmente unidos a la bacteria, sin que sufran modificaciones en su naturaleza o alteraciones en su estructura.

Se ha informado que el producto de la extracción está constituido principalmente por polisacáridos capsulares y proteínas solubles presentes en la superficie bacteriana, con pequeñas cantidades de lipopolisacárido y proteínas de membrana externa.<sup>78, 85</sup> Las investigaciones sobre *Pasteurella haemolytica*, se han centrado en este material soluble extraíble con amortiguadores, así como en las proteínas excretadas por la bacteria en cultivo; debido a que inducen resistencia a la enfermedad en animales inmunizados y a que algunos de sus componentes están involucrados en los mecanismos de patogenia.<sup>33, 40, 42, 78</sup> Cabe citar dentro de estos componentes al polisacárido capsular, el cual es capaz de unirse específicamente a los fagocitos e impedir el desarrollo de sus funciones; la remoción del material capsular por calentamiento a 41°C, rinde microorganismos descapsulados susceptibles al ataque de los mecanismos inmunes del huésped, confirmándose la participación de componentes de superficie en la disfunción de estos eventos.<sup>46, 47</sup>

La complejidad y relevancia de este material en la inducción de la resistencia, así como su participación en la patogenia, nos condujo a la búsqueda e identificación de alguno de los componentes responsables del mecanismo de adhesión, basados en la propiedad que presentan algunas adhesinas bacterianas para aglutinar eritrocitos y de que muchas de las estructuras que intervienen en este mecanismo se localizan en la superficie bacteriana.

Primeramente, los extractos salinos obtenidos de los aislamientos de *Pasteurella haemolytica* A1 y de las cepas representantes de los diferentes serotipos empleados en este estudio se sometieron a una precipitación diferencial; obteniéndose una fracción rica en proteínas solubles de cada uno de los extractos a la cual denominamos como extracto soluble precipitado.

Los extractos solubles fueron caracterizados en cuanto a su composición de azúcares y analizados electroforéticamente en geles de poliacrilamida-SDS. Los perfiles proteicos de los extractos de los serotipos del biotipo A y los del biotipo T analizados muestran ser muy similares entre serotipos pertenecientes al mismo biotipo, pero significativamente diferentes entre biotipos.

Varios investigadores han realizado estudios de caracterización del extracto salino de *Pasteurella haemolytica* A1 directamente después de la extracción y también después de tratar de separar las proteínas asociadas por diferentes métodos;<sup>78, 85</sup> por cualquiera de los métodos empleados, se ha mostrado que el extracto salino contiene una alta concentración de carbohidratos; los cuales, se ha sugerido, pueden estar formando complejos moleculares con proteínas o bien varias de estas proteínas son de naturaleza glicoprotéica.<sup>12, 42, 78</sup> Se ha informado que el extracto salino del serotipo A1 muestra 8 bandas principales de 130, 90, 67, 58, 44, 26, 24 y 14 kDa en condiciones reductoras y que varias de éstas proteínas son reconocidas por el sistema inmune de los rumiantes; pero el grado de su participación en la resistencia contra la pasteurelosis neumónica se desconoce.<sup>40, 85</sup>

Es importante destacar que una comparación de las proteínas solubles extraíbles con PBS para otros serotipos diferentes al serotipo A1 y para serotipos del biotipo T no se había realizado, a pesar de la relevancia que algunos de sus componentes pueden tener en los mecanismos de patogenia o en la protección. Sin embargo, similitudes entre extractos de serotipos del biotipo A y diferencias de éstos con el biotipo T, se han observado empleando otros métodos diferentes a la extracción salina. Por ejemplo, Thompson y Mould,<sup>121</sup> analizaron los extractos celulares obtenidos mediante extracciones con fenol/ ácido acético de cepas del biotipo A y T en SDS- PAGE y mostraron diferencias entre estos biotipos. Donachie<sup>51</sup> también observó similitudes entre extractos de cepas del biotipo A obtenidos con salicilato de sodio y Knights y cols.<sup>73</sup> por análisis de las proteínas de cubierta extraídas por tratamiento de las bacterias con lisozima y nucleasas encontraron similitudes entre cepas pertenecientes al mismo biotipo y diferencias entre cepas de ambos biotipos. Así todas estas observaciones apoyan la consideración hecha por varios autores de separar al biotipo T en una especie diferente a *Pasteurella haemolytica*, y muestran que muchas de las proteínas están altamente conservadas entre cepas de ambos biotipos. Esto último se ha mostrado por análisis de inmunotransferencia de proteínas de membrana externa, entre las que se incluyen las reguladas por hierro, las cuales poseen pesos moleculares de 35 y 70 kDa.<sup>94</sup>

La caracterización de los principales azúcares en los extractos solubles precipitados, muestra diferencias en cantidad y composición de azúcares entre serotipos. Sin embargo, en todos se encontró una proporción alta de galactosa, glucosa y *N*-acetil-glucosamina. La mayoría o una gran parte de los azúcares extraídos por el método empleado pueden ser constituyentes de componentes de superficie diferentes a la cápsula, pues éstos exhiben diferencias en cuanto a composición, presencia y cantidad de azúcares.<sup>5, 6, 7, 8, 9</sup> Aunque, solo se analizó la composición de azúcares de un serotipo del biotipo T, el T3, la presencia de GlcNAc en el extracto puede derivar de la estructura O-polisacárido del lipopolisacárido de

este serotipo,<sup>109</sup> pero también es posible que este azúcar forme parte de porciones carbohidrato de otras moléculas de superficie diferentes al lipopolisacárido.

Para los serotipos del biotipo A analizados la cantidad de GlcNAc fue variable y represento más del 50% de los azúcares presentes en los extractos de los serotipos A6, A7 y A9, para el serotipo A1 fue del 11%. La presencia de este azúcar en los extractos precipitados parece no provenir de la cápsula o del lipopolisacárido, comparando con la composición y estructuras determinadas para algunos de los serotipos analizados, a excepción del serotipo A7 en el que la GlcNAc es uno de los componentes del polisacárido capsular;<sup>8</sup> así, que cierta cantidad en el extracto de este serotipo puede tener este origen o provenir de la fracción oligosacárida de otro componente diferente.

Austin aisló un antígeno de 10-30 kDa rico en hexosaminas a partir del extracto salino de *Pasteurella haemolytica* A1, el antígeno al parecer es común en los diferentes serotipos de *Pasteurella haemolytica* y *P. multocida*.<sup>12</sup> La presencia de este componente en el material extraíble y su alto contenido en hexosaminas permite considerarlo como uno de los constituyentes del cual pueden derivar los azúcares *N*-acetilados determinados en este trabajo como la GlcNAc, GalNAc y ácido siálico (*N*-acetil-neuramínico); este último azúcar se ha identificado en la cadena *O*-polisacárido del lipopolisacárido de los serotipos 1 y 5, de acuerdo con análisis realizados por Utley.<sup>128</sup> Sin embargo, a diferencia de él Lacroix no encontró residuos de ácido siálico en éstas estructuras cuando estudió los lipopolisacáridos de estos serotipos.<sup>75</sup> En el análisis de caracterización de azúcares que realizamos, encontramos ácido siálico en los extractos de los serotipos A1, A6 y A9 en cantidades variables pero la cantidad determinada para el serotipo A1 fue mucho más alta que para los otros serotipos y a diferencia de Utley no observamos ácido siálico en el extracto del serotipo A5. Residuos de este azúcar también parecen estar localizados sobre la superficie del serotipo A12 de acuerdo con su reconocimiento por la lectina de suero del langostino *Macrobrachium rosenbergii*, que interactúa principalmente con azúcares *N*-acetilados y *O*-acetilados.<sup>132</sup>

Por otro lado, el análisis químico y estructural de la cápsula del serotipo A2 sugiere que es un polímero de ácido colomínico ( $\alpha$  2→8 ácido *N*-acetil-neuramínico).<sup>9</sup> Así éstos antecedentes muestran que algunos serotipos de *Pasteurella haemolytica* pueden contener residuos de ácido siálico sobre su superficie, los cuales pueden ser constituyentes propios de componentes polisacáridos de la bacteria o bien son incorporados a la superficie bacteriana por algún mecanismo.

La importancia de determinar la composición de azúcares en el precipitado del extracto salino se debe al papel biológico que en el reconocimiento específico tienen las estructuras oligosacáridas de la cubierta bacteriana al unirse directamente a su célula hospedera o a secreciones mucosales que median ésta interacción.<sup>104, 131</sup> A este respecto, se ha informado de diferentes interacciones involucrando los polisacáridos de superficie de varios serotipos y biotipos de la bacteria; por ejemplo, se ha observado que el biotipo T aglutina con la lectina de germen de trigo (*Triticum vulgare*), específica para *N*-acetil-glucosamina, permitiendo diferenciar los serotipos de esta especie de los serotipos del biotipo A.<sup>44</sup> Hasta ahora el componente responsable en ésta interacción se desconoce pero la participación de los polisacáridos capsulares de los diferentes serotipos del biotipo T en la reacción puede excluirse debido a que son diferentes entre sí; es posible que en el reconocimiento se encuentren involucrados oligómeros de *N*-acetil-glucosamina comunes a las porciones carbohidrato de componentes de superficie del biotipo T.<sup>44</sup> Interesantemente, el análisis de azúcares realizado al precipitado del extracto salino del serotipo T3 muestra la presencia de GlcNAc; sin embargo, no hay que olvidar que éste azúcar ha sido descrito como un constituyente del LPS de este serotipo.<sup>109</sup>

Para el serotipo A1, Brogden y cols.<sup>27</sup> observaron una reacción tipo lectina entre el polisacárido capsular y el surfactante pulmonar ovino, mediada quizás por el ácido *N*-acetil-aminomanurónico del polisacárido con la proteína A del surfactante. Además, sugieren que la interacción *in vivo* puede favorecer la unión de la bacteria a la cubierta del alvéolo permitiendo su colonización y que a su vez el microorganismo puede recubrirse con el surfactante, evadiendo los mecanismos de

defensa pulmonar. Sin embargo, en sus resultados experimentales muestran que el surfactante sólo al incubarse con azúcares sencillos precipita con GlcNAc y en menor proporción con GalNAc pero no con *N*-acetil manosamina.

La presencia de una envoltura de polisacáridos extracelulares mejor conocida como glicocalix es frecuente en *Pasteurella haemolytica*. Esta cubierta incrementa la resistencia de la bacteria a los mecanismos de fagocitosis, debido a su hidrofilia, carga y viscosidad; se considera que esta envoltura puede ser una extensión de los polisacáridos capsulares de la bacteria o de la cadena-O polisacárida. En general, las características del glicocáliz están influidas por el medio ambiente en el cual se desarrolla la bacteria y va a determinar su presencia, tamaño y composición.<sup>137</sup>

Brogden y Clarke<sup>28</sup> estudiaron la interacción de bacterias del serotipo A1, con lectinas de especificidad conocida, así como la forma en que se modifica esta interacción por las condiciones de cultivo. Estos autores observaron que la bacteria es reconocida por lectinas específicas para residuos  $\beta$  galactosil(1 $\rightarrow$ 3)*N*-acetil galactosamina, así como por lectinas que reconocen residuos de *N*-acetil-galactosamina en enlaces  $\alpha$  ó  $\beta$  y proponen que el reconocimiento es debido a la afinidad de las lectinas por la cadena-O polisacárida de dicho serotipo constituida por unidades trisacáridas repetitivas de dos residuos de D-galactosa y un residuo de *N*-acetil-galactosamina.<sup>109</sup> También observaron que existen reacciones variables de aglutinación con lectinas específicas para residuos de manosa y ácido siálico, cuando la bacteria se incubó en medios conteniendo suero; sugieren que los carbohidratos de superficie se recubren por componentes del suero, como fibronectina y colectinas (como la conglutinina y proteínas de unión a residuos de manosa); lo cual ha sido demostrado para otras bacterias.<sup>74, 114</sup> La modificación de la superficie bacteriana por estos factores del hospedero influyen en la capacidad adherente y resistencia a la fagocitosis, facilitando su persistencia y diseminación hacia los tejidos blanco.



Como la interacción bacteria-célula se inicia casi siempre a partir del reconocimiento específico de estructuras complementarias localizadas en la superficie de ambos componentes, uno de nuestros propósitos fue investigar si los extractos salinos precipitados presentaban actividad hemaglutinante debido a que diversas adhesinas bacterianas tienen ésta propiedad; además, la unión entre la adhesina y los eritrocitos es muy similar a la que se establece entre ella y su célula blanco, permitiendo su aislamiento y estudio de especificidad de unión.

La actividad hemaglutinante se buscó en los extractos salinos crudos de los diferentes serotipos y biotipos, ensayando con diferentes especies de glóbulos rojos. Se encontró actividad aglutinante para eritrocitos de conejo en los diferentes extractos analizados; solo que esta actividad fue de 3 a 7 veces más alta en los extractos del biotipo T que en los extractos del biotipo A. La actividad específica (determinada por la relación entre el título de actividad y la concentración de proteína) fue más alta en los serotipos A1, A6, A9 y A11 siendo similar entre ellos. Paradójicamente los extractos del biotipo T, a pesar de exhibir la actividad hemaglutinante más alta, presentaron menor contenido proteico. Los eritrocitos solo fueron aglutinados por los extractos cuando los glóbulos rojos fueron ensayados sin ninguna modificación enzimática, y en los primeros días de haberlos obtenido, pues su maduración o almacenamiento a 4°C por un período mayor eliminó su reconocimiento por cualquiera de los extractos probados. Es posible que esto se deba a la pérdida de fracciones de carbohidrato, principalmente N-acetilglucosamina y ácido siálico, moléculas de superficie unidas débilmente a la superficie del eritrocito, que se liberan durante el tiempo de almacenamiento o el envejecimiento de las células.<sup>21</sup> El tratamiento de los eritrocitos con las enzimas proteolíticas también afectó severamente su reconocimiento por la hemaglutinina presente en los extractos; este tratamiento, elimina o modifica el receptor sobre la superficie del eritrocito, perdiéndose cualquier capacidad de interacción entre ellos y el componente o componentes bacterianos responsables, debido posiblemente a la eliminación de componentes glicoprotéicos de la membrana del eritrocito; además, se pone de manifiesto la posible participación de residuos de ácido siálico en esta

interacción, debido a la pérdida de reconocimiento después del tratamiento con neuraminidasa.

Como se explicó anteriormente, los extractos salinos crudos presentan una gran cantidad de polisacáridos capsulares y con la idea de discernir si estos se encontraban involucrados en la actividad se procedió a precipitar de manera diferencial las proteínas solubles y eliminar la mayor cantidad posible de polisacáridos, se observó que la actividad permanecía en la misma proporción después de la precipitación, indicando que los polisacáridos capsulares no participan en la unión al eritrocito. Además, la variedad en composición y estructural de este componente dentro de los diferentes serotipos elimina la posibilidad de que sean los responsables de la actividad.

Para determinar la especificidad de la hemaglutinina presente en el extracto del serotipo A1 realizamos ensayos de inhibición competitiva con azúcares simples y glicoproteínas; al identificar la especificidad se propuso la utilización del carbohidrato específico en un sistema cromatográfico de afinidad, con el fin de intentar el aislamiento de la molécula responsable de la interacción con la membrana celular. Este proceso se realizó únicamente con *Pasteurella haemolytica*, serotipo A1, porque es el serotipo que se aísla con más alta frecuencia de las neumonías del bovino.

De los azúcares simples estudiados, la actividad hemaglutinante de la proteína purificada, así como del extracto total, se inhibió solamente con azúcares *N*-acetilados como la GlcNAc y el ácido *N*-acetil-neuráminico (ác siálico); la interacción con residuos siálicos quedó de manifiesto también por la eliminación de la actividad hemaglutinante después del tratamiento de los eritrocitos con neuraminidasa. De acuerdo con la especificidad se procedió al aislamiento de la hemaglutinina empleando columnas de agarosa unida a GlcNA, pero también se utilizaron columnas conteniendo estroma de eritrocitos de conejo tratados previamente con glutaraldehído. Por los dos procedimientos empleados se aisló una proteína

de 70 kDa que fue homogénea de acuerdo con el análisis electroforético efectuado en geles de poliacrilamida y teñidos con plata. De manera comparativa entre ambos procesos de purificación, se aprecia mayor eficiencia al emplear la columna con estroma de eritrocitos de conejo, donde toda la actividad hemaglutinante se retuvo a diferencia de la columna de GlcNAc. Estos resultados indican que efectivamente existe reconocimiento por el azúcar GlcNAc, pero que la interacción de la proteína con este azúcar simple no es suficiente para permitir la retención total de la actividad presente en el extracto. Es probable que la GlcNAc sea solo una parte integral de una estructura oligosacárida más compleja reconocida por la proteína sobre la superficie del eritrocito involucrando residuos de ácido siálico. La interacción estereoquímica proteína-eritrocito es mucho más eficiente con estructuras complejas y el empleo de columnas con estroma de estas células ofrece por lo tanto un mayor rendimiento en la purificación de la aglutinina.

El análisis químico practicado a la adhesina purificada, nos indica que es una proteína de 70 kDa que carece de fracción oligosacárida, es rica en residuos de glicina, serina, ácido glutámico, alanina y ácido aspártico y pobre en cisteína, metionina y tirosina. La presencia de cisteína indica la posible existencia de un puente disulfuro en la molécula de la proteína. Otras proteínas de peso molecular similar se han identificado en perfiles electroforéticos de preparaciones proteicas de la membrana externa, después de cultivar la bacteria en condiciones restringidas de hierro; bajo estas condiciones se identifica una banda protéica de 70 kDa cuyo análisis indicó es una mezcla de tres diferentes proteínas, una de las cuales contiene epitopos específicos de serotipo y su expresión, se ha mostrado, no es regulada por el hierro a diferencia de las otras que son reguladas por este elemento; una de estas ultimas proteínas es altamente inmunogénica y normalmente se encuentra asociada con otra proteína de 100 kDa que se une a la transferrina y cuya expresión también es regulada por hierro; mientras que la otra es la principal proteína que se tiñe en SDS-PAGE practicados a las preparaciones de membrana externa de la bacteria y al parecer es menos inmunogénica.<sup>50</sup>

Hasta esta etapa del trabajo no tenemos más elementos para identificar si la proteína aislada corresponde con alguna de las proteínas antes mencionadas; sin embargo, por el reconocimiento que muestra hacia residuos carbohidratos y por su expresión en medios enriquecidos de hierro, se considera que no se trata de una de las proteínas de membrana externa regulada por dicho elemento. Además el método utilizado para su obtención no involucra el rompimiento celular ni extracción con detergentes; es posible que se encuentre localizada y distribuida sobre la superficie de la bacteria de acuerdo con su afinidad y al suave método de extracción utilizado. Sin embargo la obtención de la secuencia de aminoácidos de la adhesina y un análisis de homología con las otras proteínas nos permitirá identificar de manera concluyente si son proteínas diferentes.

El hecho de que la proteína posea actividad hemaglutinante sugirió su participación en el mecanismo de adhesión de la bacteria; así, tratamos de investigar su posible intervención en dicho evento y estudiar la especificidad de la interacción. Los estudios de adherencia se realizaron en células ciliadas de tráquea bovina de becerros recién nacidos y se emplearon aislamientos de la bacteria cuyos extractos solubles presentaban actividad hemaglutinante para eritrocitos de conejo; al mismo tiempo fue posible comparar la capacidad adherente de estas bacterias con una cepa carente de actividad.

Las bacterias capsuladas se adhirieron pobremente a las células de tráquea bovina, en promedio 2.9 bacterias por célula; mientras que la cepa no capsulada se adhirió en mayor número 6.1 bacterias por célula. La baja adherencia de *Pasteurella haemolytica* A1 a estas células no muestra diferencias con la adherencia que exhiben, empleando este modelo, *P. multocida* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*, miembros del grupo HAP (*Haemophilus*, *Actinobacillus* y *Pasteurella*). Al igual que estos microorganismos, *Pasteurella haemolytica* se une también preferentemente a los cilios de las células.<sup>69, 70</sup>

Como el evento inicial en la patogénesis de muchas infecciones es el establecimiento y colonización del microorganismo en el aparato respiratorio superior, fue importante para nosotros evaluar la adherencia de la bacteria a este tipo de células. El hecho de haber observado una baja adherencia no le resta importancia al evento en este nivel; pues, hay que considerar que la evaluación se hizo con células aisladas y lavadas exentas de una buena cantidad de moco, lo cual difiere de la situación *in vivo*.

La adherencia en este sitio es crucial ya que sí el microorganismo evita la eliminación por el sistema mucociliar, bajo alguna circunstancia, su número se incrementa hasta alcanzar una concentración suficiente para tener acceso a los pulmones.

Investigadores como Glorioso y Jacques,<sup>59, 70, 52</sup> han empleado también otros sistemas o modelos para el estudio de la adherencia de bacterias del grupo HAP, como cultivos celulares, anillos de tráquea y cortes de tejido pulmonar; en estos sistemas las bacterias se adhieren en mucho mayor número y han permitido identificar las posibles estructuras bacterianas involucradas en la adherencia y determinar sus posibles receptores.

En varios de estos estudios se emplearon bacterias capsuladas y sus variantes no capsuladas; encontrándose que las bacterias desprovistas de cápsula se adhieren en los diferentes sistemas en mayor número que sus progenitoras capsuladas.<sup>71, 79, 117</sup> Al igual que estos investigadores nosotros observamos que la cepa no capsulada se adhirió dos veces más que las bacterias capsuladas.

La mayor capacidad adherente de las bacterias desprovistas de cápsula, sin embargo, no las hace más virulentas; por el contrario, se ha observado que las cepas capsuladas son más virulentas debido a que los componentes de la superficie bacteriana, como la propia cápsula, capacitan a la bacteria a resistir la actividad fagocítica de los macrófagos.<sup>117</sup>

En los ensayos de inhibición de la adherencia con azúcares y glicoproteínas realizados en nuestro sistema, encontramos que al igual que la adhesina bacteriana purificada, la interacción de la bacteria se inhibió con GlcNAc y ácido N-acetil-neuramínico. Para la variante no capsulada se observó inhibición además de los azúcares antes mencionados con manosa. La mucína inhibió la adherencia para ambos tipos de células, pero el efecto fue mucho más fuerte para la cepa Lau, lo cual también se ha observado para este tipo de bacterias descapsuladas.<sup>71, 79</sup>

Estas observaciones indican aparentemente la participación de diferentes componentes con propiedades adhesivas para ambos tipos de bacterias, que al parecer en las bacterias capsuladas se encuentra localizado en la superficie bacteriana; para la variante no capsulada la interacción podría estar determinada por algún componente cubierto por la cápsula como han sugerido Jacques y Bélanger para *P. multocida* y *A. pleuropneumoniae*.<sup>71, 14</sup>

El hecho de que la adherencia se inhiba con GlcNAc y ácido siálico sugiere la posible participación de la proteína con actividad hemaglutinante en el mecanismo de adhesión de la bacteria a células epiteliales de tráquea bovina. Nuestros resultados indican que la interacción específica con estos carbohidratos podría estar determinada por el grupo acetilo presente en el carbono 2 de la GlcNAc y en el carbono 5 del ácido siálico. El ácido siálico tiene una relevancia especial cuando se trata de una interacción con estructuras complejas, de esta forma observamos que en las glicoproteínas sialiladas como en la fetuína, su eliminación disminuye la capacidad de dicha glicoproteína para interactuar con la adhesina bacteriana. Esta glicoproteína típicamente está constituida por estructuras de tipo N-lactosamínico con ácido siálico en posición terminal,<sup>115</sup> aunque también se han reportado sustituciones de ácido siálico en enlaces  $\alpha 2 \rightarrow 6$  directamente sobre GlcNAc,<sup>45</sup> lo que aportaría una doble posibilidad de interacción con la adhesina y quizá explique la mayor afinidad por esta glicoproteína que por cualquiera otra.

La interacción con el ácido siálico incluye también la presencia del carboxilo en el carbono 1, de hecho esto permite que sea el único carbohidrato con posibilidad de ionizarse, ya que se encuentra con carga negativa a pH fisiológico, este carbohidrato aporta también una carga neta negativa a los grupos celulares que lo contienen, esto sugiere que la interacción de la adhesina con el receptor podría estar determinada por la participación de interacciones iónicas. Mediante la utilización de glicósidos como el heparán sulfato y el condroitín sulfato, logramos inducir la inhibición de la actividad de la adhesina, no así con protamina que posee un anión. Estos resultados sugieren que la interacción está determinada por la presencia de grupos polares que podrían estabilizar a la adhesina sobre su receptor.

La participación de azúcares N-acetilados en el mecanismo de adhesión también se ha observado para *P. multocida* tipo A, miembro de la familia *Pasteurellacea*, cuya adherencia a células epiteliales de la faringe o a células HeLa es inhibible con GlcNAc.<sup>59</sup> *Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria gram negativa colonizadora y patógena del aparato respiratorio del humano y de otros mamíferos también exhibe afinidad por GlcNAc y ácido siálico.<sup>135</sup> Al parecer existe una predilección de patógenos respiratorios por residuos N-acetilados, pues además de las bacterias antes mencionadas *Mycoplasma pneumoniae* y *Bordetella bronchiseptica* muestran afinidad por estos azúcares.<sup>68, 133</sup>

Los efectos que la proteína con actividad hemaglutinante pueda causar en este tipo de células, sin embargo, deberán ser investigados; así como el receptor o receptores sobre las células blanco. Existe evidencia de que además de reconocer o interactuar con un receptor las adhesinas desencadenan efectos biológicos a través de la liberación de moléculas secundarias, determinando el desarrollo de la interacción bacteria- célula, además de afectar los sistemas de defensa del hospedero.<sup>64, 71</sup>

Aunque nuestras observaciones sugieren la participación de la proteína de 70 kDa específica para residuos de ácido siálico y *N*-acetil-glucosamina en la adherencia de *P. haemolytica* A1, es posible que otras estructuras de la bacteria estén involucradas en el mecanismo; una de estas estructuras podría ser el LPS de la bacteria con potencial patogénico inherente y cuya participación en la adherencia ha sido insinuada.<sup>22</sup>

También se han propuesto como posibles adhesinas de la bacteria la cápsula, el glicocálix y las fimbrias; sin embargo, su papel en este mecanismo no ha sido confirmado. A pesar de que Morck y cols.<sup>93</sup> observaron estructuras fimbriales adheridas al epitelio de la tráquea por microscopía electrónica, varios investigadores han tenido dificultades para observar su presencia en aislamientos recientes de la bacteria. En ausencia de estructuras fimbriales bien definidas, se sugirió que otros componentes de superficie deben fungir como adhesinas, promoviendo la persistencia de la bacteria en el aparato respiratorio.

A este respecto Gonzalez-Rayos<sup>61, 62, 82</sup> reportó, a partir de un banco genómico del serotipo A1, un plásmido que codifica para una proteína específica de 100 kDa. La proteína parece estar localizada en la membrana externa de la bacteria y se cree puede participar en el mecanismo de adhesión, debido a que presenta un alto grado de hidrofobia.

No se sabe claramente qué factores favorecen una proliferación selectiva de *P. haemolytica* A1 durante los periodos de estrés o durante las infecciones virales respiratorias, pero se ha mencionado que la reducción en la eliminación por el sistema mucociliar, factores inmunes alterados o la alteración de receptores de la superficie epitelial contribuyen a la colonización específica de la bacteria.<sup>30, 142</sup>

En apoyo a lo anterior, en bovinos se observó que en las infecciones por el virus de la rinotraqueitis bovina (IBR), se incrementa la actividad de elastasa en el moco nasal, enzima responsable de la pérdida de fibronectina en la superficie celular



y que este evento promueve la adherencia de un gran número de bacterias de *P. haemolytica* en tejido pulmonar; la relación causal entre actividad de elastasa y colonización sugiere por lo tanto la exposición de receptores afines a la o las adhesinas de *P. haemolytica*.<sup>26</sup>

Hasta el momento es difícil aún definir si la proteína purificada e identificada como adhesina corresponde con alguna de las proteínas con peso molecular semejante, reportadas para la bacteria pero la secuenciación de la proteína o al menos de su grupo amino terminal, nos permitirá definir este aspecto. También proponemos la inclusión de la proteína en el desarrollo de inmunógenos para la prevención de la pasteurelisis neumónica, que entre otros componentes deben incluir la leucotoxina, proteínas reguladas por hierro y las enzimas responsables de la invasividad de la bacteria; ya que de esta forma podría evitarse la colonización profusa e inducir la neutralización de las exoproteínas con actividad inmunomoduladora, como la leucotoxina.

## IX CONCLUSIONES

- Extractos solubles de los diferentes serotipos de *Pasteurella haemolytica* presentan actividad hemaglutinante para eritrocitos de conejo inhibible con GlcNAc, independientemente del biotipo.
- Existen diferencias en los perfiles electroforéticos entre extractos de los serotipos del biotipo A y extractos del biotipo T, y similitudes entre serotipos correspondientes al mismo biotipo.
- El empleo de columnas de agarosa unidas a GlcNAc o columnas con estroma de eritrocito de conejo, permitió el aislamiento a homogeneidad de una proteína de 70 kDa con actividad hemaglutinante, a partir de un extracto de *P. haemolytica* A1.
- Hubo una mayor eficiencia en la recuperación de la proteína empleando columnas con estroma de eritrocitos de conejo.
- Se sugiere la participación de la proteína en el mecanismo de adhesión de la bacteria a células ciliadas de tráquea bovina, de acuerdo con la especificidad mostrada hacia residuos de GlcNAc y ácido siálico.
- Es conveniente evaluar la participación de esta hemaglutinina en otros modelos o sistemas, principalmente con poblaciones de leucocitos y determinar si la interacción facilita el efecto citolítico de la bacteria.

## X BIBLIOGRAFIA

- 1.-Abdullah, K.M., Lo, R.Y.C and Mellors, A. 1990. Distribution of glycoprotease activity and the glycoprotease gene among serotypes of *Pasteurella haemolytica*. Biochem. Soc. Trans. 18: 901-903
- 2.-Abdullah, K.M., Lo, R.Y.C. and Mellors, A. 1991. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Pasteurella haemolytica* A1 glycoprotease gene. J. Bacteriol. 173: 5597-5603
- 3.-Abdullah, K.M., Udoh, E.A., Shewen, P.E. and Mellors, A. 1992. A natural glycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1 specifically cleaves O-sialoglycoproteins. Infect. Immun. 60: 56-62
- 4.-Abraham, S.N., Beachey, E.H. and Simpson, W.A. 1983. Adherence of *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* to fibronectin-coated and uncoated epithelial cells. Infect. Immun. 41: 1261-1268.
- 5.-Adlam, C., Knights, J.M., Mugridge, A., Lindon, J.C., Baker, P.R.W., Beesley, J.E. Spacey, B., Carig, G.R. and Nagy, L.K. 1984. Purification, characterization and immunological properties of serotype-specific polysaccharide of *Pasteurella haemolytica* ( serotype A1) organisms. J. Gen. Microbiol. 130: 2415-2426
- 6.-Adlam, C., Knights, J.M., Mugridge, A., Lindon, J.C. and Williams, J.M. 1985. Purification, characterization and immunological properties of the serotype-specific capsular polysaccharide of *Pasteurella haemolytica* (serotype T4) organisms. J.Gen. Microbiol. 131: 387-394
- 7.-Adlam, C., Knights, J.M., Mugridge, A., Lindon, J.C., Williams, J.M. and Beesley, J.E. 1985. Purification, characterization and immunological properties of the serotype-specific capsular polysaccharide of *Pasteurella haemolytica* serotype T15: Its identity with the K62 (K2ab) capsular polysaccharide of *Escherichia coli* and the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup H. J. Gen. Microbiol. 131: 1963-1972
- 8.-Adlam, C., Knights, J.M., Mugridge, A., Lindon, J.C., Williams, J.M. and Beesley, J.E. 1986. Purification, characterization and immunological properties of the serotype-specific capsular polysaccharide of *Pasteurella haemolytica* serotype A7 organisms. J.Gen. Microbiol. 132: 1079-1087
- 9.-Adlam, C., Knights, J.M., Mugridge, A., Williams, J.M. and Lindon, J.C. 1987. Production of colominic acid by *Pasteurella haemolytica* serotype A2 organisms . FEMS Microbiol. Lett. 42: 23-25

- 10.-Albelda, S.M. and Clayton, B.A. 1990. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 4: 2868-2880
- 11.-Attridge, S.R. and Rowley, D. 1983. The role of the flagellum in the adherence of *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.* 147: 864-872
- 12.-Austin, F.W. and Corstvet, R.E. 1993. Purification of a *Pasteurella haemolytica* serotype 1- specific polysaccharide epitope by use of monoclonal antibody immunoaffinity. *Am. J. Vet. Res.* 54: 695-700
- 13.-Beachey, E.H. 1981. Bacterial adherence: Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.* 143: 325-345
- 14.-Bélanger, M., Dubrevil, D., Harel, J., Girard, C. and Jaques, M. 1990. Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infect. Immun.* 58: 3523-3530
- 15.-Biberstein, E.L., Gills, M. and Knight, H. 1960. Serological type of *Pasteurella haemolytica*. *Cornell Vet.* 50: 283-300
- 16.-Biberstein, E.L. 1978. Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*. *Methods in Microbiol.* 10: 253-268
- 17.-Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A. and Tarvin, T.L. 1984. Rapid analysis of amino acids using precolumn derivatization. *J. Chromatogr.* 33: 93-104
- 18.-Billingham, M.E.J. 1987. Cytokines as inflammatory mediators. *Br. Med. Bull.* 43: 350-355
- 19.-Binkhorst, G.J., Henricks, P.A.J., Ingh, T.S.G. A.M., Hajer, R. and Nijkamp, F.P. 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
- 20.-Bradford, M.M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- 21.-Bratosin, D., Mazurier, J., Debray, H., Lecocq, M., Boilly, B., Alonso, C., Mosei, M., Motas, C. and Montreuil. 1995. Flow cytometric analysis of young and senescent human erythrocytes probed with lectins. Evidence that sialic acids control their life span. *Glycoconjugate J.* 12: 258-267

- 22.-Breider, M.A., Kumar, S. and Corstvet, R.E. 1990. Bovine pulmonary endothelial cell damage mediated by *Pasteurella haemolytica* pathogenic factors. *Infect. Immun.* 58: 1671-1677
- 23.-Breider, M.A., Kumar, S. and Corstvet, R.E. 1991. Interaction of bovine neutrophils in *Pasteurella haemolytica* mediated damage to pulmonary endothelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 27: 337-350.
- 24.-Breider, M.A., Kumar, S. and Corstvet, R.E. 1991. Protective role of bovine neutrophils in *Pasteurella haemolytica* mediated endothelial cell damage. *Infect. Immun.* 59: 4570-4575.
- 25.-Breider, M.A. 1993. Endothelium and Inflammation. *JAVMA* 203: 300-306
- 26.-Briggs, R.E. and Frank, G.H. 1992. Increased elastase activity in nasal mucus associated with nasal colonization by *Pasteurella haemolytica* in infectious bovine *Rhinotracheitis* virus-infected calves. *Am. J. Vet. Res.* 53: 631-635
- 27.-Brogden, K.A., Adlam, C., Lehmkuhl, H.D. and Cutlip, R.C. 1989. Effect of *Pasteurella haemolytica* (A1) capsular polysaccharide on sheep lung in vivo and on pulmonary surfactant in vitro. *Am. J. Vet. Res.* 50: 555-559
- 28.-Brogden, K. and Clarke, C. 1997. Increase of glycocalix and altered lectin agglutination profiles of *Pasteurella haemolytica* A1 after incubation in bovine subcutaneous tissue chambers in vivo or in Ruminant serum in vitro. *Infect. Immun.* 65: 957-963
- 29.-Brogden, K.A., DeBey, B. and Cutlip, R. 1995. Lesions induced in vivo by cell-associated products of *Pasteurella haemolytica* and their role in the pathogenesis of bovine respiratory disease. *Memorias del Seminario de Pasteurelosis Neumónica del Ganado Bovino.* Monterrey, N.L., México. 23-29. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L., México
- 30.-Brown, T.T. and Shin, K.M.S. 1990. Effect of bovine *Herpesvirus-1* or *Parainfluenza-3* virus on immune receptor-mediated functions of bovine alveolar macrophages in the presence or absence of virus-specific serum or pulmonary lavage fluids collected after virus infection. *Am. J. Vet. Res.* 51: 1616-1622
- 31.-Burrows, L.L., Olah-Winfield, E. and Lo, R.Y.C. 1993. Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. *Infect. Immun.* 61: 5001-5007
- 32.-Campbell, G.A., Adams, L.G. and Sowa, B.A. 1994. Mechanisms of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopath.* 41: 295-306

- 33.-Chae, C.H., Gentry, M.J., Confer, A.W. and Anderson, G.A. 1990. Resistance to host immune defense mechanisms afforded by capsular material of *Pasteurella haemolytica* serotype 1. *Vet. Microbiol* 25: 241-251
- 34.-Chang, Y.F., Young, R., Post, D. and Struck, D.K. 1987. Identification and characterization of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect. Immun.* 55: 2348-2354
- 35.-Cladman, W.M., Watt, M.A.V., Diri, J.P. and Mellors, A. 1996. The *Pasteurella haemolytica* O-sialoglycoprotein endopeptidase is inhibited by zinc ions and does not cleave fetuin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 220: 141-146
- 36.-Clinkenbeard, K.D., Mosier, D.A. and Confer, A.W. 1989. Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect. Immun.* 57: 420-435
- 37.-Clinkenbeard, K.D., and Upton, M. 1991. Lysis of bovine platelets by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Am. J. Vet. Res.* 52: 453-457
- 38.-Cohen, M., Guarino, A., Shukla, R. and Giannella, R. 1988. Age-related differences in receptors for *Escherichia coli* heat stable enterotoxin in the small and large intestine of children. *Gastroenterol.* 94: 367-373
- 39.-Colin, R., Jaramillo, M.L., Aguilar, R.F., Trigo, T.F.J. y Merino, M.M. 1987. Serotipos de *Pasteurella haemolytica* en pulmones neumónicos de ovinos en México. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 29: 231-235
- 40.-Confer, A. W., Lessley, B.A., Panciera, R.J., Fulton, R.W. and Kreps, J.A. 1985. Serum antibodies to antigens derived from a saline extract of *Pasteurella haemolytica*: Correlation with resistance to experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Vet. Immunol. Immunopath.* 10: 265-278
- 41.-Confer, A. W. and Simons, K.R. 1986. Effects of *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide on selected functions of bovine leukocytes. *Am. J. Vet. Res.* 47: 154-157
- 42.-Confer, A.W., Simons, K.R., Panciera, R.J., Mort, A.J. and Mosier, D.A. 1989. Serum antibody response to carbohydrate antigens of *Pasteurella haemolytica* serotype 1: Relation to experimentally induced bovine pneumonic pasteurellosis. *Am. J. Vet. Res.* 50: 98-105
- 43.-Craft, D.L., Chengappa, M.M. and Carter, G.R. 1987. Differentiation of *Pasteurella haemolytica* biotypes A y T with lectins. *Vet. Rec.* 120: 393
- 44.-Cowan, S.T. and Steel's, K.J. 1979. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. Compañía Editorial Continental S.A. México

- 45.-Cumming, A.A., Hellerqvist, C.G., Harris-Brandts, M., Michnik, S.W., Carver, J.P., and Bendiak, B. Structures of asparagine linked oligosaccharides of the glycoprotein fetuin having sialic acid linked to N-acetylglucosamine. *Biochem.* 28: 6500-6512
- 46.-Czuprynski, Ch. J., Noel, E.J. and Adlam, C. 1991. Interaction of bovine alveolar macrophages with *Pasteurella haemolytica* A1 in vitro: Modulation by purified capsular polysaccharide. *Vet. Microbiol* 26: 349-358
- 47.-Czuprynski, Ch. J., Noel, E.J. and Adlam, C. 1991. *Pasteurella haemolytica* A1 purified capsular polysaccharide does not stimulate interleukin-1 and tumor necrosis factor release by bovine monocytes and alveolar macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 28: 157-163
- 48.-Devenish, J., Rosendal, S., Johnson, R. and Hubler, S. 1989. Immunoserological comparison of 104- kilodalton proteins associated with hemolysis and cytotoxicity in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Pasteurella haemolytica* y *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57: 3210-3213
- 49.-De Melo, M. and Pechere, J.C. 1990. Identification of *Campylobacter jejuni* surface proteins that bind to eucaryotic cells in vitro. *Infect. Immun.* 58: 1749-1756
- 50.-Donachie, W. 1994. Vaccine development against *Pasteurella haemolytica* infections in sheep. Abstract book HAP 94 In Edinburgh, *Haemophilus*, *Actinobacillus* and *Pasteurella*. International Conference U.K. 31 July- 4 August p. 18-19
- 51.-Donachie, W., Gilmour, N.J.L., Mould, D.L. and Poxton, R.I. 1984. Comparison of cell surface antigen extracts from two serotypes of *Pasteurella haemolytica*. *J. Gen. Microbiol.* 130: 1209-1216
- 52.-Dugal, F., Bélanger, M. and Jacques, M. 1992. Enhanced adherence of *Pasteurella multocida* to porcine tracheal rings pre-infected with *Bordetella bronchiseptica*. *Can. J. Vet. Res.* 56: 260-264
- 53.-Fenwick, B.W. 1990. Virulence attributes of the lipopolysaccharides of the HAP group organisms. *Can. J. Vet. Res.* 54: 528-532
- 54.-Ficht, T.A., Bearden, S.W., Sowa, B.A. and Marquis, H. 1990. Genetic variation at the omp2 porin locus of the brucellae: species-specific markers. *Mol. Microbiol.* 4: 1135-1142
- 55.-Filion, L.A., Wilson, P.J. and Bielefeldt-Ohmann, H. 1984. The role of stress on the induction of pneumonic pasteurellosis. *Can. J. Comp. Med.* 48: 268-274

- 56.-Finlay, B.B. and Falkow, S. 1989. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev.* 53 (2) 210-230
- 57.-Frost, L. S., Carpenter, M. and Paranchych, W. 1978. N-methylphenylalanine at the N-terminus of pilin isolated from *Pseudomonas aeruginosa* K, *Nature* 271: 87-89
- 58.- Gentry, M.J.; Corstvet, R.E. and Panciera, R.J. 1982. Extraction of capsular material from *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.* 43: 2070-2073
- 59.-Glorioso, J.C., Jones, G.W., Rush, H.G., Pentler, L.J., Darif, C.A. and Coward, J.E. 1982. Adhesion of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infections. *Infect. Immun.* 35: 1103-1109
- 60.-Goldberg, M.A. and Sansonetti, P.J. 1993. *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton: A strategy for epithelial colonization. *Infect. Immun.* 61: 4941-4946
- 61.-Gonzalez-Rayos, C., Lo, R.Y.C., Shewen, P.E. and Beveridge, T.J. 1986. Cloning of a serotype- specific antigen from *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect. Immun.* 53: 505- 510
- 62.-Gonzalez, C.T. and Maheswaran, S.K. 1993. The role of induced virulence factors produced by *Pasteurella haemolytica* in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis: Review and hypothesis. *Br. Vet. J.* 149: 183- 193
- 63.-Henricks, P.A.J., Binhorst, G.J., Druver, A.A. and Nukamp. 1992. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin enhances production of leukotriene B4 and 5-hydroxyeicosatetraenoic acid by bovine polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 60: 3238-3243
- 64.-Hoepelman, A.I.M. and Tuomanen, E.I. 1992. Consequences of microbial attachment: Directing host cell functions with adhesin. *Infect. Immun.* 60: 1729-1732
- 65.-Hughes, H.P.A., Campos, M., Mc Dougall, L., Beskorwayne, T.K., Potter, A.A. and Babiuk, L.A. 1994. Regulation of major histocompatibility complex class II expression by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect. Immun.* 62: 1609-1615
- 66.-Isberg, R.R. and Leong, J.M. 1990. Multiple beta-1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* 60: 861-871



- 67.-Ichikawa, Y., Lee, R.T. and Lee, Y.C. 1990. Synthesis of N-acetyl-D-glucosamine derivatives as probes for specificity of chicken hepatic lectin. Glycoconjugate J. 7: 335-348
- 68.-Ishikawa, H. and Isayama, Y. 1987. Evidence for sialyl glycoconjugates as receptors for *Bordetella bronchiseptica* on swine nasal mucosa. Infect. Immun. 55: 1607-1609
- 69.-Jacques, M., Parent, N. and Foiry, B. 1988. Adherence of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* to porcine nasal and tracheal epithelial cells. Can. J. Vet. Res. 52: 283-285
- 70.-Jacques, M., Bélanger, M., Roy, G. and Fohry, B. 1991. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal epithelial cells and frozen lung sections. Vet. Microbiol. 27: 133-143
- 71.-Jacques, M., Kobisch, M., Bélanger, M. and Dugal, F. 1993. Virulence of capsulated and noncapsulated isolates of *Pasteurella multocida* and their adherence to porcine respiratory tract cells and mucus. Infect. Immun. 61: 4785-4792
- 72.-Kaehler, K.L., Markham, R.J.F., Muscoplat, C.C. and Johnson, D.W. 1980. Evidence of species specificity in the cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica*. Infect. Immun. 30: 615-616
- 73.-Knights, J.M., Adlam, C. and Owen, P. 1990. Characterization of envelope proteins from *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*. J. Gen. Microbiol. 136: 495-505
- 74.-Kuan, S.F., Rust, K. and Crouch, E. 1992. Interactions of surfactant protein D with bacterial lipopolysaccharides. Surfactant protein D is an *Escherichia coli* binding protein in bronchoalveolar lavage. J. Clin. Invest. 90: 97-106
- 75.-Lacroix, R.P., Duncan, R.J., Jenkins, R.P., Leitch, R.A., Perry, J.A. and Richards, J.C. 1993. Structural and serological specificities of *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharides. Infect. Immun. 61: 170-181
- 76.-Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, London 227: 680-685
- 77.-Leitch, R.A. and Richards, J.C. 1988. Structure of the polysaccharide chain of *Pasteurella haemolytica* (serotype 4) lipopolysaccharide. Can. J. Biochem. Cell. Biol. 62: 108-114

- 78.-Lessley, B. A., Confer, A.W., Mosier, D.A., Gentry, M.J., Durham, J.A. and Rummage, J.A. 1985. Saline-extracted antigens of *Pasteurella haemolytica*: separation by chromatofocusing, preliminary characterization, and evaluation of immunogenicity. *Vet. Immunol. Immunopath.* 10: 2-29679
- 79.-Letellier, A., Dubrevil, D., Roy, G., Fairbrother, J.M. and Jacques, M. 1991. Determination of affinity of *Pasteurella multocida* isolates for porcine respiratory tract mucus, and partial characterization of the receptors. *Am. J. Vet. Res.* 52: 34-39
- 80.-Lo, R.Y.C., Shewen, P.E., Strathdee, C.A. and Greer, C.N. 1985. Cloning and expression of the leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* A1 in *Escherichia coli* K-12. *Infect. Immun.* 50: 667-671
- 81.-Lo, R.Y.C., Strathdee, C.A. and Shewen, P.E. 1987. Nucleotide sequence of the leukotoxin genes of *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect. Immun.* 57: 3210-3213
- 82.-Lo, R.Y.C., Strathdee, C.A., Shewen, P.E. and Cooney, B.J. 1991. Molecular studies of Ssa, a serotype-specific antigen of *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect. Immun.* 59: 3398-3406
- 83.-Marrs, C.F., Schoolnik, G., Koomey, J.M., Hardy, J., Rothbard, J. and Falkow, S. 1985. Cloning and sequencing of a *Moraxella bovis* pilin gene. *J. Bacteriol.* 163: 132-139
- 84.-Maheswaran, S.K., Kannan, M. S., Weiss, D.J., Reddy, K.R., Townsend, E.L., Yoo, H.S., Lee, B.W. and Whiteley, L. O. 1993. Enhancement of neutrophil-mediated injury to bovine pulmonary endothelial cells by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect. Immun.* 61: 2618-2625
- 85.-Mc Kinney, K.L., Confer, A.W. Rummage, J.A., Gentry, M.J. and Durham, J.A. 1985. *Pasteurella haemolytica*. Purification of saline-extractable proteins by isoelectrofocusing. *Vet. Microbiol.* 10: 465-480
- 86.-Mc Sweegan, E. and Walker, R.I. 1986. Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucins substrates. *Infect. Immun.* 53: 141-148
- 87.-Merril, C.R., Switzer, R.C. and Van Keuren, M.L. 1979. Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4335-4339
- 88.-Meyer, T.F., Gibbs, C.P. and Haas, R. 1990. Variation and control of protein expression in *Neisseria*. *Annu. Rev. Microbiol.* 44: 451-477

- 89.-Meyer, D.H. and Fives-Taylor, P.M. 1993. Evidence that extracellular components function in adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect. Immun.* 61 : 4933-4936
- 90.-Mirion, F. C., Abraham, S. N., Beachey, E.H. and Goguen, J. D. 1986. The genetic determinant of adhesive function in type 1 fimbrial of *Escherichia coli* is distinct from the gene encoding the fimbrial subunit. *J. Bacteriol.* 165: 1033-1036
- 91.-Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Fournet, B., Dpik, G. and Strecker, G. 1986. In *Carbohydrates Analysis, A practical approach*. Chaplin, M.F. y Kennedy, J.F. Eds. , Oxford: IRL Press, pp 143-204
- 92.-Morck, D.W., Raybould, T.J.G., Acres, D.D., Babiuk, L.A., Nelligan, J. and Costerton, J.W. 1987. Electron-microscopic description of glycocalix and fimbrial on the surface of *Pasteurella haemolytica* A1. *Can. J. Vet. Res.* 51: 83-88
- 93.-Morck, D.W., Olson, M.E., Acres, S.D., Daoust, P. and Costerton, J.W. 1989. Presence of bacterial glycocalyx and fimbrial on *Pasteurella haemolytica* in feedlot cattle with pneumonic pasteurellosis. *Can. J. Vet. Res.* 53: 167-171
- 94.-Murray, J.E., Davies, R.C. , Lainson, F.A., Wilson, C.F. and Donachie, W. 1992. Antigenic analysis of iron-regulated proteins in *Pasteurella haemolytica* A and T biotypes by immunoblotting reveals biotype-specific epitopes. *J. Clin. Microbiol.* 138: 283-288
- 95.-Otulakowski, G.L., Shewen, P.E., Udoh, A.E., Mellors, A. and Wilkie, B.N. 1983. Proteolysis of sialoglycoprotein by *Pasteurella haemolytica* culture supernatant. *Infect. Immun.* 42: 64-70
- 96.- Pasloke, B.L., Sastry, P.A., Finlay, B.B. and Paranchych, W. 1988. Two unusual pilin sequences from different isolates of *Pseudomonas aeruginosa* . *J. Bacteriol.* 170: 3738-3741
- 97.-Paton, J.C., Andrew, P.W., Boulnois, G.J. and Mitchell, T.J. 1993. Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: The role of pneumococcal proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 89-115
- 98.-Paulsen, D.B., Confer, A.W., Clinkenbeard, K.D. and Mosier, D.A. 1990. *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-induced arachidonic acid release from and neutrophil adherence to bovine pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Vet. Res.* 51: 1635-1639

- 99.-Perry, M.B. and Babiuk, L.A. 1984. Structure of the polysaccharide chain of *Pasteurella haemolytica* (serotype 4) lipopolysaccharide. Can. J. Biochem. Biol. 62: 108-114
- 100.-Pijoan, C. and Trigo, E. 1990. Bacterial adhesion to mucosal surfaces with special reference to *Pasteurella multocida* isolates from atrophic rhinitis. Can. J. Vet. Res. 54: 516-521
- 101.-Potter, A.A., Ready, K. and Gilchrist, J. 1988. Purification of fimbriae from *Pasteurella haemolytica* A1. Microb. Pathog. 4: 311-316
- 102.-Ramírez- Romero, R. and Brogden, K.A. 1995. Patogenesis del daño pulmonar provocado por *Pasteurella haemolytica*. Rev. Lat- Amer. Microbiol. 35: 353-365
- 103.-Ramphal, R. and Pier, G.B. 1985. Role of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in adherence to tracheal cells. Infect. Immun. 47: 1-4
- 104.-Rauvala, H. 1983. Cell surface carbohydrates and cell adhesion. TIBS, September 323-325
- 105.-Relman, D., Tuomaren, E., Falkow, S., Golenbock, D.T., Saukkonen, K. and Wright, S.D. 1990. Recognition of a bacterial adhesin by an integrin: Macrophage CR3 (a Mb2, CD11/ CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. Cell, 61: 1375-1382
- 106.-Richards, J.C. and Leitch, R. 1989. Elucidation of the structure of the *Pasteurella haemolytica* T 10 lipopolysaccharide O-antigen by N.M.R. Spectroscopy. Carbohydrate Res. 186: 275-286
- 107.-Ruoslahti, E. 1988. Fibronectin and its receptors. Ann. Rev. Biochem. 57: 375-413
- 108.-Schlesinger, L.S. and Horwicz, M.A. 1990. Phagocytosis of leprosy bacilli is mediated by complement receptors CR1 and CR3 on human monocytes and complement component C3 in serum. J. Clin. Invest. 85: 1304-1314
- 109.-Severn, W.B., Johnston, R.A.Z., Leitch, R.A. and Richards, J.C. 1992. Structural analysis of the lipopolysaccharide from *Pasteurella haemolytica* serotype A1. Glycobiology 2: 463 (Abstract)
- 110.-Sharma, S.A., Olchoway, T.W.J. and Breider, M.A. 1992. Alveolar macrophage and neutrophil interactions in *Pasteurella haemolytica* induced endothelial cell injury. J. Infect. Dis. 165: 651

- 111.-Shewen, P.E. and Wilkie, B.N. 1982. Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. *Infect. Immun.* 35: 91-94
- 112.-Shewen, P.E. 1994. Host response to infection with HAP implications for vaccine development. Abstract book HAP 94 In Edinburgh, *Haemophilus*, *Actinobacillus* and *Pasteurella*. International Conference. U.K. 31 July- 4 August. P. 32-33
- 113.-Simpson, A., Hastly, D.L. and Beachey, E.H. 1985. Binding of fibronectin to human buccal epithelial cells inhibits the binding of type 1 fimbriated *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 48(2) 318-323
- 114.-Smith, H., Cole, J.A. and Parsons, N.J. 1992. The sialylation of gonococcal lipopolysaccharide by host factors: A major impact on pathogenicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 100: 287-292
- 115.-Spiro, R.G. and Bhojroo, V.D. 1974. Structure of the O-glycosidically linked carbohydrate units of fetuin. *J. Biol. Chem.* 249: 704-711
- 116.-Soto, L.E., Cervantes, L.E., Lopez-Vidal, Y. y Ruíz-Palacios, G.M. 1991. Role of outer membrane proteins and lipopolysaccharides (LPS) on adherence and invasion by *Campylobacter jejuni*. In: Ruiz-Palacios, G., Calva, E., RuízPalacios, B., eds, *Campylobacter* V. Proceedings of the fifth International Workshop on *Campylobacter* Infections. Instituto Nacional de la Nutrición. International Congress series ISBN 968-6685-00-6, 1991: 192-195
- 117.-St. Gerne, J.W. and Falkow, S. 1991. Loss of capsule expression by *Haemophilus influenzae* type b results in enhanced adherence to and invasion of human cells. *Infect. Immun.* 59: 1325-1333
- 118.-Straus, D.C., Jolley, W.L. and Purdy, Ch. W. 1993. Characterization of neuraminidases produced by various serotypes of *Pasteurella haemolytica*. *Infect. Immun.* 55: 2348-2354
- 119.-Switalski, L.M., Ryden, C., Rubin, K., Ljungh, A., Hook, M. and Wadstrom, T. 1983. Binding of fibronectin to *Staphylococcus* strains. *Infect. Immun.* 42: 628-635
- 120.-Taylor, R.K., Miller, V.L., Furlong, D.B. and Mekalanos, J.J. 1987. Use of *pho* A gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 2833-2837
- 121.-Thompson, D.A. and Mould, D.L. 1975. Protein electrophoretic pattern of *Pasteurella haemolytica*. *Res. Vet. Sci.* 18: 342-343

- 122.-Trigo, E., Liggitt, H.D. and Evermann, J.F. 1985. Effect of in vitro inoculation of bovine respiratory *Syncytal* virus on bovine pulmonary alveolar macrophage function. *Am. J. Vet. Res.* 46: 1098-1103
- 123.-Trigo, E. and Pijoan, C. 1988. Presence of pili in *Pasteurella multocida* strains associated with atrophic rhinitis. *Vet. Rec.* 122: 19
- 124.-Trigo, E., Trigo, F.J. and Berruecos, V.J. 1982. Patología y bacteriología de pulmones neumónicos de becerros. *Vet. Mex.* 13: 131-140
- 125.-Trigo, F.J. 1987. El complejo infeccioso de los bovinos y ovinos. *Ciencia Veterinaria* 4: 1-36
- 126.-Trigo, T.J.F. 1995. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos. Memorias del Seminario Pasteurellosis Neumónica del Ganado Bovino. Monterrey, N.L. México. 18-22. Universidad Autónoma de Nuevo León Monterrey, N.L., México
- 127.-Trigo, J.F. y Romero J. 1986. La relevancia de las neumonías como causa de mortalidad en corderos. *Vet. Méx.* 17: 116-119
- 128.-Utley, S.R., Bhat, U.R., Byrd, W. and Kadis, S. 1992. Characterization of lipopolysaccharides from four *Pasteurella haemolytica* serotype strain: Evidence for presence of sialic acid in serotypes 1 and 5. *FEMS Microbiol. Letters* 92: 211-216
- 129.-Van Alphen, L. 1994. Adhesin-receptor interactions between *Haemophilus influenzae* and human cells. Abstract book HAP 94 In Edinburgh, *Haemophilus, Actinobacillus* and *Pasteurella*. International Conference. U.K: 31 July- 4 August. P. 22
- 130.-Van Driessche, E. and Beeckmans, S. 1993. Fimbrial lectins from enterotoxigenic *Escherichia coli*: A mini-overview. In *Lectrins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Vol. 8, by Van Driessche, E., Franz, H., Beeckmans, S., Pfüller, U., Kallikorm, A. and Bog-Hansen, T.C. Eds. Published by Textop, Hellerup, Denmark. Chapter 4, p 207-216
- 131.-Varki, A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all theories are correct. *Glycobiology* 3: 97-130
- 132.-Vazquéz, L., Jaramillo, L., Lascorraín, R., Cooper, E.L., Rosas, P. and Zenteno, E. 1996. Bacterial agglutination by the sialic acid specific serum lectin from *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 113B: 355-359
- 133.-Vazquéz, L., Jaramillo, L., Reyes, J., Montaña, L.F. y Zenteno, E. 1992. Analisis estructural de las mucinas y su relevancia como receptor de agentes infecciosos. *Rev. Inst. Nal, Enf. Resp. Méx.* 5: 134-140

- 134.-Vazquez, L., Massó, F., Rosas, P., Montaña, L. and Zenteno, E. 1993. Purification and characterization of a lectin from *Macrobrachium rosenbergii*. *Comp. Biochem. Physiol. (B)* 105: 617-623
- 135.-Vishwanath, S. and Ramphal, R. 1985. Tracheobronchial mucin receptor for *Pseudomonas aeruginosa*: Predominance of aminosugars in binding sites. *Infect. Immun.* 48: 331-335
- 136.-Whiteley, L.O., Maheswaran, S.K., Weiss, D.J. and Ames, T.R. 1990. Immunohistochemical localization of *Pasteurella haemolytica* A1 derived endotoxin, leukotoxin and capsular polysaccharide in Experimental bovine *Pasteurella pneumonia*. *Vet. Pathol.* 27: 150-161
- 137.-Whitfield, C. 1988. Bacterial extracellular polysaccharides. *Can. J. Microbiol.* 34: 415-420
- 138.-Woods, D.E. 1987. Role of fibronectin in the pathogenesis of gram- negative bacteria pneumonia. *Rev. Infect. Dis.* 9 (Suppl. 4) 317-321
- 139.-Woods, D.E., Straus, D.C., Johanson, W.G. and Bass, J.A. 1981. Role of fibronectin in the prevention of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to buccal cells. *J. Infect. Dis.* 143: 784-790
- 140.-Woods, D.E., Straus, D.C. and Johanson, W.G. 1983. Factors influencing the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mammalian buccal epithelial cells. *Rev. Infect. Dis.* 5: 846-851
- 141.-Yates, W.D.G. 1982. A review of infections bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can. J. Comp. Med.* 46: 225-263
- 142.-Yates, W.D.G., Babiuk, L.A. and Jericho, K.W.F. 1983. Viral- bacterial pneumonia in calves: Duration of the interaction between bovine Herpesvirus-1 and *Pasteurella haemolytica*. *Can. J. Comp. Med.* 47: 257-264
- 143.-Yoo, H. S., Maheswaran, S.K., Lin, G., Townsend, E.L. and Ames, T.R. 1995. Induction of inflammatory cytokines in bovine alveolar macrophages following stimulation with *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 63: 381-388.