

B
21



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



Apéndices extracelulares en *Actinobacillus pleuropneumoniae*
aislados de casos agudos de Pleuroneumonía contagiosa porcina

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

JACOBO GARIBAY ESCOBEDO

DIRECTORES DE TESIS: DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA

DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

ASESORES DE TESIS: P. h. D. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN

M. EN C. SOFIA GONZALEZ GALLARDO



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Apéndices extracelulares en Actinobacillus pleuropneumoniae
aislados de casos agudos de pleuroneumonía contagiosa porcina

que presenta el pasante: Jacobo Garibay Escobedo
con número de cuenta: 8330839-4 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 10 de Febrero de 199 5

PRESIDENTE	<u>M.V.Z. Luz Ma. Ortega Leyva</u>
VOCAL	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>
SECRETARIO	<u>Dra. Susana E. Mendoza Elvira</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.I. Andrea Becerril Osnaya</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Q.F.B. Marcela Hernández Vargas</u>

[Signature]
[Signature]
[Signature]
[Signature]
[Signature]

DEDICATORIA

A mis Padres:

Vicente Garibay Reyes
Concepción Escobedo de Garibay

Porque sus esfuerzos y su gran espíritu de trabajo estuvieron siempre en mi pensamiento e hicieron levantarme en los momentos más difíciles. A ustedes me debo y de ustedes es este logro.

Los amo.

A mis Hermanos:

<i>Everardo</i>	<i>Isaac</i>
<i>Heriberto</i>	<i>Berenice</i>
<i>Esther</i>	<i>Isaias</i>
<i>Alejandro</i>	<i>Vicente</i>

Los momentos junto a ustedes no los cambiaría por nada, sigamos siempre juntos y en unidad. Gracias por aguantar mis malos ratos y por los muchos días de velada en los cuales les era imposibles consiliar el sueño por el ruido de la máquina de escribir y el foco de 100 wats prendido.

A mis sobrinos:

Anita, Wendy (Las bananas) y Alejandrito
Porque sus sonrisas y alegría llenaron de felicidad toda mi alma.

A los señores:

Ma. del Carmen Chin de Beltrán
Agustín Beltrán Olvera
Con ustedes construí una base muy fuerte de cariño y amistad. Los quiero, son parte de mi familia.

A mis amigos:

Felipe de Jesús Beltrán Chin
Rodolfo López N.
David Vázquez G.
Claudia Gómez P.
Alejandro González Corzo

A ti Laurita:

Porque a tu lado y en medio de este mundo agitado, he encontrado una atmósfera de amor, dulzura y comprensión. Te amo con todo mi corazón.

Al Sr. Mario Zaragoza, Sra. Porfiria Serrano de Zaragoza, Leonel Zaragoza, Beatriz Garcia, Enrique Zaragoza, Teresa Contreras C., Leonel Jr., y David. Y a la Familia Contreras C. Gracias por permitirme formar parte de su círculo familiar.

AGRADECIMIENTOS

A mi H. Jurado quienes con sus observaciones y sugerencias enriquecieron este trabajo. Gracias.

Me considero deudor y profundamente agradecido por el apoyo, enseñanza y estímulo constante, a mis directores y asesores:

Dra. Susana E. Mendoza Elvira

Dr. Abel Ciprián Carrasco

PhD Eliseo Hernández Baumgarten

M. C. Sofía González Gallardo

Con especial reconocimiento al Técnico Académico Rodolfo Robles Gómez por su valiosa ayuda en la impresión de las micrografías electrónicas y por iniciarme en el interesante mundo de la fotografía y la microscopía electrónica de barrido.

Al lic. Ignacio García Salgado por su valioso apoyo en la base de datos para la revisión bibliográfica.

A la M. C. Sofía González Gallardo por su ayuda en la estandarización en las técnicas para microscopía electrónica de transmisión.

Al PhD. Eliseo Hernández Baumgarten, por sus conocimientos, sus aceradas críticas y sus amables sugerencias.

Al Dr. Abel Ciprián Carrasco y a la Dra. Susana E. Mendoza Elvira por permitirme ser parte de la Universidad y haberme aceptado en su círculo de colaboradores.

Al MVZ Victor Quintero por su ayuda en la recolección de la sangre.

A la Q.F.B. Rosario Ruiz Venegas por su amistad y ayuda incondicional.

Al personal de la Biblioteca: Lic. Rommel Flores R., María Elena García Salgado, Fidel, Roberto, Tere y Adrian. Gracias por su ayuda incondicional.

Al laboratorio de Microscopía Electrónica, porque gracias a su temperatura, en invierno nos conservamos más jóvenes y en verano es agradable estar en él.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, gracias por su estancia. Y a mis profesores gracias por todos sus conocimientos.

ES POCO LO QUE SE HA HECHO, ESCASAMENTE UN INICIO; Y SIN EMBARGO, ES MUCHO COMPARADO CON EL VACIO TOTAL DE HACE UN SIGLO. Y NUESTROS CONOCIMIENTOS, COMO PUEDE INTUIRSE FACILMENTE, PARECERAN A SU VEZ LA IGNORANCIA MAS SUPINA A AQUELLOS QUE VENGAN DETRAS NUESTRO. SIN EMBARGO, NO CABE DESPRECIARLOS, PUES ATRAVES DE ELLOS NOS ACERCAMOS A TIENTAS HASTA ALCANZAR LA ORILLA DE LA VESTIDURA DEL ALTISIMO.

AGNES M. CLERKE

**ESTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN EL LABORATORIO DE
MICROSCOPIA ELECTRONICA Y EL LABORATORIO DE VIROLOGIA DE LA
COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO EN LA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN U N A M.**

INDICE

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	II
LISTA DE CUADROS Y GRAFICOS	III
LISTA DE MICROGRAFIAS	IV
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VI
I. INTRODUCCION	1
1. PLEURONEUMONIA CONTAGIOSA PORCINA	1
1.1 DISTRIBUCION E IMPORTANCIA	1
1.2 TRANSMISION	3
1.3 PATOGENIA	3
1.4 SIGNOS CLINICOS	4
1.5 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	4
2. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA COLONIZACION BACTERIANA	6
2.1 COLONIZACION	7
2.2 ASOCIACION	9
2.3 ADHESION	10
2.4 FISICOQUIMICA DE LA ADHESION	10
2.5 LAS ADHESINAS BACTERIANAS	13
2.6 ADHESINAS FIMBRIALES	15
2.7 ADHESINAS PROTEICAS NO FIMBRIALES	16
2.8 ADHESINAS COMPUESTAS POR CARBOHIDRATOS Y LIPIDOS	16
2.9 INVASION	17
3. FIMBRIAS, PRINCIPALES MEDIADORES EN LA ADHESION BACTERIANA	19
3.1 ESTRUCTURA	20
3.2 CLASIFICACION	23
3.2.1 GRUPO 1. FIMBRIAS COMO ORGANELOS DE ADHERENCIA	23
3.2.2 GRUPO 2. PILI SEXUAL	25
3.2.3 GRUPO 3	25
3.2.4 GRUPO 4	26
3.2.5 GRUPO 5	26
3.2.6 GRUPO 6	26
3.3 RECEPTORES	28
3.4 EXPRESION	28
3.5 ORGANIZACION GENETICA	29
3.6 VARIACION DE FASE	31
3.7 MAPEO GENETICO	33
3.8 EL OPERON <i>pap</i>	34

4. ENSAMBLAJE POSTSECRECIONAL	38
4.1 CAPERONES	38
4.2 BIOGENESIS DE LA FIMBRIA	38
II. OBJETIVOS	44
III. MATERIALES Y METODOS	45
1. MATERIAL BIOLÓGICO	45
2. MEDIOS DE CULTIVO	45
2.1 AGAR SANGRE	45
2.2 AGAR BHI	45
2.3 EXTRACTO DE LEVADURA	45
3. OBTENCIÓN DE ERITROCITOS DE BOVINO	46
4. REJILLAS	46
5. PELÍCULA SOPORTE	47
6. METODOS	48
6.1 AISLAMIENTO DE <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	48
6.2 IDENTIFICACIÓN DE <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	49
6.2.1 TINCIÓN GRAM	49
6.2.2 PRUEBA DE LA CATALASA	49
6.2.3 PRODUCCIÓN DE HEMOLISINA	50
6.2.4 REACCIÓN DE CAMP	50
6.2.5 PRUEBA DE SATELITISMO	51
6.2.6 DEPENDENCIA DEL FACTOR V	51
6.2.7 PRUEBA DE UREASA	51
6.2.8 FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS	52
7. SEROTIFICACIÓN	52
8. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	52
8.1 FIJACIÓN DE LA BACTERIA	52
8.2 TINCIÓN NEGATIVA	53
IV. RESULTADOS	55
V. DISCUSIÓN	70
VI. CONCLUSIONES	75
VII. REFERENCIAS	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de interacción Bacteria-Mucosa envueltos en la infección bacteriana de las superficies de mucosas	7
Figura 2. Asociación reversible de la superficie bacteriana con la superficie de la célula epitelial	12
Figura 3. Adhesión irreversible de la bacteria y la superficie celular epitelial mediada por la interacción específica adhesina-receptor	14
Figura 4. Invasión bacteriana del epitelio intestinal	18
Figura 5. Representación esquemática de la apariencia morfológica de las adhesinas de <i>Escherichia coli</i>	21
Figura 6. Diagrama esquemático de la estructura de la fimbria	22
Figura 7. Elemento invertible que controla la variación de fase de la fimbria de tipo 1	32
Figura 8. Localización del gene <i>fim</i> en el cromosoma de <i>Escherichia coli</i>	33
Figura 9. Resumen de la estructura, función y regulación de algunos grupos de genes de adhesinas de <i>E. coli</i>	35
Figura 10. Resumen de la estructura, función, y regulación del operón <i>pap</i>	36
Figura 11. Modelo de la biogénesis de la fimbria de tipo P	42
Figura 12. Desfibrinador utilizado en la recolección de eritrocitos de bovino	47

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	2
TABLA 2. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	5
TABLA 3. RESUMEN DE LA CLASIFICACION DE LAS FIMBRIAS	27
TABLA 4. RECEPTORES DE ALGUNAS ADHESINAS DE <i>E. coli</i>	29
TABLA 5. CODIFICACION GENETICA DE ALGUNOS TIPOS DE FIMBRIAS EN <i>E. coli</i> K12.....	33

LISTA DE CUADROS Y GRAFICOS

CUADRO 1. RESULTADO DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS DESARROLLADAS A <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	56
CUADRO 2. NUMERO DE CELULAS FIMBRIADAS OBSERVADAS AL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE TRANSMISION EN <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> A PARTIR DE LOS AISLAMIENTOS EN PULMONES NEUMONICOS	57
CUADRO 3. RELACION DE LAS MUESTRAS FIMBRIADAS Y NO FIMBRIADAS Y EL SEROTIPO CORRESPONDIENTE EN LOS 25 AISLAMIENTOS DE <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	58
CUADRO 4. EVALUACION TOTAL Y PORCENTAJE PROMEDIO DEL NUMERO DE CELULAS FIMBRIADAS EN CADA UNO DE LOS SEROTIPOS IDENTIFICADOS	60
CUADRO 5. DIAMETRO DE FIMBRIAS HALLADO EN <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	61
GRAFICA 1. NUMERO DE AISLAMIENTOS FIMBRIADOS Y SU SEROTIPO OBTENIDOS EN EL PRIMER Y SEGUNDO PASE	59

LISTA DE MICROGRAFIAS

MICROGRAFIA 1. MICROGRAFIA ELECTRONICA DE TRANSMISION DE <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> POR EL METODO DE TINCION NEGATIVA. 15 000 X	62
MICROGRAFIA 2. MICROGRAFIA ELECTRONICA DE TRANSMISION DE <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> POR EL METODO DE TINCION NEGATIVA. 15 000 X	63
MICROGRAFIA 3. MICROGRAFIA ELECTRONICA DE TRANSMISION DE <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> POR EL METODO DE TINCION NEGATIVA. 15 000 X	64
MICROGRAFIA 4. MICROGRAFIA ELECTRONICA DE TRANSMISION DE <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> POR EL METODO DE TINCION NEGATIVA. 30 000 X	65
MICROGRAFIA 5. MICROGRAFIA ELECTRONICA DE TRANSMISION DE <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> POR EL METODO DE TINCION NEGATIVA. 10 000 X	66
MICROGRAFIA 6. MICROGRAFIA ELECTRONICA DE TRANSMISION DE <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> POR EL METODO DE TINCION NEGATIVA. 15 000 X	67
MICROGRAFIA 7. MICROGRAFIA ELECTRONICA DE TRANSMISION DE <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> POR EL METODO DE TINCION NEGATIVA. 10 000 X	68
MICROGRAFIA 8. MICROGRAFIA ELECTRONICA DE TRANSMISION DE <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> POR EL METODO DE TINCION NEGATIVA. 15 000 X	69

ABREVIATURAS

AMPC	Adenosina-5'-monofosfato cíclico
BHI	Infusión de Cerebro y Corazón
bp	Pares de bases
CAMP	Prueba de Christie, Atkins, y Munch-Peterson
CRP	Proteína Receptora de AMP cíclico
DNA	Acido Desoxirribonucleico
ETEC	<i>E. coli</i> Enterotoxigénica
F	Factor de fertilidad
Kd	kilodalton
min	Minutos
mm	Milímetros
MR	Manosa Resistente
MS	Manosa Sensitiva
MRHA	Hemaglutinación Manosa Resistente
NAD	Nicotinamida-adenín-dinucleótido
nm	Nanómetro
<i>pap</i>	Operón <i>pap</i>
PCP	Pleuroneumonia Contagiosa Porcina
RNA	Acido Ribonucleico
seg	Segundos
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
µg	Microgramos
µm	Micrómetro

RESUMEN

La pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP) causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* ha sido por mucho tiempo la enfermedad respiratoria responsable de una alta mortalidad en los cerdos. Los esfuerzos para diagnosticar y controlar esta enfermedad dependen, en gran medida, de los conocimientos sobre los mecanismos mediante los cuales causa enfermedad y los factores de virulencia implicados. En la actualidad, las fimbrias han adquirido especial interés, primero porque son los organelos implicados en el establecimiento de una población estable de bacterias sobre la superficie de las mucosas, y segundo por su participación en la transferencia génica con otras bacterias, adquiriendo de este modo nuevos patrones de resistencia frente a determinados antibióticos. El presente trabajo pretende demostrar que *Actinobacillus pleuropneumoniae* es capaz de expresar este tipo de organelo.

Se estudiaron 25 casos de pulmones con PCP, a partir de los cuales se obtuvieron 25 aislamientos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. El primer aislamiento se llevó a cabo en agar sangre con cepa nodriza de *Staphylococcus aureus*, a partir de este se hicieron dos pases en agar BHI. A cada uno de los aislamientos se les realizaron pruebas bioquímicas para su identificación, determinando también el serotipo al que pertenecen. Se evaluó al microscopio electrónico de transmisión un número de 100 células en cada uno de los pases, registrando el número de células fimbrias y tomando micrografías a varios

aumentos. En el primer aislamiento en agar sangre, el 56% de los aislamientos presentó fimbrias. En el segundo pase en agar BHI solamente en 2 de los 25 aislamientos se conservó la fimbria, y en el tercer pase no se observó ninguna célula fimbriada. El serotipo 1 fué el que con más frecuencia se encontró en los aislamientos fimbriados. Las fimbrias encontradas presentaron una amplia diversidad en sus diámetros, desde 2 nm hasta 7nm, y longitudes que van desde 115 nm hasta 1800 nm. La fimbria encontrada más frecuentemente posee un diámetro de 4 nm.

I.- INTRODUCCION

1.1 PLEURONEUMONIA CONTAGIOSA PORCINA

Los costos de las neumonías para la industria porcícola son altísimos debido a la cronicidad con la cual generalmente se manifiestan, lo cual ocasiona retraso en el crecimiento y pobres ganancias de peso, además de la mortalidad presente en los casos agudos. Por los antecedentes anteriores, las enfermedades respiratorias ha sido objeto de numerosos estudios, desde diferentes puntos de vista con el propósito de entender mejor el fenómeno del campo.

1.1 DISTRIBUCION E IMPORTANCIA

Actinobacillus pleuropneumoniae es el agente causal de la pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP), la cual es una de las principales enfermedades respiratorias de los cerdos. La enfermedad se extiende en gran parte del mundo (Tabla 1) y causa pérdidas económicas muy importantes. Las pérdidas ocasionadas por la enfermedad son cuantiosas. En Canadá se han hecho estimaciones de alrededor de 40 millones de dólares canadienses de pérdidas anuales, mientras que en Estados Unidos las pérdidas se estiman entre 200 a 250 millones de dólares anuales (61). En México, prácticamente no existe zona con porcicultura intensiva en donde no se haya reconocido la enfermedad, consecuentemente su significado económico es muy alto. Aunque no existen estudios publicados que precisen la cuantía de las pérdidas que ocasiona, se ha estimado que los brotes agudos de neumonía

Tabla 1. Distribucion geográfica de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

País	Serotipo Prevalente	Serotipo Dominante(s)	Referencias.
Argentina	1,2,3,5	1	Vena et al (1988)
Australia	1,2,3,7,UT	1	Eaves y Blackall, (1988)
Bélgica	2,3,6,7,8,9,11,UT	3	Hommez et al (1990)
Brasil	1,3,4,5,UT	5	Piffer et al (1987)
Canadá	1,2,3,4,5,6,7,8,10,12	1,5	Rosendal et al (1981) Mittal et al (1982)
Chile	1,5	1,5,	Olivares y Morgado (1988)
Checoslovaquia	1,2,7	2	Skillova y Gois (1987)
Dinamarca	1,2,3,5,6,7,8,10,11,12	2	Nielsen (1982, 1987)
Francia	2,3,7,8,9	9	Kobisch (1990)
Alemania	2,3,4,5,6,7,9,10	9,2,7	Schimmel y Haas (1983) Muller et al (1986)
Hungría	1,2,3,5,6,7,10,11,12	1,2	Fodor et al (1989) Molnar (1990)
Italia	1,2,3,4,5,7	5	Manzat et al (1987) Sidoli et al (1987)
Irlanda	3,UT	3	Power et al (1983)
Japón	1,2,3,5,6,7,8,9	1	Chan et al (1978) Kume et al (1986) Fukuyasu et al (1991)
Corea	2,3,5,7	5,2	Yen (1990)
México	1,2,3,4,5,6,7,8,9	1	Díaz et al (1988) Ciprián et al (1988)
Holanda	1,2,3,5,7,8,9,11	2,9,11	Kamp et al (1987)
Noruega	2	2	Falk et al (1991)
Polonia	1,2,5,9	1	Molenda (1988)
España	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10	4	Ferri et al (1990)
Suecia	2,3,4	2	Gunnarsson (1979)
Suiza	2,3,7,9	2	Nicolet (1988)
Reino Unido	1,2,3,5,6,7,8,10	3	Hunter et al (1983) Brandreth y Smith (1985)
U. S. A	1,3,5,7,8,9	1,5	Schultz et al (1983) Rapp et al (1985) Hoffman et al (1985) Fales et al (1989)

Tomado de Mittal y cols., Vet. Microbiol. 32: 137 (1992)

causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* pueden matar 20-30% de los cerdos y reducir las ganancias de peso y la eficiencia alimentaria en 30%.

1.2 TRANSMISION

La mayoría de los autores sugiere que la transmisión de la enfermedad es por contacto de un cerdo a otro en forma íntima. Muchos han propuesto que el contacto nariz con nariz es la vía usual, sin embargo, se ha considerado también la participación de vectores o fomites en la transmisión de la enfermedad. Por ejemplo, la transmisión por ropa, botas u objetos impregnados de exudado nasal ha sido sugerida (61). Por otro lado, se ha tratado de demostrar el papel de los roedores y de los pájaros en la transmisión de la pleuroneumonía. En estudios realizados por Ciprián y cols. (17) en una zona del occidente del país, se concluyó que los pájaros tenían anticuerpos de infección al igual que los roedores, aunque en menor porcentaje.

1.3 PATOGENIA

La enfermedad se desarrolla una vez que la bacteria llega a la región alveolar y su virulencia está asociada a varios factores: Cápsula, Lipopolisacáridos, Proteínas de membrana, Hemolisinas, Pleurotoxinas y Exotoxinas (19).

Macroscópicamente se observan en los pulmones múltiples lesiones con áreas de inflamación, hemorragia y necrosis. El daño pulmonar se ha relacionado a trombosis vascular y activación de los neutrófilos, después de tres horas se producen agregados de

plaquetas que se observan adheridas en el endotelio de los capilares. Algunos de estos cambios han sido atribuidos a la activación del mecanismo de coagulación. Recientemente la investigación sobre las pleurotoxinas han demostrado que poseen la habilidad para interferir con los mecanismos celulares del pulmón y causar daño (34).

1.4 SIGNOS CLINICOS.

La enfermedad se caracteriza por la súbita presentación, con signos respiratorios severos y alta mortalidad en hatos susceptibles, lo que puede ocasionar casos sobreagudos, agudos, crónicos y/o subclínicos (61).

En la enfermedad aguda se desarrolla una pleuroneumonía fibrinohemorrágica necrotizante y en la presentación crónica abscesos y adherencias de los órganos de la cavidad torácica, además de retraso en el crecimiento en los animales afectados.

Usualmente los brotes se caracterizan por un curso hiperagudo o agudo y posteriormente encontraremos casos crónicos o subclínicos. En un brote primario súbitamente mueren algunos cerdos sin mostrar signos clínicos, en seguida se ven otros animales con fiebre alta, disnea muy severa, tos, epistaxis y anorexia (23).

1.5 *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

El agente de la pleuroneumonía contagiosa porcina ha sido transferido del género *Haemophilus* al género *Actinobacillus* en base a los estudios de hibridación DNA-DNA desarrollados por Pohl y cols. (81).

Actinobacillus pleuropneumoniae es un parásito del tracto respiratorio con una alta especificidad en su hospedero, el cerdo. Es un microorganismo pleomórfico que generalmente se observa como pequeños bastones Gram-negativos, capsulado y de aproximadamente 0.5 a 1,5 μm de largo y 0.3 μm de diámetro, son inmóviles, no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos, y crecen en medios enriquecidos que contienen factor V (NAD), pero no requieren del factor X (hemina) (22).

Por su necesidad del factor V crecen en la proximidad de colonias de *Staphylococcus aureus*, fenómeno que se conoce como crecimiento satélite o satelitismo.

Las características bioquímicas se muestran en la tabla 2:

TABLA 2. Características bioquímicas de *A. pleuropneumoniae*.

Factor V	+
Factor X	-
Catalasa	+
Nitratos	+
Oxidasa	d
Urea	+
Indol	-
Citratos	-
Hemolisina B	+
Xilosa	+
Dextrosa	+
Fructosa	+
Inositol	-
Fosfatasa alcalina	+
Factor V = NAD	
Factor X = Hemina	
d = dudoso	

Tomado de Cowan, S. T. (22)

Existe una gran variedad de serotipos y hasta el presente han sido descritos 12 (70), teniendo el serotipo 5 dos subtipos 5a y 5b. La especificidad serológica esta dada por los lipopolisacáridos capsulares y los lipopolisacáridos celulares, aunque cabe mencionar que existen similitudes entre estos componentes en algunos serotipos, lo cual explica las reacciones cruzadas que se observan entre los serotipos 1,9 y 11,3,6, y 8,4, y 7 (79).

2. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA COLONIZACION BACTERIANA

Para la colonización bacteriana en la superficie de las mucosas se requiere que la bacteria:

- 1) Se establezca en la proximidad de la mucosa
- 2) Evite ser eliminada por "harrimiento" del aparato mucociliar
- 3) Adquiera los nutrientes esenciales para su crecimiento
- 4) Se multiplique en proporción suficiente para extender su población.
- 5) Resistir las defensas del hospedero.

Los mecanismos mediante los cuales la bacteria mantiene su proximidad a la superficie de la mucosa pueden ser divididos basicamente en:

Asociación

Adhesión

Invasión

dependiendo del grado de afinidad entre la bacteria y la superficie de la mucosa. La asociación es la forma más simple de interacción de superficie, implica el establecimiento de la bacteria a lo largo de la superficie con unión reversible y débil (Fig.1).

La adhesión es una forma más específica de unión, es una unión irreversible y relativamente estable mediada por moléculas especializadas complementarias de la bacteria y la superficie mucosal. Una forma más íntima de interacción entre la bacteria y la mucosa es la invasión, mediante la cual la bacteria penetra la barrera mucosal para establecerse dentro de las células epiteliales o el tejido estromal adyacente. Ejemplo claro de estos dos procesos lo constituyen *Bordetella pertusis* y *Salmonella typhimurium* (4).

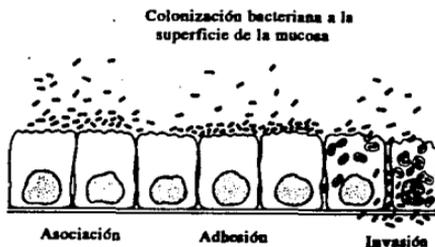


Figura 1. Tipos de Interacción Bacteria-Mucosa envueltos en la infección bacteriana de las superficies de mucosas.
(Tomado de Arp, L. H., 1988.)

2.1 COLONIZACION

La colonización es la formación de una población estable de bacterias en un hábitat apropiado. La colonización requiere que la población bacteriana se multiplique

constantemente para reemplazar la pérdida de bacterias por envejecimiento, dispersión, y mecanismos bactericidas locales.

El establecimiento de la bacteria sobre la superficie de la mucosa está determinado por la capacidad de la bacteria para aprovechar el hábitat disponible y por la capacidad de resistir los mecanismos antibacterianos del huésped. La información genética contenida en los plásmidos y el cromosoma bacteriano determinan las moléculas de superficie necesarias para la interacción con el tejido huésped, el sistema enzimático disponible para la utilización del sustrato, y los productos bacterianos liberados (4). Las bacterias patógenas potenciales están expuestas a una presión selectiva constante por parte de las defensas específicas y no específicas del huésped, la competencia con organismos de la flora normal, y productos antimicrobianos (antibióticos y bacteriocinas) de origen exógeno y endógeno.

Como primer punto crítico importante en la infección de la mucosa, la bacteria debe establecerse y mantener su posición en proximidad con la superficie de la mucosa. Los revestimientos de la mucosa traqueal e intestinal son ejemplo de superficies expuestas a mecanismos físicos importantes en la eliminación de partículas, mediante las cuales la bacteria puede perder sus mecanismos adhesivos específicos de adherencia. La colonización de bacterias al tracto respiratorio ciliado, cavidad oral, intestino delgado, uretra y córnea, usualmente involucra moléculas adhesivas específicas de superficie que se unen con los receptores de la célula huésped y de este modo iniciar una unión irreversible, importante en la colonización. *Moraxella bovis*, agente de la

queratoconjuntivitis en bovinos, requiere de fimbrias como factor de patogenicidad importante para la colonización al epitelio de la córnea y conjuntiva, para posteriormente invadir la córnea dando como resultado una queratitis ulcerativa y la pérdida visual (4).

La virulencia bacteriana requiere de múltiples factores, por ejemplo, la producción de enterotoxinas junto con los factores de colonización son necesarios en la patogenicidad de cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli*. La pérdida de algún producto génico permite a otros organismos virulentos competir por ese espacio y colonizarlo; sin embargo, muchas bacterias patógenas poseen múltiples mecanismos mediante los cuales aseguran algún nivel de colonización. La pérdida de algún factor de colonización permite reducir solamente la eficiencia adhesiva, y puesto que muchos factores de virulencia están codificados por plásmidos, las bacterias tienen un gran repertorio de factores de virulencia potenciales capaces de asegurar una colonización sucesiva.

2.2 ASOCIACION

La asociación es un término no específico usado para referirse al establecimiento de la bacteria sobre una superficie, antecede a la adhesión e invasión bacteriana y no especifica los mecanismos envueltos (Fig.1). En la infección, la bacteria mantiene su posición a lo largo de la superficie de la mucosa por asociación con el moco o exudado mediante el establecimiento de un número pequeño de uniones covalentes, la unión es reversible y débil. La asociación puede darse también por quimiotaxis (2, 31), mecanismo de virulencia significativo de bacterias patógenas de la superficie de mucosas, la cual

ayuda a la bacteria a aprovechar las regiones de la mucosa que poseen substratos óptimos provechosos y también para penetrar la capa de la mucosa y mejorar el contacto con los receptores de la superficie epitelial. *In vivo*, los mecanismos quimiotácticos requieren que la bacteria exprese flagelos y la necesaria formación de factores quimiotácticos. El envío de células móviles para establecer colonias bacterianas permite la colonización de la superficie de la mucosa y de este modo avanzar en dirección opuesta a los mecanismos físicos de eliminación.

2.3 ADHESION

El término adhesión es usado para describir una unión relativamente estable e irreversible a la superficie de la mucosa, es específica y requiere de una interacción entre las moléculas protéicas de superficie bacteriana y las moléculas de carbohidratos de la membrana eucariota, o bien del glicocálix. El término adherencia es frecuentemente usado como sinónimo de adhesión, sin embargo, algunos autores argumentan que la adhesión es término preferible para los fenómenos de unión bacteriana (65).

2.4 FISICOQUIMICA DE LA ADHESION

La carga electrostática y la hidrofobicidad son características generales de la superficie celular que afectan profundamente la adhesión. Las glicoproteínas ancladas por regiones hidrofóbicas de aminoácidos, y los glicolípidos anclados a la membrana celular mediante sus colas hidrofóbicas representan una variedad de moléculas cargadas las cuales

contribuyen a la composición del glicocálix celular (12). El glicocálix es importante en la formación de colonias, resistencia a las defensas del huésped, adquisición de nutrientes, y para la concentración y conservación de enzimas bacterianas. El glicocálix de una célula epitelial está estrechamente asociado con la capa mucosa y contribuye también con la carga negativa de la superficie celular, además de proveer muchas moléculas complejas de superficie que intervienen en la quimiotaxis y en la adhesión (21).

Los estudios recientes sobre la adhesión bacteriana indican que la unión irreversible es precedida por una fase reversible y débil, la asociación. La fase reversible inicial de la unión pudiera ser el resultado de los efectos combinados de las fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógeno, e interacciones iónicas e hidrofóbicas (48). En contraste, la adhesión específica irreversible probablemente requiera de un mayor número de enlaces no covalentes concentrados entre las macromoléculas complementarias de las superficies adyacentes.

Una posible explicación fisicoquímica concerniente a la interacción adhesiva neta entre dos superficies cargadas negativamente es probada por la teoría de Derjaguin-Landau y Verwey-Overbeek (DVLO) (48, 4). Esta teoría de interacción física entre partículas en estado coloidal establece que a medida que dos cuerpos rígidos de carga similar se acercan uno al otro, son afectados por fuerzas de atracción y repulsión, las cuales varían en forma independiente con la distancia a la que se encuentran los cuerpos. Por arriba de distancias relativamente grandes, mayores a 10 nm, hay una fuerza neta de atracción, y los cuerpos son asidos en un estado de asociación débil reversible. A distancias intermedias, de 1 a

10 nm, la concentración de la nube iónica sobre las superficies opuestas causa una fuerza neta repulsiva. Finalmente, si la zona intermedia de repulsión pudiera ser puenteada, entonces habría una fuerza neta de atracción a distancias menores de 1 nm, y los cuerpos pueden establecer una interacción adhesiva fuerte e irreversible (Fig.2); pero, ¿de qué modo la bacteria puentea la zona intermedia de repulsión?

Una posible explicación es considerar cuales son los componentes que constituyen la superficie funcional de la bacteria y la célula eucariota. Normalmente, la superficie epitelial de la célula consiste de microvellosidades, cilios, o pliegues cubiertos por una capa compleja de glicocálix y moco. La superficie bacteriana, en contraste, está

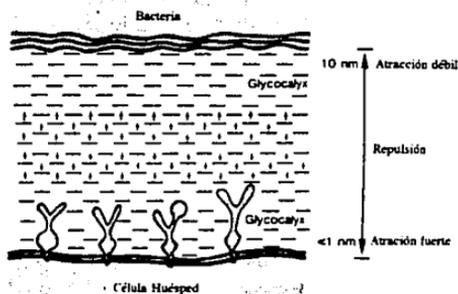


Figura 2. Asociación reversible de la superficie bacteriana con la superficie de la célula epitelial. A una distancia de 10 nm, las células están débilmente unidas por enlaces no covalentes, una unión más íntima es imposible debido a la máxima energía generada por las fuerzas electrostáticas a distancia de 1 a 10 nm. Ambas células poseen un glicocálix compuesto de polisacáridos aniónicos, los cuales contribuyen con la carga negativa de la superficie.
(Tomado de Harp, L. H., 1988)

comunmente rodeada por complejos poliméricos o apéndices filamentosos los cuales se proyectan a varios micrómetros del medio ambiente que los rodea. Las estructuras de superficie con radio de curvatura pequeño producen menor fuerza repulsiva que la célula completa. Ambas fuerzas, atractivas y repulsivas disminuyen a medida que se reduce el radio de curvatura de la superficie que interactúa, sin embargo, cuando el radio de curvatura llega a ser pequeño las fuerzas de repulsión disminuyen más que las fuerzas de atracción dando como resultado un aumento neto en las fuerzas de atracción. Los apéndices de superficie y moléculas del glicocálix bacteriano tienen la característica de poseer radios pequeños de curvatura que pueden ser capaces de extenderse através de la zona repulsiva intermedia (Fig. 3) y establecer interacciones estables ligando-receptor (50). Adicionalmente, los cationes tales como Ca^{2+} , Mn^{2+} y Fe^{3+} pueden actuar como puentes iónicos entre moléculas de superficie cargadas negativamente (49).

2.5 LAS ADHESINAS BACTERIANAS

La unión irreversible de la bacteria a la superficie de las mucosas, la adhesión, está mediada por una variedad de complejos poliméricos localizados en la superficie bacteriana los cuales reciben el término de adhesinas. La mayoría de las adhesinas que han sido caracterizadas a nivel genético y molecular son proteínas de superficie de bacterias gram negativas, las cuales tienen la capacidad de interactuar con receptores específicos de forma similar a como sucede con las moléculas de anticuerpos. Estas

proteínas de reconocimiento pueden inducir la aglutinación de eritrocitos, por lo que también reciben el nombre de **hemaglutininas** (53). Además de la composición protéica de la mayoría de adhesinas, algunas suelen estar compuestas por **polisacáridos** (64), **ácido lipoteicoico** (7) o conjugados de estos.

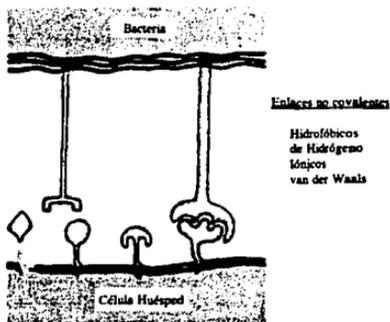


Figura 3. Adhesión irreversible de la bacteria y la superficie celular epitelial mediada por la interacción específica adhesina-receptor. Debido a que la adhesina bacteriana posee un radio de curvatura pequeño, puede puentear la zona de máxima repulsión para establecer numerosos enlaces covalentes con moléculas receptoras específicas de la superficie epitelial. Un mal acoplamiento entre la adhesina bacteriana y el receptor de la célula epitelial no contribuye al proceso adhesivo. (Tomado de Arp, L. H., 1988).

Las adhesinas protéicas bacterianas pueden ser divididas en dos grupos: (i) Aquellas que poseen morfología fimbrial y (ii) Aquellas que no poseen una forma y tamaño definido, o sea, no fimbriales. Por lo tanto, podemos establecer la siguiente clasificación de

adhesinas (4):

- 1) Adhesinas fimbriales
- 2) Adhesinas proteicas no fimbriales
- 3) Adhesinas compuestas por carbohidratos y lípidos.

2.6 ADHESINAS FIMBRIALES

La fimbria y pili son términos morfológicos usados en muchas ocasiones como sinónimos para denotar a todos los apéndices filamentosos no flagelares distribuidos radialmente en la superficie bacteriana. Para evitar confusión de estos términos comunes Jones e Issacson (50) han sugerido que el término "fimbria" sea utilizado para referirse a todos los apéndices bacterianos no flagelares, mientras que el uso del término "pili" o "pili sexual" sea empleado exclusivamente para aquellas estructuras no flagelares que:

- a) Están genéticamente determinados por el factor de fertilidad F o de otros DNAs extracromosómicos.
- b) Actúan como receptores específicos de ciertos fagos.
- c) Intervienen en la transferencia de material genético durante la conjugación bacteriana.

Las adhesinas fimbriales se disponen en forma polar o perfrica en la superficie bacteriana y varían en número desde unas cuantas hasta cientos de ellas. Poseen un diámetro de 2 a 8 nm y pueden extenderse hasta 4 μm de la superficie bacteriana. A diferencia de los flagelos que son más gruesos y curvados, las fimbrias son rectas, o plegadas y flexibles. Mas adelante se tratan los detalles de su morfología, estructura

genética y molecular.

2.7 ADHESINAS PROTEICAS NO FIMBRIALES

Gran variedad de especies bacterianas producen adhesinas protéicas de superficie que no tienen una morfología definitiva. Estas tienden a ser proteínas de membrana externa o proteínas secretadas que permanecen estrechamente asociadas con la superficie bacteriana, se adhieren y aglutinan únicamente a los eritrocitos humanos. La aglutinación se observa mayormente a pH 7 y pH 5, lo cual indica una polivalencia de este tipo de adhesinas (53). El carbohidrato receptor de todas las adhesinas no fimbriales está contenido en la glicoporfina A. Los análisis de estructura de este tipo de adhesinas indican que son de estructura fibrilar.

2.8 ADHESINAS COMPUESTAS POR CARBOHIDRATOS Y LIPIDOS.

Las bacterias capaces de colonizar superficies mucosas frecuentemente expresan múltiples adhesinas simultáneamente o secuencialmente en el curso de la colonización. Al igual que las adhesinas protéicas no fimbriales, muchas adhesinas lipídicas o de carbohidratos actúan como complejos poliméricos enlazantes, los cuales contribuyen a la formación de microcolonias en las superficies epiteliales (18). El ácido lipoteicoico, componente de la pared celular de *Staphylococcus* y *Streptococcus* se unen a una amplia variedad de células eucariotas mediante interacción con los receptores de fibronectina.

2.9 INVASION

¿Porqué algunas bacterias solo colonizan las superficies de la mucosa, mientras que otras extienden su hábitat a un medio intracelular?. Aunque una colonización intracelular puede proveer nuevas fuentes de nutrientes y protección de muchas defensas del huésped, el medio ambiente intracelular también presenta nuevos problemas para la bacteria. Los patógenos intracelulares poseen varios mecanismos para penetrar a la célula huésped, evitar ser destruidas, multiplicarse, y proveer el escape e invasión de su progenie a otras nuevas células del huésped (69).

Muchos de los cambios morfológicos asociados con la invasión bacteriana son similarmente indiferentes del patógeno bacteriano y la célula eucariota envuelta. La patología estructural de la salmonelosis en cobayos ilustra muchas de las lesiones celulares asociadas con la bacteria invasiva. La estrecha proximidad de *Salmonella typhimurium* a las microvellosidades, inicia la siguiente secuencia de eventos: (i) La degeneración de las microvellosidades adyacentes, (ii) Invaginación de la membrana celular, (iii) Degeneración de las uniones de la célula y organelos celulares, (iv) Internalización de la bacteria por endocitosis, (v) Producción de material denso alrededor de la bacteria en la vacuola, (vi) Multiplicación bacteriana, (vii) Traslado a la región subnuclear del citoplasma, y (viii) Posible expulsión de la bacteria de la célula infectada (Fig. 4). Las vacuolas endocíticas pueden contener una o más bacterias, o bien, la bacteria puede encontrarse libre en el citoplasma.

Muchos de los parásitos intracelulares obligados y facultativos, incluyendo virus,

protozoarios, y bacterias, penetran a la célula eucarióta por endocitosis, un proceso que es comparable a la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos. El proceso requiere de la función de proteínas contráctiles (microfilamentos) y de energía provista através de vías

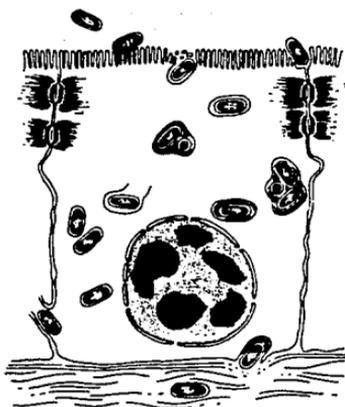


Figura 4. Invasión Bacteriana del epitelio intestinal. La bacteria se une a las microvellosidades después de que ha penetrado la capa mucosa. La bacteria invasiva estimula la endocitosis en la célula huésped, mediante la cual penetra al citoplasma dentro de una vacuola endocítica. Algunas bacterias permanecen y se multiplican dentro de la vacuola mientras resisten los efectos de las enzimas lisosomales, mientras que otras bacterias escapan de la vacuola para replicarse libremente en el citoplasma. La bacteria se extiende a otras células por destrucción de la membrana celular o por exocitosis a partir de la vacuola. (Tomado de Arp, L. H., 1988).

metabólicas oxidativas y glicolíticas. Una vez dentro de la vacuola endocítica, la bacteria debe poseer mecanismos que impidan su destrucción por los productos bactericidas producidos por la fusión de lisosomas con la vacuola endocítica. *Shigella flexneri* escapa

Introducción

al citoplasma después de causar la lisis de la vacuola endocítica (85), mientras que *Legionella pneumophila* y *Brucella abortus* (3) son reunidas en el retículo endoplásmico, donde ocurre su multiplicación. Ciertos compuestos como la citocalasina B pueden inhibir el proceso de endocitosis y de este modo evitar que la bacteria se internalice.

Las bases moleculares y genéticas de la invasión han sido mayormente caracterizadas en bacterias patógenas entéricas. Se ha comprobado que se requieren grandes plásmidos para una total expresión del fenotipo invasivo en *Shigella spp.*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum*, *Yersinia enterocolitica*, y *E. coli* enteroinvasiva. La pérdida del plásmido es acompañada de la pérdida de invasividad, y el fenotipo invasivo es restaurado cuando este plásmido es introducido nuevamente a la bacteria avirulenta.

3. FIMBRIAS, PRINCIPALES MEDIADORES EN LA ADHESION BACTERIANA.

Las fimbrias, o apéndices filamentosos no flagelares, están presentes en varios tipos bacterianos, en particular, en aquellas cepas que han sido aisladas recientemente a partir de su hábitat natural. Dos características importantes son atribuibles a éstas estructuras:

- a) El aumento en la actividad de superficie, pues aumentan potencialmente las actividades asociadas a membrana, tales como la respiración y/o captación de nutrientes.
- b) Su papel como organelos de adherencia.

Estas consideraciones básicas dejan en claro que estos apéndices bacterianos pueden servir para múltiples funciones, y ayudan a las bacterias a adaptarse y resistir las agresiones de su hábitat.

3.1 ESTRUCTURA

Los ensayos realizados por los métodos de Lowry y ninhidrina, al igual que los estudios por microscopía electrónica y electroforesis, demuestran que la fimbria está compuesta principalmente de proteína (15). En *E. coli* la fimbria contiene 4.6% de nitrógeno (Kjendahl), encontrándose en menor proporción: DNA, RNA, fosfato, polisacáridos y azúcares reductores (0.6%). La proteína estructural que forma a la fimbria se denomina *fimbrina*, y posee un peso molecular que va de 14 a 27 kD (42). El término de *pilina* se reserva para la proteína estructural del pili sexual.

La mayor parte de aminoácidos que conforma a la fimbrina están presentes en la forma L con una gran cantidad de cadenas laterales de hidrocarburos. La cadena lateral no polar de esos aminoácidos pudiera ser la responsable de la propiedad hidrofóbica de esta estructura. Dos modelos de asociación de estas subunidades proteicas han sido propuestas y son usadas para describir dos estructuras fimbriales morfológicamente distintas (Fig. 5):

a) La forma rígida (Fig. 5 y 6) que mide de 5-8nm de diámetro y ejemplificado por la fimbria de tipo I y 987P. Esta estructura posee un diámetro de sección transversal uniforme y una cavidad axial, la cual reafirma la homología entre el flagelo bacteriano y

la fimbria. En la fimbria de tipo 1 la cavidad axial mide de 2.0 a 2.5 nm, mientras que en el pili sexual es de 2.5 a 3.1 nm. Aparentemente el diámetro interno de la cavidad axial puede sufrir considerables variaciones. Las subunidades de fimbrina se ensamblan formando una estructura helicoidal de mano derecha con interacción de las subunidades

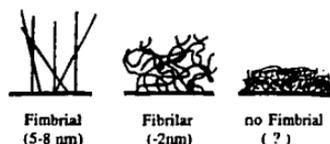


Figura 5. Representación esquemática de la apariencia morfológica de las adhesinas de *Escherichia coli*. (Tomado de Klaus, J. y Hoshutzky, H., 1991).

en las puntas y a los lados. Debido a esta manera de ensamblaje, el movimiento de las subunidades está forzado generando una estructura rígida con diámetros de sección transversal bien definidos. Para la fimbria de tipo 1 se ha determinado que el número de subunidades de fimbrina por cada vuelta es de $3 \frac{1}{8}$ (14).

b) La forma flexible, que mide de 2-3 nm de diámetro es ejemplificada por las fimbrias K88 y K99 de *E. coli*. Esta estructura ha sido llamada también fibrilla. El modelo para esta clase también es helicoidal (42), pero las moléculas de fimbrina no poseen interacciones (Fig. 6).

La fimbria se disocia fácilmente en subunidades libres en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS), guanidina, o ácido diluido. Se pueden separar electroforéticamente o por otros medios físicos. Las subunidades de fimbrina de las fimbrias 987P y de tipo 1

Introducción

obtenidas mediante tratamiento con guanidina son ensambladas nuevamente cuando la guanidina es removida por diálisis. Este proceso de ensamblaje *in vitro* es lento. Por lo tanto esto sugiere que el ensamblaje *in vivo* es catalizado por otros componentes celulares.

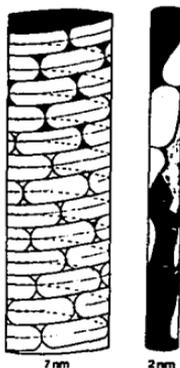


Figura 6. Diagrama esquemático de la estructura de la fimbria. La estructura de la izquierda es representativa de la fimbria de tipo 1 con 3 y 1/8 de subunidades por vuelta. El diámetro es de 7 nm. La estructura a la derecha es una posible configuración de la fimbria K99. K99 es más flexible que la fimbria de tipo 1. (Tomado de Isaacson, R. E., 1988)

De acuerdo con esto, se sabe ahora que la expresión *in vivo* y el ensamblaje de la fimbria parece estar muy regulado y ser un proceso bastante complejo que requiere de muchos polipéptidos diferentes.

El 50% de los aminoácidos de la fimbria son aminoácidos no polares y la relativa hidrofobicidad de las moléculas de fimbrina ha sido calculada usando los valores de

hidrofobicidad de los aminoácidos (73). En comparación con la albúmina sérica humana, las moléculas de fimbrina son menos hidrofóbicas, sin embargo, la presencia de las fimbrias en la superficie bacteriana aumenta marcadamente su hidrofobicidad. Todas las fimbrias de *E. coli* promueven la adsorción de las células a un gel hidrofóbico, por ejemplo, octil o fenil sefarosa (90); por lo que las propiedades de los enlaces hidrofóbicos de las fimbrias han sido explotadas sucesivamente como blancos potenciales para la terapia antiinfectiva para prevenir la colonización del intestino delgado por la cepa enterotoxigénica de *E. coli* (ETEC).

3.2 CLASIFICACION

Con base en sus propiedades hemaglutinantes, en la especificidad de sus propiedades de adherencia, en sus propiedades morfológicas observadas mediante el microscópio electrónico, se han descrito diversos tipos de fimbrias. Las más estudiadas han sido las fimbrias de *E. coli* y en general las de otras enterobacterias. Una clasificación completa se presenta a continuación, la cual agrupa a las fimbrias en seis diferentes grupos (76).

3.2.1 Grupo 1. Fimbrias como organelos de adherencia.

Este grupo de fimbrias incluye a las fimbrias de tipo 1-4 descritas por Deguid (76), se distribuyen en forma peritrica y no intervienen en el proceso de la conjugación bacteriana. Su producción está mediada por el cromosoma bacteriano. Las fimbrias de este

grupo se clasifican a su vez en cuatro subtipos, o tipos caracterizadas principalmente por su morfología, habilidad para hemaglutinar a los eritrocitos, su sensibilidad a la manosa y otras características adhesivas.

Subtipo 1 (fimbria de tipo 1). Las fimbrias pertenecientes a este tipo se distribuyen en forma peritrica, miden aproximadamente 7 nm de diámetro y son responsables de las propiedades adherentes en general y la habilidad para hemaglutinar en particular. Las enterobacterias con fimbrias subtipo 1 se adhieren a hongos, plantas y células animales incluyendo eritrocitos. Los eritrocitos de cobayos, aves y caballos son aglutinados fuertemente por estas fimbrias, y debido a que esta interacción es inhibida por D-manosa y α -D-metilmanósido (75), estas adhesinas son llamadas **manosa sensitivas (MS)**. Poseen también una función estabilizante entre los pares de bacterias apareados durante la conjugación bacteriana.

Subtipo 2 (fimbrias de tipo 2). Estas fimbrias se encuentran en algunas especies de *Salmonella*, se piensa que son mutantes de las fimbrias del subtipo 1. Difieren del subtipo 1 de fimbria en que pierden las propiedades adhesivas y hemaglutinantes (76).

Subtipo 3 (fimbrias de tipo 3). Este tipo de fimbria es específico de *Klebsiella* y *Serratia marcescens* (72). Difieren del subtipo 1 y 2 en que son más delgadas, pues miden 4.8 nm de diámetro y son más numerosas. Su característica más importante es que son fuertemente

resistentes a manosa, por lo que son **manosa resistentes (MR)** se adhieren a hongos, plantas, y a superficies de vidrio, así como a fibras de celulosa. Este tipo de fimbria sólo aglutina a los eritrocitos cuando son tratados con ácido tánico.

Subtipo 4 (fimbria de tipo 4). Fimbrias producidas por *Proteus spp.* Son extremadamente delgadas, diámetros menores a 4 nm, se distribuyen en forma perfricta y confieren a las células manosa resistentes propiedades hemaglutinantes y adhesivas.

3.2.2 Grupo 2. Pili sexual. (fimbria de tipo F). El pili sexual F es controlado por factores sexuales o algunos otros DNAs extracromosómicos. Es una estructura cilíndrica hueca, de 8 nm de diámetro con una cavidad axial de 2 nm, típicamente se extiende a unas 2 micras de la superficie celular, el número promedio por célula es de 0.5 a 1.5. Actúan como puente durante la conjugación y funcionan como receptores específicos para ciertos bacteriófagos RNA, tales como el f2, R17 los cuales se unen a lo largo de la longitud de la fimbria, y ayudan a distinguir los pilis sexuales de otros apéndices de superficie (41).

3.2.3 Grupo 3. Presente en género de *Agrobacterium spp.* Miden de 40 a 60 nm de diámetro y poseen una longitud arriba de 3 μm , por lo que las hace una de las más gruesas y excepcionales. Estos rasgos corresponden a un nuevo grupo de apéndices filamentosos no flagelares. Su naturaleza y función aún no quedan del todo establecidas (76).

3.2.4 Grupo 4. Son fimbrias flexibles, cilíndricas, que se disponen polarmente en la superficie bacteriana. La presentan los géneros de *Pseudomonas* y *Vibrio* (92). La disposición polar de este tipo de fimbria promueve el movimiento, característica que las hace diferentes a las fimbrias dispuestas peritricamente las cuales actúan como organelos de adherencia.

3.2.5 Grupo 5. Este grupo incluye también las fimbrias dispuestas polarmente. Son de forma tubular y contráctiles, presentes en *Pseudomonas "rhodos"*, *P. "echinoides"*, *Agrobacterium spp.* y *Rhizobium lupini*. Estas estructuras actúan junto con los pili sexuales estableciendo puentes entre bacterias competentes para que de este modo pueda llevarse a cabo la conjugación. Por lo tanto estas estructuras sirven de reconocimiento, contacto y unión irreversible en células competentes (76).

3.2.6 Grupo 6. Presentes en *Corynebacterium renale*. Produce un haz característico de fimbrias. Hasta ahora, tales haces aún no han sido descritos en otras especies de bacterias Gram negativas. Cada haz contiene varios filamentos de aproximadamente 2.5 a 3.0 nm de diámetro. El número de haces varía considerablemente de acuerdo a la cepa. Estos filamentos actúan como antígenos específicos, pero no se observa que halla hemaglutinación.

Dependiendo del tipo de carbohidrato que las fimbrias reconocen en los receptores

eucarióticos (78) (glicolípidos y glicoproteínas), se distinguen al menos 4 tipos:

- (i).- Fimbria común, que reconoce a la α -manosa.
- (ii).- Fimbria P que reconoce al α -galactosil 1,4- β -galactosa.
- (iii).- La fimbria S que reconoce al α -sialil-2-3- β -galactosa.
- (iv).- La fimbria M que reconoce a receptores con galactosa/N-acetilgalactosamina/serina.

La fimbria P se encuentra presente en muchas cepas de *E. coli* aisladas de infecciones del tracto urinario. La fimbria S es común en cepas de *E. coli* aisladas de meningitis en humanos (78).

Fimbrias	Características
Grupo 1. Fimbrias como organelos de adherencia.	
Subtipo 1.	Poseen diámetro de 7 nm y propiedades hemaglutinantes.
Subtipo 2.	Similares al subtipo 1 más no son adhesivas ni hemaglutinantes.
Subtipo 3	Poseen diámetros de 4.8 nm con capacidad hemaglutinante, son manosa resistentes.
Subtipo 4	Poseen diámetros menores de 4 nm, con propiedades adhesivas y hemaglutinantes.
Grupo 2. Pili sexual	Poseen diámetro de 8 nm, intervienen en la conjugación bacteriana.
Grupo 3.	Miden de 40 a 60 nm de diámetro. Su naturaleza y función aún no están establecidas.
Grupo 4.	Flexibles y cilíndricas, dispuestas polarmente. Confieren a la bacteria motilidad.
Grupo 5.	Contráctiles, dispuestas polarmente, intervienen junto con los pili sexuales en la conjugación.
Grupo 6.	Poseen diámetros de 2 a 3 nm, varios filamentos se asocian formando un haz característico. No son hemaglutinantes

Tabla 3. Resumen de la clasificación de las fimbrias

3.3 RECEPTORES.

Con pocas excepciones, las adhesinas fimbriales y no fimbriales interactúan y reconocen a complejos de carbohidratos localizados sobre la superficie de la célula eucariota (en su mayor parte formada por glicolípidos y glicoproteínas). Algunos sitios específicos junto con la naturaleza de la adhesina involucrada se muestra en la tabla número 4 (53).

3.4 EXPRESION

La expresión fenotípica de adhesinas bacterianas está grandemente determinada por las condiciones de crecimiento tanto *in vivo* como *in vitro*. Muchas bacterias patógenas que cuentan con adhesinas para la colonización de las superficies de mucosas, cesan su producción cuando son cultivadas en medios de cultivo convencionales. La expresión de muchas adhesinas fimbriales está sujeta a variaciones de fase cualitativas y cuantitativas (74). La cantidad de adhesina producida por las células bacterianas individuales también varía con el medio ambiente bacteriano. La producción de adhesinas de varias bacterias patógenas dependientes de temperatura es probablemente un reflejo de las diferentes condiciones de crecimiento *in vivo*. Las adhesinas K99 y K88 de la cepa enterotoxigénica de *E. coli* son expresadas en el intestino delgado y a 37 °C en medio de cultivo, pero ninguna de las adhesinas es producida en cantidades significativas a 18 °C (36). Las fimbrias de tipo 1 son producida rápidamente por *Salmonella typhimurium* y *E. coli* en un medio líquido estático más allá de la fase logarítmica de crecimiento, pero son

minimamente expresadas si la bacteria es crecida en un medio sólido. En contraste, la fimbria K99 de *E. coli* se produce mejor en la fase logarítmica de crecimiento en un medio líquido aireado y con agitación (43).

Receptor		Adhesina
Dominio	Sobre	
$(\alpha\text{-Man})_n$	Glicoproteína	Fimbrial (tipo 1)
$\alpha\text{-Gal-1,4-}\beta\text{-Gal}$	Glicolípidos	Fimbrial (P)
$\alpha\text{-GalNac-1,3-}\alpha\text{-Gal}$	Glicolípidos	Fimbrial (PRS)
$\alpha\text{-Sia-2,3/6-}\beta\text{-Gal}$	Glicoproteínas	Fimbrial (S)
$\beta\text{-GalNac-1,4-}\beta\text{-Gal-1,4-}\beta\text{-Glc}$	Glicolípidos	Fimbrial (CFA/I)
Gal, GalNac	Glicolípidos	Fibrilar (K88, K99)
Gal, GalNac, Scrina	Glicoproteínas	No fimbrial.

Tabla 4. Receptores de algunas adhesinas de *E. coli*. (Tomado de Klaus, J. y Hoshutzky, H., 1991).

La producción de adhesinas bacterianas es también afectada por una variedad de compuestos en el microambiente. Los antibióticos tales como la tetraciclina y penicilina interrumpen la producción de adhesinas así como también algunas otras funciones bacterianas (89).

3.5 ORGANIZACION GENETICA.

Las adhesinas fimbriales y no fimbriales de *E. coli* han sido las mas estudiadas y

caracterizadas a nivel molecular y estructural. La organización genética de la expresión de las fimbrias posee dos características importantes:

- i) La expresión está bajo un control de variación de fase de modo que una célula de entre miles, espontáneamente cambia a un fenotipo opuesto (v.g. $Fim' \rightarrow Fim''$).
- ii) Además del gen para la subunidad fimbrial, se requieren varios genes para la expresión del organelo.

En el tipo salvaje y fimbriado de *E. coli*, las mutaciones que se dan frecuentemente pueden producir células que permanecen no fimbriadas bajo cualquier condición. Sin embargo, esta cepa puede nuevamente convertirse en una célula fimbriada si toma lugar el proceso de conjugación con células fimbriadas (Fim'), o con células que estuvieron solamente en fase no fimbriada (Fim''). Esto nos permite agrupar genotípicamente y fenotípicamente a las células fimbriadas del siguiente modo (76):

Fim' Genotípicamente y Fenotípicamente fimbriadas.

Fim'' Genotípicamente pero no Fenotípicamente fimbriadas.

Fim' Genotípicamente y Fenotípicamente no fimbriadas.

La conversión de una cepa $Fim' \rightarrow Fim''$ se piensa que puede ser reversible, aunque no este reflejada claramente por la morfología colonial, como lo son los cultivos Fim' y Fim'' de *E. coli*. Estos datos hacen necesario considerar la posibilidad de que el estado fimbriado es controlado al menos por tres variables:

- 1.- Mutaciones a partir de genotipos Fim' y Fim'. Este tipo de variación de fase es raro y puede suceder solamente en condiciones naturales.
- 2.- Variación de fase entre organismos genotípicamente fimbriados (Fim' o Fim'F) y organismos fenotípicamente no fimbriados, pero sí genotípicamente fimbriados (Fim'' o Fim N). Este tipo de fimbriación se pierde solamente después de repetidos pases o subcultivos.
- 3.- Supresión fenotípica de fimbrias en cualquiera de las dos fases fimbriadas. La pérdida rápida de las fimbrias en los microorganismos se produce bajo ciertas condiciones de cultivo en unas cuantas horas.

3.6 VARIACION DE FASE

Ciertos componentes de la superficie celular en algunas bacterias patógenas sufren una variación antigénica de fase. La variación de fase es el proceso por el cual las células oscilan entre un estado de expresión y no expresión de una proteína de superficie, usualmente a frecuencias de 10^2 y 10^3 células por generación (13). La variación antigénica ocurre cuando una alteración en un componente estructural da como resultado un cambio en la antigenicidad.

La fimbria de tipo 1 en *E. coli* está sujeta a una variación de fase. Brinton (1959, 13) mostró que la cepa B de *E. coli* oscila entre estados de fimbriación y no fimbriación en una proporción de 1/1000 bacterias por generación. Eissenstein (1981) determinó que esta expresión metaestable de la fimbria de tipo 1 es controlada a nivel de transcripción

(26) pues la fusión del operón *fim-lac* exhibe una variación de fase del fenotipo Lac. Estudios subsecuentes han mostrado que la variación de fase de la fimbria de tipo 1 es mediada por la inversión de un segmento de DNA de 314-bp unidas por 9-bp repetitivas invertidas que están localizadas inmediatamente y en dirección contraria del gene estructural de la fimbria *fimA* (1). Esta secuencia invertible contiene una región muy parecida a un promotor de *E. coli* necesario para la transcripción. Esta secuencia es capaz de actuar como un promotor en la orientación ON, sin embargo está orientada en dirección opuesta y sobre la hebra de sentido contrario cuando la posición está en OFF (Fig. 7) (88). Este mecanismo es muy parecido a la expresión alternada de los antígenos flagelares H1 y H2 de *Salmonella typhimurium*, la cual es debida a la inversión de un segmento de DNA de 95 bp. La inversión en *Salmonella* es mediada por una recombinasa de sitio específico que es el producto del gene *hin* localizado en el elemento invertible.

Se ha sugerido que la fimbria de tipo P y S están sujetas también a una variación de fase (83,72).

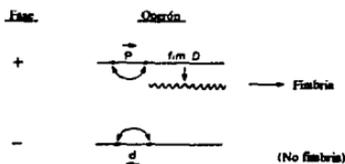


Figura 7. Elemento invertible que controla la variación de fase de la fimbria de tipo 1. Las células en fase + (Fim⁺) y las células en fase - (Fim⁻) contienen el gene estructural para la subunidad fimbrial, pero el gene es expresado solamente en el estado de fase +. El control es transcripcional; un elemento invertible de 314 pares de bases contiene un promotor que permite la transcripción de *fimD* (ahora llamado *fimA*) en una orientación solamente. (Tomado de Eisenstein, B. L., 1987)

3.7 MAPEO GENETICO

Las técnicas de biología molecular han sido usadas para identificar el loci genético de las fimbrias. Se ha determinado que no todos los tipos de fimbrias están codificados en el cromosoma bacteriano. La siguiente tabla muestra la codificación genética de algunos tipos de fimbrias en *E. coli* K12.

Fimbrias codificadas en el cromosoma bacteriano	Fimbrias codificadas por plásmidos
Tipo 1	K88
Tipo 4	K99
987P	CFA/I
F41	CFA/II
AFA-1	F
S	
P	

Tabla 5. Codificación genética de algunos tipos de fimbrias en *Escherichia coli* K12.

Varios genes están envueltos en la biosíntesis y expresión de las fimbrias. El sitio del gene *fim* para la expresión de la fimbria de tipo 1 ha sido asignado a los 98 minutos de la posición del mapa en el cromosoma de *E. coli* (67) (Fig. 8):



Figura 8. Localización del gene *fim* en el cromosoma de *E. coli*. El gene *fim* se encuentra en el minuto 98. (tomado de Miller, J. H., 1992)

La figura número 9 resume la estructura, función y regulación de algunas fimbrias expresadas por *E. coli*.

3.8 EL OPERON *pap*.

El gene para la expresión de la fimbria de tipo P, *pap*, ha sido secuenciado totalmente, consta de un total de 11 genes los cuales constituyen el operón *pap* (Fig.10). La mayor parte de fimbria de tipo P está compuesta por PapA, el producto del gene *papA* (5), el cual está localizado en la parte proximal del promotor terminal del operón *pap*. La inactivación de *papA* suprime la expresión de la fimbria, pero la habilidad de la bacteria para hemaglutinar se conserva. La propiedad adhesiva de la fimbria tipo P no es determinada por la proteína de la subunidad estructural mayor, si no que depende de la expresión de una proteína de 35 kD producida por el gene *papG* localizado en la parte distal terminal del operón (39). Se ha demostrado también que PapG, junto con el producto de otros dos genes del operón *pap*, *papE* y *papF* son componentes menores en la estructura de la fimbria P localizadas exclusivamente en la punta (59). PapE aparentemente funciona como un adaptador que acopla la adhesina PapG al filamento de la fimbria porque la inactivación de *papE* resulta en la reducción de los títulos de la hemaglutinación de las fimbrias purificadas. La inactivación de *papF* resulta en la reducción drástica de los niveles de fimbriación, sugiriendo que juega un papel importante en el inicio del ensamblaje de la fimbria (59).

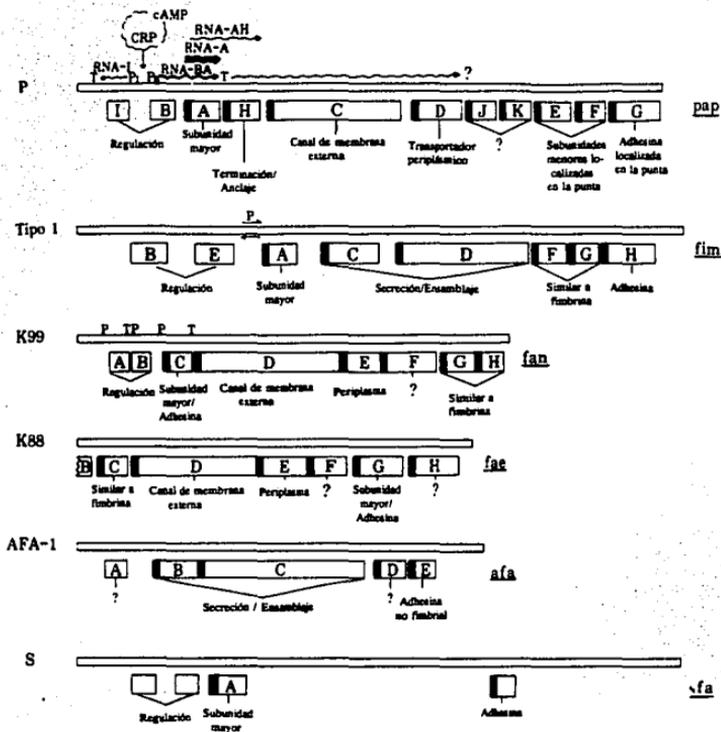


Figura 9. Resumen de la estructura, función, y regulación de algunos grupos de genes de adhesinas de *E. coli*. Los grupos de genes *pap*, *fim*, *fan*, *fae*, y *sfa* que codifican adhesinas fimbriales se muestran junto con el grupo de genes de la adhesina no fimbrial *afa*. La posición de las secuencias promotoras y de terminación dentro de los grupos de genes están indicadas con la letra P y T respectivamente. Los promotores *papI* y *papB* se muestran junto con el sitio regulador propuesto para la proteína CRP. El RNA mensajero transcribe a partir de P₁ y P₂ y está representado por las líneas gruesas. (Tomado de Tennent, J. M., 1990).

El producto de los dos genes, *papC* y *papD*, juegan un papel crucial en la translocación y/o ensamblaje de la fimbria; la inactivación genética de cualquiera de estos dos genes suprime la fimbriación (39). PapC es una proteína de membrana externa de 88 kD que se piensa forma el centro de ensamblaje para la polimerización de la fimbria. El producto génico de *papD* codifica a una proteína de 28.5 kD localizada en el espacio periplásmico. Una mutación en *papD* da como resultado una degradación proteolítica

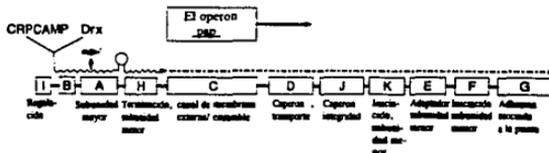


Figura 10. Resumen de la estructura, función, y regulación del operón *pap*. Las funciones postuladas y establecidas de varios productos génicos están indicadas. El RNA mensajero que sale del promotor *papB* está indicado por la línea ondulada seguida por una línea punteada; los blancos reguladores de la CRP, proteína DRX, y cAMP también se muestran. Un terminador transcripcional (círculo) se encuentra entre *papA* y *papH*. (Tomado de Hultgren, S. J., y Normark, S. 1991).

rápida de las subunidades mayores y menores de la fimbria (60), así como la degradación limitada de PapG. Estos hallazgos sugieren que PapG interactúa con las diferentes subunidades de la fimbria en el periplasma, estabilizándolas en una forma de ensamblaje competente. El papel de PapJ no es muy claro pero puede estar involucrado en el ensamblaje de la fimbria. Finalmente, *papI* y *papB* regulan la expresión de la fimbria, pues la inactivación de estos genes afecta drásticamente la transcripción del operón *pap*.

Introducción

La organización genética del grupo de genes de la fimbria tipo 1 es similar al operón *pap*. Aunque son pocos genes los que componen a este tipo de fimbria, sus funciones son muy similares a los correspondientes genes del operón *pap*, sugiriendo que la síntesis de estas estructuras supramoleculares son similares. El gene *fim* de la fimbria tipo 1 de *E. coli* está constituido por ocho genes (Fig. 9). El gen *fimA*, dos genes reguladores *fimB* y *fimE*, los cuales dirigen la expresión dependiente de fase de el gene *fimA*. El mecanismo del fenomeno de variación de fase envuelve la inversión de un segmento de DNA de 300 pares de bases albergado en el promotor del gene *fimA* (1). En adición a *FimA* y sus reguladores, *fimC* y *fimD* han sido identificados y son necesarios para el transporte y ensamblaje de la fimbria (54). *FimC* se piensa que es una proteína periplásmica y posiblemente funciona en la translocación y ensamblaje de las proteínas fimbriales de igual forma que *PapD* en el operón *pap*. *FimC* es también requerido para la localización en la superficie de la adhesina enlazante de manosa (mannose-binding adhesin) en ausencia de la subunidad mayor *FimA* (38). *FimD* reside en la membrana externa y puede servir para la misma función que *PapC* en el ensamblaje de la fimbria. Tres genes distales al gen estructural han sido identificados, y sus correspondientes productos genicos parecen ser componentes menores de la fimbria de tipo 1. El producto de uno de estos genes, *FimH*, ha sido específicamente implicado en la unión específica con D-manosa (55).

4. ENSAMBLAJE POSTSECRECIONAL

4.1 CAPERONES.

La presencia de proteínas especializadas en células eucariotas y procariontes que intervienen en el ensamblaje postsecrecional de proteínas oligoméricas está emergiendo como un fenómeno general. Recientemente se ha aprendido mucho acerca de una clase de proteínas llamadas caperones (28). Los caperones son componentes esenciales de células procariontes y eucariotas que tienen como función ayudar a otros polipéptidos a mantener o asumir conformaciones que permitan su correcto ensamblaje dentro de estructuras oligoméricas, o bien, su secreción a través de la membrana citoplásmica; intervienen en muchas funciones celulares incluyendo plegamientos, importación y exportación de proteínas en varios compartimentos celulares (57).

En bacterias Gram-negativas, los caperones se localizan en el periplasma y son necesarios para el ensamblaje de muchas estructuras de superficie adhesivas asociadas con la virulencia.

4.2 BIOGENESIS DE LA FIMBRIA

El ensamblaje de la fimbria bacteriana es un proceso complejo que envuelve una interacción molecular específica entre proteínas estructurales y caperones. El proceso de ensamblaje ocurre postsecrecionalmente, una vez que las subunidades han sido trasladadas a través de la membrana citoplásmica. Cada una de las proteínas conocidas envueltas en el ensamblaje de la fimbria y la secreción son sintetizadas en una forma de precursor que

es procesada a través de la membrana citoplásmica. Los caperones periplásmicos son requeridos generalmente para unirse a las subunidades interactivas y dividir las en complejos competentes de ensamblaje. La unión del caperón a las subunidades aparentemente protege a la superficie interactiva y evita que se agregen en tiempo y lugar equivocados dentro de la célula. La fimbria se ensambla en polímeros lineales que se empaquetan en una hélice de mano derecha después de su movilización a través de canales específicos de la membrana externa. Cada filamento de la fimbria es un ensamblaje cuaternario de la subunidad estructural y varias subunidades menores incluyendo el fragmento adhesina. Aunque el ensamblaje y organización de la fimbria tipo 1 y tipo P son muy similares, existen algunas diferencias notables. Por ejemplo, la adhesina de la fimbria P está localizada exclusivamente en la punta del filamento de la fimbria y forma parte de una estructura morfológicamente distinta. En contraste, el fragmento de adhesina de la fimbria de tipo 1 está insertada dentro del filamento de la fimbria a intervalos, pero solamente la molécula de adhesina expuesta a la punta de la fimbria es funcional. Poco se conoce acerca de la estructura y ensamblaje de la fimbria de tipo 4, la cual es una clase única de fimbria expresada por varias especies diferentes de bacterias Gram negativas. La variación de fase del gene *pilC* en *N. gonorrhoeae* al estado apagado (off) resulta en la acumulación de subunidades no ensambladas tóxicas a la célula.

Este proceso ejerce una presión de selección fuerte en las células que disparan alteraciones en el gene estructural de la fimbria. Esta variación antigénica de la fimbria en este organismo puede ser regulada a nivel del ensamblaje (37).

La fimbria de tipo P está compuesta por fibras que consisten de una delgada punta fibrilar heteropolimérica unida de extremo a extremo al grueso del tubo fimbrial. La punta fibrilar es una fibra lineal compuesta de cuatro subunidades especializadas, PapG, PapF, PapE, y PapK. PapG es una adhesina bacteriana que media la unión al receptor Gal- α -(1-4)Gal presente en las globoseries de glicolípidos en el riñón. PapF es una proteína adaptadora que une PapG a PapE. La estructura de la punta fibrilar consiste de subunidades repetitivas de PapE, las cuales se unen al tubo helicoidal homopolimérico por medio de la proteína adaptadora PapK. El tubo consiste de subunidades repetitivas de PapA dispuestas en forma de hélice de mano derecha ancladas a la célula bacteriana por PapH. El caperón PapD une cada una de las subunidades fimbriales a medida que son transportadas de la membrana citoplásmica al periplasma, y los transporta a los sitios de ensamblaje compuestos de PapC localizados en la membrana externa. La proteína PapC ha sido referida como una molécula acomodadora porque recibe a la subunidad unida al caperón y la incorpora, o acomoda a la fimbria en crecimiento en un orden definido. PapC es una proteína de membrana externa. El número de fimbrias formadas por célula está directamente relacionado a la cantidad de PapC producida. PapC juega un papel activo en la disociación de la subunidad unida a PapD a medida que son ensamblada dentro de la fimbria.

La proteína PapC atraviesa el periplasma para convertirse en un componente integral de la membrana externa de la bacteria, probablemente toma la forma de un canal transmembranal. Las subunidades individuales PapA, PapE, PapF, y PapG son

rapidamente estabilizadas en el medio ambiente periplásmico via su asociación con el caperón PapD. El producto génico del gene *papK* también se piensa sea similar a la fimbrina en su estructura primaria, así, puede formar parte de la estructura completa de la fimbria. Sin embargo, en la actualidad los únicos datos que se tienen sobre la proteína *papK* son en el sentido de que ni ésta ni *papJ* son esenciales para la expresión del fenotipo MRHA y la expresión de la fimbria.

Se cree que la biogénesis de la fimbria (Fig. 11) se inicia con la interacción de PapF con algún otro factor aún no identificado. Un candidato es PapJ, el producto génico del gene *papJ* identificado solamente por análisis de secuencia del DNA. Es probable que las regiones similares a la fimbrina en PapJ, es decir, las regiones de PapJ que se parecen a la fimbrina, puedan promover alguna forma de interacción entre esta proteína y otras subunidades de la fimbria. La fimbria de tipo P crece desde la base (62), una vez que PapF y PapG se han acomodado en la punta de la fimbria, es probable que estas sean las primeras proteínas en interactuar con PapC. En este proceso, PapF y PapG estarían depositadas en PapC en una configuración estable inducida por su asociación con el caperón PapD. Para ayudar a la adhesina Gal(α 1-4)Gal a ser localizada en la superficie, la proteína PapE es liberada cercana al puerto de membrana PapC donde se ligaría firmemente a las proteínas que se requieren para la adhesión al cuerpo de la fimbria. Bajo la llegada del complejo PapA'-PapD a PapC, la subunidad de PapA pudiera ser disociada del transportador periplásmico e incorporarse a la estructura de la fimbria atrás de PapE.

Para formar una estructura madura de fimbria, aproximadamente 1000 subunidades

de PapA son adicionadas a la fibra en crecimiento antes de que PapH interactúe con la fimbria y ancle el polímero en la superficie bacteriana (posiblemente vía PapC), de este modo terminando la extensión de la fimbria (90). El ensamblaje de la fimbria está

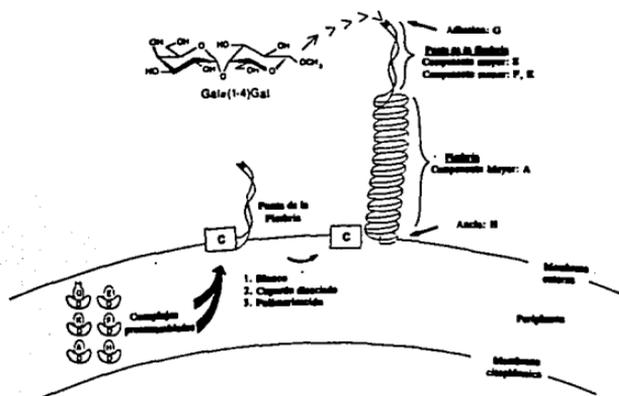


Figura 11. Modelo de la biogénesis de la fimbria de tipo P. El caperón PapD interactúa con cada una de las subunidades proteicas de la fimbria formando un complejo competente de ensamblaje los cuales son llevados a la proteína ensamblante de la membrana externa PapC requerida para la biogénesis de la fimbria de tipo P. Las subunidades de PapA se empaquetan en una forma de tubo helicoidal de mano derecha. La incorporación de PapH termina la polimerización de PapA y ancla la fimbria a la célula. Las subunidades de PapE forman fibras helicoidales abiertas llamadas punta de fibrilla. La adhesina PapG localizada en la parte final distal de la fibrilla (mostrada en negro), media la unión al receptor Galα(1-4)Gal. PapF y PapK han sido localizados en las puntas de las fimbrias, su posición exacta en la punta de la fimbria se desconoce. (Tomado de Kuehn, M. J., Heuser, J., y Normark, S., 1992).

estrechamente ligado a la organización transcripcional y a la regulación del grupo de genes que forman el operón pap.

PapH es una proteína similar a la fimbrina con un peso molecular de aproximadamente 20 kD, con una característica que la hace diferente a las demás subunidades fimbriales, pues es muy rica en prolina en su extensión amino terminal. Durante la biogénesis de la fimbria, PapH es la última subunidad que se incorpora al filamento de la fimbria. Su localización en la base de la fimbria se piensa que es debido a que actúa como señal de terminación en el crecimiento de la fimbria. La longitud promedio de la fimbria parece estar controlada por la relativa estequiometría entre la proteína PapH y la subunidad estructural mayor PapA. Cuando existe una sobreproducción de PapH en relación con PapA, la fimbria producida es de una longitud muy corta. Por el contrario, si los niveles de PapH son menores en relación con PapA, las fimbrias que se expresadas alcanzan longitudes mayores, por lo que en ocasiones éstas son secretadas hacia el medio de cultivo (37). Todo esto sugiere que PapH puede formar interacciones con la pared celular (o con PapC) y de este modo anclar la fimbria a la superficie celular (90). Se piensa que la extensión rica en prolina de PapH sirva para fijar esta proteína y la fimbria en la superficie celular y de este modo establecer una unión firme entre la fimbria y la superficie celular (90).

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de fimbria en *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.- Aislar e identificar a *Actinobacillus pleuropneumoniae* a partir de casos agudos de Pleuroneumonía Contagiosa Porcina.
- 2.- Determinar la presencia de fimbria hasta el tercer pase, mediante Microscopía Electrónica de Transmisión en *Actinobacillus pleuropneumoniae* a partir de casos agudos de Pleuroneumonía Contagiosa Porcina.
- 3.- Determinar el número, diámetro y longitud de las fimbrias, y la expresión de estas en relación con el serotipo.

Objetivos

III. MATERIALES Y METODOS

1.- Material biológico

Se obtuvieron 25 pulmones de cerdo con Pleuroneumonía contagiosa porcina, a partir de los cuales se aisló a *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Los pulmones presentaron zonas fibrino-hemorrágicas características de donde se aisló a *Actinobacillus pleuropneumoniae* en condiciones asepticas, para lo cual se cortó un fragmento de pulmón e inoculó en cajas de agar sangre.

2.- Medios de Cultivo

2.1 *Agar Sangre*: Se preparó con agar de Infusión cerebro corazón (BHI) y adicionando 5% de sangre desfibrinada de bovino.

2.2 *Agar de infusión cerebro corazón (BHI)*: Se preparó con agar BHI enriquecido con extracto de levadura al 10 %.

2.3 *Extracto de levadura*

Se preparó con 50 gramos de levadura fresca de panadería los cuales se suspendieron en 100 ml de agua destilada. Se calentó a 80-85 °C durante 20 minutos, se clarificó mediante la filtración con cartuchos Millipore "Lifegard" CP-15, se ajustó el pH

a 7.6 con una solución 1 N de NaOH. Se esterilizó por filtración en membranas Millipore de 0.22 μm de diámetro. El filtrado se realizó en condiciones estériles, y el extracto de levadura obtenido se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

3.- *Obtención de eritrocitos de bovino*

Se preparó un desfibrinador utilizando un matraz erlenmeyer de boca ancha al cual se adicionó cantidad suficiente de perlas de vidrio, se tapó con un tapón de hule previsto de dos orificios donde se introdujeron dos tubos de vidrio de aproximadamente 1 cm de diámetro, de los cuales a uno de ellos se le colocó una manguera de látex, mientras que el otro tubo funcionó como respirador debidamente tapado con un algodón y cubierto con papel aluminio (Fig. 12). Se esterilizó todo a 15 lb/15 min.

Se localizó la vena yugular del bovino y se punccionó con aguja del número 16, la sangre se recolectó en el desfibrinador con agitación constante.

4.- *Rejillas*

Se utilizaron rejillas de cobre malla 300 lavadas en solución de acetona en un sonicador "Ultrasonic Cleaner" (Cole-Parmer Instruments) por cinco minutos y enjuagadas con agua destilada 3 veces y nuevamente sonicadas por cinco minutos. Las rejillas se dejaron secar para ser usadas posteriormente.

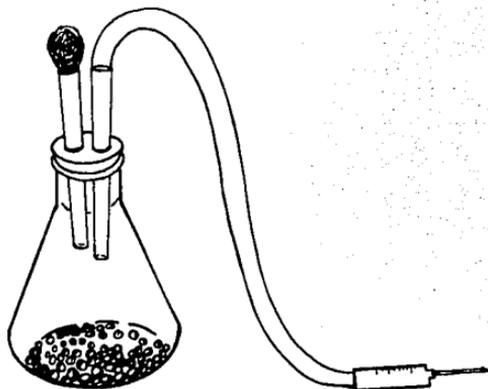


Figura 12. Desfibrinador utilizado en la recolección de eritrocitos de bovino.

5.- Película soporte

La película tiene que ser muy delgada (60-70 nm de grosor) para que disperse el menor número de electrones. Se preparó una solución de Formvar (polivinil formal) al 0.1% en cloroformo (86). Se introdujo en la solución un portaobjetos totalmente limpio y libre de grasa, manteniéndolo en posición horizontal, se sacó y se inclinó verticalmente para eliminar el exceso de solución de formvar, esta operación se hizo rápidamente pues el cloroformo evapora fácilmente. El formvar quedó pegado al portaobjetos formando una

fina película. Para separar la película, se cortó cuidadosamente la orilla de la película adherida al portaobjetos, y se introdujo horizontalmente en un cristizador lleno de agua, la película se desprendió y quedó flotando en el agua reflejando un color dorado-plateado lo que nos indica que tiene un grosor de 60-90 nm. Se colocaron las rejillas en la película flotante, las cuales fueron recogidas con papel filtro. Las rejillas fueron secadas en estufa a 50 °C, después de lo cual la película quedó firmemente adherida a las rejillas

6. METODOS

6.1. Aislamiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

A. pleuropneumoniae se aisló a partir de pulmones neumónicos y en cajas de agar sangre del siguiente modo: La zona lesionada del pulmón se quemó con una espátula caliente, en condiciones asepticas y con tijeras estériles se realizó un corte de aproximadamente 4 cm²; la parte interior del corte se impregnó en la caja de agar sangre y se estrió con asa de platino, posteriormente se colocó un inóculo de una cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* (no hemolítica) en forma perpendicular al estriado original. Las cajas se incubaron a 37°C por un tiempo de 12 a 18 horas (23). Se realizaron los pases en agar BHI (Bioxón) con levadura y se incubaron a 37°C por un tiempo de 12 a 18 horas.

6.2. Identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Las pruebas realizadas para su identificación (63) fueron las siguientes:

6.2.1 Tinción Gram.

Los cultivos a teñir deben ser jóvenes (incubados con un máximo de 24 horas), esto debido a que los cultivos viejos liberan enzimas por autólisis y atacan la pared celular modificando sus propiedades estructurales y convirtiendo las bacterias Gram positivas en Gram negativas.

- a) Se prepara un frotis de un aislamiento reciente.
- b) Se añade una solución de cristal violeta durante 30 seg.
- c) Agregar la solución de lugol durante 30 seg.
- d) Escurrir la solución de lugol sin lavar.
- e) Lavar rápidamente con agua.
- f) Decolorar con algunas gotas de alcohol-acetona, no más de 4 seg.
- g) Contrastar con safranina al 0.5%, 30 seg.
- h) Lavar y secar la laminilla.

6.2.2 Prueba de la Catalasa

Comprueba la presencia de la enzima catalasa.

Se utilizó peróxido de hidrógeno al 30%. La solución se conservó en frasco ambar y se refrigeró hasta su uso.

Método del portaobjetos:

- a) Con un aplicador de madera se recogió el centro de una colonia pura de 18-24 horas y se colocó sobre un portaobjetos de vidrio limpio procurando no tomar trazas de agar sangre
- b) Se adicionó una gota de peróxido de hidrógeno al 30% sobre el organismo del portaobjetos.

La prueba es positiva si existe formación inmediata de burbujas bien visibles (formación de oxígeno). La prueba es negativa si no hay formación de burbujas.

6.2.3 Producción de Hemolisina.

En el aislamiento en Agar sangre se determinó el grado de hemólisis producido por *A. pleuropneumoniae*.

6.2.4 Reacción de CAMP

Se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* productora de β -lisina. Se realizó en agar sangre, estriando a *Actinobacillus pleuropneumoniae* en toda la caja, posteriormente se colocó un inóculo de *Staphylococcus aureus* en forma perpendicular al estriado. La prueba CAMP es positiva si existe hemólisis completa en la zona de las colonias cercanas a la cepa nodriza.

6.2.5 Prueba de Satelitismo.

Puede observarse tanto en agar sangre como en agar BHI. La prueba es positiva si *Actinobacillus pleuropneumoniae* crece en la periferia de la cepa nodriza.

6.2.6 Dependencia del factor V.

Actinobacillus pleuropneumoniae requiere del factor V (Nicotinamin Adenin Dinucleótido, NAD) para su crecimiento, el cual fué proporcionado adicionando al agar sangre la cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* y al agar BHI el 10% de extracto de levadura. *A. pleuropneumoniae* crecerá si estos factores son adicionados al medio de cultivo por lo que la prueba será positiva.

6.2.7 Prueba de Ureasa.

Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoniaco por la acción de la enzima ureasa. El medio empleado es el caldo de urea de Stuart.

Se depositó un inóculo en el medio contenido en un tubo de ensaye (la cantidad recogida con el asa de inoculación tres veces), se agitó suavemente y se incubó a 35 °C. Se observó la reacción después de las 8, 12, 24 y 48 horas de incubación. La prueba es positiva si se produce un color rojo rosado en todo el caldo. La reacción es negativa si no hay cambio de color.

6.2.8 Fermentación de carbohidratos

Se inocularon tubos conteniendo 0.5 ml de caldo base rojo de fenol, 1% del azúcar a probar y 10 µg/ml de NAD con un cultivo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* de 18-24 hrs. de crecimiento. El cambio de coloración en el medio de rojo a amarillo indicó una prueba positiva al carbohidrato que contenía ese tubo.

7. Serotipificación

Se emplearon antiseros de los serotipos 1, 3, 5 y 7 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. La prueba se realizó en placa, adicionando un inóculo de la bacteria para cada antisuero en la placa. Se adicionó entonces una gota de antisuero correspondiente a cada inóculo, se homogenizó suavemente (23). La bacteria pertenece a cualquiera de los serotipos probados si existe una aglutinación.

8.- Microscopía Electrónica.

8.1 Fijación de la Bacteria

Se depositó un inóculo bastante denso en aproximadamente 0.5 ml de solución fijadora de glutaraldehído-rojo de rutenio (solución de rojo de rutenio al 0.01% en solución de glutaraldehído al 2.5%) (66) contenido en un tubo de microcentrifuga de polipropileno (tipo Eppendorf, Beckman instruments). Se fijó por 30 minutos.

Terminado el tiempo de fijación se centrifugó en una Microcentrifuga "Microfuge E, Beckman" por 3 minutos, se retiró la solución fijadora y se resuspendió con buffer de

fosfatos pH 7.2 0.2 M (Sorensen).

8.2 Tinción negativa.

Se colocó un trozo de papel parafilm y sobre el se depositaron dos gotas de suspensión bacteriana, enseguida se colocaron dos rejillas cubiertas con membrana formvar, y se dejaron adsorber las bacterias por 15 minutos, se cubrió todo con una tapa de caja petri.

Las bacterias ya adsorbidas en las rejillas se pasaron a una gota de ácido fosfotúngstico (colocada en el mismo parafilm) y se tiñeron por 10 minutos (66). Las rejillas se sacaron y se absorbió el exceso de solución de ácido fosfotúngstico con la punta de un trozo pequeño de papel filtro.

Se dejaron secar en una caja petri para posteriormente ser observadas en el Microscópio Electrónico de Transmisión JEOL JEM-100S, evaluándose un número de cien células por rejilla, y registrando el número de células fimbriadas, de las cuales se obtuvieron fotos a diferentes aumentos. El diámetro de las fimbrias fué determinado por la siguiente fórmula (24):

$$\text{Tamaño de partícula (nm)} = \frac{\text{Tamaño de partícula en la micrografía (nm)} \times 10^6}{\text{Magnificación final de la micrografía}}$$

La magnificación final de la micrografía se calcula multiplicando la magnificación a la cual el objeto fué fotografiado en el microscópio electrónico de transmisión por las

veces en que el negativo fué ampliado en la impresión.

Las fimbrias fueron medidas con un micrometro de platino (Carl Zeiss) calibrado en décimas de milímetro con ayuda de un microscópio estereoscópico "Leitz wetzlar".

IV. RESULTADOS.

Actinobacillus pleuropneumoniae se recuperó a partir de diferentes zonas lesionadas del pulmón, lográndose obtener 25 aislamientos de la bacteria a partir de los 25 pulmones neumónicos. Cada uno de los aislamientos se identificó, se les determinó el serotipo al que pertenecen, se les realizaron los pases subsecuentes en agar BHI y se evaluó el número de células fimbriadas presentes en cada uno de los pases.

Los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a cada uno de los aislamientos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se muestran en el Cuadro 1. Todos los aislamientos presentaron beta-hemólisis.

Las observaciones realizadas en el microscopio electrónico de transmisión mostraron que de los 25 aislamientos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en 14 de ellos se hallaron células fimbriadas, lo cual corresponde al 56% del total de los aislamientos. Esta proporción fué hallada en el primer pase con agar sangre, en el segundo pase con agar BHI únicamente 2 muestras presentaron fimbrias, lo que corresponde a un 8% del total de los aislamientos. En el tercer pase ninguno de los aislamientos presentó fimbrias (Cuadro 2).

En cuanto a los serotipos, se identificaron tres distintos serotipos, siendo los siguientes: serotipo 1, serotipo 3, serotipo 5, y únicamente en un caso estuvieron

CUADRO No. 1
RESULTADO DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS DESARROLLADAS
A *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Prueba	Resultados
Tinción Gram	Gram negativo
Morfología	Cocobacilo pleomórfico
CAMP	Positivo
Satelitismo	Positivo
Dependencia del factor V	Positivo
Ureasa	Positivo
Catalasa	Negativo
Fermentación de CHOS:	
D(+)Fructosa	Positivo
L(+)Arabinosa	Negativo
D(+)Xilosa	Positivo
D(+)Lactosa	Negativo
Sacarosa	Positivo

involucrados dos serotipos el 1 y el 3 (muestra 12 del cuadro 2). El serotipo 1 se encontró tanto en los aislamientos fimbriados como en los no fimbriados, al igual que el serotipo 3. El serotipo 5 (muestra 7 del cuadro 2) y el caso en donde estuvieron involucrados ambos serotipos 1 y 3 únicamente fueron encontrados en los aislamientos que presentaron fimbrias (Cuadro 3).

Resultados

CUADRO No. 2
NUMERO DE CELULAS FIMBRIADAS OBSERVADAS AL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE
TRANSMISION EN *Actinobacillus pleuropneumoniae* A PARTIR DE LOS
AISLAMIENTOS EN PULMONES NEUMONICOS. EL CUADRO MUESTRA TAMBIEN
EL SEROTIPO AL QUE PERTENECEN.

No. de aislamiento	Número de células fimbriadas en cien células observadas			Serotipo
	1º Pase	2º Pase	3º Pase	
1	66	0	0	1
2	57	0	0	1
3	75	0	0	3
4	50	0	0	1
5	52	0	0	1
6	33	0	0	1
7	52	0	0	5
8	44	0	0	1
9	25	0	0	3
10	57	0	0	1
11	38	0	0	1
12	85	0	0	1,3
13	40	5	0	3
14	23	3	0	1

1º Pase: Agar sangre

2º Pase: Agar BHI

3º Pase: Agar BHI

Resultados

El serotipo 1 fué el que con más frecuencia se aisló, así mismo, fué también el serotipo que más se presentó en los aislamientos fimbriados, pues 9 de ellos correspondieron a este serotipo.

CUADRO No. 3
RELACION DE LAS MUESTRAS FIMBRIADAS Y NO FIMBRIADAS Y
EL SEROTIPO CORRESPONDIENTE EN LOS 25 AISLAMIENTOS DE
Actinobacillus pleuropneumoniae

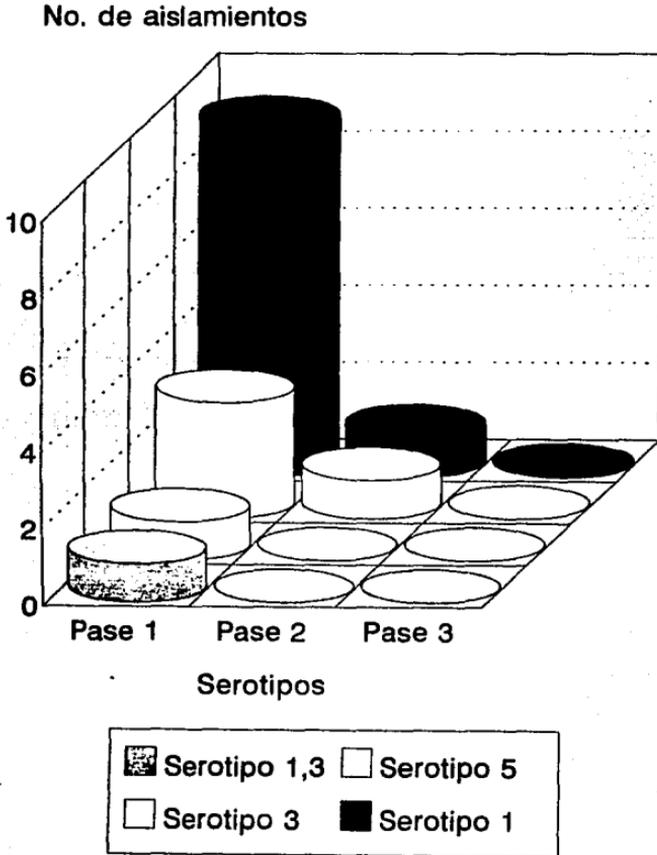
Serotipo	Muestras Fimbriadas	Muestras No Fimbriadas
1	9/25	7/25
3	3/25	4/25
5	1/25	0/25
1,3	1/25	0/25
TOTAL	14/25	11/25

La gráfica 1 presenta de manera más ilustrativa el número de aislamientos fimbriados obtenidos del primer pase en agar sangre y el número de aislamientos que mantuvieron esta estructura en el segundo y tercer pase en agar BHI, así mismo muestra también el serotipo correspondiente.

De las cien células evaluadas para cada caso, el mayor recuento se obtuvo en el aislamiento 12, correspondiente al serotipo 1,3 con un porcentaje promedio de 85%

Resultados

Numero de aislamientos fimbrizados y su serotipo obtenidos en el primer y segundo pase.



Resultados

(Cuadro No. 4). Con respecto a los aislamientos del serotipo 1 y del serotipo 3 el porcentaje promedio de células fimbriadas fué de 46.6% para ambos.

CUADRO No. 4
EVALUACION TOTAL Y PORCENTAJE PROMEDIO DEL NUMERO
DE CELULAS FIMBRIADAS EN CADA UNO DE LOS SEROTIPOS
IDENTIFICADOS

Serotipo	Total de Células fimbriadas	Porcentaje Promedio
1	420/900	46.6%
3	140/300	46.6%
5	52/100	52.0%
1,3	85/100	85.0%

La disposición de las fimbrias en la mayoría de los casos se presentó en forma aleatoria y solo en unos cuantos en forma polar. El número de fimbrias por célula tuvo una media de 2.19 ± 1.59 y el diámetro hallado varió desde 2nm hasta 7nm. La relación de los diámetros encontrados se muestra en el Cuadro No. 5. Las fimbrias con diámetros de 4 nm fueron las que con mayor frecuencia se encontraron (33.3%), siendo las fimbrias con diámetros de 7 nm las que menos se expresaron (9.5%).

La longitud de las fimbrias fué muy variable, de 115 nm a 1800 nm, con una media de 642.23 ± 480.66 nm. La siguiente serie de micrografías electrónicas muestra los tipos de fimbria más representativos.

Resultados

CUADRO No. 5
DIAMETRO DE FIMBRIAS HALLADO EN
Actinobacillus pleuropneumoniae

Diámetro de fimbria (en nm)	Porcentaje (%)
2.0 - 2.9	19.0
4.0 - 4.3	33.3
5.0 - 5.8	23.8
6.0 - 6.4	14.3
7.3 - 7.4	9.5

Resultados



MICROGRAFIA No. 1. Micrografía electrónica de Transmisión de *Actinobacillus pleuropneumoniae* por el método de tinción negativa. La bacteria fué crecida en agar sangre con cepa nodriza de *S. aureus*. Las fimbrias aquí presentes, indicadas con flechas, muestran una apariencia morfológica fibrilar, poseen un diámetro de 2.1 nm y longitudes de 1 y 1.7 μm . La bacteria mide 0.54 μm . La micrografía fué tomada a 15 000 aumentos. Barra = 0.2 μm .

Resultados



MICROGRAFIA No. 2. Micrografía electrónica de Transmisión de *A. pleuropneumoniae* (obtenida por el mismo método que la micrografía no. 1). Las fimbrias indicadas con flechas poseen un diámetro de 2.9 nm y longitudes de 0.48 μm y 0.58 μm . Note la disposición polar de las fimbrias y el ligero adelgazamiento de la bacteria en la zona media lo cual indica un proceso de división. La bacteria mide 0.72 μm . La micrografía fué tomada a 15000 aumentos. Barra = 0.11 μm

Resultados



MICROGRAFIA No. 3. Micrografía electrónica de transmisión de *A. pleuropneumoniae* (obtenida por el mismo método que la micrografía no. 1). La fimbria indicada con flecha muestra una disposición polar y posee un diámetro de 4.16 nm y longitud de 9.7 μm . La bacteria mide 0.4 μm . La micrografía fué tomada a 15 000 aumentos.
Barra = 0.125 μm



MICROGRAFIA No. 4. Micrografía electrónica de transmisión de *A. pleuropneumoniae* (obtenida por el mismo método que la micrografía no. 1). Las fimbrias presentes e indicadas con flechas muestran una distribución perifrónica, poseen un diámetro de 5 nm y las longitudes respectivas son de 0.36 μm ; 2.2 μm , y 8.3 μm . La bacteria mide 0.62 μm . La micrografía fué tomada a 30 000 aumentos. Barra = 0.1 μm

Resultados



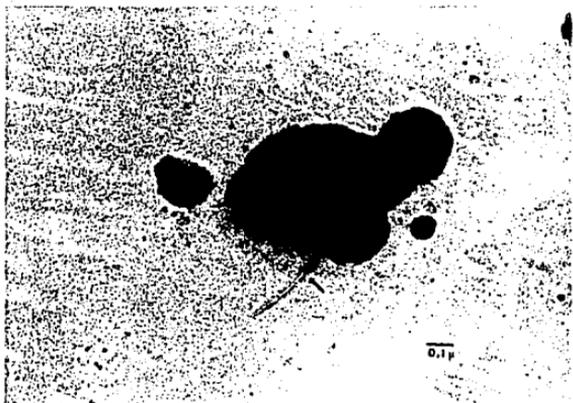
MICROGRAFIA No. 5. Micrografía electrónica de transmisión de *A. pleuropneumoniae* (obtenida por el mismo método que la micrografía no. 1). Las fimbrias indicadas con flechas y distribución aleatoria miden 5 nm. Note se la gran longitud que poseen de 1.8 μm ; 1.6 μm ; 8.5 μm ; 7.8 μm y 0.5 μm . las bacterias miden 0.45 μm y 0.6 μm . La micrografía muestra también una conexión de las dos células mediante la fimbria de 0.5 μm de longitud. La micrografía fué tomada a 10 000 aumentos. Barra = 0.24 μm

Resultados



MICROGRAFIA No. 6. Micrografía electrónica de transmisión de *A. pleuropneumoniae* (obtenida por el mismo método que la micrografía no. 1). Las fimbrias, indicadas con flechas, se observan distribuidas peritricamente y poseen un diámetro de 5.3 nm y longitudes de 6.6 μm y 4.6 μm . La bacteria mide 0.5 μm . La micrografía fué tomada a 15 000 aumentos. Barra = 0.1 μm

Resultados



MICROGRAFIA No. 7. Micrografía electrónica de transmisión de *A. pleuropneumoniae* (obtenida por el mismo método que la micrografía no. 1). La micrografía muestra a dos células juntas, de las cuales una presenta fimbria, indicada con flecha, que posee un diámetro de 6.2 nm y longitud de 3.1 μm . Las bacterias miden 0.5 μm . La micrografía fué tomada a 10 000 aumentos. Barra = 0.1 μm

Resultados



MICROGRAFIA No. 8. Micrografía electrónica de transmisión de *A. pleuropneumoniae*. La fimbria indicada con la flecha posee un diámetro de 7.4 nm y una longitud de 0.85 μm . La bacteria tiene un diámetro de 0.3 μm . La micrografía fué tomada a 15 000 aumentos. Barra = 0.1 μm

Resultados

V. DISCUSION.

Antes de que el agente de la pleuroneumonía porcina fuese transferido del género *Haemophilus* al género *Actinobacillus* por Pohl y cols. en 1983, la presencia de fimbrias no había sido descrita en otros miembros de este género hasta que en 1981 Kahn y Gromkova la describieron en *Haemophilus parainfluenza* mediante técnicas de microscopía electrónica y creciendo a la bacteria en medio BHI a 37 °C en condiciones aerobias obteniendo un 35% de células fimbriadas. En ese estudio, el medio BHI resultó ser un medio adecuado no solamente para el crecimiento de la bacteria, si no también para la expresión de las fimbrias. En *Actinobacillus pleuropneumoniae*, al igual que *Haemophilus parainfluenza*, el medio BHI es el más utilizado para su crecimiento junto con el agar sangre (10), sin embargo, aunque en nuestros resultados en ambos medios de cultivo (agar sangre y BHI) hubo crecimiento bacteriano, solo en el agar sangre se obtuvo el mayor número de células fimbriadas (cuadro 2), mientras que en el segundo pase en agar BHI unicamente dos del total de los aislamientos fimbriados conservaron esta estructura, de las cuales solamente 5 células en el aislamiento número 13 y 3 células en el aislamiento número 14 presentaron fimbrias.

El mayor recuento de células fimbriadas con porcentaje promedio de 85% (cuadro 4) correspondiente al aislamiento 12 (cuadro 2), única muestra donde estuvieron involucrados ambos serotipos 1,3 no puede considerarse que sea el aislamiento con el

mayor número de células fimbriadas, pues es necesario promediarla con una cantidad mayor de aislamientos donde estén involucrados ambos serotipos. Ocurre lo mismo con el aislamiento del serotipo 5. Lo que sí puede tomarse en cuenta es el porcentaje promedio de células fimbriadas hallado en el serotipo 1 y el serotipo 3, pues en estos, el número de aislamientos fué mayor (Cuadro 3). El serotipo 1 presente en la mayoría de los aislamientos fimbriados (Gráfica 1), ha estado asociado con los brotes más severos de pleuroneumonía ocasionando una elevada mortalidad, además de ser el serotipo más prevalente en el país (68, 19). Esto sugiere que de algún modo la presencia de este organelo coadyuva a la severidad de las lesiones.

No puede asegurarse en este estudio, que la fimbria se conserva hasta el segundo pase, pues fué mínima su expresión; aunque existen bacterias en las cuales la producción de fimbria se ha logrado conservar *in vitro* hasta el cuarto pase (6), en la mayoría de los casos solo se ha conservado hasta el tercero. En el caso de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Utrera y Pijoan (91) lograron obtener células fimbriadas únicamente hasta el segundo pase y en proporción menor que en el primero en agar sangre como medio de cultivo. El reporte de Utrera y Pijoan al igual que el nuestro, han sido hasta la fecha, los dos únicos que han demostrado de manera muy clara que *Actinobacillus pleuropneumoniae* expresa estos tipos de apéndices extracelulares. Si bien el primer reporte (91) muestra su persistencia hasta el segundo pase con diámetros de hasta dos nanómetros y longitudes de hasta 450 nm; nuestro estudio completa en forma total lo referente a estas estructuras, pues los diámetros encontrados de 2 nm hasta 7 nm y las

Discusión

longitudes de hasta 1800 nm incluyen todas las formas de fimbrias hasta la fecha caracterizadas: la "rígida" que posee diámetro de entre 5 a 8 nm y que está involucrada tanto en la adherencia como en la conjugación y la forma "flexible" con diámetros de hasta 2 nm involucrada únicamente en el fenómeno de adherencia (53). Este hallazgo trasciende aún más, pues es muy probable que entre la amplia gama de diámetros hallados, *Actinobacillus pleuropneumoniae* este expresando fimbrias de conjugación y con ello explicar el porque de la resistencia a varios fármacos, punto que hasta la fecha aún no queda muy claro. Según lo reportado por Colmenares y cols. en 1988, la resistencia de 20 aislamientos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* a un gran número de antibióticos, entre ellos ampicilina y penicilina (cefaloxina, estreptomicina, kanamicina, furadomicina, gentamicina, tilosina tiamulian entre otros) no estaba codificada por plásmidos; en un trabajo posterior desarrollado por Borr y cols en 1991 con técnicas de hibridización de DNA, las doce cepas existentes de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y obtenidas de varios países, ninguna presentó plásmidos. Sin embargo, en el estudio realizado por Bélanger y cols., en 1990 sobre el papel que juegan los lipopolisacáridos en la adherencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, cuatro de los 17 aislamientos albergaron plásmidos confiriendo a la bacteria resistencia a varios antibióticos notablemente a ampicilina y penicilina. Aún no queda muy claro lo referente a este punto, pero si resulta muy importante que las investigaciones sean dirigidas no solamente a la caracterización de las fimbrias, sino también a la correlación de la resistencia a antibióticos con la presencia de plásmidos y los posibles mecanismos de recombinación, mediante los cuales se ha hecho

resistente a varios antibióticos, punto muy importante ya que el número de cepas resistentes continúa aumentando y se siguen desarrollando nuevos patrones de resistencia.

Es indiscutible, que si quieren establecerse medidas de control y erradicación de la pleuroneumonía es necesario conocer los factores de virulencia involucrados en la enfermedad, los mecanismos mediante los cuales causa daño, establecer sistemas de diagnóstico eficientes que indiquen el serotipo responsable en los brotes y de este modo aplicar la vacuna y tratamiento adecuado. Actualmente se desconocen aún muchos de los mecanismos involucrados en la patogénesis de la enfermedad. Varias actividades citotóxicas y hemolíticas han sido descritas (32, 33, 34, 52), un factor de permeabilidad (58) y otros factores tóxicos de macrófagos (8, 80) y neutrofilos (84) han sido reportados, pero los factores de virulencia envueltos en la colonización del tracto respiratorio permanecen grandemente desconocidos. Las investigaciones dirigidas sobre la forma en que *Actinobacillus pleuropneumoniae* se establece en vías respiratorias y coloniza el pulmón sugerían que la adherencia era el punto principal en la infección pulmonar (93). Sin embargo, cuando Jacques y cols, en 1991 evaluaron la adherencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en células epiteliales de tráquea y secciones de pulmón, mostraron que el serotipo y el material capsular no parecen estar envueltos en este fenómeno, al igual que los factores arriba mencionados.

Los lipopolisacáridos (LPS), descritos y caracterizados primeramente en *Actinobacillus pleuropneumoniae* por Fenwick en 1986 y purificados por Byrd y Kadis en 1989 han resultado estar estrechamente relacionados en el fenómeno de adherencia,

Discusión

Además de ser las adhesinas mayormente presentes en *Actinobacillus pleuropneumoniae* (69). Se ha pretendido mostrar la accesibilidad de los LPS en la superficie de este microorganismo, prerequisite esencial para cualquier adhesina bacteriana, y localizar el sitio preferencial de unión del LPS sobre secciones de tejido pulmonar y determinar cual región de este complejo molecular está envuelto en la adherencia. Las técnicas de inmunomicroscopía electrónica y citometría de flujo han logrado demostrar que los LPS son en efecto accesibles a la superficie de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (77) y que además los ensayos de adhesión en secciones de pulmón congelados combinados con inmunotinción muestran que los LPS extraídos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se adhieren al endotelio vascular, mesenquima del pulmón y al epitelio traqueal. Esta observación soporta la idea de que los LPS de *Actinobacillus pleuropneumoniae* juegan un papel importante en la adherencia, mas no son los únicos involucrados en este fenómeno. Desde que Inzana y cols. en 1988 sugirieron la presencia de fimbrias en bacterias opsonizadas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (40) los esfuerzos por demostrar esta estructura han sido mínimos. Hasta esta fecha solamente el reporte de Utrera y Pijoan y el presente trabajo ponen de manifiesto la presencia de estas estructuras involucradas más directamente en la colonización bacteriana, sin embargo, aún falta establecer si algunos otros antígenos bacterianos, los cuales posean una conformación esteroquímica, perfil hidrofóbico y carga neta electrostática complementariamente con ciertas estructuras de membrana sobre una célula blanco, estén involucradas también, como adhesinas potenciales (46).

VI. CONCLUSIONES.

- 1.- El agente causal de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, es una bacteria capaz de expresar fimbrias.
- 2.- De los 25 aislamientos obtenidos de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, solo 14 de ellos presentaron fimbrias. La mayoría en el primer pase.
- 3.- La expresión de las fimbrias fué mínima en agar BHI, siendo el agar sangre el medio en el cual se obtuvo el máximo número de bacterias fimbriadas.
- 4.- En el total de los aislamientos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se identificaron los serotipos 1, 3, 5, y solo en un caso ambos serotipos 1 y 3 resultaron estar involucrados. Los aislamientos fimbriados corresponden en su mayoría a los serotipos 1 y 3.
- 5.- Las fimbrias encontradas muestran una amplia variedad de diámetros que van de 2 nm hasta 7 nm y con longitudes desde 115 nm hasta 1800 nm. El tipo de fimbria que con más frecuencia se encontró posee un diámetro de 4 nm.
- 6.- La presencia de fimbrias en *Actinobacillus pleuropneumoniae* debe ser motivo de una investigación más amplia con el fin de establecer hasta que punto está involucrada en la virulencia de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina.

REFERENCIAS.

- 1.- Abraham, J. M., Freitag, C. S., Clements, J. R., and Eisenstein B. I. 1985. An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. **82**: 5724-5727.
- 2.- Allweiss, B., Dostal, J., Carey, K., Edwards, T., and Freter, R. 1977. The role of chemotaxis in the ecology of bacterial pathogens of mucosal surfaces. Nature. **266**: 448-450.
- 3.- Anderson, T. D., Cheville, N. F., and Meador, P. V. 1986. Pathogenesis of placentitis in the goat inoculated with *Brucella abortus*. II. Ultrastructural studies. Vet. Pathol. **23**: 227-239.
- 4.- Arp, L. H. 1988. Bacterial infection of mucosal surfaces: an overview of cellular and molecular mechanisms. In: Roth, A. J. (editor), Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 3-27.
- 5.- Baga, M., Normark, S., Hardy, J., O'Hanley, P., Lark, D. 1984. Nucleotide sequence of the gene encoding the *papA* pilus subunit of human uropathogenic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **157**: 330-333.
- 6.- Bakaletz, L. O., Tallan, B. M., Hoepf, T., DeMaria, T. H. and Lim, J. D. 1988. Frequency of Fimbriation of Nontypable *Haemophilus influenzae* and Its Ability to Adhere to Chinchilla and Human Respiratory Epithelium. Infect. Immun. **56**: 331-335.
- 7.- Beachey, E. H. 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. J. Infect. Dis. **143**: 325-345.
- 8.- Bendixen, P. H., Shewen, P. E., Rosendal, S., and Wilkie, B. N. 1981. Toxicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* for Porcine Lung Macrophages, Peripheral Blood Monocytes and Testicular Cells. Infect. Immun. **33**: 673-676.
- 9.- Belanger, M., Bubreuil, D., Harel, J., Christiane, G., and Jacques, M. 1990. Role of Lipopolysaccharides in Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to Porcine Tracheal Rings. Infect. Immun. **58**: 3523-3530.

- 10.- Biberstein, E. L., Gunnarson and Hurvell, B. 1977. Cultural and Biochemical criteria for the identification of *haemophilus spp* from swine. Am. J. Vet. Res. 38: 7-11
- 11.- Borr, J., Ryan, D., MacInnes, J. 1991. Analisis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and related organisms by DNA-DNA hybridization and restriction endonuclease fingerprinting. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 121-129.
- 12.- Bretscher, M.S. 1985. The molecules of the cell membrane. Sci. Am. 253: 100-108.
- 13.- Brinton, C. C. 1959. Non-flagellar appendages of bacteria. Nature. 183: 782-786.
- 14.- Brinton, C. C. 1965. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria. Trans. N. Y. Acad. Sci. 27: 1003-1054.
- 15.- Brinton, C.C., Gemski, P., Falkow, S., and Baron, L. S. 1961. Location of the piliation factor on the chromosome of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 5: 293-298.
- 16.- Byrd, W., and Kadis, S. 1989. Structures and sugar compositions of lipopolisaccharides isolated from seven *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes. Infect. Immun. 57: 3901-3906.
- 17.- Carrión, G. M., y Ciprián, C. A. 1992. Epizootiología de APP. Papel de roedores y pájaros. Memorias XXVII, Congreso Amvec. pp. 54-57.
- 18.- Christensen, G. D., Simpson, W.A., and Beachey, E. H. 1985. Adhesion of bacteria to animal tissues: complex mechanisms. In: D. C. Savage and M. Fletcher (Editor), Bacterial Adhesion Mechanisms and Physiological Significance. Plenum Publishing Corp. New York. 279-305
- 19.- Ciprián, C.A, y Mendoza, E. S. 1994. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Agente responsable de la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina. Memorias del Primer ciclo nacional de Afecciones respiratorias del cerdo. pp. 83-94.
- 20.- Colmenares, G. V., Torres, A. O., Lara, V. S. 1988. Resistencia antimicrobiana no codificada por plásmidos en *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 1. Vet. Mex. 19: 315-320.
- 21.- Costerton, J.W., Irvin, T.R. 1981. The role of bacterial surface structures in pathogenesis. Crit. Re. Microbiol. 8: 303-338.

Referencias

- 22.- Cowan, S.T., and Steel, J. 1974. Manual for Identification of medical bacteria. 2th ed. Cambridge Univ. Press. 137-142.
- 23.- Díaz, R. C. 1992. Aislamiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Memorias: *Actinobacillus pleuropneumoniae. Diagnóstico bacteriológico y serológico*. pp. 11-16
- 24.- Doane, F. W., and Anderson, N. 1987. Electron Microscopy in Diagnostic Virology. 1st. Edition. Cambridge University Press, U.S.A. 14-38.
- 25.- Dom, P., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., and Charlier, G. 1994. In vivo Association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 2 with the Respiratory Epithelium of Pigs. *Infect. Immun.* 62: 1262-1267.
- 26.- Eisenstein, B. I. 1981. Phase variation of type 1 fimbria in *Escherichia coli* is under transcriptional control. *Science.* 214: 337-339.
- 27.- Eisenstein, B. I. 1987. Fimbriae. In: Frederick C. Neidhardt (Editor), *Escherichia coli an Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology. American Society of Microbiology, Washington, D.C. 84-90.
- 28.- Ellis, R. J., Hemmingson, S. M. 1989. Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends Biochem. Sci.* 14: 339-342.
- 29.- Fenwick, B. W., Osburn, B. I., and Olander, H. J. 1986. Isolation and Biological characterization of two Lipopolisaccharides and a Capsular-enriched Polysaccharide Preparation from *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* 47: 1433-1441.
- 30.- Finlay, B. B., and Fikow, S. 1989. Common Themes in Microbial Pathogenicity. *Microbiol. Rev.* 53: 210-230.
- 31.- Freter, R., Allweiss, B., O'Brien, P., Halstead, S., and Macsai, M., 1981. Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa: in vitro studies. *Infect. Immun.* 34: 241-249.
- 32.- Frey, J., and Nicolet, J. 1990. Hemolysin patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 28: 232-236.
- 33.- Frey, J., Beck, M., Stuchi, U., and Nicolet, J. 1993. Analysis of Hemolysin Operons in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene* 123: 51-58.

- 34.- Frey, J., Bosse, J. T., Chang, Y. F., Cullen, B., Fenwick, G. F., Geraldch, D., Fygi, D., Haesebrouck, F., Inzana, T. J., Jansen, E. M., Kamp, J., MacInnes, D. R., Mittal, D. R., Nicolet, J., Rycroft, A. N., Segers, R. P., Smiths, M. A., Stembach, E., Struck, D. K., Van den Bosch, J. F., Wilson, P. J., and Young, R. 1993. *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: Uniform Designation of Haemolysins, Cytolysins, Pleurotoxin and their genes. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1723-1728.
- 35.- Frost, S. L. 1992. Bacterial conjugation: everybody's doin'it. *Can. J. Microbiol.* **38**: 1091-1096.
- 36.- Gaastra, W., and Graaf, F. K. 1982. host-specific fimbrial adhesins and noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiol. Rev.* **46**: 129-161.
- 37.- Hultgren, S. J., and Normark, S. 1991. Chaperone-assisted assembly and molecular architecture of adhesive pili. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 383-415.
- 38.- Hultgren, S. J., Duncan, J. L., Schaeffer, A. J., Amundsen, S. K. 1990. Mannose-sensitive hemagglutination in the absense of piliation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **4**: 1311-1318.
- 39.- Hultgren, S. J., Lindberg, F., Magnusson, G., Kihlberg, J., Tennant, J. M., Normark, S. 1989. The PapG adhesin of uropathogenic *Escherichia coli* contains separate regions for receptor binding and for the incorporation into the pilus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 4357-4361.
- 40.- Inzana, T. J., Jianneng, Wordman, T., Gogolewski, R. P., and Anderson P. 1988. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.* **56**: 1880-1889.
- 41.- Ippen-Ihler, K. A. 1986. The conjugation system of F, the fertility factor of *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Genet.* **20**: 593-624.
- 42.- Isaacson, R. E., 1988. Molecular and Genetic Basis of Adherence for Enteric *Escherichia coli* in animals. In: Roth, A. J. (Editor), *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, American Society for Microbiology, Washington, D. C. 28-41.
- 43.- Isaacson, R. E. 1980. Factors affecting expression of the *Escherichia coli* pilus K99. *Infect. Immun.* **28**: 190-194.

- 44.- Jacques, M., Foiry, B., Higgins, R., and Mittal, K. R. 1988. Electron Microscopic Examination of Capsular Material from Varius Serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Bacteriol. 170: 3314-3318.
- 45.- Jacques, M., Bélanger, M., Roy, G., and Foiry, B. 1991.- Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal epithelial cells and frozen lung sections. Vet. Microbiol. 27: 133-143.
- 46.- Jaan, D., and Hoschutzky, H. 1990. Nature and organization of adhesins. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 151: 55-68.
- 47.- Jensen, A. E., and Bertram, T. A. 1986. Morphological and Biochemical Comparison of Virulent and Avirulent Isolates of *Haemophilus pleuropneumoniae* Serotype 5. Infect. Immun. 51: 419-424.
- 48.- Jones, G. W. 1977. The attachment of bacteria to the surfaces of animal cells. In: J. L. Reissing (editor), Microbial Interaction. Chapman & Hall, Ltd., London. 141-176.
- 49.- Jones, G. W., Abrams, G. D. and Freter, R. 1976. Adhesives properties of *Vibrio cholerae*: adhesion to isolated rabbit brush border membranes and hemagglutinating activity. Infect. Immun. 14: 232-239.
- 50.- Jones, G.W., and Isaacson, R.E. 1983. Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. Crit. Rev. Microbiol. 10: 229-260
- 51.- Kahn, M. E., and Gromkova, R. 1981. Occurrence of Pili on and Adhesive Properties of *Haemophilus parainfluenza*. J. Bacteriol. 45: 1075-1078.
- 52.- Kamp, E. M., Popma, J. K., Anakotta, J., and Smits, M. A. 1991. Identification of Hemolytic and Cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by Use of Monoclonal Antibodies. Infect. Immun. 59: 3079-3085.
- 53.- Klaus J. and Hoschutzky, H. 1991. Characterization and surface organization of *E. coli* adhesins. In: Ron, E. Z., and S. Rottem (Editor), Microbial Surface Components and Toxins in Relation to Pathogenesis, Plenum Press, New York, 3-10
- 54.- Klemm, P., Jorgensen, B. J., van Die, I., de Ree, H., Bergman, H. 1985. The *fim* genes responsible for synthesis of type 1 fimbriae in *Escherichia coli* cloning and genetic organization. Mol. Gen. Genet. 199: 410-414.

- 55.-Krogfelt, K. A., Bergmans, H., Klemm, P. 1990. Direct evidence that the fimH protein is the mannose specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infect. Immun.* **58**: 1995-1999.
- 56.- Kuehn, M. J., Heuser, J., Normark, S., and Hultgren, S.J. 1992. P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. *Nature.* **356**: 252-255.
- 57.- Kuehn, M. J., Ogg, D. J., Kihlberg, J., Slonim, L. N. Flemmer, K., Bergfors, T., and Hultgren S. J. 1993. Structural basis of Pilus Subunit Recognition by the PapD Chaperone. *Science* **262**: 1234-1240.
- 58.- Lallier, R., Le Blanc, L., Morrissette, F., and Higgins, R. 1987. Detection of a Permeability Factor Produced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Curr. Microbiol.* **15**: 141-144.
- 59.- Lindberg, F. P., Lund, B., Johansson, L., Normark, S. 1987. Localization of the receptor-binding protein at the tip of the bacterial pilus. *Nature.* **328**: 84-87.
- 60.- Lindberg, F. P., Tennent, J. M., Hultgren, S. J., Jund, B., Normark, S. 1989. PapD, a periplasmic transport protein in P-pilus biogenesis. *J. Bacteriol.* **171**: 6052-6058.
- 61.- López, M. J. R. 1993. Complejo neumónico causado por *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Porcivama.* **3**: 32-49.
- 62.- Lowe, M. A., Holt, S. C., and Eisenstein, B. I. 1987. Immunoelectron microscopic analysis of elongation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 157-163.
- 63.- Mac Faddin, J. 1984. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Panamericana, México. 241.
- 64.- Marcus, H., and Baker, N. R. 1985. Quantitation of adherence of mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* to hamster tracheal epithelium. *Infect. Immun.* **46**: 723-729.
- 65.- Marshall, K. C.,(editor). 1984. Glossary: Microbial adhesion and aggregation. Springer-Verlag, New York. 397-399.
- 66.- Mercer, E. H., and Birbeck, M. S. 1972. Manual de Microscopía Electrónica para Biólogos. Segunda Ed., Blume Ediciones, España. 1-16, 45-49, 115-119.

- 67.- Miller, J. H. 1992. A Short course in Bacterial Genetic. A laboratory manual and hadbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor. U.S.A. 1.1-1.33.
- 68.- Mittal, K. R., Higgins, R., Lariviere, S., and Nadeau, M. 1992. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec. *Vet. Microbiol.* 32: 135-148.
- 69.- Moulder, J. W. 1985. Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiol. Rev.* 49: 298-337.
- 70.- Nielsen, R. 1987. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. *Acta. Vet. Scand.* 27: 453-455.
- 71.- Niven, D. F., and Lévesque. 1988. V-Factor-Dependent Growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Biotype 2 (Bertschinger 2008/76). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 319-320.
- 72.- Nowicki, B., Rhen, M., Vaisanen-Rhen, V., Pere, A., and Korhonen, T. K. 1985. Kinetics of phase variation between S and type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 28: 237-242.
- 73.- Nozaki, L., and Tanford, C. 1971. The solubility of amino acid and two glycine peptides in aqueous ethanol and dioxane solutions. *J. Biol. Chem.* 246: 2211-2217.
- 74.- Old, D. C., and Duguid, J. P. 1972. Selective outgrowth of fimbriate bacteria in static medium. *J. Bacteriol.* 103: 447-456.
- 75.- Old, D. C. 1972. Inhibition of the interacción between fimbrial hemagglutinins and erythrocytes by D-mannose and other carbohydrates. *J. Gen. Microbiol.* 71: 149-157.
- 76.- Ottow, J. C. G. 1975. Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. *Annu. Rev. Microbiol.* 29: 79-108.
- 77.- Paradis, S. E., Dubreuil, D., Rioux, S., Gottschalk, M., and Jacques, M. 1994. High-Molecular-Mass lipopolisaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infect. Immun.* 62: 3311-3319.
- 78.- Pérez, M. J., Suarez, G. F., Flores, C. R. 1990. *Bacteriología General: Principios Químico biológicos.* Universidad Nacional Autónoma de México. Primera edición. México. 102-105.

- 79.- Perry, M.B., Altaman, E., Brisson, J.R., Beynon, L.M. and Richards, J.C., 1990. Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* strains. Serodiag. Immunother. Infet. Dis., 4: 299-308.
- 80.- Pijoan, C. 1986. Effect of *Pasteurella multocida* and *Haemophilus pleuropneumoniae* toxins on swin alveolar macrophages. Vet. Immunol. Immunopathol. 13: 141-149.
- 81.- Pohl, S., H. U. Bertschinger, W. Frederiksen, and W. Mannheim. 1983. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumoniae to the genus *Actinobacillus (Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and DNA relatedness. Int. J. Syst. Bacteriol. 33: 510-514.
- 82.- Rebers, P. A., Jensen, A. E., and Laird, G. A. 1988. Expression of Pili and Capsule by the Avian Strain P-1059 of *Pasteurella multocida*. Av. Dis. 32: 313-318.
- 83.- Rhen, M., Madela, H., and Korhonen, T. K. 1983. P-fimbriae of *Escherichia coli* are subject to phase variation. FEMS Microbiol. Lett. 19: 267-271.
- 84.- Rosendal, S., Devenish, J., MacInnes, J. E., Lumsden, J. H., Watson, S. and Xun, H. 1988. Evaluation of Heat-Sensitive, Neutrophil-toxic, and Hemolytic Activity of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae*. Am. J. Vet. Reserch. 49: 1053-1058.
- 85.- Sansonetti, P. J., Ryter, P. C., Maurelli, A. T., and Mounier, J. 1986. Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. Infect. Immun. 51: 461-469.
- 86.- Sjostrand, F.S. 1967. Electron Microscopy of Cells and Tissues. 2nd Printing. Academic Press, New York. 138-175, 362-369.
- 87.- Smyth, C., Jonsson, P., Soderlund, E., Rosengren, J., Hjerten, S., and Wadstrom, T. 1978. Differences in hydrophobic surface characteristics of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* with and without K88 antigen as reveled by hydrophobic interacción chromatography. Infect. Immun. 22: 462-472.
- 88.- Spears, P. A., Schauer, D., and Orndorff, P. E. 1986. Metastable regulation of type 1 piliation in *Escherichia coli* and isolation and characterization of a phenotypically stable mutant. J. Bacteriol. 168: 179-185.

- 89.- **Stephens, d. S., Krebs, J. W. and McGee, Z. A.** 1984. Loss of pili and decreased attachment to human cells by *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* exposed to subinhibitory concentrations of antibiotics. *Infect. Immun.* **46**: 507-513.
- 90.- **Tennent, J. M.** 1990. Genetics of Adhesin Expression in *Escherichia coli*. In: Barbara H. Iglewsky, and Virginia L. Clark (Editors), *Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis*. 80-110.
- 91.- **Utrera, V., Pijoan, C.** 1991. Fimbria in *A. pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. *Vet. Record.* **128**: 357-358.
- 92.- **Weiss, R. L.** 1971. The structure and occurrence of pili (Fimbria) on *Pseudomona aeruginosa*. *Gen. Microbiol.* **67**: 135-143.
- 93.- **Woods, D. E.** 1988. Bacterial Colonization of the Respiratory Tract: Clinical Significance. In: J. E. Pennington (Editor), *Respiratory Infection: Diagnosis and Management*. 2nd Edition. Raven Press. New York. 34-40.
- 94.- **Zhang, J. M., Cowell, J., Steven, A. C., Carter, P. H., McGrath, P. P., and Manclark, C.** 1985. Purification and Characterization of Fimbria Isolated from *Bordetella pertusis*. *Infect. Immun.* **48**: 422-427.