



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO**

---

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

**“ADHERENCIA *IN VITRO* DE *Actinobacillus seminis* A  
CÉLULAS EPITELIALES DE ÓRGANOS DEL APARATO  
REPRODUCTOR DEL CARNERO”**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**PATRICIA KARINA VICENTE CASTILLO**

**TUTOR PRINCIPAL: JORGE LUIS TÓRTORA PÉREZ**

**COMITÉ TUTORAL: VICTOR R. TENORIO GUTIÉRREZ**

**EFRÉN DÍAZ APARICIO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## INDICE

CONTENIDO	PAGINA
Introducción	2
Etiología	2
Transmisión y Patogenia	6
Cuadro clínico y lesiones	7
Mecanismos de patogenicidad	8
Colonización y adherencia	8
Justificación	12
Hipótesis, objetivos	13
Materiales y métodos	14
Resultados	17
Discusión	26
Conclusiones	28
Bibliografía	29

## I.- INTRODUCCION

La epididimitis ovina puede ser definida como una enfermedad infecciosa, transmisible, de los carneros en la cual la principal lesión es la inflamación del epidídimo. Los dos microorganismos frecuentemente asociados con esta condición son *Brucella ovis* y *Actinobacillus seminis*. La epididimitis ha sido considerada una causa importante de infertilidad en carneros desde hace muchos años (Burgess, 1982).

Varios bacilos pleomórficos Gram negativos, están asociados con la epididimitis contagiosa y la infertilidad en carneros: *Actinobacillus seminis*, , *Histophilus somni*, *Manhemmia haemolytica* y *Brucella ovis*, además de bacterias Gram positivas *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Staphylococcus spp*, y *Streptococcus spp* (De la Puente- Redondo *et al*, 2000).

La epididimitis por *A. seminis* también conocida como de los “corderos vírgenes” afecta carneros de 6 a 15 meses de edad, tiene alto impacto económico en productores de pie de cría que producen carneros con fines reproductivos, los corderos infectados que desarrollan la enfermedad primero, reducen su fertilidad y finalmente resultan estériles (Hwang *et al.*, 1989).

*A. seminis* puede provocar la pérdida de hasta el 20% de los posibles reemplazos, durante el primer año de vida, aunque normalmente esta pérdida es algo más baja. Es importante considerar que *A. seminis* ha sido aislado hasta en el 13.8% de carneros que no presentaban lesiones clínicas en el epidídimo, el testículo o alteraciones seminales, por lo que se considera que la infección puede encontrarse en estado latente o incluso ser la bacteria un comensal oportunista que en ciertas condiciones es capaz de inducir la lesión del tracto reproductor del macho, por lo que los animales infectados pueden ser considerados portadores asintomáticos (Acosta y Tórtora, 2002).

### 2. Etiología.

Desde el primer aislamiento del *Actinobacillus seminis* realizado en 1960 por Baynes y Simmons, a partir de casos de Epididimitis en carneros, la bacteria se describe como un bacilo pleomórfico, Gram negativo, de 1 µm x 1-

4  $\mu\text{m}$ , inmóvil y sin presencia de endoesporas. El crecimiento óptimo ocurre cuando es incubado en una atmósfera de 10% de  $\text{CO}_2$  y 37° de temperatura, su crecimiento se ve favorecido con el agregado de sangre o suero. Luego de 24 horas se observan colonias del tamaño de la cabeza de un alfiler, que a las 48 horas alcanzan un diámetro de 1-2 mm, de color gris blanquecino, convexas, redondeadas con márgenes enteros, a los cuatro días adquieren un diámetro mayor de 3 mm y muestran estriaciones radiales (Burgess, 1982).

Las características bioquímicas de *A. seminis* incluyen ser catalasa positivo, oxidasa negativo, nitrato negativo, indol negativo y presentar pobre fermentación de la glucosa (Low *et al.*, 1995). En estudios de microscopía electrónica no se observan esporas, cápsula, ni *pili* en las cepas evaluadas (Sponenberg *et al.*, 1983).

En la utilización del sistema APIZYM (método comercial de identificación microbiológica), se constatan grandes similitudes entre *A. seminis* y *H. somni*. La cepa de referencia de *A. seminis* (ATCC15768) se caracteriza por resultar positiva a las siguientes reacciones del sistema: 2-fosfatasa alcalina, 4-esterasa C4, 6- Leucine arylamidasa, 11- fosfatasa ácida, 12- fosfoamidasa y 15-  $\beta$  glucoronidasa (Acosta, 2001).

*Actinobacillus seminis* ha sido aislado, en casos de epididimitis, de muestras de semen y de epidídimo en Australia (Baynes y Simmons, 1960), Nueva Zelanda (Ekdahl *et al.*, 1968), Estados Unidos de Norte América (Livingston y Hardy, 1964), Sudáfrica, Reino Unido, Kenia y más recientemente en España (De la Puente Redondo *et al.*, 2000). En México existen reportes de casos de epididimitis por esta bacteria desde 1986, donde se aisló del epidídimo de un carnero del estado de Hidalgo, posteriormente Oviedo *et al.*, 1988, aislaron el patógeno en carneros del Estado de México, en estos dos reportes sin embargo la identificación del agente se realizó por pruebas bioquímicas. Recientemente Méndez *et al.*, 1999, aislaron la bacteria y confirmaron el diagnóstico en pruebas de IDD con la utilización de antígenos sonicados, comprobando la existencia de identidad antigénica con la cepa de referencia ATCC 15768 (Acosta, 2001).

*A. seminis* también se ha aislado de fetos abortados y de úteros después del aborto en ovejas Dorper en Sudáfrica (Van Tonder, 1973). Recientemente se ha relacionado en el Reino Unido con abortos en ovejas ocurridos dos semanas antes del comienzo de las pariciones. Los fetos presentaban pocos cambios postmortem indicando que la muerte se produjo poco antes del mismo. En las placentas se encontraron amplias adherencias y necrosis cotiledoniana, se descartaron otras causas del aborto (*Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Brucella spp.*, *Chlamydia* y *Toxoplasma*) y los aislamientos se lograron del contenido estomacal de los fetos (Foster *et al.*, 1999). Se le ha relacionado con casos de poliartritis y postitis en borregos (Watt *et al.*, 1970). También fue encontrado en semen normal de bovino (Van Tonder y Bolton, 1970); y se ha inducido mastitis necrótica aguda luego de la inoculación intracisternal en ovinos. Estas observaciones señalan a *A. seminis* como una bacteria propia del ambiente de cría ovina, capaz de inducir o asociarse a distintas condiciones patológicas. (Watt *et al.*, 1970; Alsenosy y Dennis, 1985).

Baxendell, citado por Jackson y White, 1982, señala a *A. seminis* como uno de los microorganismos de importancia en la producción de epididimitis en caprinos, sin importar su condición, presentándose en machos adultos de cualquier edad. Ekdal *et al.*, 1968, aislaron microorganismos semejantes a *A. seminis* en el semen de casos de epididimitis, pero no aislaron la bacteria de las lesiones en la necropsia, estos autores proponen que las lesiones encontradas pudieron ser provocadas por otros microorganismos, y que *A. seminis* se encontraría sólo en glándulas anexas. Sin embargo el hallazgo repetido en semen de *A. seminis* y bacterias semejantes a *A. seminis* sugiere fuertemente su papel en la etiología de la epididimitis tanto clínica como subclínica (Acosta, 2001).

Para la demostración de *A. seminis* en semen se ha empleado la inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos policlonales. Esta técnica es considerada, altamente específica, lográndose la identificación del patógeno en forma clara con la ayuda adicional de su característico pleomorfismo (Ajai *et al.*, 1980).

Las pruebas de inmunodifusión de *A. seminis* muestran reacciones cruzadas, por la presencia de antígenos comunes, con *H. haemoglobinophilus* y los integrantes del grupo *Haemophilus – Histophilus somni* (*H. somnus*, *H. agni*, *H. ovis*) (Stephens *et al*, 1983).

Las muestras de sangre de animales infectados experimentalmente presentan anticuerpos contra *A. seminis* que fijan el complemento a los 14 días postinfección, con una persistencia de 35 días. Los títulos mayores o iguales a 1:20 se consideran positivos, los títulos 1:10 se consideran dudosos, pero también se encontró que animales de los cuales se aisló *A. seminis* del semen, no presentaban títulos detectables por fijación del complemento (Baynes y Simmons, 1960).

Se han desarrollado pruebas de ELISA utilizando antígenos de *A. seminis* completo y sonicado. Los títulos obtenidos con el antígeno completo fueron menores que los obtenidos con células sonicadas (Cárdenas y Maky, 1986). También se han desarrollado pruebas de ELISA empleando como antígeno el LPS, preparado por autoclavado y centrifugación (Tekes y Hajtos, 1990).

Al estudiar los perfiles proteicos de la membrana externa por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), se encontró homogeneidad en las bandas de la cepa de referencia *A. seminis* (ATCC 15768) y de un aislamiento de campo realizado en Australia, los perfiles proteicos de la membrana externa de *H. somni*, *H. ovis* e *H. agni* fueron similares, pero no idénticos a los de *A. seminis*, en cambio los perfiles de *H. haemoglobinophilus*, *H. influenzae* y *A. lignierensis* resultaron diferentes entre sí y con los anteriores (Stephens *et al.*, 1983). Estos resultados soportan las diferencias entre estas especies, durante mucho tiempo discutidas como distintas, al mismo tiempo que subrayan la necesidad de asegurar la especificidad de los antígenos que se emplean en las pruebas serológicas para su identificación.

Recientemente, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ribotipo se ha utilizado para la identificación rápida y establecer diferencias con otros géneros bacterianos. El PCR con base en elementos palindrómicos, repetitivos extragénicos (REP) y PCR consenso enterobacterial repetitivo intergénico (ERIC), se han descrito para distinguir *A. seminis* de otros microorganismos cercanamente relacionados (De la Puente- Redondo, 2000).

### **3. Transmisión y Patogenia.**

La intervención de las hembras en la transmisión de la enfermedad no ha sido claramente establecida. Sin embargo la detección de *A. seminis* en borregos después del destete y la presencia del patógeno en las muestras cervicales en el 38% de la hembras de una explotación con problemas de epididimitis, sustenta la posibilidad de la transmisión a partir de la madre en el momento del parto. La transmisión oral a través de la leche fue sugerida en 1985 por Alsenosy, ya que la bacteria fue encontrada en leche 9 días posinfección experimental, pudiendo resultar en una infección latente en los corderos. También se sugiere como medio de transmisión a la actividad homosexual cuando los carneros se aproximan a la pubertad, o la vía venérea durante la época de monta (Heath *et al.*, 1991).

Investigar la patogenia de la enfermedad se ha dificultado debido a que *Actinobacillus seminis* parece ser un componente transitorio de la microbiota genital ovina y probablemente sólo es un patógeno oportunista, hasta ahora los postulados de Koch no se han podido satisfacer al intentar reproducir la enfermedad en carneros, no hay un modelo animal disponible, tampoco se ha logrado un modelo *in vitro* (Hwang *et al.*, 1989).

Por lo anterior la patogenia de la epididimitis es incierta, Jansen sugiere que *A. seminis* es un microorganismo ambiental que invade la cavidad prepucial y es capaz de ascender hacia las partes profundas del tracto genital y establece que la infección se presenta en animales jóvenes, más vigorosos y de mayor velocidad de crecimiento (Jansen, 1983).



La bacteriemia no ha sido demostrada y la información disponible apunta a que la bacteria realiza una migración retrógrada por la uretra, desde la mucosa peniana y prepucial, para alcanzar las glándulas anexas y por último, el epidídimo. Persiste la duda si este agente se comporta como patógeno primario o se trata de un patógeno secundario, ya que en muchas oportunidades se le encuentra asociado con *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Actinomyces pyogenes* (Acosta y Tórtora, 2002).

#### **4. Cuadro clínico y Lesiones**

En algunos casos de orquitis severa y epididimitis se presenta pirexia, anorexia y depresión, ocasionalmente la infección es fatal. En otros casos, la infección se presenta solo en forma subclínica con la presencia de neutrófilos en el semen (Sponenberg, 1983; Heath *et al.*, 1991)

El cuadro clínico- patológico de epididimitis no es específico y no permite distinguir entre los posibles agentes causales. El proceso inicia con rubor escrotal, distensión del saco escrotal, el escroto se puede ver tumefacto y con dolor al tacto, por lo cual los animales presentan dificultad para caminar o lo hacen en forma rígida. En otros casos se aprecia el calor y el aumento de tamaño del testículo y el epidídimo afectado, generalmente en forma unilateral; que luego evoluciona al agrandamiento permanente de la cola del epidídimo, con fibrosis y obstrucción de la luz del epidídimo, que resulta en éstasis espermática. En el proceso inflamatorio ocurre la rotura de la pared tubular y el contacto de los espermatozoides con el sistema inmunitario, con la formación de granulomas espermáticos como lesión característica. La participación de estos procesos autoinmunes en el cuadro de epididimitis es el componente que determina el carácter progresivo e irreversible del proceso de lesión, que culmina con la esterilidad del animal (Acosta y Tórtora, 2002).

Cuando se realiza la necropsia o la castración de los carneros afectados en forma aguda, al incidir el escroto, el subcutáneo y la túnica vaginal se muestran marcadamente congestivos y edematosos. La túnica vaginal aparece adherida, congestiva y en muchos casos cubierta por depósitos de fibrina. En

estos casos los testículos comúnmente se encuentran de tamaño normal y los epidídimos están agrandados y firmes (Baynes y Simmons, 1960).

## **5. Mecanismos de Patogenicidad**

La patogenicidad microbiana, depende de mecanismos estructurales y bioquímicos de los microorganismos. Entre los componentes estructurales de las células bacterianas se consideran: cápsulas, fimbrias, lipopolisacárido (LPS) u otros componentes de la pared celular y entre los mecanismos bioquímicos la secreción activa de sustancias que pueden dañar el tejido o protegen a la bacteria de los mecanismos de defensa del hospedero. La infección puede implicar colonización, multiplicación, invasión o persistencia de un patógeno sobre o en el hospedero. Hay dos cualidades fundamentales por medio de las cuales las bacterias pueden causar enfermedad: invasión y producción de toxinas (Kenneth, 2002). Para el desarrollo de una enfermedad bacteriana es necesaria la localización de la bacteria en un ambiente adecuado para su establecimiento, replicación y expresión de sus factores de patogenicidad (Figueroa y Verdugo, 2005).

## **6. Colonización y adherencia**

La supervivencia de un microorganismo en las mucosas depende fuertemente de su habilidad para adherirse, las adhesinas de la bacteria tienen una estructura que les permite reconocer receptores moleculares presentes en las células del hospedero, con una estereoquímica específica (Figueroa y Verdugo, 2005). La adherencia provee a la bacteria de la habilidad de evadir los mecanismos de defensa de las superficies mucosas (Jacques y Paradis, 1998).

La adherencia a tejidos es considerada un importante prerrequisito para la colonización y la manifestación de enfermedad. La adherencia permite que ocurra la colonización y que la bacteria ejerza sus efectos patógenos. Se han descrito varias estructuras de superficie en la familia *Pasteurellacea* involucrados en la adhesión, incluyendo cápsula, fimbria, lipopolisacáridos y proteínas de membrana externa (Van Overbeke *et al.*, 2002).

Las bacterias patógenas necesitan en el proceso de colonización, del establecimiento de una relación fuerte y estable, entre las adhesinas de la superficie bacteriana y los receptores celulares. Esta unión determina a los hospederos susceptibles y el organotropismo de la bacteria; además, las adhesinas tienen la capacidad de activar a linfocitos B y neutrófilos, lo que resulta en una variedad de respuestas biológicas incluyendo proliferación celular y secreción de citocinas (Sellwood *et al.*, 1975).

La adhesión bacteriana puede inducir cambios en la célula receptora, originalmente para las cepas enteropatógenas de *E. coli*, se describieron cambios en el citoesqueleto que inducían malformaciones de superficie, estos cambios son demostrables con técnicas fluorescentes y se conocen como prueba de FAS (Fluorescent- Actin Staining). Esta prueba es de las más utilizada para la detección y visualización de la lesión de adherencia y pérdida de microvellosidades (efacelación) A/E (Attaching / Effacing), consecuente a la adherencia bacteriana sobre las células intestinales del hospedero, con cambios en su citoesqueleto. La habilidad de causar esta lesión en las células de la mucosa del intestino, fue identificada como un factor de patogenicidad importante en las cepas de *Escherichia coli* enteropatógenas (EPEC) y enterohemorrágicas (EHEC). La lesión AE es generada por la unión íntima de la bacteria a los enterocitos, lo cual es seguido por la agregación del citoesqueleto de actina y el “rasurado” de las microvellosidades. La agregación del citoesqueleto causada por esta lesión de las cepas de *E. coli*, resulta en un cuadro típico de daño tisular el cual puede ser visualizado por una tinción fluorescente de actina (Beutin *et al.*, 2003).

En general, las adhesinas de bacterias Gram negativas son: fimbria, fibrilla, flagelo, lipopolisacárido (LPS), cápsula y Proteínas de membrana externa (OMP) (Figuroa y Verdugo, 2005). En el caso de *Actinobacillus seminis* carece de flagelo.

Pili o fimbrias: Un pilus se constituye básicamente por una secuencia ordenada de subunidades proteicas de pilina que forman una estructura cilíndrica. Los *pili* son largos, flexibles y se extienden hacia el exterior de la superficie bacteriana para interactuar con la célula hospedadora, pueden encontrarse distribuidos en todo el perímetro microbiano o en alguna zona

específica. Las puntas de los *pili* median la adherencia uniéndose a ciertas moléculas ubicadas sobre la superficie de las células; por lo general estos receptores de las adhesinas fimbriales corresponden a carbohidratos, glicoproteínas o glicolípidos, cuya función primaria consiste en mantener unidas a las células de los tejidos. La unión de los *pili* a su célula “blanco” es tan específica, que los receptores presentes en los tejidos del hospedador determinan el tipo de bacterias que colonizan la zona implicada. En algunos casos, la unión específica entre el carbohidrato superficial de la célula hospedadora y el extremo distal del pilus depende de otras proteínas localizadas precisamente en la punta de la fibrilla; no obstante; numerosas reacciones de adhesión se basan en la participación directa de la pilina (Garza *et al.*, 2000).

Las fimbrias inicialmente se clasificaron de acuerdo a su morfología y patrón de hemoaglutinación, posteriormente se encontraron fimbrias que no entraban en ese esquema. El tipo 1, refiere a fimbrias que son rígidas y exhiben una hemoaglutinación sensible a la manosa; el tipo 2 se relaciona serológicamente al tipo 1 pero no causa hemoaglutinación; el tipo 3 es resistente a la manosa, flexible y común en las *Enterobacteriaceae*; el tipo 4 posee N- metilfenilalanina en la región aminoterminal de la subunidad mayor; y las del tipo 5 son sensibles a la manosa y delgadas como las del tipo 1 (Ofek y Doyle, 1994).

Lipopolisacárido (LPS): Son largas estructuras de polisacáridos, consistentes en unidades repetidas de tri o tetrasacáridos, presentes en las bacterias Gram negativas. Puede mediar la interacción de las bacterias con las células fagocíticas (Ofek y Doyle, 1994). Estas moléculas grandes y complejas contienen tanto lípidos como hidratos de carbono y están formadas por tres partes: 1) lípido A, 2) polisacárido central o *core* y 3) cadena lateral O. La región del Lípido A contiene dos derivados del azúcar glucosalina, se encuentra inserto en la membrana externa, mientras que el resto de la molécula del LPS sobresale de la superficie, el *core* se encuentra unido al lípido A, la cadena lateral o antígeno O es una cadena de polisacáridos, que varían según la cepa bacteriana. El LPS contribuye a la carga negativa de la superficie bacteriana,

facilita la estabilización de la estructura de la membrana. El lípido es tóxico, y el LPS actúa como endotoxina cuando estas bacterias son degradadas o destruidas (Prescott *et al.*, 2004). El LPS en *A. seminis* según Tekes y Hajtos, 1990, no es el antígeno más apropiado para detectar una infección genital subclínica

Debido a que se ha establecido que la adhesión bacteriana a las células es una interacción específica entre adhesinas de la superficie bacteriana y moléculas de la membrana celular en una característica ligando-receptor. La interacción entre la adhesina y receptor puede ser bloqueada cuando ocurre una interferencia estérica entre la adhesina y receptor o el organismo no es viable (Healey *et al.*, 1990).

### **6.1 Adherencia de *Actinobacillus seminis*.**

Teniendo en cuenta que la capacidad de adhesión a mucosas es esencial para determinar la virulencia de muchas bacterias y significa el paso inicial en la patogénesis de muchas enfermedades, Healey *et al.*, 1991, desarrollaron un modelo para comprobar la adhesión de *A. seminis* a la línea celular de células epiteliales de riñón de bovino y la inhibición de la misma por el uso de anticuerpos policlonales, con resultados positivos. Es posible en consecuencia, que *A. seminis* se adhiera a la mucosa del tracto reproductor por adhesinas de superficie que se asocien a receptores específicos de las células epiteliales.

Enríquez *et al.*, 2003 demostraron la adhesión *in vitro* de *A. seminis* a fibrinógeno, observando que la bacteria se adhiere a partir de una concentración de 0.05 µg (8.1%), que se incrementa hasta 50 µg (100%). La unión inicia a los 5 minutos, saturándose a las 2 horas. Posteriormente para caracterizar la naturaleza química de la adhesina, observaron que la N acetil galactosamina, la glucosa, la galactosa y la manosa, inhibieron la adhesión en un 50%, la N acetil glucosamina un 84%, el LPS un 60%, la Proteinasa K y la Tripsina un 95%, la lizosima un 75%, el EDTA y EGTA un 30%. Mientras el CaCl<sub>2</sub> y el ác. periódico aumentaron la unión en un 27 y un 69%. La fibronectina, la hemoglobina, la colágena y el MgCl<sub>2</sub>, no tuvieron efecto, ni

tampoco el agitar en vortex. Por lo que concluyeron que *A. seminis* se une al fibrinógeno por medio de proteínas glucosiladas presentes en la membrana bacteriana.

## 7. Justificación

Una bacteria patógena puede colonizar la mucosa al adherirse a la superficie epitelial, establecerse dentro de las células epiteliales o en el tejido intersticial. Se considera que este proceso es relativamente estable y la unión de las adhesinas bacterianas a los receptores celulares es irreversible. En muchos casos esta unión se da entre proteínas de superficie y moléculas receptoras con carbohidratos, presentes en la membrana de la célula huésped. Sin embargo esta asociación puede ocurrir con otras moléculas.

Hasta el momento no se ha probado si *A. seminis* presenta organotropismo para su adherencia, por las lesiones provocadas en el epidídimo podría ser considerado este el órgano blanco para su establecimiento, por otro lado esta bacteria se ha aislado de las glándulas anexas al aparato reproductor, pudiendo ser este su sitio de colonización. Es por estos motivos que, en este trabajo utilizaremos células epiteliales provenientes de estos órganos del aparato reproductor, para analizar si existe el organotropismo y se realizara *in vitro* para evitar la respuesta defensiva del hospedador.

## HIPOTESIS

*Actinobacillus seminis* tiene mecanismos que le permiten adherirse a los epitelios del tracto reproductor del carnero, esta adherencia puede expresarse *in vitro* en aislados de éstas células

## OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar la capacidad de adherencia *in vitro* de *Actinobacillus seminis* a los epitelios de: epidídimo, ámpulas del conducto deferente, uretra y en la línea celular de células de riñón de conejo RK-13.

Objetivos particulares:

- Definir si el fenómeno de adherencia de *A. seminis* es capaz de inducir cambios en el citoesqueleto de las células afectadas, a través de la prueba de FAS (Fluorescent- Actin Staining).
- Establecer las posibles diferencias en la capacidad de adherencia de la bacteria a los epitelios, según se trate de carneros pre o pospuberales.
- Definir condiciones que puedan bloquear la adherencia en cada caso.

## MATERIALES Y METODOS

### Bacterias

Se utilizó la cepa de referencia de *A. seminis* ATCC 15768 (Healey et al 1985; Cárdenas y Maki 1986; Healey et al, 1988; Scalan et al 1989) y las cepas aisladas en México 866- 9 y 867-9 de un trabajo en proceso, cedidas por el Dr. Jorge Acosta Dibarrat, identificadas mediante el APIZYM y PCR como *A. seminis*.

### Curva de Crecimiento

Las bacterias se cultivaron en medio líquido; Infusión Cerebro Corazón, con incubación en movimiento, en estufa a 37°. De la bacteria incubada en movimiento, se tomaron muestras cada hora, durante 12 horas, se leyó la absorbancia del cultivo como indicador del crecimiento bacteriano. Se graficó la curva de crecimiento por absorbancia, leyendo las muestras a 600nm para determinar en que fase utilizarlas en las pruebas de adherencia, en las horas 2, 4, 5, 6 y 8.

### Muestras de Tejidos

Se tomaron muestras en rastro de cola del epidídimo, ámpulas del conducto deferente y uretra peniana, de siete animales adultos de buena condición corporal, sin lesiones aparentes en los órganos a utilizar y de dos corderos de 3 a 4 meses de edad, a los cuales se realizó la necropsia por haber padecido una infección gastroentérica por lo que se uvo registro de su edad.

Las muestras se colectaron de la manera aséptica, se lavaron con solución salina, y se disecaron intentando eliminar la mayor cantidad de tejido conjuntivo. Los órganos tubulares como uretra y ámpulas, se extendieron para exponer su superficie interna, raspándolos con navaja de bisturí de manera cuidadosa para procurar obtener la mayor cantidad de células epiteliales.

El epidídimo se lavó con PBS dos veces y otras tres veces más con agua destilada para eliminar la mayor cantidad de espermatozoides y se cortó



en trozos, que posteriormente se pasaron por el mortero para su disgregación y poder obtener una cantidad adecuada de células epiteliales.

Las suspensiones celulares obtenidas, se centrifugaron a 6- 10 ° C a 1000 xg (3000 rpm) por 10 minutos y se resuspendieron en solución salina estéril, para la elaboración de los frotis.

#### Elaboración de frotis

Para estandarizar la densidad de células; se evaluaron diferentes concentraciones celulares en la suspensión, empleando densidades desde  $10^5$  a  $10^8$  células por ml, realizando frotis que se tiñeron con Giemsa, verificando que las células quedaran suficientemente dispersas para poder observar y caracterizar los patrones de adherencia bacteriana.

Se tomaron 50  $\mu$ l de la suspensión celular elegida, se extendieron para realizar el frotis en laminillas de vidrio esterilizadas, circulares de 13 mm de diámetro, se secaron y se les agregó metanol absoluto hasta el secado total (Zepeda y González, 1995). Las laminillas fueron colocadas dentro de microplacas de 24 pozos de 15 mm de diámetro, donde se realizaron las pruebas de adherencia.

#### Técnica de FAS (Fluorescent- Actin Staining)

La técnica de FAS (Fluorescent- Actin Staining) es la más utilizada para la detección y visualización de la lesión de adherencia y pérdida de microvellosidades (efacelación) A/E (Attaching / Effacing), (Beutin *et al.*, 2003).

Para la prueba de FAS se utilizaron células de un cultivo celular de riñón de conejo RK-13<sup>1</sup>, cultivadas en MEM, que se colocaron en las microplacas que contenían laminillas para su fijación en el fondo de las mismas, cuando en estas condiciones alcanzaron una confluencia del 70%, se expusieron a una suspensión de  $1 \times 10^6$  UFC/ml de *A. seminis* y se realizó la prueba. Para demostrar los cambios en el citoesqueleto se utilizó una tinción de Faloidina rodamina (Beutin *et al.*, 2003). Como controles positivos se emplearon las

---

<sup>1</sup> Ceditas por el Dr. Guillermo Valdivia de Anda

cepas de *E. coli*, 933 J y la 933 W y como control negativo la cepa K-12 de esta misma bacteria.

#### Pruebas de Adherencia.

Una parte del cultivo se agregó a frotis de células epiteliales obtenidas de la uretra con los cuales se incubaron durante 3 horas, para evaluar su capacidad de adherencia de acuerdo con la etapa de crecimiento y se sembraron cajas con agar sangre para evaluar la viabilidad de la bacteria.

Las pruebas se realizaron en microplacas de 24 pozos, en cada pozo se colocó una laminilla de vidrio sobre la que adhirieron las células en cultivo o los frotis de las células epiteliales obtenidas de uretra, ámpula y epidídimo, fijadas con metanol absoluto. Se realizó una prueba de adherencia de células epiteliales obtenidas de la uretra peniana, utilizando células sin fijar y células fijadas con metanol absoluto, la elaboración de los frotis fue de manera similar a los anteriores.

En todos los casos, a los preparados celulares se les adicionó 1 ml de la suspensión bacteriana de *A. seminis* cepa 866-9 a concentraciones de  $1 \times 10^6$  UFC y se dejó incubar durante tres horas a 37°. Realizando tres repeticiones de cada caso.

Las placas tratadas e incubadas con la bacteria se lavaron con PBS cinco veces, posteriormente se fijaron con metanol, se tiñeron con Giemsa, y se les aplicó resina para su montaje en portaobjetos y su observación microscópica.

La lectura de la adherencia consideró el patrón de distribución de las bacterias sobre la célula: Adherencia **local** (Fotos 3 y7), las bacterias forman acúmulos localizados sobre las células, **agregativa** (Fotos 4, 5 y 8), las bacterias se unen entre si formando cordones que adhieren por el extremo sobre la célula y **difusa** (Foto 6), las bacterias se adhieren individualmente, en diferentes partes de la célula (Beutin *et al.*, 2003). Se consideró positiva la adherencia con solo observar 1 célula con bacterias adheridas, la valoración se realizó contando 100 células y de estas cuantas presentaban bacterias adheridas, para obtener un porcentaje de adherencia.

Se hicieron tres repeticiones de esta prueba para cada animal utilizado.

## Pruebas de Inhibición de la Adherencia

En todas las condiciones, células de cultivo o de órganos, frescas o fijadas, se hicieron en paralelo pruebas de inhibición de la adherencia con D-manosa al 0.1 %, con suero hiperinmune de conejo, plasma seminal y suero de ovinos infectados experimentalmente<sup>2</sup>, en los que se había medido por ELISA la presencia de IgG. El plasma seminal utilizado correspondió a los que presentaron una mayor positividad a la prueba de ELISA es decir tuvieron una mayor concentración de IgG

Los sueros y el plasma seminal utilizados se emplearon sin diluir y en diluciones 1:10, 1:20 y 1:40, para evaluar su efecto.

Se incubó a 37° durante 30 minutos, la suspensión de bacterias con manosa al 0.1% y con los respectivos sueros, antes de agregarlas a los cultivos y los frotis con las células epiteliales de diferente origen, para su incubación de adherencia. Como controles negativos se utilizaron plasma y suero de ovinos sin anticuerpos, de animales controles que no fueron infectados con la bacteria y que fueron evaluados como negativos mediante serología (ELISA) y cultivo seminal (Enríquez *et al.*, 2004, Healey *et al.*, 1991)

Estas pruebas se realizaron con tres repeticiones, para cada caso.

## Análisis Estadístico

Las diferencias de adherencia entre tratamientos se analizaron con el software Statgraphics, con la prueba de Tukey al 95%

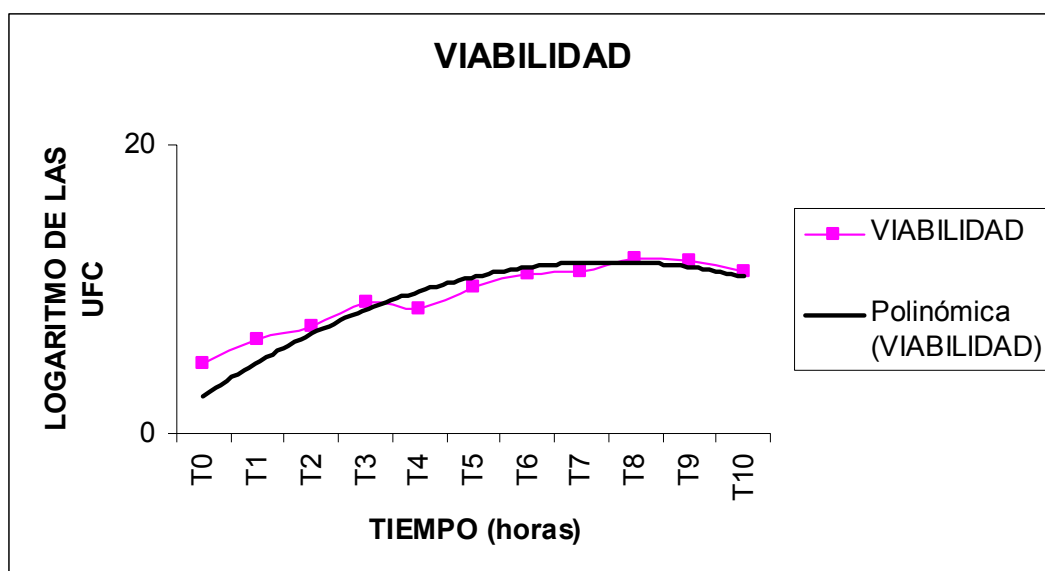
---

<sup>2</sup> cedidos por el Dr. Jorge Acosta Dibarrat

## RESULTADOS

Considerando el comportamiento de la bacteria en las pruebas de crecimiento, viabilidad y adherencia, se consideró que el mejor tiempo para utilizarla en las pruebas de adherencia sobre diferentes muestras, era el de 6 horas de incubación, en que se demostró una absorbancia de 0.724, leída a 600nm y buena viabilidad ( $1 \times 10^6$  UFC por ml), (Gráfica 1). A partir de las 6 horas de cultivo, el crecimiento de la bacteria se detuvo y empezó a haber muerte bacteriana.

Se calcularon las graficas de crecimiento y la viabilidad de todas las cepas disponibles, no se observaron diferencias entre ellas por lo que se eligió solo a una para realizar las pruebas de adherencia, siendo elegida la 866-9.



**GRAFICA 1.** Curva de crecimiento y Viabilidad. El gráfico muestra, con corrección logarítmica, las UFC de *A. seminis* en los diferentes tiempos de crecimiento.

Los mejores frotis en término de cantidad y adecuada distribución de células para evaluar la adherencia, se lograron con las suspensiones celulares con una concentración de  $10^8$  células por ml.

El cuadro 1, resume los resultados de las pruebas de adherencia de *A. seminis* a células epiteliales de uretra de ovino fijadas. En estos frotis se observaron dos tipos celulares dominantes, uno constituido por células de

bordes irregulares, cortados, enucleadas y de aspecto escamoso; el otro por células nucleadas, de bordes bien definidos y de citoplasma más basófilo. Fue evidente una mayor afinidad de la bacteria a las células de morfología escamosa que se veían llenas de bacterias, que a las células nucleadas que presentaban pocas bacterias adheridas.

**Cuadro 1.** Resultados de la prueba de adherencia de *Actinobacillus seminis*, con diferentes tiempos de cultivo a frotis de células epiteliales fijadas de uretra de ovino.

Frotis incubados 3 horas con la cepa 866-9 de <i>A. seminis</i>	Células con adherencia (%)	Patrón de adherencia
A (incubado con T2)	a) 20% b) 85%	a y b) AD
B (incubado con T4)	a) y b) 100% adherencia	AL
C (Incubado con T5)	a) y b) 100%	AD
D (Incubado con T8)	a) 1% b) 100%	a) AL b) AD

Los incisos a) y b) se refieren a los dos tipos celulares encontrados en la uretra vistos en el Microscopio Óptico, siendo a) las células nucleadas y b) las células de tipo escamoso que no presentaban núcleo.

En el cuadro 2, se resumen los resultados obtenidos al utilizar células de riñón de conejo RK-13 y exponerlas a *A. seminis*, las tres cepas ensayadas mostraron adherencia de tipo local y agregativa (fotografías 3 y 5) y resultaron positivas en la demostración de FAS. *A. seminis* fue capaz de adherir y polimerizar la actina del citoesqueleto de estas células y la respuesta positiva permitió que se visualizaran puntos fluorescentes, como se muestra en las fotografías 1 y 2, en forma equivalente a los controles positivos realizados con las cepas de *E. coli*.

**CUADRO 2.** Resultados de adherencia sobre células de riñón de conejo RK-13 y de la prueba de FAS

CEPA	FAS	Patrón de Adherencia
A. seminis 867- 9	++	AL Y AA
A. seminis 866-9	++	AL Y AA
A. seminis ATCC	++	AL
E. coli 933 J	++	AL
E. coli 933 W	++	AL
E. coli K- 12	----	----

---- Negativo a la prueba

++ Alta positividad en prueba de FAS

AL Adherencia Local

AA Adherencia Agregativa

Foto 1

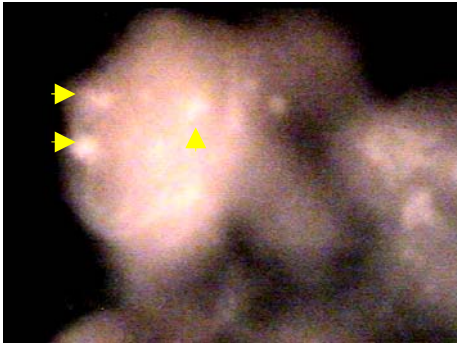
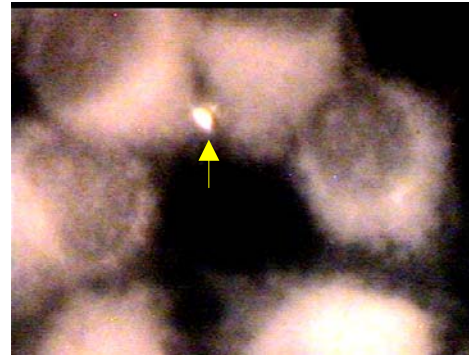


Foto 2



Las flechas señalan la fluorescencia, puntos de la polimerización de la actina, que corresponden a los sitios donde están adheridas las bacterias. En la foto 1 se trata de *A. seminis* 866-9 y en la 2 *E. Coli* 933W

### PATRONES DE ADHERENCIA

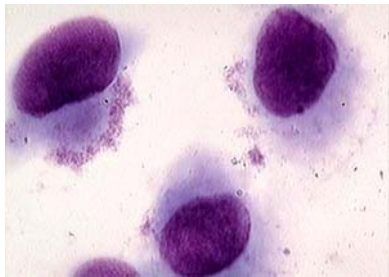


Foto 3. Células RK-13 con adherencia local Agregativa



Foto 4. Célula RK-13 con A.

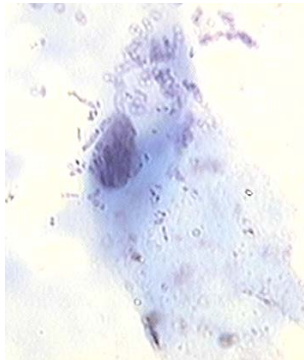


Foto 5. Célula de uretra con Adherencia Difusa

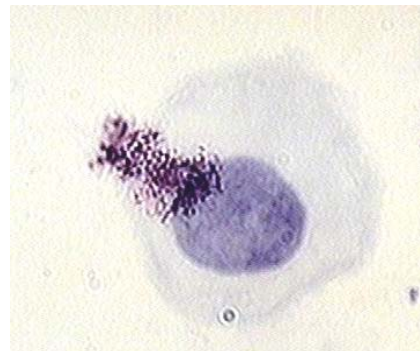
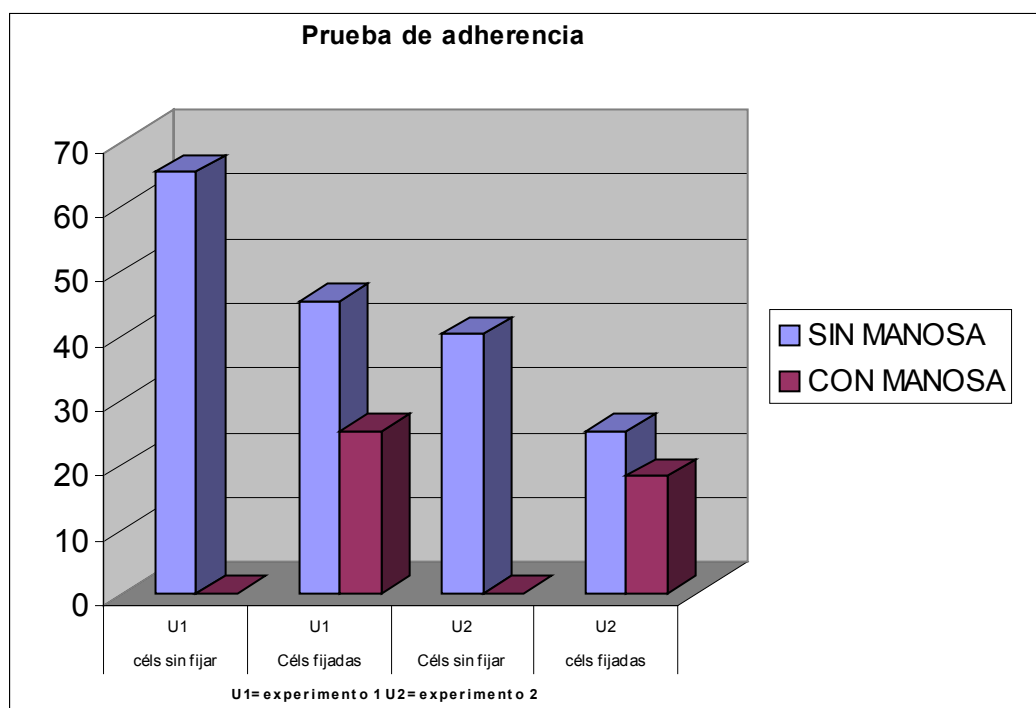


Foto 6. Célula de uretra con Adherencia local



Foto 7. Célula de uretra con adherencia Agregativa

En el ensayo realizado probando la adherencia de *A. seminis* cepa 866-9 en células de uretra frescas y fijadas, la adherencia fue mayor en las células no fijadas (frescas) (Gráfica 2). El análisis de adherencia por órganos con células fijadas demostró por su parte que la adherencia fue significativamente mayor en las células de cultivo RK-13, en las de uretra y en ampulla del deferente, que en las células del epidídimo ( $p < 0.05$ ) (Gráfica 3).

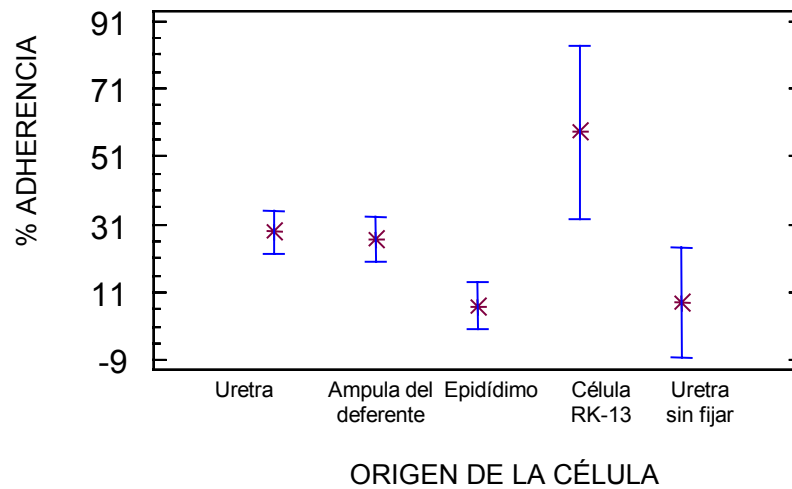


**Gráfica 2.** Prueba de Adherencia en células epiteliales de uretra peniana de ovino, fijadas y no fijadas con metanol absoluto y el efecto de la D-manosa en la inhibición de la adherencia.

En las células de uretra no fijadas con el metanol (frescas), la manosa al 0.1% si bloqueó la adherencia de *A. seminis*, sin embargo este mismo tratamiento no logro inhibir la adherencia a las mismas en las células fijadas. En contraparte los sueros positivos contra *A. seminis* (conejo y carnero) y el plasma seminal positivo, inhibieron la adherencia en ambos tipos celulares (fijadas y no fijadas). Los sueros y el plasma seminal negativos, sin anticuerpos contra la bacteria, controles negativos, no inhibieron la adherencia bacteriana a ninguno de los tipos celulares ensayados ( $p < 0.05$ ).

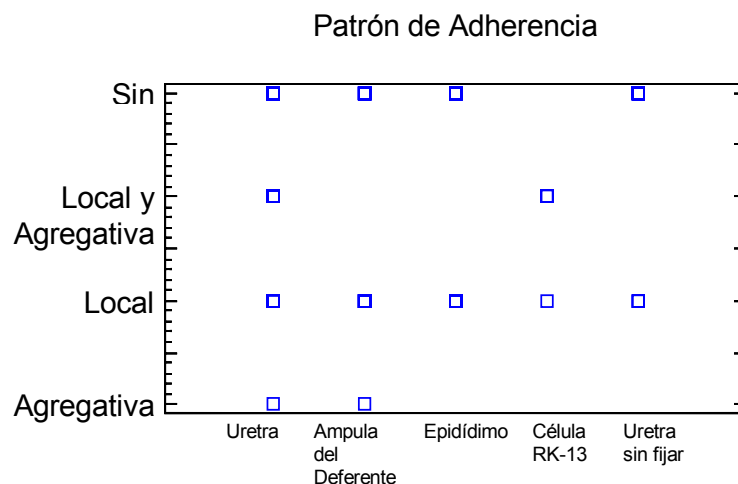


### Comparación de la Adherencia

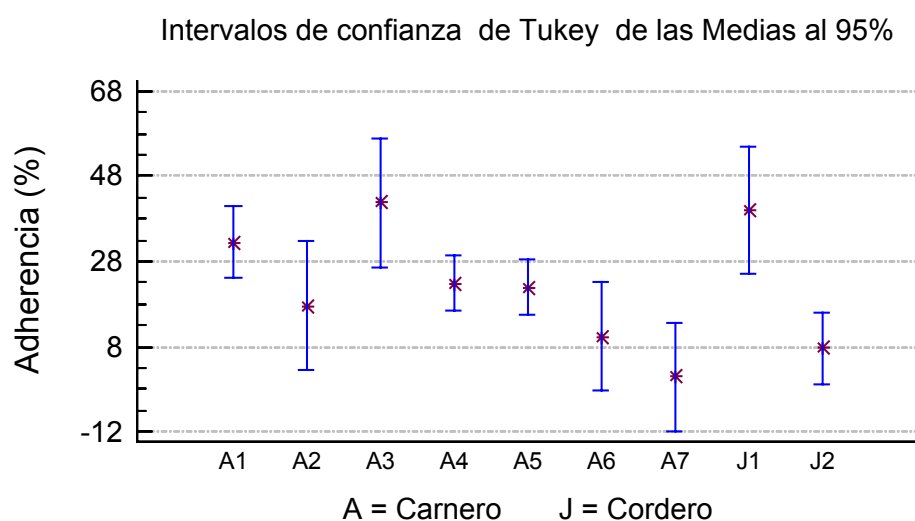


**Grafica 3.** Comparación del porcentaje de adherencia entre las células epiteliales de diferente origen.

Al comparar los patrones de adherencia, se observó que en las células de uretra fijada y células RK-13 se presentó adherencia local y agregativa de manera simultánea y por separado como el ámpula del deferente, mientras que en las células de epidídimo solo ocurrió adherencia local (Gráfica 4)



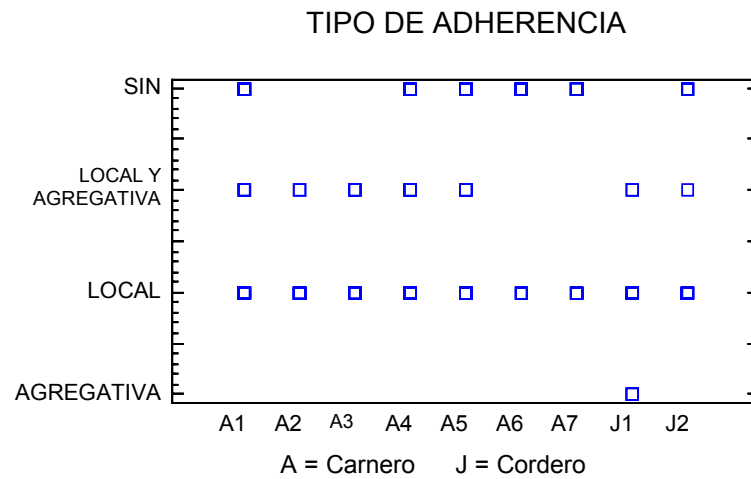
**Gráfica 4.** Comparación del Patrón de Adherencia dependiendo del origen de la célula epitelial.



**Gráfica 5.** Gráfica de las medias obtenidas al comparar el Porcentaje de adherencia, dependiendo de la edad del animal.

Al analizar la adherencia en base a la edad del ovino del que se obtuvieron las células para la realización de los frotis, no se encontró diferencia significativa por grupo de edad corderos y carneros pospuberales en los porcentajes de adherencia (Gráfico 5) y tampoco se presentaron cambios relevantes en el tipo de adherencia (Gráfica 6). Sin embargo, en el examen

individual los animales, los identificados como A3 (pospuberal) y J1 (cordero) mostraron un porcentaje mayor de adherencia ( $p < 0.05$ ).



**Grafica 6.** Comparación del patrón de Adherencia, dependiendo de la edad del ovino del que se tomaron las muestras.

## DISCUSION

Se ha demostrado la capacidad de *A. seminis* de adherir a matrices extracelulares, de fibrina (Enríquez *et al.* 2004) sin embargo esta capacidad solo resultaría útil a la bacteria en aquellos casos en que otras situaciones patológicas determinen lesión en la mucosa, incluido el epitelio y promuevan la formación de una trama de fibrina. Este mecanismo de adhesión, implicaría en la patogenia de la enfermedad, que la bacteria requeriría de un proceso inflamatorio previo, con exudado fibrinoso en superficie de la mucosa para poder colonizar el tracto. Estos procesos por si mismos podrían inducir respuestas autoinmunes y *Actinobacillus seminis* podría en estos casos, ser solo un complicante secundario.

Los resultados de este trabajo demuestran que la bacteria sería capaz de establecerse y colonizar, la mucosa del aparato reproductor del carnero, independientemente de su edad, lo que explicaría su presencia aún en animales jóvenes y sanos. Aunque se usaron pocos animales, se puede apreciar que los animales A3 (Adulto 3) y J1 (Carnero 1) que mostraron una susceptibilidad mayor al compararlos con los de más individuos. (Grafica 4), sin considerar la edad de los mismos.

El que el porcentaje de adherencia fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ), en la uretra y el ámpula del conducto deferente, que en el propio epidídimo, soporta la propuesta de Jansen, 1983, de que la bacteria se establece en las partes bajas del tracto genital del macho desde donde es capaz de ascender a las partes profundas del mismo. Por otra parte, las células del epidídimo, pese a ser el órgano blanco perceptible en la enfermedad, demostraron menor capacidad de adherencia, esto puede deberse a que la bacteria necesite de alguna sustancia presente en el fluido seminal que le facilite la adherencia. Acosta *et al.*, 2006, al intentar reproducir la enfermedad mediante la inoculación de la bacteria por vía intrauretral e intraepididimal, la logran recuperar del semen, pero no de forma constante de los distintos órganos del aparato reproductor, incluido el epidídimo lesionado. Sin embargo encuentran en forma relativamente constante lesiones sugestivas de la enfermedad sólo en las glándulas anexas y es en estas mismas glándulas de

donde se obtiene el mayor número de aislamientos al sacrificio, concluyendo que el ámpula del deferente y las vesículas seminales podrían actuar como refugio de la bacteria en el tracto reproductor, sugiriendo que la bacteria encuentra en las glándulas anexas un nicho más adecuado para mantenerse que en el propio epidídimo inoculado directamente con *A. seminis*. Los resultados de este trabajo, en cuanto la capacidad de adherencia a las células de estos órganos, soportan la posibilidad de que las glándulas anexas ofrecerían condiciones más adecuadas de colonización y permanencia para el microorganismo.

Healey *et al.*, 1991 observaron la inhibición de aproximadamente el 90% de la adherencia de la bacteria a cultivo de células epiteliales de riñón de bovino (BKECs), al incubarla con suero de ratón con anticuerpos policlonales anti *A. seminis* en soluciones sin diluir, en dilución de  $10^{-2}$ , se alcanzó un 90% en la inhibición de la adherencia, la cual disminuyó hasta el 50% cuando se utilizó una dilución de  $10^{-4}$ , el efecto inhibitorio disminuyó progresivamente a mayores diluciones. En este trabajo se obtuvo una inhibición de la adherencia de casi el 100% al utilizar los plasmas seminales y sueros ovinos, con demostrada presencia de IgG anti *A. seminis* por ELISA, sin diluir, con diluciones 1:20 y 1:40 ya no ocurrió el bloqueo de la adherencia.

Enríquez *et al.*, 2004, demostraron que *A. seminis* se adhiere al fibrinógeno biotinilado a partir de los 5 minutos alcanzándose la saturación a las 2 horas, a partir de los 0.05 $\mu$  hasta los 50 $\mu$ g. En este estudio se probó el tiempo de adherencia a las 1, 2 y 3 horas de incubación, alcanzándose la saturación a las 2 horas, siendo en la primer hora de aproximadamente el 25%. Estos procesos de adherencia fueron inhibidos con la adición de manosa, al igual que se demuestra en el presente trabajo. En el experimento en el que usaron células de la uretra sin fijar y fijadas con metanol, se observó que la D-manosa en las células sin fijar, fue capaz de bloquear la adherencia, mientras que en las células fijadas no bloquea la adherencia, esto sugiere que la fijación por el metanol estaría de alguna manera modificando en los receptores celulares glicosilados.

Los resultados en la prueba de FAS, el bloqueo de la adherencia por D-manosa y por sueros y plasma seminal con IgG contra la bacteria, indican fuertemente que la adherencia observada es específica y la posibilidad de la

existencia de al menos dos tipos de receptores para la bacteria, uno de ellos modificaría su comportamiento con la fijación. Esta especificidad en la adherencia sería un elemento para considerar a esta bacteria como un patógeno potencial del aparato reproductor del carnero.

La posibilidad de bloquear "*in vitro*" la adherencia bacteriana mediante anticuerpos, abre una expectativa a las posibilidades del uso de estrategias vacunales en el control de la infección en rebaños afectados, tal como se ha logrado en el caso de *Campylobacter fetus* var. *veneralis* en los toros, empleando una bacterina oleosa.

## CONCLUSIONES

Se demostró la capacidad de *A. seminis* para adherirse *in vitro* a las células de la mucosa del tracto reproductor del carnero, sin distinción de edad entre animales pre y pospuberales.

La mayor adherencia a las células de la uretra y el ámpula del deferente, soporta observaciones previas sobre la posibilidad de que las glándulas anexas actúen como un nicho de persistencia en los animales infectados.

La inhibición de la adherencia con sueros inmunes y la demostración del desarrollo de la prueba de FAS, son elementos sugestivos de la especificidad de lo observado.

Las diferencias observadas entre células de distintos individuos, es un elemento sugerente de que la adherencia podría ser un componente a considerar en la diferente susceptibilidad a la enfermedad.

## BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Acosta D. J. P (2001). Patogenia de la epididimitis en ovinos. Tesis de Maestría en Ciencias. UNAM,.
- ❖ Acosta D. J .P., Tórtora P. J. L (2002). Epididimitis en ovinos. Acontecer Ovino- Caprino. Vol. IV N° 15:36- 40
- ❖ Acosta D. J. P., Díaz A. E., Arellano R. B., Tenorio G. V. R., Tórtora P. J, L. (2006). Inducción experimental de epididimitis en ovinos por inoculación intrauretral con *Actinobacillus seminis*: estudio bacteriológico, serológico e histopatológico. Téc. Pecuaria Méx; 44(2):257-267
- ❖ Ajai C. O., Cook J. E., Dennis S. M. (1980). Diagnosing ovine epididymitis by immunofluorescence. Vet Rec; 107: 421- 424
- ❖ Alsenosy A. M., Dennis S. M. (1985). Pathology of acute experimental *Actinobacillus seminis* mastitis in ewes. Aust Vet J: 62; 234- 237
- ❖ Baynes I. D., Simmons G. C. (1960). Ovine epididymitis caused by *Actinobacillus seminis*. Aust Vet J: 36; 454- 459
- ❖ Boyle E. C., Finlay B. B. (2003). Bacterial pathogenesis; exploiting cellular adherence. Current Opinion in cell Biology, 15: 663-39
- ❖ Burgess G. W. (1982). Ovine contagious epididimitis: a review. Vet Microbiol; 7551-575
- ❖ Cárdenas L., Maky L. R. (1986). Detection of antibody in rams with contagious epididimitis, using the enzyme – linked immunosorbent assay. Am J Vet Res: 47; 738- 739
- ❖ De la Puente- Redondo V. A., García B. N., Pérez M. C., González R. M. C., Rodríguez F. E. F., Gutiérrez M. C. B. (2000). Isolation of *actinobacillus seminis* from the genital tract of rams in spain. J Comp Pathol: 122; 217- 222
- ❖ Ekdahl M. O., Money D. F. L., Martin C. A. (1968). Some aspects of epididymitis of rams in New Zaeland. N Z Vet J: 16; 81- 82
- ❖ Enriquez V. I., Godinez V. D., De la Garza M., Tenorio G. V. (2004). Mecanismo de Patogenicidad: Adhesión *In vitro* de *Actinobacillus seminis* a fibrinogeno. Memorias del XIX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Octubre 24-28. Buenos Aires, Argentina.

- ❖ Figueroa O. I. M., Verdugo R. A. (2005). Mecanismos moleculares de Patogenicidad de *Salmonella*. Rev. Latinoam. Microbiol.; 47 (1-2): 25-42
- ❖ Foster G., Collins M. D., Lawson P. A., Buxton D., Murray F. J., Sime A. (1999). *Actinobacillus seminis* as a cause of abortion in UK sheep folck. Vet Rec: 144; 479- 480
- ❖ Garza V. R., Avalos G. J., Ugalde M. S. M., López L. M. (2002). Principales factores bacterianos que promueven la colonización e invasión de los tejidos humanos. Profesores al Día. Educación Química11 (2). Abril
- ❖ Healey M. C., Hwang H. H., Elsner Y. Y., Johnston A. V. (1991). A model for demonstrating the adhesion of *Actinobacillus seminis* to epithelial cells. Can j Vet Res: 55; 121- 127
- ❖ Heath P. J., Davies J. H., Morgan, Aitken I. A. (1991). Isolation of *Actinobacillus seminis* from rams in the United Kingdom. Vet Rec; 129: 304- 307
- ❖ Hwang H. H., Healey M. C., Elsner Y. Y., Johnston A. V. (1989). Primary culture of ram epididymal epithelial cells. J Tissue Cult Methods: 12; 77- 81
- ❖ Jackson P. G. G., White R. A. S. (1982). Epididymitis in a goat. Vet Rec; 111: 81-82
- ❖ Jansen B. C. (1983). The epidemiology of bacterial infection of genitalia rams. Onderstepoort J Vet Res.; 50: 275- 282
- ❖ Jacques M., Paradis S. E. (1998). Adhesin- receptor interactions in Pasteurellaceae. Fems Microbiol. Rev. Apr; 22(1): 45-59
- ❖ Kenneth Todar University of Wisconsin- Madison Department of Bacteriology. (2002). Mechanisms of bacterial pathogenicity: colonization and invasion.
- ❖ Livinstong C. W., Hardy W. T. (1964). Isolation of *Actinobacillus seminis* from ovine epididymiis. Am j Vet res: 25; 660-663
- ❖ Low J. C., Somerville D., Mylne J. A., Mc Kelvey W. A. C. (1995). Prevalence of *Actinobacillus seminis* in the semen of rams in the United Kingdom. Vet Rec; 136: 268-269



- ❖ Méndez N. G., Díaz A. E., Morales J. F., Aguilar R. F., Suárez G. F. (1999). Epididimitis ovina; estudios bacteriológicos y serológicos. *Vet Mex*: 30; 329- 336
- ❖ Negrete- Abascal E., Reyes E. M., García M. R., Vaca S., Girón A. J., García O., Zenteno E., De la Garza M. (2003). Flagella and motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Bacteriology*. Jan p. 664-68
- ❖ Ofek I., Doyle R. J. (1994). *Bacterial Adhesión to cells and tissues*. Chapman & Hall.
- ❖ Oviedo F. C., Hernández V. C., Hernández G. S., Reyes G. A. (1988). Epididimitis ovina (*Brucella ovis*). Diagnóstico, prevalencia y descripción en el Estado de México. *Memorias del 1er. Congreso Nacional de Producción Ovina*. La Calera, Zacatecas. México. Marzo de
- ❖ Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A. (2004). *Microbiología*. 5ª edición. Mc Graw Hill.
- ❖ Sellwood R., Gibbons R. A., Jones G. W., Rutter J. M. (1975). Adhesión of enteropathogenic *Escherichia coli* to pig intestinal brush borders: the existence of two pig phenotypes. *J Med Microbiol*: 8; 405- 411
- ❖ Sheryl S. K., Deena A. Y., Lynn G. N., Carnevale E. M. (2000) Use of specific sugars to inhibit bacterial adherence to equine endometrium in vitro. *AJVR*, Vol 61, N°4, April
- ❖ Stephens L. R., Humphrey J. D., Little P. B., Barnum D. A. (1983). Morphological, Biochemical, Antigenic, and Cytochemical relationship among *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni*, *Haemophilus haemoglobinophilus*, *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis*. *J Clin Microbiol*: 17; 728-737
- ❖ Sponenberg D. P., Carter G. R., Cordes D. O., Stevens S. E., Veit H. P. (1983). Suppurative epididymitis in a ram infected with *Actinobacillus seminis*. *J Am Vet Med Ass*;182: 990-991
- ❖ Tekes L., Hajtos I. (1990). Trials with an Enzyme- Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the diagnosis of subclinical genital infections in rams caused by *Histophilus ovis* and *Actinobacillus seminis*. *J Vet Med B*; 37: 549- 555
- ❖ Van Overbeke. I., Chiers K., Chiers K., Charlier G., Vandenberghe I., Van Beeumen J., Ducatelle R., Haesebrouck F. (2002). Characterization

of the in vitro adhesion of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to swine alveolar epithelial cells. *Veterinary Microbiology*, 88: 59- 74

- ❖ Van Tonder E. M., Bolton T. F. W. (1970). The isolation of *Actinobacillus seminis* from bovine semen: a preliminary report. *J S Afr Vet Ass*: 41; 287- 288
- ❖ Van Tonder E. M. (1973). Infection of rams with *Actinobacillus seminis*. *J S Afr Vet Ass*: 44; 235- 240
- ❖ Watt D. A., Bamford V., Nair M. E. (1970). *Actinobacillus seminis* as cause of polyarthritis and posthitis in sheep. *Aust Vet J*: 46; 515
- ❖ Zepeda- López, H. M., González- Lugo, G. M. (1995). *Escherichia coli* Adherence to HEp- 2 cells with Prefixed cells. *Journal of Clinical Microbiology*, May; 1414-1417