



Mecanismos de Patogenicidad y Adherencia de *Pasteurella haemolytica*

M. L. JARAMILLO,¹ E. ZENTENO² Y F. J. TRIGO^{3*}

CENID Microbiología, INIFAP, SAGAR. Km. 15.5 Carretera México-Toluca. Cuajimalpa, D. F.¹
Facultad de Medicina, UNAM. Ciudad Universitaria, Coyoacán, D. F. 04510.² Facultad de Medicina
Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Ciudad Universitaria, Coyoacán, D. F. 04510³

*Autor para la correspondencia. Tel. (5) 6-22-58-49, Fax (5) 6-16-23-42

ABSTRACT. *Pasteurella haemolytica* is one of the bacteria most commonly isolated from pneumonic cases in ruminants. Some of the mechanisms and factors involved in the pathogenesis of the disease are partially documented; and the early stages of bacterial colonization have not been totally clarified. Therefore a review is presented in this paper, particularly related with the mechanisms of bacterial pathogenicity responsible of pulmonary damage to ruminants, as well as a detailed analysis of the adherence process.
Key Words: *Pasteurella haemolytica*, Pathogenicity, Adherence.

RESUMEN. *Pasteurella haemolytica* es una de las bacterias que se aísla con alta frecuencia de los procesos neumónicos de los rumiantes. Los mecanismos y factores involucrados en la patogénesis de la enfermedad están documentados parcialmente; pero las fases tempranas de la colonización bacteriana no han sido completamente aclaradas. El presente trabajo presenta una revisión acerca del conocimiento actual de los mecanismos de patogenicidad de esta bacteria y la patogénesis que le permite causar lesiones pulmonares severas a los rumiantes, y se presenta un análisis del proceso de adherencia descrito para *Pasteurella haemolytica*.

Palabras clave: *Pasteurella haemolytica*, Patogenicidad, Adherencia.

MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

La neumonía producida por *Pasteurella haemolytica* se caracteriza por ser una pleurobronconeumonía aguda o sobreaguda que puede manifestarse como septicemia en animales jóvenes. Los periodos de incubación fluctúan desde los 2 hasta los 14 días después de la aparición del factor predisponente; la morbilidad es del 5 al 40%, mientras que la mortalidad varía del 5 al 20%.⁸⁴

Las lesiones que se observan a nivel pulmonar son áreas de consolidación con necrosis central y hemorragia en la periferia de estas áreas; así como una pleuritis fibrinosa. Los estudios histopatológicos muestran áreas multifocales de bronconeumonía fibrino-hemorrágica aguda con necrosis coagulativa, pleuritis fibrinosa, y congestión capilar.¹⁹

Los productos bacterianos de *P. haemolytica* se consideran importantes para la inducción del daño al tejido pulmonar, dentro de éstos la cápsula, el lipopolisacárido (LPS) y la leucotoxina son los mejor estudiados. Otros factores de virulencia cuyo papel en la patogénesis no está bien documentado incluyen: proteínas de membrana externa, proteínas reguladas por hierro, glicocalix, fimbrias y enzimas como la neuraminidasa y sialoglicoproteasa neutra.^{3,66,67,74}

Las bacterias del género *Pasteurella* son comensales de las mucosas del aparato respiratorio alto de los rumiantes, donde pueden permanecer sin causar daño. Esta colonización inofensiva resulta de un equilibrio entre el crecimiento bacteriano y la respuesta del hospedero que evita una colonización profunda por mecanismos inmunes a nivel local.⁷⁸

Las células con actividad fagocítica representan la primera línea de defensa celular contra *P. haemolytica*, pero como resultado de un comensalismo evolutivo, la bacteria ha desarrollado estrategias que le permiten evitar los efectos antibacterianos de estas células; uno de dichos mecanismos es la liberación de una exotoxina o leucotoxina que altera y destruye los diferentes tipos de leucocitos de rumiantes, como macrófagos alveolares, monocitos, neutrófilos, linfocitos, células cebadas y plaquetas.^{24,26,79} Los genes de la leucotoxina poseen alta homología con las hemolisinas de *Escherichia coli* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Estas toxinas contienen una serie de nonapéptidos ricos en ácido aspártico y glicina, localizados a partir del tercer residuo en el carboxilo terminal de la toxina; debido a esta característica se agrupan dentro de la familia de las toxinas de secuencias repetitivas (RTX).^{37,58,59}

La toxina es una citolisina productora de poros, compuesta por dos o más subunidades proteicas, que dañan a la



célula insertándose en la membrana y formando poros transmembranales, lo que provoca la salida de potasio e incorporación de calcio extracelular, con el subsecuente hinchamiento y lisis celular.²⁷

La especificidad de la leucotoxina por leucocitos de rumiantes sugiere el reconocimiento de un receptor común, al parecer de naturaleza proteica, presente en la superficie de la membrana de estas células a diferencia de otras citolisin RTX cuyos receptores son glicolípidos y muestran un amplio espectro de especificidades celulares. La lisis y degranulación de los neutrófilos por la leucotoxina se considera como la causa primaria del proceso inflamatorio agudo característico de las pasteurelosis neumónica, debido a la liberación de mediadores inflamatorios como leucotrienos, histamina y ácido 5-hidroxiicosatetraenoico.^{43,53,74}

Estudios realizados *in vitro* ponen de manifiesto que la leucotoxina además de su efecto citotóxico sobre neutrófilos de bovino, también estimula el estallido respiratorio y la desgranulación de los lisosomas, estos eventos son evidentes por la generación de radicales libres, como: el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La liberación de radicales de oxígeno, es un evento inmediato, mientras que la citolisis y liberación de proteasas por la desgranulación ocurre posteriormente; estos cambios amplifican la respuesta inflamatoria, que dan como resultado lesiones más severas.^{61,74}

La leucotoxina inhibe la expresión de moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad en monocitos y macrófagos, reduciendo su capacidad para presentar antígenos al linfocito T cooperador; además, concentraciones subletales de leucotoxina inhiben la transformación blastoide de linfocitos.⁴⁷ Los efectos que la leucotoxina induce por la activación y destrucción de células inmunocompetentes guardan más relación con la sobrevivencia de la bacteria en el sitio de infección, que con el daño al endotelio vascular donde su efecto no es directo, sino que es consecuencia de esta activación.^{45,88}

Los diferentes serotipos de *P. haemolytica* producen leucotoxinas de tamaño similar a la del serotipo A1, y son reconocidas al utilizar antisueros policlonales contra la leucotoxina de dicho serotipo en análisis de inmunotransferencia, indicando con ello que están inmunológicamente relacionadas; pero, por análisis de "Southern blot" y al determinar secuencia nucleotídica se demostró que no son idénticas.²¹

El LPS de *P. haemolytica* A1 comprende del 10 al 25% del peso seco de la bacteria, presenta lípido A, una región

central compuesta de Hex-Hep-ac2-ceto-3-desoxioctulosónico y un polisacárido somático o unidades trisacáridas repetitivas de dos residuos de D-galactosa y un residuo de N-acetil-D-galactosamina.⁷⁶ El LPS se encuentra generalmente asociado a la célula bacteriana pero en las infecciones, ha podido detectarse en forma libre en las lesiones pulmonares.¹⁴ Se considera uno de los componentes de la bacteria con alta capacidad para inducir una respuesta inflamatoria; las lesiones que induce, constan de grandes áreas de hiperemia y edema que abarcan el área de la lesión y parte de los lóbulos adyacentes, también pueden observarse áreas de hemorragia y adherencias fibrinosas.¹⁹

Microscópicamente se observan neutrófilos, exudación de fibrina, edema en los espacios alveolares y agregación de plaquetas y neutrófilos en los capilares; estos eventos son consecuencia del daño al endotelio vascular son inducidos por el macrófago activado y por la liberación de mediadores proinflamatorios, como el factor de necrosis tumoral α (TNF α), interleucina-1 (IL-1), leucotrienos y ácido araquidónico.^{14,15,40,70,77,90} Las citocinas mencionadas aumentan la expresión de moléculas de adhesión en neutrófilos y células endoteliales, favoreciendo el reclutamiento de los neutrófilos; en ocasiones la presencia excesiva de estas células daña el endotelio vascular por la liberación de enzimas lisosomales y metabolitos del oxígeno, durante los procesos de adhesión y activación.^{13,16,29,74} Se sugiere, entonces que estas células juegan un papel central en la conducción de la cascada inflamatoria inducida por este componente bacteriano.

Los eventos fisiopatológicos mencionados pueden llevar en muchas ocasiones al choque letal, que se caracteriza por fallas funcionales de órganos vitales como los riñones y tracto gastrointestinal, además del pulmón, debidas a una sobreproducción de mediadores endógenos derivados del sistema inmune, de los cuales el factor de necrosis tumoral (TNF α) es el más importante.¹¹

Lacroix et al.,⁵⁴ realizaron la caracterización de los LPSs de los 16 diferentes serotipos de la bacteria; el análisis mostró que los serotipos 2 y 8, carecen de la cadena O-polisacáridica, indicando con ello que el LPS de estos serotipos es de tipo rugoso, mientras que los otros 14 serotipos presentan un patrón característico del LPS tipo liso. Por espectroscopía de resonancia magnética nuclear se reveló que el polisacárido de la cadena-O, de los serotipos 1, 6 y 9 es idéntico. y por análisis de inmunotransferencia, se encontró que muchos de los serotipos del biotipo A, portan epitopos comunes en su cadena-O; además; se demostró

Tabla 1. Estructuras de las cadenas O-Polisacáridos de *Pasteurella haemolytica*.

Serotipos	Unidad Repetitiva	Referencia
1,6,9	$\rightarrow 4$)- β -D-Gal _p -(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Gal _p -(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Gal _p -Nac-(1 $\rightarrow$	54,76
3,15	$\rightarrow 3$)- β -D-Gal _p -Nac(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-Ram _p -1($\rightarrow$	55
4,10	$\rightarrow 3$)- α -D-Gal _p (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-Gal _p -1 $\rightarrow$	71,75

Tabla 2. Composición de monosacáridos de lipopolisacáridos de *Pasteurella haemolytica*

Azúcares	Relación molar*													
	Serotipo del biotipo A										Serotipo del biotipo T			
	1	2	6	7	8	9	11	12	16	3	4	10	15	
Ramnosa										1.8	0.5	0.4	2.6	
Glucosa	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
Galactosa	0.7	0.5	1.2	0.6	0.2	1.0	0.8	0.8	0.7	0.1	17.9	5.5	0.1	
Glucosamina	0.7	0.6	0.7	0.6	0.6	1.0	0.2	0.8	0.8	2.3	0.8	0.9	3.5	
D-Glicero-D-Mano-Heptosa	1.3	0.6	1.4	0.7	0.6	0.8	0.1	1.2	1.0	1.2	0.5	0.6	0.7	
L-Glicero-D-Mano-Heptosa	1.5	0.8	1.4	1.1	0.7	0.6	0.1	1.4	1.3	1.5	0.9	1.6	1.2	

* Razón molar en la relación con la glucosa (considerada como 1.0)

Lacroix, R. P. y col. (54)

Tabla 3. Composición de monosacáridos de la región core de los LPSs de *Pasteurella haemolytica*

Azúcares	Relación molar*							
	Serotipo del biotipo A					Serotipo del biotipo T		
	1	6	8	9	12	4	10	15
Ramnosa						1.0	0.7	1.3
Glucosa	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Galactosa	0.8	0.9		0.2	1.0	12.0	2.0	0.9
D-Glicero-D-Mano-Heptosa	2.0	2.0	2.1	2.0	2.0	1.1	0.9	1.6
L-Glicero-D-Mano-Heptosa	2.2	2.3	2.3	2.6	1.9	2.3	2.2	2.3

* Razón molar en relación con la glucosa (Considerad como 2.0)

Lacroix, R. P. y Col. Infect. Immun. 61 (1) 1993

que los polisacáridos de las cadenas O de los serotipos 3 y 15 del biotipo T, así como aquellos de los serotipos 4 y 10 son idénticos (Tabla 1). En cuanto a la composición de los monosacáridos de la región central, es muy similar en los serotipos 1, 6, 8, 9 y 12 de biotipo A, los oligosacáridos contienen cantidades molares iguales de D-glucosa, D-glicero-D-mano-heptosa y L-glicero-D-mano-heptosa; la composición de los monosacáridos de esta región en los serotipos del biotipo T difiere del biotipo A, ya que éstos contienen L-ramnosa, D-glucosa, D-galactosa, D- y L-glicero-D-mano-heptosa (Tablas 2 y 3).

El LPS y la cápsula de *Pasteurella* desempeñan un papel crítico como interfases principales, entre el microorganismo y la célula huésped, razón por la cual muchas investigaciones tienen el propósito de estudiar las interacciones que se establecen entre la bacteria y su ambiente a un nivel estructural y funcional. Brogden *et al.*,¹⁸ observaron que el polisacárido capsular del serotipo AI, interactúa con el surfactante alveolar *in vitro* causando una reacción de precipitación en la que intervienen azúcares N-acetilados; cuando trataron de identificar la especificidad de ésta interacción, encontraron que el surfactante reaccionaba fuertemente

con N-acetil-glucosamina y en menor grado con N-acetil-galactosamina, pero no presentaba ningún efecto con N-acetil-manosamina uno de los constituyentes del polisacárido capsular. La interacción de este componente bacteriano con el surfactante *in vivo* no produce cambios fisiopatológicos importantes que conduzcan a daño del tejido pulmonar, pero se cree pudiera ser una interacción tipo receptor-adhesina involucrada en la adhesión de la bacterias al epitelio alveolar.

La cápsula protege a la bacteria de la fagocitosis y de la actividad bactericida mediada por el complemento; una posible explicación a este último fenómeno es que el material capsular forma una barrera entre el complejo de ataque a la membrana, formado por los componentes del complemento de C5 hasta C9, y la superficie bacteriana, previniendo el efecto lítico, aún en presencia de anticuerpos. Sin embargo, la presencia de anticuerpos específicos al material capsular facilitan la fagocitosis de la bacteria y pueden ser de particular importancia en la resistencia a la pasteurelosis.^{23,35,36}

La diversidad estructural y consecuentemente de las características antigénicas de los polisacáridos capsulares (Tabla 4), pueden estar relacionadas con la especificidad al



hospedero; así como, con las diferencias en el potencial patógeno que hay entre cepas y así mismo con la inmunidad conferida por las vacunas.^{4,5,6,7,9}

En la actualidad a pesar de conocer algunos de los principales mecanismos de virulencia de la bacteria; se desconocen las estructuras que le permiten colonizar el aparato respiratorio y ejercer sus efectos patógenos. Morck et al.,⁶⁶ sugieren que la colonización de los alveolos pulmonares por *P. haemolytica* es una etapa inicial importante en la patogénesis de la pasteurelosis en la que además puede estar involucrado el glicocalix el material capsular, y/o las fimbrias. Estas estructuras se identificaron en *P. haemolytica* serotipo A1 por estudios de microscopía electrónica tanto en condiciones *in vitro* como en el fluido broncoalveolar de animales infectados experimentalmente en los cuales se observaron estructuras fimbriales adheridas al epitelio de la tráquea.⁶⁵ Estas observaciones apoyan la sugerencia de Morck sobre la posible participación de las fimbrias en la colonización del aparato respiratorio alto; curiosamente el glicocalix bacteriano o material de superficie de esta bacteria es mayor en la fase de crecimiento logarítmico, al igual que la producción de leucotoxina, sugiriéndose que esta estructura podría participar en la adherencia de la bacteria a los leucocitos y favorecer su efecto citolítico.^{66,79}

Potter et al.,⁷³ lograron la purificación de subunidades fimbriales de 35 kDa, carentes de actividad hemaglutinante; sin embargo, varios laboratorios han tenido dificultades para demostrar la presencia de estas estructuras en aislamientos de la bacteria.

Se ha identificado y caracterizado una neuraminidasa, ésta enzima se considera un factor de virulencia importante para muchas bacterias como: *Streptococcus agalactiae*, *S. pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae* y *Vibrio cholerae*, el papel sugerido para la enzima es la remoción de ácido siálico de las glicoproteínas de la superficie celular o del moco, facilitando la adherencia de dichos microorganismos.^{41,69,82}

En un estudio hecho sobre la producción de esta enzima en los diferentes serotipos de *P. haemolytica* se mostró que sólo el serotipo 11 no la produce; los pesos moleculares de las neuraminidasas producidas varían entre serotipos y comprenden moléculas de 150 a 200 kDa, que presentan especificidad hacia substratos similares con enlaces cetosídicos como: *N*-acetilneuraminil-lactosa, fetuina, ácido colomínico y son menos activas hacia la mucina submaxilar bovina.⁸²

Además de la neuraminidasa, la bacteria secreta una glicoproteasa específica para *O*-sialoglicoproteínas; la enzima es una metaloproteasa neutra de 35 kDa con un sitio de unión al zinc y un punto isoeléctrico de 5.2, que presenta actividad hacia residuos *O*-sialoglicopéptidos.^{25,68} Un examen sobre la distribución de esta enzima entre los diferentes serotipos reveló que todos los serotipos del biotipo A contienen el gen *gcp* que la codifica, a excepción del serotipo 11, que mostró una organización genética diferente y no presentó actividad proteolítica. El biotipo T carece del

gen *gcp* y no presenta actividad proteolítica; esto último puede tener relevancia en la patogenicidad diferencial entre ambos biotipos.^{1,2,3}

Aparentemente existe relación entre su capacidad de inducir neumonía y la cantidad de producción de las enzimas neuraminidasa y sialoglicoproteasa, debido a que se ha encontrado que aislamientos recientes del serotipo A1 producen niveles altos de neuraminidasa. Este hecho indica la activa participación de estas enzimas en el proceso invasivo de *P. haemolytica* A1.^{3,43,74} Además en los procesos neumónicos se ha aislado con mayor frecuencia el serotipo A1.

MECANISMOS DE ADHERENCIA BACTERIANA

La adherencia o unión de las bacterias a las superficies epiteliales representa la etapa crítica e inicial para la colonización e infección; esta capacidad está relacionada con el reconocimiento de estructuras relevantes sobre las superficies de las células, tanto bacteriana como hospedera e involucra interacciones fisicoquímicas específicas como no específicas.

De manera general se conoce que las bacterias se adhieren a la superficie epitelial vía receptores específicos y que los factores bacterianos involucrados en las interacciones bacteria-célula son diversos, indicando que estos microorganismos pueden expresar formas alternativas de adhesión celular.^{9,63}

Las estructuras bacterianas hasta ahora conocidas responsables de la adherencia incluyen fimbrias, adhesinas no fimbriales, adhesinas proteináceas parecidas a la cápsula, el glicocalix, el LPS, proteínas de membrana externa y la misma cápsula que tiene aparentemente capacidad para desempeñar esta función; en general se asume que cualquier antígeno de la superficie bacteriana que tenga una conformación estereoquímica, perfil hidrofóbico y carga neta electrostática complementaria con las estructuras de membrana de su célula blanco pueden funcionar como adhesinas.⁴¹ La presencia de receptores celulares para adhesinas bacterianas se encuentra determinada genéticamente, su expresión se relaciona con la edad del hospedero y varía en los diferentes niveles de los tractos mucosales; explicando las diferencias en el grado de colonización y la susceptibilidad o resistencia a la infección.²⁸

Se ha observado que una bacteria con numerosas adhesinas que se unen a diferentes sitios receptores muestra mayor avidez hacia su célula blanco que una bacteria con menos adhesinas que se une a un solo sitio receptor.

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

La secreción de mucina previene la adherencia a célu-

Tabla 4. Estructura de los polisacáridos capsulares de *Pasteurella haemolytica*

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

las epiteliales del hospedero, bloqueando los sitios de unión bacterianos y facilita su eliminación por el movimiento ciliar; sin embargo, si el sistema mucociliar se daña, el moco puede formar una matriz donde quedan atrapados los microorganismos debido a su consistencia pegajosa o a interacciones específicas entre receptores de la mucina y las adhesinas de la bacteria.

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

En los miembros de la familia *Pasteurellaceae*, dentro de la cual se encuentran importantes patógenos para el hombre y los animales incluidos los géneros *Haemophilus*, *Pasteurella* y *Actinobacillus* se han identificado múltiples mecanismos moleculares de adherencia celular. Las adhesinas identificadas para algunos miembros de esta familia incluyen diferentes proteínas (fimbrias, fibrillas y proteínas de membrana externa) así como polisacáridos (LPSs, lipooligosacáridos y polisacáridos capsulares). De manera resumida, se ha observado que el LPS permite la adherencia de *A. pleuropneumoniae* tanto a células epiteliales de tráquea de cerdo como a tejido pulmonar.^{10,49} La adherencia de *Haemophilus influenzae*, otro miembro de la familia, puede establecerse de manera dependiente de fimbrias o independientemente, involucrando proteínas de alto peso molecular. Las fimbrias se unen al gangliósido GM2 el cual forma parte del antígeno del grupo sanguíneo AnWj. Estas estructuras están constituidas por polímeros de una proteína de 23 kDa, y la síntesis de la proteína está sujeta a variación de fase durante el crecimiento bacteriano.⁸⁵

En el caso de *Pasteurella multocida* se han realizado estudios de adherencia principalmente con cepas aisladas de conejos y de cerdos. Glorioso y col.,⁴² utilizando células faríngeas de conejo y células Hela, observaron que existe una adherencia diez veces mayor para *P. multocida* grupo

A que para el grupo D y que la adherencia se inhibía con *N*-acetil-glucosamina. En cerdos se encontró que la presencia de fimbrias en *P. multocida* no es relevante para la colonización de las superficies mucosas y es independiente del serotipo capsular; sin embargo, las cepas toxigénicas tanto A como D tienen mayor capacidad de adherencia a las mucosas del aparato respiratorio superior.^{51,72,83} Se ha sugerido que estructuras como el LPS y una proteína de membrana externa de 35 kDa pueden participar como adhesinas para la bacteria, como lo indican estudios de adherencia de cepas capsuladas y no capsuladas a anillos traqueales y ensayos de adherencia al moco *in vitro*.^{39,50,57}

Para *P. haemolytica*, sin embargo, no se conocen con precisión que estructuras le permiten adherirse al epitelio mucosal; aunque, han sido insinuados el LPS, las fimbrias y el glicocálix. Se conoce que el componente del polisacárido capsular facilita que *P. haemolytica* pueda unirse específicamente a los fagocitos e impedir el desarrollo de sus funciones; la eliminación del material capsular por calentamiento a 41°C, permite que sean susceptibles al ataque de los mecanismos inmunes del hospedero, confirmando la participación de componentes de superficie en la disfunción de estos eventos.^{35,36}

El material solubilizado después del calentamiento de suspensiones bacterianas en solución salina fisiológica (SSF) a 41°C, mejor conocido como extracto salino muestra una alta complejidad, de acuerdo con estudios de caracterización realizados en extractos salinos de *P. haemolytica*, los cuales se han practicado directamente después de la extracción y también después de tratar de separar las proteínas asociadas por diferentes métodos.^{56,62} Por cualquiera de los métodos empleados, se ha mostrado que el extracto salino contiene una alta concentración de carbohidratos; los cuales, se ha sugerido, pueden estar formando complejos moleculares con proteínas o bien varias de estas proteínas son de naturaleza glicoprotéica.^{32,56,62} El extracto salino del serotipo A1 presenta varias proteínas reconocidas por el sistema inmune de los rumiantes lo cual sugiere su participación en la resistencia contra la enfermedad.^{31,62}

La relevancia de este material en la patogenia, así como su participación en la resistencia, ha propiciado la búsqueda



da e identificación de algunos de los componentes responsables del mecanismo de adherencia. Se investigó recientemente si los extractos salinos precipitados presentaban actividad hemaglutinante, basados en la propiedad que presentan algunas adhesinas bacterianas para aglutinar eritrocitos y de que muchas de las estructuras que intervienen en este mecanismo se localizan en la superficie bacteriana; además, la unión entre la adhesina y los eritrocitos es muy similar a la que se establece entre ella y su célula blanco, permitiendo su aislamiento y estudio de especificidad de unión.⁵²

Los extractos salinos descritos en los diferentes serotipos presentan actividad hemaglutinante hacia eritrocitos de conejo y que dicha actividad es más alta en extractos de los serotipos del biotipo T que en los extractos del biotipo A. Se observó que la actividad de este último biotipo es más alta en los serotipos A1, A6, A9 y A11 siendo similar entre ellos. Los eritrocitos sólo son aglutinados recién de haberlos obtenido y cuando se ensayan sin ninguna modificación enzimática, pues su maduración o almacenamiento a 4°C por un período mayor elimina su reconocimiento por los extractos;⁵² este efecto se atribuye a la pérdida de ciertas fracciones de carbohidratos, que son moléculas de superficie que están unidas débilmente al eritrocito, y se liberan durante el tiempo de almacenamiento o por el envejecimiento de las células.¹² El tratamiento de los eritrocitos con enzimas proteolíticas y neuraminidasa también afecta su reconocimiento por la hemaglutinina presente en los extractos. Este tratamiento, elimina o modifica el receptor sobre la superficie del eritrocito, perdiéndose cualquier capacidad de interacción entre ellos y el componente o componentes bacterianos responsables, debido posiblemente a la eliminación de componentes glicoproteicos de la membrana del eritrocito; además, se puso de manifiesto la posible participación de residuos de ácido siálico en esta interacción, como lo indica la falta de reconocimiento después del tratamiento con neuraminidasa.⁵²

Los extractos salinos crudos presentan una gran cantidad de polisacáridos capsulares y con la idea de discernir si estos se encontraban involucrados en la actividad se procedió a precipitar de manera diferencial las proteínas solubles, eliminando gran cantidad de polisacáridos. Se observó que la actividad permanecía en la misma proporción después de la precipitación, indicando que los polisacáridos capsulares no participan en la unión al eritrocito; además, la variedad en composición estructural de este componente dentro de los diferentes serotipos, elimina la posibilidad de que sean los responsables de la actividad.⁵²

La especificidad de la hemaglutinina presente en el extracto del serotipo A1, se realizó mediante ensayos de inhibición competitiva con azúcares simples y glicoproteínas. Al identificar la especificidad, se propuso la utilización del carbohidrato específico en un sistema cromatográfico de afinidad, con el fin de intentar el aislamiento de la molécula responsable de la interacción con la membrana celular. Este proceso se realizó únicamente con *P. haemo-*

lytica serotipo A1, porque es el serotipo que se aísla con más frecuencia de las neumonías del bovino y el que muestra mayor virulencia.⁵²

La actividad hemaglutinante de la proteína purificada, y de los azúcares simples estudiados así como del extracto total, se inhibió solamente con azúcares *N*-acetilados como la GlcNAc y el ácido *N*-acetil-neuráminico (ácido siálico); la interacción con residuos siálicos quedó de manifiesto también por la falta de reconocimiento después del tratamiento de los eritrocitos con neuraminidasa. El aislamiento de la hemaglutinina se hizo empleando de acuerdo a la especificidad columnas de agarosa unida a GlcNAc, y columnas conteniendo estromas de eritrocitos de conejo tratados previamente con glutaraldehído. Por los dos procedimientos empleados se aisló una proteína de 70 kDa que fue homogénea de acuerdo con el análisis electroforético en geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata. Se apreció mayor eficiencia al emplear la columna con estromas de eritrocitos de conejo, donde se retuvo toda la actividad hemaglutinante a diferencia de la columna de GlcNAc. Estos resultados indican que efectivamente existe reconocimiento por el azúcar GlcNAc, pero que la interacción de la proteína con este azúcar simple no es suficiente para permitir la retención total de la actividad presente en el extracto. Es probable que este azúcar sea sólo una parte integral de una estructura oligosacárida más compleja reconocida por la proteína sobre la superficie del eritrocito involucrando residuos de ácido siálico. La interacción esterequímica proteína-eritrocito es mucho más eficiente con estructuras complejas y el empleo de columnas con estroma de estas células ofreció por lo tanto un mayor rendimiento en la purificación de la aglutinina.⁵²

El análisis químico practicado a la adhesina purificada, indicó que es una proteína de 70 kDa que carece de fracción oligosacáridica, rica en residuos de glicina, serina, ácido glutámico, alanina y ácido aspártico y pobre en cisteína, metionina y tirosina.⁵²

Se han identificado otras proteínas de peso molecular similar en perfiles electroforéticos de preparaciones proteicas de la membrana externa, después de cultivar la bacteria en condiciones restringidas de hierro; bajo estas condiciones se identificó una banda proteica de 70 kDa cuyo análisis indicó es una mezcla de tres diferentes proteínas, una de las cuales contiene epitopos específicos de serotipo y su expresión, se ha mostrado no es regulada por el hierro, a diferencia de las otras que son reguladas por este elemento. Una de estas últimas proteínas es altamente inmunogénica y normalmente se encuentra asociada con otra proteína de 100 kDa que se une a la transferrina y cuya expresión también es regulada por hierro; mientras que la otra es la principal proteína que se tiñe en SDS-PAGE practicados a preparaciones de membrana externa de la bacteria y al parecer es menos inmunogénica.³⁸

Hasta esta etapa se ignora si la proteína aislada corresponde con alguna de las proteínas antes mencionadas; sin embargo, por el reconocimiento que muestra hacia resi-

duos carbohidratos y por su expresión en medios enriquecidos de hierro, se considera que no se trata de una de las proteínas de membrana externa regulada por dicho elemento. Además el método utilizado para su obtención no involucra el rompimiento celular ni la extracción con detergentes; es posible que se encuentre localizada y distribuida sobre la superficie de la bacteria de acuerdo con su afinidad y al suave método de extracción utilizado. Sin embargo la obtención de la secuencia de aminoácidos de la hemaglutinina y un análisis de homología con las otras proteínas permitirá identificar de manera concluyente si son proteínas diferentes.⁵²

El hecho de que la proteína posea actividad hemaglutinante sugirió su participación en el mecanismo de adhesión de la bacteria; así, que se trató de investigar su intervención en dicho evento y estudiar la especificidad de la interacción. Se realizaron estudios de adherencia en células cilindricas de tráquea bovina de becerros recién nacidos y se emplearon aislamientos de la bacteria cuyos extractos solubles presentaban actividad hemaglutinante para eritrocitos de conejo; al mismo tiempo fue posible comparar la capacidad adherente de estas bacterias con una cepa carente de actividad. Las bacterias capsuladas se adhirieron pobremente a las células de tráquea bovina, en promedio 2.9 bacterias por célula; mientras que la cepa no capsulada se adhirió en mayor número con 6.1 bacterias por célula.⁵² La baja adherencia de *P. haemolytica* A1 a estas células no mostró diferencias con la adherencia que exhiben, empleando este modelo, *P. multocida* y *A. pleuropneumoniae*, miembros del grupo HAP (*Haemophilus*, *Actinobacillus* y *Pasteurella*). *P. haemolytica* se une también preferentemente a los cilios de las células.^{49,51} El hecho de observar una baja adherencia en estos estudios no le resta importancia al evento en este nivel; pues, hay que considerar que las evaluaciones se hacen con células aisladas y lavadas exentas de una buena cantidad de moco, lo cual difiere de la situación *in vivo*.

También se han empleado también otros sistemas o modelos para el estudio de la adherencia de bacterias del grupo HAP, como cultivos celulares, anillos de tráquea y cortes de tejido pulmonar; en estos sistemas las bacterias se adhieren en mucho mayor número y han permitido identificar las posibles estructuras bacterianas involucradas en la adherencia y determinar sus posibles receptores.^{39,42,49} En estos y otros estudios se emplearon bacterias capsuladas y sus variantes no capsuladas; encontrándose que las bacterias desprovistas de cápsula se adhieren en los diferentes sistemas en mayor número que sus progenitoras capsuladas.^{50,56,81} La mayor capacidad adherente de las bacterias desprovistas de cápsula, sin embargo, no las hace más virulentas; por el contrario, se ha observado que las cepas capsuladas son más virulentas debido a que los componentes de la superficie bacteriana, como la propia cápsula, capacitan a la bacteria a resistir la actividad fagocítica de los macrófagos.⁸¹

Se encontró también que al igual que la adhesina bacte-

riana purificada, la interacción de la bacteria se inhibió con GlcNAc y ácido *N*-acetil-neuramínico. Para la variante no capsulada se observó inhibición además de los azúcares antes mencionados con manosa.⁵² La mucina inhibió la adherencia para ambos tipos de células, pero el efecto fue mucho más fuerte para la cepa descapsulada, lo cual también se ha observado para este tipo de bacterias.^{50,57}

Estas observaciones indican aparentemente la participación de diferentes componentes con propiedades adhesivas para ambos tipos de bacterias, que al parecer en las bacterias capsuladas se encuentra localizados en la superficie bacteriana; para la variante no capsulada la interacción podría estar determinada por algún componente cubierto por la cápsula como han sugerido Jacques y Bélanger para *P. multocida* y *A. pleuropneumoniae*.^{10,50}

El hecho de que la adherencia se inhiba con GlcNAc y ácido siálico sugiere que la proteína con actividad hemaglutinante interviene en el mecanismo de adherencia de la bacteria a células epiteliales de tráquea bovina. La interacción específica con estos carbohidratos podría estar determinada por el grupo acetilo presente en el carbono 2 de la GlcNAc y en el carbono 5 del ácido siálico.⁵² El ácido siálico tiene una relevancia especial cuando se trata de una interacción con estructuras complejas, de esta forma se observó, que en las glicoproteínas sialiladas como en la fetuina, su eliminación disminuyó la capacidad de dicha glicoproteína para interactuar con la hemaglutinina bacteriana. Esta glicoproteína típicamente está constituida por estructuras de tipo *N*-lactosamínico con ácido siálico en posición terminal,⁸⁰ aunque también se han reportado substituciones de ácido siálico en enlaces $\alpha 2,6$ directamente sobre GlcNAc,³⁴ lo que aportaría una doble posibilidad de interacción con la hemaglutinina y quizá explique la mayor afinidad por esta glicoproteína.

La interacción con el ácido siálico incluye también la presencia del carboxilo en el carbono 1, de hecho esto permite que sea el único carbohidrato con posibilidad de ionizarse, ya que se encuentra con carga negativa a pH fisiológico. Este carbohidrato aporta también una carga neta negativa a los grupos celulares que lo contienen, esto sugiere que la interacción de la hemaglutinina con el receptor podría estar determinada por la participación de interacciones iónicas. Mediante la utilización de glicósidos como el heparán sulfato y el condroitín sulfato, se ha logrado inducir la inhibición de la actividad de la adhesina, no así con protamina que posee un anión.⁵² Estos resultados sugieren que la interacción está determinada por la presencia de grupos polares que podrían estabilizar a la hemaglutinina sobre su receptor.

La participación de azúcares *N*-acetilados en el mecanismo de adhesión también se ha observado para *P. multocida* tipo A, cuya adherencia a células epiteliales de la faringe o a células HeLa puede ser inhibida con GlcNAc.⁴² *Pseudomonas aeruginosa* una bacteria Gram negativa colonizadora y patógena del aparato respiratorio del humano y de otros mamíferos también exhibe afinidad por GlcNAc



y ácido siálico.⁸⁷ Al parecer existe una predilección de patógenos respiratorios por residuos *N*-acetilados, pues además de las bacterias antes mencionadas *Mycoplasma pneumoniae* y *Bordetella bronchiseptica* muestran afinidad por estos azúcares.^{48,86}

Los efectos que la proteína con actividad hemaglutinante pueda causar en este tipo de células, sin embargo, deberán ser investigados; así como el receptor o receptores sobre las células blanco. Existe evidencia de que además de reconocer o interactuar con un receptor las adhesinas desencadenan efectos biológicos a través de la liberación de moléculas secundarias, determinando el desarrollo de la interacción bacteria-célula; además de afectar los sistemas de defensa del hospedero.^{46,50}

Aunque, las observaciones presentadas,⁵² señalan la participación de la proteína de 70 kDa específica para residuos de ácido siálico y GlcNAc en la adherencia de *P. haemolytica* A1, es posible que otras estructuras de la bacteria estén involucradas en el mecanismo; una de estas estructuras podría ser el LPS de la bacteria con potencial patógeno inherente y cuya participación en la adherencia ha sido insinuada.¹⁴

También se han propuesto como posibles adhesinas de la bacteria la cápsula, el glicocálix y las fimbrias; sin embargo, su papel en este mecanismo no ha sido confirmado. A pesar, de que Morck et al.,⁶⁵ observaron estructuras fimbriales adheridas al epitelio de la tráquea por microscopía electrónica, varios investigadores han tenido dificultades para observar su presencia en aislamientos recientes de la bacteria. En ausencia de estructuras fimbriales bien definidas, se sugirió que otros componentes de superficie deben fungir como adhesinas, promoviendo la persistencia de la bacteria en el aparato respiratorio.

A este respecto Gonzalez-Rayos et al.,^{43,44,61} reportaron, a partir de un banco genómico del serotipo A1, un plásmido que codifica para una proteína específica de 100 kDa. La proteína parece estar localizada en la membrana externa de la bacteria y se cree puede participar en el mecanismo de adhesión, debido a que presenta un alto grado de hidrofobicidad.

No se sabe claramente que factores favorecen una proliferación selectiva de *P. haemolytica* A1 durante los periodos de estrés o durante las infecciones virales respiratorias, pero se ha mencionado que la reducción en la eliminación por el sistema mucociliar, factores inmunes alterados o la alteración de receptores de la superficie epitelial contribuyen a la colonización específica de la bacteria.^{20,89}

En apoyo a lo anterior, en bovinos se observó que en las infecciones por el virus de la rinotraqueitis bovina, se incrementa la actividad de elastasa en el moco nasal, enzima responsable de la pérdida de fibronectina en la superficie celular y que este evento promueve la adherencia de un gran número de bacterias de *P. haemolytica* en tejido pulmonar; la relación causal entre actividad de elastasa y colonización sugiere por lo tanto la exposición de receptores afines a la o las adhesinas de *P. haemolytica*.¹⁷

En conclusión, si bien los mecanismos de patogenicidad y adherencia presentados por *P. haemolytica* y *P. multocida* han sido en buena medida esclarecidos, es obvio que dependiendo de la cepa involucrada, del estado inmunológico del hospedero y de la interacción con otros agentes patógenos, la infección podrá o no ser exitosa. Además, es claro que estas bacterias utilizan una amplia variedad de mecanismos para tratar de establecer la colonización y lesiones en el aparato respiratorio, por lo cual para que un animal sea resistente a la infección de estos agentes, debe poseer una rica variedad de anticuerpos que neutralicen a estas moléculas bioactivas. Se sabe que estas bacterias utilizan proteínas (fimbrias, proteínas de membrana externa) y polisacáridos (LPSs, lipooligosacáridos y polisacáridos capsulares) como adhesinas; las cuales pueden interactuar con diversos receptores. Además estas estructuras pueden actuar de manera secuencial durante el proceso de colonización. Se ha demostrado que las adhesinas pueden funcionar como inmunógenos adecuados. Aún se deben esclarecer varias incógnitas relacionadas con el proceso de colonización de *P. haemolytica*, tales como la regulación de su expresión y la prevalencia de estas estructuras y de sus genes entre los diversos aislamientos. Se desconocen también los receptores específicos que interactúan con las adhesinas de *P. haemolytica*. Se estima que un mayor conocimiento de las adhesinas y los receptores de esta bacteria permitirá el diseño de vacunas de subunidades o recombinantes más efectivas, así como la manipulación farmacológica del proceso de adhesión para controlar y prevenir la colonización e infección por esta bacteria.

REFERENCIAS

1. Abdullah, K. M., Y. C. Lo y A. Mellors, A. 1990. Distribution of glycoprotease activity and the glycoprotease gene among serotypes of *Pasteurella haemolytica*. Biochem. Soc. Trans. 18:901-903.
2. Abdullah, K. M., R. Y. C. Lo y A. Mellors, A. 1991. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Pasteurella haemolytica* A1 glycoprotease gene. J. Bacteriol. 173:5597-5603.
3. Abdullah, K. M., E. A. Udoh, P. E. Shewen, y A. Mellors, A. 1992. A natural glycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1 specifically cleaves O- sialoglycoproteins. Infect. Immun. 60:56-62.
4. Adlam, C., J. M. Knights, A. Mugridge, J. C. Lindon, y J. M. Williams. 1985. Purification, characterization and immunological properties of the serotype-specific capsular polysaccharide of *Pasteurella haemolytica* (serotype T4) organisms. J. Gen. Microbiol. 131:387-394.
5. Adlam, C., J. M. Knights, A. Mugridge, A., J. C. Lindon, P. W. R. Baker, J. E. Beesley, B. Spacey, G. R. Carig, y L. K. Nagy. 1984. Purification, characterization and immunological properties of serotype-specific

- polysaccharide of *Pasteurella haemolytica* (serotype A1) organisms. J. Gen. Microbiol. 130:2415-2426.
6. Adlam, C., J. M. Knights, A. Mugridge, J. C. Lindon, J. M. Williams, y J. E. Beesley. 1985. Purification, characterization and immunological properties of the serotype-specific capsular polysaccharide of *Pasteurella haemolytica* serotype T15: Its identity with the K62 (K2ab) capsular polysaccharide of *Escherichia coli* and the capsular polysaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup H. J. Gen. Microbiol. 131:1963-1972.
7. Adlam, C., J. M. Knights, A. Mugridge, J. C. Lindon, J. M. Williams, J. E. and Beesley. 1986. Purification, characterization and immunological properties of the serotype-specific capsular polysaccharide of *Pasteurella haemolytica* serotype A7 organisms. J. Gen. Microbiol. 132:1079-1087.
8. Adlam, C., J. M. Knights, A. Mugridge, J. M. Williams, y J. C. Lindon. 1987. Production of colominic acid by *Pasteurella haemolytica* serotype A2 organisms. FEMS Microbiol. Lett. 42:23-25.
9. Attridge, S. R. and D. Rowley, D. 1983. The role of the flagellum in the adherence of *Vibrio cholerae*. J. Infect. Dis. 147:864-872.
10. Bélanger, M., D. Dubrevil, J. Harel, C. Girard, M. Jaques. 1990. Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. Infect. Immun. 58:3523-3530.
11. Billingham, M. E. J. 1987. Citokines as inflammatory mediators. Br. Med. Bull. 43:350-355.
12. Bratosin, D., J. Mazurier, H. Debray, M. Lecocq, B. Boilly, C. Alonso, M. Mosei, C. Motas, y Montreuil. 1995. Flow cytometric analysis of young and senescent human erythrocytes probed with lectins. Evidence that sialic acids control their life span. Glycoconjugate J. 12:258-267.
13. Breider, M. A. 1993. Endothelium and Inflammation. JAVMA 203:300-306.
14. Breider, M. A., S. Kumar, R. E. Corstvet, R.E. 1990. Bovine pulmonary endothelial cell damage mediated by *Pasteurella haemolytica* pathogenic factors. Infect. Immun. 58:1671-1677.
15. Breider, M. A., S. Kumar, y R. E. Corstvet. 1991. Interaction of bovine neutrophils in *Pasteurella haemolytica* mediated damage to pulmonary endothelial cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 27:337-350.
16. Breider, M. A., S. Kumar, y R. E. Corstvet 1991. Protective role of bovine neutrophils in *Pasteurella haemolytica* mediated endothelial cell damage. Infect. Immun. 59:4570-4575.
17. Briggs, R.E. y G. H. Frank. 1992. Increased elastase activity in nasal mucus associated with nasal colonization by *Pasteurella haemolytica* in infectious bovine rhinotracheitis virus-infected calves. Am. J. Vet. Res. 53:631-635.
18. Brogden, K. A., C. Adlam, H. D. Lehmkuhl y R. C. Cutlip. 1989. Effect of *Pasteurella haemolytica* (A1) capsular polysaccharide on sheep lung in vivo and on pulmonary surfactant in vitro. Am. J. Vet. Res. 50:555-559.
19. Brogden, K. A., B. DeBey, y R. Cutlip, R. 1995. Lesions induced in vivo by cell-associated products of *Pasteurella haemolytica* and their role in the pathogenesis of bovine respiratory disease. p. 23-29. Memorias del Seminario de Pasteurelosis Neumónica del Ganado Bovino. Monterrey, N. L., México. Marzo. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L., México.
20. Brown, T. T. y K. M. S. Shin. 1990. Effect of bovine herpesvirus-1 or Parainfluenza-3 virus on immune receptor-mediated functions of bovine alveolar macrophages in the presence or absence of virus-specific serum or pulmonary lavage fluids collected after virus infection. Am. J. Vet. Res. 51: 1616-1622.
21. Burrows, L. L., E. Olah-Winfield, y R.Y.C. Lo. 1993. Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. Infect Immun. 61:5001-5007.
22. Campbell, G. A., L. G. Adams, y B. A. Sowa. 1994. Mechanisms of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. Vet. Immunol. Immunopath. 41:295-306.
23. Chae, C. H., M. J. Gentry, A. W. Confer, y G.A. Anderson. 1990. Resistance to host immune defense mechanisms afforded by capsular material of *Pasteurella haemolytica* serotype 1. Vet. Microbiol 25:241-251.
24. Chang, Y. F., R. Young, D. Post, D. K. Struck. 1987. Identification and characterization of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Infect. Immun. 55:2348-2354.
25. Cladman, W. M., M.A.V. Watt, J. P. Diri, y A. Mellors. 1996. The *Pasteurella haemolytica* O-sialoglycoprotein endopeptidase is inhibited by zinc ions and does not cleave fetuin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 220:141-146.
26. Clinkenbeard, K. D., y M. Upton, M. 1991. Lysis of bovine platelets by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Am. J. Vet. Res. 52:453-457.
27. Clinkenbeard, K. D., D. A. Mosier, y A. W. Confer. 1989. Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Infect. Immun. 57:420-435.
28. Cohen, M., A. Guarino, R. Shukla, y R. Giannella. 1988. Age-related differences in receptors for *Escherichia coli* heat stable enterotoxin in the small and large intestine of children. Gastroenterol. 94:367-373.
29. Confer, A. W. and Simons, K.R. 1986. Effects of *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide on selected functions of bovine leukocytes. Am. J. Vet. Res. 47:154-157.
30. Confer, A. W., B. A. Lessley, R. J. Panciera, R. W. Fulton, y J. A. Kreps. 1985. Serum antibodies to antigens derived from a saline extract of *Pasteurella*



- haemolytica*: Correlation with resistance to experimental bovine pneumonic pasteurellosis. Vet. Immunol. Immunopath. 10:265-278.
31. Confer, A. W., B. A. Lessley, R. J. Panciera, R. W. Fulton, y J. A. Kreps. 1985. Serum antibodies to antigens derived from a saline extract of *Pasteurella haemolytica*: Correlation with resistance to experimental bovine pneumonic pasteurellosis. Vet. Immunol. Immunopath. 10:265-278.
 32. Confer, A. W., K. R. Simons, R. J. Panciera, A.J. Mort, y D. A. Mosier. 1989. Serum antibody response to carbohydrate antigens of *Pasteurella haemolytica* serotype 1: Relation to experimentally induced bovine pneumonic pasteurellosis. Am J. Vet. Res. 50:98-105.
 33. Cowan, S. T. y K. J. Steel's. 1979. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. Compañía Editorial Continental S.A. México.
 34. Cumming, A. A., C. G. Hellerqvist, M. Harris-Brandts, S. W. Michnik, J. P. Carver, y B. Bendiak. Structures of asparagine linked oligosaccharides of the glycoprotein fetuin having sialic acid linked to N-acetylglucosamine. Biochem. 28:6500-6512.
 35. Czuprynski, C. J., E. J. Noel, y C. Adlam. 1991. Interaction of bovine alveolar macrophages with *Pasteurella haemolytica* A1 *in vitro*: Modulation by purified capsular polysaccharide. Vet. Microbiol. 26: 349-358.
 36. Czuprynski, C. J., E. J. Noel, y C. Adlam. 1991. *Pasteurella haemolytica* A1 purified capsular polysaccharide does not stimulate interleukin-1 and tumor necrosis factor release by bovine monocytes and alveolar macrophages. Vet. Immunol. Immunopathol. 28:157-163.
 37. Devenish, J., S. Rosendal, R. Johnson, y S. Hubler. 1989. Immuno-serological comparison of 104-kilodalton proteins associated with hemolysis and cytotoxicity in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis*, *Pasteurella haemolytica* y *Escherichia coli*. Infect. Immun. 57:3210-3213.
 38. Donachie, W. 1994. Vaccine development against *Pasteurella haemolytica* infections in sheep. Abstract book HAP 94 In Edinburgh, *Haemophilus*, *Actinobacillus* and *Pasteurella*. International Conference U.K. 31 July- 4 August, p. 18-19.
 39. Dugal, F., M. Bélanger, y M. Jacques. 1992. Enhanced adherence of *Pasteurella multocida* to porcine tracheal rings pre-infected with *Bordetella bronchiseptica*. Can. J. Vet. Res. 56:260-264.
 40. Fenwick, B. W. 1990. Virulence attributes of the lipopolysaccharides of the HAP group organisms. Can. J. Vet. Res. 54:528-532.
 41. Finlay, B. B. y S. Falkow. 1989. Common themes in microbial pathogenicity. Microbiol. Rev. 53:210-230.
 42. Glorioso, J. C., G. W. Jones, H. G. Rush, L. Pentler, C. A. Darif, y J. E. Coward. 1982. Adhesion of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infections. Infect. Immun. 35:1103-1109.
 43. Gonzalez, C. T. y S. K. Maheswaran. 1993. The role of induced virulence factors produced by *Pasteurella haemolytica* in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis: Review and hypothesis. Br. Vet. J. 149:183-193.
 44. Gonzalez-Rayos, C., R.Y.C. Lo, P. E. Shewen, y T. J. Beveridge. 1986. Cloning of a serotype-specific antigen from *Pasteurella haemolytica* A1. Infect. Immun. 53:505-510.
 45. Henricks, P. A. J., G. J. Binhorst, A. A. Druver, A.A. and Nukamp. 1992. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin enhances production of leukotriene B4 and 5-hydroxyeicosatetraenoic acid by bovine polymorphonuclear leukocytes. Infect. Immun. 60:3238-3243.
 46. Hoepelman, A. I. M. y E. I. Tuomanen. 1992. Consequences of microbial attachment: Directing host cell functions with adhesin. Infect. Immun. 60:1729-1732.
 47. Hughes, H. P. A., M. Campos, L. Mc Dougall, T. K. Beskorwayne, A. A. Potter, y L. A. Babiuk. 1994. Regulation of major histocompatibility complex class II expression by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. Infect. Immun. 62:1609-1615.
 48. Ishikawa, H. y Y. Isayama. 1987. Evidence for sialyl glycoconjugates as receptors for *Bordetella bronchiseptica* on swine nasal mucosa. Infect. Immunol. 55:1607-1609.
 49. Jacques, M., M. Bélanger, G. Roy, y B. Fohry. 1991. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal epithelial cells and frozen lung sections. Vet. Microbiol. 27:133-143.
 50. Jacques, M., M. Kobisch, M. Bélanger, y F. Dugal. 1993. Virulence of capsulated and noncapsulated isolates of *Pasteurella multocida* and their adherence to porcine respiratory tract cells and mucus. Infect. Immun. 61:4785-4792.
 51. Jacques, M., N. Parent, y B. Foirey, B. 1988. Adherence of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* to porcine nasal and tracheal epithelial cells. Can. J. Vet. Res. 52:283-285.
 52. Jaramillo, M. L. 1998. Aislamiento de una hemaglutinina de *Pasteurella haemolytica* A1 y el estudio de su especificidad por carbohidratos. Tesis Maestría en Ciencias, México, D. F. UNAM. Facultad de Medicina.
 53. Kaehler, K. L., R. J. F. Markham, C. C. Muscoplat, y D. W. Johnson. 1980. Evidence of species specificity in the cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica*. Infect. Immun. 30:615-616.
 54. Lacroix, R. P., R. J. Duncan, R. P. Jenkins, R. A. Leitch, J. A. Perry, y J. C. Richards. 1993. Structural and serological specificities of *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharides. Infect. Immun. 61:170-181.
 55. Leitch, R.A. and Richards, J.C. 1988. Structure of the O-chain of the lipopolysaccharide of *Pasteurella haemolytica* serotype T3. Biochem. Cell. Biol. 66: 1055-1065.



56. Lessley, B. A., A. W. Confer, D. A. Mosier, M. J. Gentry, J. A. Durham, y J. A. Rummage. 1985. Saline-extracted antigens of *Pasteurella haemolytica*: separation by chromatofocusing, preliminary characterization, and evaluation of immunogenicity. *Vet. Immun. Immunopath.* 10:672-679.
57. Letellier, A., D. Dubreuil, G. Roy, J. M. Fairbrother, y M. Jacques. 1991. Determination of affinity of *Pasteurella multocida* isolates for porcine respiratory tract mucus, and partial characterization of the receptors. *Am. J. Vet. Res.* 52:34-39.
58. Lo, R. Y. C., P. E. Shewen, C. A. Strathdee, y C. Greer. 1985. Cloning and expression of the leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* A1 in *Escherichia coli* K-12. *Infect. Immun.* 50:667-671.
59. Lo, R. Y. C., C. A. Strathdee, y P. E. Shewen. 1987. Nucleotide sequence of the leukotoxin genes of *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect. Immun.* 57:3210-3213.
60. Lo, R. Y. C., C. A. Strathdee, P. E. Shewen, y B. J. Cooney. 1991. Molecular studies of Ssa, a serotype-specific antigen of *Pasteurella haemolytica* A1. *Infect. Immun.* 59:3398-3406.
61. Marrs, C. F., G. Schoolnik, J. M. Koomey, J. Hardy, J. Rothbard, y S. Falkow. 1985. Cloning and sequencing of a *Moraxella bovis* pilin gene. *J. Bacteriol.* 163:132-139.
62. Mc Kinney, K. L., A. W. Confer, J. A. Rummage, M. J. Gentry, y J. A. Durham. 1985. *Pasteurella haemolytica*. Purification of saline-extractable proteins by isoelectrofocusing. *Vet. Microbiol.* 10:465-480.
63. Meyer, D. H. y P. M. Fives-Taylor. 1993. Evidence that extracellular components function in adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to epithelial cells. *Infect. Immun.* 61:4933-4936.
64. Mirion, F. C., S. N. Abraham, E.H. Beachey, y J. D. Goguen. 1986. The genetic determinant of adhesive function in type 1 fimbrial of *Escherichia coli* is distinct from the gene encoding the fimbrial subunit. *J. Bacteriol.* 165:1033-1036.
65. Morck, D. W., M. E. Olson, S. D. Acres, P. Daoust, y J. W. Costerton. 1989. Presence of bacterial glycocalyx and fimbrial on *Pasteurella haemolytica* in feedlot cattle with pneumonic pasteurellosis. *Can. J. Vet. Res.* 53:167-171.
66. Morck, D. W., T. J. G. Raybould, D. D. Acres, L. A. Babiuk, J. Nelligan, y J. W. Costerton. 1987. Electron-microscopic description of glycocalix and fimbrial on the surface of *Pasteurella haemolytica* A1. *Can. J. Vet. Res.* 51:83-88.
67. Murray, J. E., R. C. Davies, F. A. Lainson, C. F. Wilson, y W. Donachie. 1992. Antigenic analysis of iron-regulated proteins in *Pasteurella haemolytica* A and T biotypes by immunoblotting reveals biotype-specific epitopes. *J. Clin. Microbiol.* 138:283-288.
68. Otulakowski, G. L., P. E. Shewen, A.E. Udoh, A. Mel-lors, A. y B. N. Wilkie. 1983. Proteolysis of sialoglyco-protein by *Pasteurella haemolytica* culture supernatant. *Infect. Immun.* 42:64-70.
69. Paton, J. C., P. W. Andrew. G. J. Boulnoisy T. J. Mitchell. 1993. Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: The role of pneumococ-cal proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:89-115.
70. Paulsen, D. B., A. W. Confer, K. D. Clinkenbeard, y D. A. Mosier. 1990. *Pasteurella haemolytica* lipopolysac-charide-induced arachidonic acid release from and neu-trophil adherence to bovine pulmonary artery endothe-lial cells. *Am. J. Vet. Res.* 51:1635-1639.
71. Perry, M.B. and Babiuk, L.A. 1984. Structure of the polysaccharide chain of *Pasteurella haemolytica* (serotype 4) lipopolysaccharide. *Can.J. Biochem. Cell. Biol.* 62: 108-114.
72. Pijoan, C. y E. Trigo. 1990. Bacterial adhesion to mu-cosal surfaces with special reference to *Pasteurella multocida* isolates from atrophic rhinitis. *Can. J. Vet. Res.* 54:516-521.
73. Potter, A. A., K. Ready, y J. Gilchrist. 1988. Purifica-tion of fimbriae from *Pasteurella haemolytica* A1. *Mi-crobiol. Pathol.* 4:311-316.
74. Ramirez-Romero, R. Y K. A. Brogden. 1995. Patoge-nesis del daño pulmonar provocado por *Pasteurella haemolytica*. *Rev. Lat- Amer. Microbiol.* 35:353-365.
75. Richards, J.C. and Leitch, R. 1989. Elucidation of the structure of the *Pasteurella haemolytica* T 10 lipopoly-saccharide O-antigen by N.M.R. spectroscopy. *Carbo-hydrates Res.* 186:275-286.
76. Severn, W. B., R. A. Z. Johnston, R. A. Leitch, y J. C. and Richards. 1992. Structural analysis of the lipopoly-saccharide from *Pasteurella haemolytica* serotype A1. *Glycobiology* 2:463 (Abstract).
77. Sharma, S. A., T. W. J. Olchow y M. A. Breider. 1992. Alveolar macrophage and neutrophil interactions in *Pasteurella haemolytica* induced endothelial cell in-jury. *J. Infect. Dis.* 165:651.
78. Shewen, P. E. 1994. Host response to infection with HAP implications for vaccine development. Abstract book HAP 94 In Edinburgh, *Haemophilus, Actinobacil-lus* and *Pasteurella*. International Conference. U.K. 31 July- 4 August. p. 32-33.
79. Shewen, P. E. y B. N. Wilkie. 1982. Cytotoxin of *Pas-teurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. *In-fect. Immun.* 35:91-94.
80. Spiro, R. G. y V. D. Bhoyroo. 1974. Structure of the O-glycosidically linked carbohydrate units of fetuin. *J. Biol. Chem.* 249:704-711.
81. St. Gerne, J. W. y S. Falkow, S. 1991. Loss of capsule expression by *Haemophilus influenzae* type b results in enhanced adherence to and invasion of human cells. *In-fect. Immun.* 59:1325-1333.
82. Straus, D. C., W. L. Jolley, y C. W. Purdy. 1993. Char-acterization of neuraminidases produced by various se-rotypes of *Pasteurella haemolytica*. *Infect Immun.* 55:2348-2354.



83. Trigo, E., H. D. Liggitt, y J. F. Evermann. 1985. Effect of in vitro inoculation of bovine respiratory syncytal virus on bovine pulmonary alveolar macrophage function. *Am. J. Vet. Res.* 46:1098-1103.
84. Trigo, T. J. F. 1995. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos. Memorias del Seminario Pasteurelosis Neumónica del Ganado Bovino. p. 18-22. Monterrey, N. L. México. Marzo. Universidad Autónoma de Nuevo León Monterrey, N. L., México.
85. Van Alphen, L. 1994. Adhesin-receptor interactions between *Haemophilus influenzae* and human cells. Abstract book HAP 94 In Edinburgh, *Haemophilus*, *Actinobacillus* and *Pasteurella*. International Conference. U.K: 31 July- 4 August. p. 22.
86. Vázquez, L., L. Jaramillo, J. Reyes, L. F. Montaña, y E. Zenteno. 1992. Análisis estructural de las mucinas y su relevancia como receptor de agentes infecciosos. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Méx.* 5:134-140.
87. Vishwanath, S. and Ramphal, R. 1985. Tracheobronchial mucin receptor for *Pseudomonas aeruginosa*: Pre-dominance of aminosugars in binding sites. *Infect. Immun.* 48: 331-335.
88. Whiteley, L. O., S. K. Maheswaran, D. J. Weiss, y T. R. Ames. 1990. Immunohistochemical localization of *Pasteurella haemolytica* A1 derived endotoxin, leukotoxin and capsular polysaccharide in experimental bovine *Pasteurella* pneumonia. *Vet. Pathol.* 27:150-161.
89. Yates, W. D. G., L. A. Babiuk, y K. W. F. Jericho. 1983. Viral-bacterial pneumonia in calves: Duration of the interaction between bovine Herpesvirus-1 and *Pasteurella haemolytica*. *Can. J. Comp. Med.* 47:257-264.
90. Yoo, H. S., S. K. Maheswaran, G. Lin, E. L. Townsend, y T. R. Ames. 1995. Induction of inflammatory cytokines in bovine alveolar macrophages following stimulation with *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 63:381-388.