

ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LAS FIMBRIAS

INTRODUCCION

Un grupo numeroso de bacterias llevan sobre su superficie varias centenas de finisimos apendices filamentosos rectos y delgados observables -- solamente bajo el microscopio electronico. Estas estructuras filiformes, -- de naturaleza proteica, fueron llamadas inicialmente fimbrias o pili, y dada su gran ubicuidad y variedad se trató de separarlas en distintas categorias considerando su tamaño y dimensiones. Así surgió la primera clasificación -- que los agrupó en dos tipos: los pili sexuales y las fimbrias. La presencia de éstas últimas le confiere propiedades adhesivas al microorganismo que -- las presenta, facilitando su fijación sobre objetos animados o inanimados; -- esta característica sirvió para acuñar un término para nombrarlas: adhesinas.

Cuando las células fimbriadas se cultivan en caldo bajo condiciones -- estacionarias, la sobrepoblación promueve que las bacterias se asocien entre sí acomodandose en la interfase aire-agua, y la película microbiana flotante así formada tiene un acceso mayor al oxígeno.

La consideración de las propiedades adhesivas conjuntamente con sus -- características morfológicas y dimensiones, han servido de base para clasificaciones ulteriores; una de ellas, la de Ottow, las separa en seis grupos, -- ubicando a las fimbrias dentro del grupo 1.

Desde el punto de vista clínico, las propiedades adhesivas de las fimbrias tienen una gran relevancia, pues se ha reconocido ampliamente que la -- adherencia es un factor de virulencia importante en la patogénesis de ciertas infecciones bacterianas. Este evento promueve la colonización y posterior invasión de epitelios y tejidos del hospedero ya sea humano o animal, -- causandoles severas infecciones intestinales, urogenitales, orales o respiratorias.

La unión de gérmenes a las células epiteliales, mediada por adhesinas es específica y evita su expulsión por los mecanismos fisicoanatómicos del -- hospedero como son el estornudo, tos, acción ciliar, expulsión de moco, -- peristaltismo y acción de lavado que ejercen las secreciones.

La interacción entre las fimbrias y las células eucarióticas es inhibida por  $\alpha$ -D-Manosa, ciertos análogos y oligosacaridos de  $\alpha$ -D-Manosa, lo -- que implica la presencia de un receptor específico sobre la superficie celular el cual debe contener manosa o un compuesto de estructura similar, probablemente un glicolípido. Las fimbrias permiten también la asociación de -- las bacterias a los eritrocitos humanos o de origen animal; en consecuencia, la actividad hemaglutinante de un microorganismo revela indirectamente la -- existencia de fimbrias sobre él.

BIBLIOGRAFIA

... y E. T. Cuddy, 1953. Microbiology for Engineers. McGraw-Hill International Book Company, 1a. Edition. pp365-367.

... y M. H. Deinema (1961). The Sheathed bacteria. In: Mortimer, P., Stolpe, H., Tribes, H.G., Balows, A., Schlegel, H.G. (eds). The Prokaryotes: A Handbook of bacteria, isolation and identification of bacteria. Vol. 1. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York.

... y J. L. Ingraham. 1986. Microbiología. Ediciones Repla, S.A. Versión española de la 4a. Edición. 582-583.

... y M.H. Deinema (1978). The Sporeforming-Lepidoptera group of bacteria. Microbiol. Rev. 42 (2): 329-356.

ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE DE LAS FIMBRIAS

INTRODUCCION

Un grupo numeroso de bacterias llevan sobre su superficie varias cen-  
-- tensa de finísimos apéndices filamentosos rectos y delgados observables  
-- solamente bajo el microscopio electrónico. Estas estructuras filiformes,  
-- de naturaleza proteica, fueron llamadas inicialmente fimbrias o pili, y dada  
-- su gran abundancia y variedad se trató de separarlas en distintas categorías  
-- considerando su tamaño y dimensiones. Así surgió la primera clasificación  
-- que los agrupó en dos tipos: los pili sexuales y las fimbrias. La presencia  
-- de estas últimas se conoce por propiedades adhesivas al microorganismo que  
-- las presenta, facilitando su fijación sobre objetos animados o inanimados;  
-- esta característica sirvió para señalar un término para nombrarlas: adhesinas.

Cuando las células fimbriadas se cultivan en caldo bajo condiciones  
-- estacionarias, la sobreproducción promueve que las bacterias se asocien entre  
-- sí acomodándose en la interfase aire-agua, y la película microbiana flotante  
-- así formada tiene un acceso mayor al oxígeno.

La consideración de las propiedades adhesivas conjuntamente con sus  
-- características morfológicas y dimensionales, han servido de base para clasifi-  
-- caciones recientes; una de ellas, la de Ottow, las separa en seis grupos,  
-- ubicando a las fimbrias dentro del grupo I.

Desde el punto de vista clínico, las propiedades adhesivas de las fim-  
-- brias tienen una gran relevancia, pues se ha reconocido ampliamente que la  
-- adherencia es un factor de virulencia importante en la patogénesis de cer-  
-- tas infecciones bacterianas. Este evento promueve la colonización y poste-  
-- rior invasión de epitelios y tejidos del hospedero ya sea humano o animal,  
-- causando severas infecciones intestinales, urogenitales, orales o respirato-  
-- rias.

La unión de gérmenes a las células epiteliales, mediada por adhesinas  
-- es específica y evita su expulsión por los mecanismos fisiológicos del  
-- hospedero como son el estornudo, tos, acción ciliar, expulsión de moco,  
-- peristaltismo y acción de lavado que ejercen las secreciones.

La interacción entre las fimbrias y las células epiteliales es inhi-  
-- bida por α-D-Manosa, ciertos análogos y oligosacáridos de α-D-Manosa, lo  
-- que implica la presencia de un receptor específico sobre la superficie celu-  
-- lar el cual debe contener manosa o un compuesto de estructura similar, propo-  
-- siblemente un glicolípido. Las fimbrias permiten también la asociación de  
-- las bacterias a los eritrocitos humanos o de origen animal; en consecuencia,  
-- la actividad hemaglutinante de un microorganismo revela indirectamente la  
-- existencia de fimbrias sobre él.

MATERIAL Y REACTIVOS

OBJETIVO

Este experimento persigue los siguientes propósitos:

- 1) Demostrar la capacidad adhesiva de las células fimbriadas presentes en un cultivo bacteriano.
- 2) Comprobar que la asociación entre las fimbrias bacterianas y la superfi-  
-- cie de los eritrocitos es específica, e involucra un receptor que contie-  
-- ne manosa.
- 3) De acuerdo al perfil de hemaglutinación mostrado, ubicar a las fimbrias -  
-- del organismo estudiado en su categoría correspondiente de acuerdo a la -  
-- clasificación de Ottow.

FUNDAMENTO

Salina Fosfatos (PBS): Disolver 2.7598 gramos de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> monohidra-  
-- tado y 8.906 gramos de NaCl en un litro de  
-- agua destilada. Ajustar el pH a 7.4. La  
-- Dada la capacidad hemaglutinante de las células fimbriadas, se prepara-  
-- rá un cultivo bacteriano en el medio y condiciones ambientales adecuadas -  
-- que permitan la expresión máxima de las fimbrias: el caldo Infusión Cerebro  
-- Corazón o el Caldo Nutritivo exento de glucosa sirven para este propósito.  
-- La glucosa muestra una actividad represora sobre la biosíntesis de estos fil-  
-- lamentos y también una acción estimulante sobre la formación de cápsula, por  
-- que los microorganismos cultivados en su presencia manifiestan una capacidad  
-- hemaglutinante disminuida.

Solución Anticoagulante: Citrato de sodio al 4%. Disolver 0.2 gramos de cit-  
-- El cultivo bacteriano será cosechado en fase estacionaria, precisamen-  
-- te donde son máximos tanto la proporción de células fimbriadas como el núme-  
-- ro de apéndices por célula. No es recomendable tratar esta suspensión con-  
-- agentes bactericidas como la formalina o el glutaraldehído, porque aunque no  
-- modifican la morfología de las fimbrias, si afectan severamente sus propieda-  
-- des hemaglutinantes.

Los procedimientos siguientes deberán realizarse empleando estéril-  
-- y condi- Para obtener una aglutinación apreciable, la suspensión bacteriana -  
-- deberá contener como mínimo 10<sup>8</sup> células/ml y la cantidad de eritrocitos em-  
-- pleados será la necesaria para tener una relación bacterias: eritrocitos de  
-- 1:1.

El ensayo de hemaglutinación se hará empleando placas de vidrio exca-  
-- vadas y eritrocitos de diversos organismos. Para lograr la inhibición de -  
-- la hemaglutinación las bacterias se tratarán con diferentes carbohidratos -  
-- a una concentración de 2.5 mg/ml preparados en Regulador-Salina-Fosfatos -  
-- (PBS).

La inhibición de la hemaglutinación es proporcional a la concentra-  
-- ción de azúcar en un rango comprendido entre 0.1 y 2.5 mg/ml.

OBJETIVO

Este experimento persigue los siguientes propósitos:

- 1) Demostrar la capacidad adhesiva de las células fimbriadas presentes en un cultivo bacteriano.
- 2) Comprobar que la asociación entre las fimbrias bacterianas y la superficie de los eritrocitos es específica, e involucra un receptor que contiene enzimas.
- 3) De acuerdo al perfil de hemaglutinación mostrado, ubicar a las fimbrias del organismo estudiado en su categoría correspondiente de acuerdo a la clasificación de Ottow.

FUNDAMENTO

Dada la capacidad hemaglutinante de las células fimbriadas, se prepara un cultivo bacteriano en el medio y condiciones ambientales adecuadas que permitan la expresión máxima de las fimbrias: el caldo Infusión Corazón o el Caldo Nutritivo exento de glucosa sirven para este propósito. La glucosa muestra una actividad repressora sobre la biosíntesis de estos filamentos y también una acción estimulante sobre la formación de cápsula, por lo que los microorganismos cultivados en su presencia manifiestan una capacidad hemaglutinante disminuida.

El cultivo bacteriano será cosechado en fase estacionaria, precisamente donde son máximas tanto la proporción de células fimbriadas como el número de apéndices por célula. No es recomendable tratar esta suspensión con agentes bactericidas como la formalina o el glutaraldehído, porque aunque no modifican la morfología de las fimbrias, sí afectan severamente sus propiedades hemaglutinantes.

Para obtener una aglutinación apreciable, la suspensión bacteriana deberá contener como mínimo  $10^8$  células/ml y la cantidad de eritrocitos empleados será la necesaria para tener una relación bacterias: eritrocitos de 1:1.

El ensayo de hemaglutinación se hará empleando placas de vidrio excarvadas y eritrocitos de diversos organismos. Para lograr la inhibición de la hemaglutinación las bacterias se tratarán con diferentes carbonilatos a una concentración de 2.5 mg/ml preparados en Regulador-Salina-Fosfatos (PBS).

La inhibición de la hemaglutinación es proporcional a la concentración de azúcar en un rango comprendido entre 0.1 y 2.5 mg/ml.

MATERIAL Y REACTIVOS

- 1 asa bacteriológica
- 1 tubo de ensaye de 18 x 150 mm
- 1 matraz Erlenmeyer de 500 ml
- 8 jeringas desechables de 5 ml
- 8 pipetas Pasteur con bulbo de caucho
- 8 tubos de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de hule conteniendo 0.5 ml de Citrato de sodio al 4%.
- 4 tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- 5 pipetas graduadas de 10 ml
- 2 pipetas graduadas de 5 ml
- 2 placas de vidrio con excavaciones
- 1 centrifuga refrigerada
- 1 incubadora
- cuatro frío a 4°C o refrigerador

Regulador Salina Fosfatos (PBS): Disolver 2.7598 gramos de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  monohidratado y 8.766 gramos de NaCl en un litro de agua destilada. Ajustar el pH a 7.4. La solución así formada será 0.02M en  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 0.15 M en NaCl.

Caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC): Preparese según las instrucciones del fabricante.

Soluciones de D-Manosa, D-Galactosa, D-Fructosa 2.5 mg/ml: Disolver 0.0125 gramos del azúcar en 5 ml de PBS.

Solución Anticoagulante: Citrato de sodio al 4%: Disolver 0.2 gramos de citrato de sodio en 5 ml de agua destilada.

METODOS

Los procedimientos siguientes deberán realizarse empleando material estéril y condiciones asépticas.

A) SUSPENSIONES BACTERIANAS

- 1.- Preparar un cultivo de toda la noche de la cepa fimbriada de *E. coli* que le será proporcionada en Agar ICC inclinado. Para ello inocular por asada 10 ml de caldo ICC contenidos en un tubo de ensaye de 18 x 150 mm. Incubar a 37°C durante toda la noche.
- 2.- Transferir 1 ml del cultivo de toda la noche a 150 ml de Caldo ICC contenidos en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, e incubar a 37°C durante 48 horas en condiciones estáticas.

MATERIAL Y REACTIVOS

- 1. - 100 ml de agua bacteriológica
- 1. - 1 tubo de ensaye de 18 x 150 mm
- 1. - Matraz Erlenmeyer de 500 ml
- 8. - Jeringas desechables de 5 ml
- 8. - Pipetas Pasteur con bulbo de caucho
- 8. - Tubos de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de hule conteniendo 0.5 ml de Citrato de sodio al 4%
- 4. - Tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- 2. - Pipetas graduadas de 10 ml
- 2. - Pipetas graduadas de 5 ml
- 2. - Placas de vidrio con excavaciones
- 1. - Centrífuga refrigerada
- 1. - Incubadora
- 1. - Cuatro fríos a 4°C o refrigerador

Regulador Salina Fosfatos (PBS): Disolver 2.758 gramos de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> monohidratado y 8.766 gramos de NaCl en un litro de agua destilada. Ajustar el pH a 7.4. La solución sal formada será 0.02M en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0.15 M en NaCl.

Caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC): Preparase según las instrucciones del fabricante.

Soluciones de D-Manosa, D-Galactosa, D-Fructosa 2.5 mg/ml: Disolver 0.0125 gramos del azúcar en 5 ml de PBS.

Solución Anticoagulante: Citrato de sodio al 4%: Disolver 0.2 gramos de citrato de sodio en 5 ml de agua destilada.

MÉTODOS

Los procedimientos siguientes deberán realizarse empleando material estéril y condiciones asépticas.

A) SUSPENSIONES BACTERIANAS

1.- Preparar un cultivo de toda la noche de la cepa tipo de *E. coli* que se será proporcionada en Agar ICC inclinado. Para ello inocular por asada 10 ml de caldo ICC contenidos en un tubo de ensaye de 18 x 150 mm. Incubar a 37°C durante toda la noche.

2.- Transferir 1 ml del cultivo de toda la noche a 150 ml de Caldo ICC contenidos en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, e incubar a 37°C durante 48 horas en condiciones estáticas.

- 3.- Del cultivo obtenido, transferir alícuotas de 5 ml a 4 tubos de ensaye de 13 x 100 mm designados Tubo A, B, C y D respectivamente.
- 4.- Centrifugar los tubos a 5,000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.
- 5.- Desechar el sobrenadante y el sedimento lavarlos dos veces de la siguiente manera: resuspender el paquete celular en el volumen residual de sobrenadante, luego adicionar 5 ml de PBS homogenizando suavemente la suspensión.
- 6.- Centrifugar a 5,000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.
- 7.- Descartar el sobrenadante, resuspender el sedimento conforme las indicaciones del paso 5. Una vez hecha la suspensión, centrifugar a 5,000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.
- 8.- Eliminar el sobrenadante, el sedimento del tubo A resuspenderlo con 5 ml de PBS, el del tubo B con 5 ml de Manosa 2.5 mg/ml en PBS, el del tubo C con 5 ml de Galactosa 2.5 mg/ml en PBS y el del tubo D con 5 ml de Fructosa 2.5 mg/ml en PBS.
- 9.- Guardar las cuatro suspensiones en refrigeración hasta el momento de su uso.

B) SUSPENSIONES DE ERITROCITOS

- 1.- Colectar 5 ml de sangre de las siguientes especies: humanos, pollo, cerdo, cobayo, res, conejo y caballo empleando jeringas desechables, y transferirlas a tubos de ensaye de 13 x 100 mm conteniendo 0.5 ml de anticoagulante.
- 2.- Lavar los eritrocitos dos veces de la siguiente manera: centrifugar la sangre a 3,000 r.p.m. por 10 minutos.
- 3.- Eliminar el suero empleando pipetas Pasteur.
- 4.- Resuspender el paquete celular con suficiente PBS hasta completar el volumen original; para homogenizar coloque un tapón de hule en el tubo e inviertalo con suavidad varias veces par evitar la hemólisis.
- 5.- Centrifugar nuevamente a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos.
- 6.- Eliminar el sobrenadante y resuspender los eritrocitos con PBS hasta completar el volúmen inicial de sangre. Esta suspensión fresca de eritrocitos deberá ser empleada solamente el día de su preparación.

- 3.- Del cultivo obtenido, transferir alícuotas de 5 ml a 4 tubos de ensayo de 13 x 100 mm designados Tubo A, B, C y D respectivamente.
- 4.- Centrifugar los tubos a 2,000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.
- 5.- Desecar el sobrenadante y el sedimento lavarlo dos veces de la siguiente manera: resuspender el paquete celular en el volumen residual de sobrenadante, luego adicionar 5 ml de PBS homogenizando suavemente la suspensión.
- 6.- Centrifugar a 2,000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.
- 7.- Desecar el sobrenadante, resuspender el sedimento conforme las indicaciones del paso 5. Una vez hecha la suspensión, centrifugar a 2,000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.
- 8.- Eliminar el sobrenadante, el sedimento del tubo A resuspenderlo con 5 ml de PBS, el del tubo B con 5 ml de Manosa 2.5 mg/ml en PBS, el del tubo C con 5 ml de Galactosa 2.5 mg/ml en PBS y el del tubo D con 5 ml de Fructosa 2.5 mg/ml en PBS.
- 9.- Guardar las cuatro suspensiones en refrigeración hasta el momento de su uso.

B) SUSPENSIONES DE ERITROCITOS

- 1.- Colectar 5 ml de sangre de las siguientes especies: humanas, pollo, cerdo, caballo, res, conejo y caballo empleado jeringas desechables y transferirlas a tubos de ensayo de 13 x 100 mm conteniendo 0.5 ml de anticoagulante.
- 2.- Lavar los eritrocitos dos veces de la siguiente manera: centrifugar la sangre a 3,000 r.p.m. por 10 minutos.
- 3.- Eliminar el suero empleando pipetas Pasteur.
- 4.- Resuspender el paquete celular con suficiente PBS hasta completar el volumen original; para homogenizar coloque un tapón de hule en el tubo e invértalo con suavidad varias veces para evitar la hemólisis.
- 5.- Centrifugar nuevamente a 3,000 r.p.m. durante 10 minutos.
- 6.- Eliminar el sobrenadante y resuspender los eritrocitos con PBS hasta completar el volumen inicial de sangre. Esta suspensión fresca de eritrocitos deberá ser empleada solamente el día de su preparación.

C) ENSAYO DE HEMAGLUTINACION

- 1.- Guardar en refrigeración durante toda la noche una placa de vidrio con excavaciones envuelta en papel.
- 2.- Colocar separadamente en las excavaciones de la placa una gota de las siete suspensiones de eritrocitos preparadas, luego
- 3.- Adicionar a cada una de ellas una gota de la suspensión bacteriana en PBS.
- 4.- Mezclar suavemente con el extremo romo de un palillo de madera.
- 5.- La aparición de grumos en el fondo de la excavación indicará una aglutinación inmediata.
- 6.- Incubar la placa en refrigeración a 4°C durante 15 minutos.
- 7.- Observar a simple vista si ocurrió aglutinación. El grado de hemaglutinación se registrará en unidades arbitrarias desde (+), (++) o (+++); en caso de no ocurrir aglutinación anotar (-). Registrar sus resultados.

MANOSA	GALACTOSA	FRUCTOSA	CONTROL

D) INHIBICION DE LA AGLUTINACION

- 1.- En las excavaciones de la placa de vidrio colocar separadamente una gota de las siete suspensiones de eritrocitos, luego
- 2.- Adicionar a cada una de ellas una gota de la suspensión bacteriana tratada con Manosa 2.5 mg/ml en PBS.
- 3.- Mezclar suavemente con un palillo de madera
- 4.- Observar si ocurre aglutinación inmediata
- 5.- Incubar la placa a 4°C durante 15 minutos
- 6.- Observar a simple vista si ocurrió aglutinación, de ser así utilice las unidades referidas anteriormente y anótelas.
- 7.- Para las suspensiones bacterianas tratadas con Galactosa 2.5 mg/ml en PBS o Fructosa 2.5 mg/ml, proceder de la misma forma.
- 8.- Registrar los resultados de ambos ensayos.

C) ENSAYO DE HEMAGLUTINACION

- 1.- Guardar en refrigeración durante toda la noche una placa de vidrio con excavaciones envuelta en papel.
- 2.- Colocar separadamente en las excavaciones de la placa una gota de las siete suspensiones de eritrocitos preparadas, luego
- 3.- Adicionar a cada una de ellas una gota de la suspensión bacteriana en PBS.
- 4.- Mezclar suavemente con el extremo romo de un palillo de madera.
- 5.- La aparición de grumos en el fondo de la excavación indicará una aglutinación inmediata.
- 6.- Incubar la placa en refrigeración a 4°C durante 15 minutos.
- 7.- Observar a simple vista si ocurrió aglutinación. El grado de hemaglutinación se registrará en unidades aritmeticas desde (+), (++) o (+++); en caso de no ocurrir aglutinación anotar (-). Registrar sus resultados.

D) INHIBICION DE LA AGLUTINACION

- 1.- En las excavaciones de la placa de vidrio colocar separadamente una gota de las siete suspensiones de eritrocitos, luego
- 2.- Adicionar a cada una de las una gota de la suspensión bacteriana tratada con Manosa 2.5 mg/ml en PBS.
- 3.- Mezclar suavemente con un palillo de madera
- 4.- Observar si ocurre aglutinación inmediata
- 5.- Incubar la placa a 4°C durante 15 minutos
- 6.- Observar a simple vista si ocurrió aglutinación, de ser así utilice las unidades referidas anteriormente y anote las.
- 7.- Para las suspensiones bacterianas tratadas con Galactosa 2.5 mg/ml en PBS o Fructosa 2.5 mg/ml, proceder de la misma forma.
- 8.- Registrar los resultados de ambos ensayos.

DISCUSION **RESULTADOS**

1.- En la tabla siguiente anotar los resultados obtenidos tanto en el - Ensayo de Hemaglutinación como en el de la Inhibición de la Hemaglutinación.

Tratamiento de las células - bacterianas	HEMAGLUTINACION DE ERITROCITOS DE						
	HUMANO	POLLO	CERDO	COBAYO	RES	CONEJO	CABALLO
NINGUNO							
MANOSA							
GALACTOSA							
FRUCTOSA							

(+++): hemaglutinación completa e instantanea; (++) : hemaglutinación incompleta y retardada; (+): hemaglutinación debil; (-): no hemaglutinó