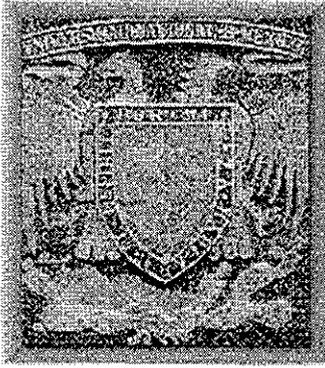


01674

10



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

BIOTIPIFICACIÓN Y ADHERENCIA DE 40
AISLAMIENTOS DE *Haemophilus paragallinarum*
OBTENIDOS DE CASOS CLÍNICOS EN MÉXICO

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

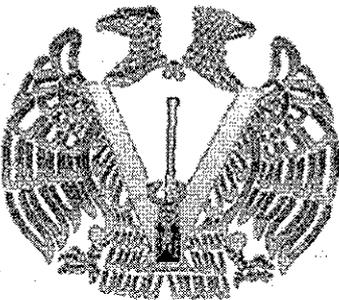
PRESENTA
POMPOSO FERNÁNDEZ ROSAS

TUTOR: MVZ Ph D GUILLERMO TELLEZ ISAÍAS

COMITÉ TUTORAL:

QFB D en C VÍCTOR TENORIO GUTIÉRREZ

MVZ Ph D ARIEL ORTÍZ MUÑÍZ



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2002



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.

**BIOTIPIFICACIÓN Y ADHERENCIA DE 40 AISLAMIENTOS
DE *Haemophilus paragallinarum* OBTENIDOS DE CASOS
CLÍNICOS EN MÉXICO.**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DECLARACIÓN

Doy mi consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que esta tesis sea disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.



MVZ Pomposo Fernández Rosas

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DEDICATORIA

A mis ahijados

Ángel Mario Bringas Curiel e Irais Elliana Bringas Curiel

Por el cariño y apoyo que me brindan

A mi comadre

Luz María López Curiel

Por el apoyo que me ha brindado siempre.

Al M. en C. Valente Velázquez Ordóñez

Por su visión y tenacidad en Pro de la Educación Veterinaria y la Salud Animal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A La Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de cursar los estudios de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia y el posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

A la Universidad Autónoma del Estado de México, por darme la oportunidad de vivir la actividad más alta del hombre que es la Docencia.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal por las facilidades otorgadas para la realización del trabajo experimental de ésta tesis

Al Dr Guillermo Téllez Isaías por su gran sabiduría y amistad inmerecida que me brinda

Al personal todo del Departamento de Producción Animal Aves, mi gran familia.

Al M. en C Edgardo Soriano Vargas por todas las experiencias vividas en y por la investigación.

A mis tesisas y amigos Manuel Longinos y Enrique Velásquez

Al gran corazón que aloja corporalmente Ricardo Salado Carvajal (M.V.Z., por supuesto).
Al inolvidable Luis Vera Noguéz (q p d) ejemplo de constancia y trabajo.

A Alvaro Vera Noguez, por su gran generosidad traducida en apoyo a la formación de graduados en Ciencias Avícolas.

A Eleucadio Vera Chaparro, mi gran amigo y paradigma A la admirable y gran familia Vera Noguez

Con especial reconocimiento al Maestro en Ciencias Pecuarias, Ernesto Soto Priante, por su brillante trayectoria en el campo de las Ciencias Avícolas

Con profundo agradecimiento al M.V.Z Ph D Pedro Ochoa Galván, por su valiosa orientación en el análisis estadístico de este trabajo.

A los distinguidos miembros de mi jurado:

Ph D Abel Ciprian Carrasco, D en C. Víctor Tenorio Gutiérrez, Ph D Ariel Ortiz Muñiz, M Sc Gustavo Adolfo García Delgado y Ph D Guillermo Téllez Isaías

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

TÍTULO	I
DECLARACIÓN	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
CONTENIDO	V
LISTA DE CUADROS	VII
RESUMEN	VIII
SUMARY	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Justificación	9
1.3 Hipótesis	9
1.4 Objetivos	10
2. MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1 Método de fermentación de carbohidratos	11
2.1.1 Medio de cultivo	11
2.2 Susceptibilidad <i>in vitro</i> a antimicrobianos	12
2.3 Aglutinación en placa	13
2.4 Inhibición de la hemoaglutinación	13
2.4.1 Técnica para serovar A	13
2.4.2 Técnica para los serovares B y C	14
2.5 Prueba de adherencia <i>in vitro</i> de <i>H. paragallinarum</i> a células epiteliales traqueales	15
2.5.1 Preparación de suspensiones bacterianas	15

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.5.2 Preparación de células epiteliales traqueales	15
2.5.3 Exposición de bacterias a células epiteliales traqueales	15
2.6 Método estadístico	16
3. RESULTADOS	17
3.1 Prueba de fermentación de carbohidratos	17
3.2 Prueba de susceptibilidad <i>in vitro</i> a antimicrobianas	17
3.3 Prueba de aglutinación en placa	17
3.4 Prueba de la inhibición de la hemoaglutinación	18
3.5 Poder discriminatorio de los métodos	18
3.6 Prueba de adherencia <i>in vitro</i> de <i>H. paragallinarum</i> a células epiteliales traqueales de pollo	19
4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	27
4.1 Discusión	27
4.2 Conclusiones	32
5. LITERATURA CITADA	34
6 ANEXOS	40

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LISTA DE CUADROS

	CUADROS	PÁGINA
1.	RESULTADOS DE LA PRUEBA DE FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS DE 40 AISLAMIENTOS DE <i>Haemophilus paragallinarum</i>	20
2.	Cuadro 2. SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE 40 AISLAMIENTOS DE <i>Haemophilus paragallinarum</i>	20
3.	RESULTADOS DE LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN EN PLACA CON SUERO OBTENIDOS DE 40 AISLAMIENTOS DE <i>Haemophilus paragallinarum</i>	21
4.	RESULTADOS OBTENIDOS DE 40 AISLAMIENTOS DE <i>Haemophilus paragallinarum</i> SOMETIDOS A LA PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN.....	21
5.	ÍNDICES DE DISCRIMINACIÓN DE LOS MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO.....	22
6.	FRECUENCIA DE SEROVARES ENCONTRADOS POR ESTADO DE LA REPÚBLICA MEXICANA.....	22
7.	PROMEDIO DE ADHERENCIA DE 40 AISLAMIENTOS DE <i>Haemophilus paragallinarum</i> A CÉLULAS EPITELIALES TRAQUEALES.....	23
8.	PROMEDIO DE ADHERENCIA DE CEPAS TIPO DE <i>Haemophilus paragallinarum</i> A CÉLULAS EPITELIALES TRAQUEALES DE POLLO (25 observaciones por cepa).....	24
9.	TABLA DE ANOVA DE MEDIAS DE ADHERENCIA DE <i>Haemophilus paragallinarum</i> A CÉLULAS EPITELIALES TRAQUEALES DE POLLO.....	24
10.	PROMEDIO DE ADHERENCIA DE 40 AISLAMIENTOS DE <i>Haemophilus paragallinarum</i> A CÉLULAS EPITELIALES TRAQUEALES DE POLLO.....	24
11.	COMPARACIÓN DE MEDIAS DE ADHERENCIA DE CEPAS TIPO DE <i>Haemophilus paragallinarum</i> A CÉLULAS EPITELIALES TRAQUEALES DE POLLO. PRUEBA DE TUKEY.....	25
12.	COMPARACIÓN DE MEDIAS DE ADHERENCIA DE <i>Haemophilus paragallinarum</i> A CÉLULAS EPITELIALES TRAQUEALES DE POLLO PRUEBA DE TUKEY.....	26

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

FERNÁNDEZ ROSAS POMPOSO. BIOTIPIFICACIÓN Y ADHERENCIA DE 40 AISLAMIENTOS DE *Haemophilus paragallinarum* OBTENIDOS DE CASOS CLÍNICOS EN MÉXICO. (Bajo la tutoría: MVZ Ph D Guillermo Téllez Isaías, QFB D en C Víctor Tenorio Gutiérrez y MVZ Ph D Ariel Ortiz Muñiz).

Se realizó la biotipificación de 40 aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* mediante las pruebas de fermentación de carbohidratos, susceptibilidad *in vitro* a antimicrobianos e inhibición de la hemoaglutinación, de acuerdo a lo reportado por Blackall y Yamaguchi. Así mismo, se realizó una prueba *in vitro* de adherencia bacteriana a células epiteliales traqueales de pollo, con el propósito de determinar diferencias en la habilidad de adherencia bacteriana entre cepas de referencia de los tres serovares y aislamientos. En la prueba de fermentación de carbohidratos, todos los aislamientos produjeron ácido a partir de glucosa y manosa, pero no a partir galactosa, lactosa, trehalosa y xilosa. Hubo variación en maltosa, manitol y sucrosa. Estos resultados fueron agrupados en 4 biovariantes bioquímicos. En la prueba de susceptibilidad *in vitro* a antimicrobianos, todos los aislamientos fueron susceptibles a la penicilina, ampicilina y eritromicina. Se obtuvo variación para la estreptomocina, neomicina y tetraciclina. Estos resultados fueron agrupados en 5 patrones de susceptibilidad. En la prueba de inhibición de la hemoaglutinación se determinaron los serovares A, B y C del esquema de Page en la siguiente proporción: 52%, 12.5% y 35.5% respectivamente. La habilidad discriminadora de las tres técnicas de tipificación fueron analizadas mediante el índice de diversidad de Simpson, de acuerdo a Hunter y Gaston. El índice más alto (0.960) se obtuvo combinando las tres técnicas. Para la prueba de adherencia, se contaron las bacterias adheridas a 25 células mediante observación al microscopio óptico, y los promedios obtenidos fueron agrupados de acuerdo al serovar, obteniéndose los siguientes resultados (bacterias/célula): 36.2, 32.2 y 33.9 para los serovares A, B y C respectivamente.

Palabras clave: *Haemophilus paragallinarum*, coriza infecciosa, fermentación de carbohidratos, susceptibilidad *in vitro* a antimicrobianos, prueba de inhibición de la hemoaglutinación, adherencia bacteriana.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SUMMARY

FERNÁNDEZ ROSAS POMPOSO: BIOTYPIFICATION AND ADHERENCE TESTS OF 40 *Haemophilus paragallinarum* FIELD-ISOLATES OBTAINED FROM CASES IN MEXICO.
(Advised by: MVZ Ph D Guillermo Téllez Isaías, QFB D en C Víctor Tenorio Gutiérrez y MVZ Ph D Ariel Ortiz Muñiz).

Forty isolates from clinical coryza cases in poultry farms in Central Mexico were tested using carbohydrate fermentation, *in vitro* susceptibility to chemotherapeutic drugs and hemagglutination-inhibition techniques proposed by Blackall and Yamaguchi. On the other hand, an *in vitro* adherence test using chicken tracheal epithelial cells were performed with the aim of determine differences in the adhesion ability between serovars and isolates. In the fermentation test, all isolates acidified glucose and mannose and were negative in galactose, lactose, trehalose and xylose. There was variation in maltose, mannitol and sucrose. Those results were grouped in four biochemical biovariants. In the *in vitro* susceptibility test to chemotherapeutic drugs, all isolates were susceptible to penicillin, ampicillin and erythromycin. There was variation to streptomycin, neomycin and tetraciline. These results were grouped in five susceptibility patterns. The hemagglutination-inhibition tests were used to serotypify according to Page's scheme. 21 isolates (52%) were A serovar, 5 (12.5%) were B serovar and 14 (35.5%) were C serovar. The discriminatory ability of the three typification techniques were analyzed using the Simpson's diversity index described by Hunter and Gaston. The highest index (0.960) was obtained combining the three techniques. In the adherence tests, cellular and bacterial suspensions were mixed and incubated briefly to allow bacteria to adhere to the cells. Smears were made and stained for microscopic observation and counting of bacteria adhered to 25 cells. The means were grouped according to serovar. A serovar showed 36.2 bacteria/cell, B serovar 32.2 and C serovar 33.9.

Key words: *Haemophilus paragallinarum*, infectious coryza, biotypification tests, carbohydrate fermentation test, *in vitro* antimicrobial drug sensibility test, hemagglutination-inhibition test, bacterial adherence.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La bacteria *Haemophilus paragallinarum* es el agente causal de la coriza infecciosa (CI), una enfermedad del tracto respiratorio superior de pollos y gallinas (*Gallus gallus*), que se caracteriza por producir descarga nasal, estornudo e inflamación facial. La importancia económica de la enfermedad radica en las pérdidas que ocasiona a la avicultura debido a incremento en el número de aves eliminadas y desarrollo pobre en aves en crecimiento, así como una reducción en la producción de huevo, que va del 10 al 40%, en gallinas de postura (Yamamoto, 1991; Blackall *et al.*, 1997).

En 1931, De Blicke reportó por primera vez el aislamiento de una bacteria hemofílica a partir de pollos con signos de coriza, nombrándola *Bacillus hemoglobinophilus coryzae gallinarum* (citado por Blackall, 1989). En 1934, de forma independiente, Elliot y Lewis y Delaplane *et al.*, propusieron el nombre de *Haemophilus gallinarum* para el agente causal de la coriza infecciosa aviar (citado por Blackall, 1989). No obstante, existieron discrepancias en cuanto a los requerimientos de los factores de crecimiento X (hemina) y V (NAD), que llevaron a la propuesta por parte de Biberstein y White (1969) de *Haemophilus paragallinarum* para aquellos microorganismos dependientes del factor V e independientes del factor X. Blackall y Yamamoto (1989) mencionan que *H. gallinarum* nunca existió y que las discrepancias se debieron a la desuniformidad en las técnicas de aislamiento. Recientemente, se ha reportado el aislamiento de *H. paragallinarum* independientes del factor V, a partir de aves con signos clínicos de CI, lo cual crea confusión en la nomenclatura y clasificación taxonómica del agente (Horner *et al.*, 1995; Bragg *et al.*, 1997).

El agente causal de la CI es una bacteria gram negativa, de tinción bipolar, no móvil, capsulada, con tendencia a la formación de filamentos, que no esporula y que se inactiva rápidamente fuera del hospedero (Blackall y Yamamoto, 1990). Para su crecimiento en medios artificiales son esenciales el NADH (1.26 - 25.0 µg/ml de medio), cloruro de sodio (NaCl) (1.0 - 1.5%) (Rimler *et al.*, 1977) y suero de pollo al 1%. *H.*

paragallinarum crece a una atmósfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂), a una temperatura de incubación de 37° C (Rimler *et al.*, 1976).

La coriza infecciosa en México.

La coriza infecciosa en México se presenta en forma enzoótica en las zonas avícolas densamente pobladas, dada la concentración de la producción en algunas regiones del país. Además, la enfermedad se perpetúa en granjas donde se manejan diferentes edades a través de aves portadoras, recuperadas o enfermas (Soriano *et al.*, 1997).

Desde el punto de vista epidemiológico, la coriza infecciosa se puede presentar en cualquier época del año pero puede incrementarse en la época de estiaje. Es probable que las aves de traspatio y los sistemas de comercialización y movilización en nuestro país contribuyan a perpetuar la infección en las granjas con deficiencias sanitarias. Esta infección la que causa mayores pérdidas económicas en las granjas productoras de huevo comercial. Ya que a un en parvadas inmunizadas con bacterinas comerciales diferentes, en granjas multiedades, con problemas de coriza enzoótica pueden ocurrir bajas de producción de 8 al 10% (Galicia BH 2002, comunicación personal).

Biotipificación

Balows e Isenberg (1978) definieron la biotipificación de las bacterias como el reconocimiento de similitudes o disimilitudes biológicas entre aislamientos del mismo género y especie. Debido a lo anterior, los esquemas serológicos son considerados los de mayor interés dada la variabilidad antigénica y patogénica de *H. paragallinarum*.

Biotipificación de *Haemophilus paragallinarum*.

Los pruebas de biotipificación utilizadas con mayor frecuencia para tipificar cepas de *H. paragallinarum*, reportadas en varios estudios comprenden:

I. Prueba de fermentación de carbohidratos.

En un estudio realizado con 92 cepas de *H. paragallinarum* se observó que todas las cepas fermentaron glucosa y manosa. Los azúcares a los que presentaron variabilidad fueron: manitol, maltosa y sacarosa; lo que permitió una clasificación en 5 biovariantes: I, II, III, IV y V. Un total de 75 cepas se asignaron al biovariante I, que fermentaron manitol, maltosa y sacarosa; 10 cepas en el biovariante II fermentaron manitol pero no maltosa o sacarosa; 4 cepas en el biovariante III fermentaron maltosa y sacarosa pero no manitol; 2 cepas en el biovariante IV fermentaron manitol y maltosa pero no sucrosa y, una cepa en el biovariante V fermentó manitol y sacarosa pero no maltosa (Blackall *et al.*, 1989).

Variaciones en los patrones de fermentación de carbohidratos pueden deberse a diferencias en los medios y métodos empleados (Blackall, 1983).

II. Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos

En un estudio con 92 cepas de *H. paragallinarum*, se utilizó el método de microdilución para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los siguientes antimicrobianos: ampicilina, eritromicina, penicilina, estreptomycin, tetraciclina y neomicina. Los valores de CMI para ampicilina, eritromicina y penicilina fueron similares para todas las cepas, obteniéndose resultados variables para neomicina, estreptomycin y tetraciclina. Con base en lo anterior, se propuso una clasificación de 5 biovariantes a los antimicrobianos: I, II, III, IV y V. La mayoría de las cepas se asignaron a los biovariantes I y II, 67 y 20 respectivamente; una cepa en el biovariante III; una cepa en el biovariante IV y 3 cepas en el biovariante V (Blackall *et al.*, 1989). Las cepas que se asignaron al biovariante I fueron susceptibles a la neomicina, estreptomycin y tetraciclina; el biovariante II fue susceptible a la neomicina y a la tetraciclina pero resistente a la estreptomycin; el biovariante III fue susceptible a la neomicina y resistente a la estreptomycin y tetraciclina; el biovariante IV fue susceptible a la tetraciclina pero resistente a la neomicina y estreptomycin; y el biovariante V fue susceptible a la tetraciclina y susceptibilidad intermedia para la neomicina y estreptomycin. En otro estudio con 75 cepas de *H. paragallinarum*, bajo la misma metodología se observó resistencia a la neomicina, estreptomycin y tetraciclina, lo que indica que el patrón

obtenido es considerado bastante estable y consistente, ya que no se han detectado plásmidos en las bacterias, lo cual pudiera influir en el patrón de resistencia (Blackall, 1988).

III. Patrones serológicos y estructura antigénica de *Haemophilus paragallinarum*.

a) Patrones serológicos

A. Esquema de Page. En 1962, Page clasificó 12 cepas de *H. paragallinarum* obtenidas de brotes de CI en el estado de California, Estados Unidos. Identificó los serovares A, B y C mediante pruebas de aglutinación en placa.

B. Esquema de Hinz. Mediante la prueba de aglutinación en placa, Hinz (1973) determinó los serovares A y B en aislamientos de Alemania.

C. Esquema de Kato. Mediante la prueba de aglutinación en placa, Kato y Tsubahara (1962) se identificaron los serovar I, II y III en aislamientos de Japón (citado por Sawata *et al.*, 1978)

D. Esquema de Sawata. Sawata *et al.* (1978) extendieron los estudios de Kato y Tsubahara y sugirieron que los serovares II y III eran variantes del serovar I, identificando dos serovares, 1 y 2 en aislamientos de Japón.

E. Esquema de Kume. Kume *et al.* (1983) propusieron una clasificación serológica basada en pruebas de inhibición de la hemoaglutinación con 17 cepas de *H. paragallinarum*. En esencia, los serovares A, C y B de Page fueron elevados a los serogrupos I, II y III respectivamente, reconociendo siete serovares hemoaglutinantes entre los tres serogrupos: tres para el I, tres para el II y una para el III.

F. Esquema de Blackall. Eaves *et al.* (1989) y Blackall *et al.* (1990) identificaron dos hemoaglutininas adicionales para los serogrupos I y II. Blackall *et al.* (1990) propusieron una nomenclatura alterada del esquema de Kume *et al.* (1983). Combinaron el esquema de serotipificación anterior y el esquema de Page, quedando de la siguiente manera: A-1 a A-4, B-1, y C-1 a C-4, lo que permite la inclusión de nuevas hemoaglutininas conforme se vayan identificando.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

b) Estructura antigénica de *H. paragallinarum*

Respecto a la estructura antigénica de *H. paragallinarum*, Sawata *et al* (1979) identificaron dos antígenos de tipo específico, termolábiles y sensibles a la tripsina, designados como L1 y L2. Así mismo, identificaron tres antígenos comunes para los dos serovares: L3, termolábil y sensible a la tripsina; HL, termolábil y resistente a la tripsina; y HS, termoestable y resistente a la tripsina. Varios estudios mostraron una correlación entre la especificidad de los serovares aglutinantes (1 y 2) y el inmunotipo (Kume *et al*, 1980a; Kume *et al*, 1980b; Kume *et al*, 1983)

Kato (1965) describió por vez primera la capacidad hemoaglutinante de algunos aislamientos de *H. paragallinarum* (citado por Yamaguchi *et al*, 1989). Las cepas de los serovares A, B y C poseen determinantes antigénicos con capacidad hemoaglutinante. Sin embargo, difieren en que suspensiones bacterianas del serovar A hemoaglutinan eritrocitos frescos de varias especies, aún distantes filogenéticamente (Iritani y Miyajima, 1979); mientras que, tanto eritrocitos como la suspensión bacteriana de los serovares B y C requieren ser tratados por medios físicos, químicos o enzimáticos para que expresen actividad hemoaglutinante (Iritani y Hidaka, 1976; Iritani *et al*, 1978; Iritani, 1979; Sawata *et al*, 1982). Recientemente se reportó la actividad hemoaglutinante de cepas de *H. paragallinarum* de los tres serovares sin tratamiento alguno (Blackall *et al*, 1990).

Dos tipos de hemoaglutininas (HA) se identificaron en la cepa 221 serovar A. La HA tipo 1 presentó propiedades biológicas e inmunológicas similares al antígeno aglutinante L1 específico de serovar. La HA tipo 2 presentó características similares al antígeno aglutinante HL común entre serovares (Yamaguchi e Iritani, 1980; Yamaguchi *et al*, 1980). Posteriormente, se determinó que la HA tipo 1 era específica del serovar A, y que la HA tipo 2 era un antígeno común para los tres serovares (Iritani *et al*, 1981). De forma similar, Sawata *et al*. (1984) describieron tres tipos de HA localizadas en la membrana externa de cepas del serovar A. Los antígenos fueron denominados HA-L1, HA-HL y HA-HS debido a que las propiedades biológicas e inmunológicas eran similares a las observadas en los antígenos aglutinantes L, HL y HS respectivamente. Los antígenos HA-L1 y HA-HL se encontraron corresponder a las HA tipo 1 y 2 descubiertas por Yamaguchi e Iritani (1980). De forma similar al antígeno aglutinante L1, el antígeno HA-L1

indujo inmunidad específica de serovar en pollos (Kume *et al.*, 1983; Kume y Sawata, 1984). Así mismo, Iritani *et al.* (1980) e Iritani *et al.* (1981a) extrajeron un antígeno polisacárido, termolábil, de una cepa serovar 2 que presentó propiedades similares al antígeno L2 específico del serovar C. Contrariamente a la HA tipo 1 del serovar A, este antígeno no mostró actividad hemoaglutinante. De forma similar, extrajeron un antígeno lipopolisacárido capaz de inhibir la hemoaglutinación de la HA tipo 1 de *H. paragallinarum* en presencia de eritrocitos frescos (Iritani *et al.*, 1981b).

En un estudio serológico y de patogenicidad que incluyó aislamientos y las cepas de referencia 0222 y Spross del serovar B, se identificaron seis antígenos hemoaglutinantes específicos de serovar denominados como: B-I, B-II, B-III, B-IV, B-V y B-VI (Yamaguchi *et al.*, 1990). La cepa 0222 expresó las hemoaglutininas B-I, B-IV y B-V, mientras que la cepa Spross expresó la hemoaglutininas B-III, B-IV, B-V y B-VI. En la prueba de patogenicidad todas las cepas produjeron signos clínicos de CI, excepto la cepa 0222, contrastando con estudios realizados anteriormente por Rimler, quien observó la presencia de signos clínicos en aves desafiadas con esta cepa (Rimler *et al.*, 1977; Rimler, 1979).

Antígenos capsulares

Se ha demostrado que cepas de *H. paragallinarum* con cápsula son patogénicas, mientras que cepas sin cápsula son apatógenicas y susceptibles al suero normal e hiperinmune de pollos (Hinz KH., 1973; Sawata *et al.*, 1984).

Ueda *et al.* (1982) en ensayos *in vitro* identificaron un material denso en la membrana externa de cepa de *H. paragallinarum* sin cápsula, adherida a fibroblastos de embrión de pollo. Cuando reprodujo el ensayo *in vitro* por la vía intratraqueal, encontraron bacterias firmemente adheridas entre los cilios, sugiriendo, que ésta adhesión habilitaba a la bacteria para colonizar la superficie de la célula epitelial, resistiendo la remoción mucociliar del tracto respiratorio. En contraste, Sawata *et al.* (1985) reportan cepas capsulares que producen pérdida marcada de cilios y microvellos, infiltración de leucocitos y deposición mucopurulenta en la superficie de la mucosa nasal.

Citoadherencia de *H. paragallinarum*.

El fenómeno de la adherencia bacteriana a células animales se ha venido estudiando en los últimos años con notable interés, y se ha llegado a establecer que el evento inicial en la patogénesis de la mayoría de las enfermedades bacterianas es la adherencia a los tejidos del hospedero (Beachey, 1981). Con este motivo, se han estudiado diferentes agentes bacterianos causantes de enfermedad, tales como: *Escherichia coli* (Polotsky *et al.*, 1994), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Dom *et al.*, 1994), *Haemophilus influenzae* (Noel *et al.*, 1994) y *Pasteurella multocida* (Nakai *et al.*, 1988; Jacques *et al.*, 1993), entre otros.

La capacidad de las bacterias para adherirse al epitelio mucoso depende de la expresión de moléculas adhesivas especiales o estructuras llamadas adhesinas, que permiten la fijación del microorganismo a moléculas complementarias en las células o receptores (Jacques, 1996).

Con relación a *H. paragallinarum* y adherencia celular, existen pocos trabajos en la literatura científica. En este sentido, Ueda *et al.* (1982) estudiaron los mecanismos de adherencia *in vitro* de *H. paragallinarum* a fibroblastos de embrión de pollo, mediante microscopía óptica, electrónica y de barrido. Las cepas empleadas fueron la 221 (serovar A), FY3 (serovar C) y una cepa no serotificada denominada GP. Los porcentajes de células con bacterias adheridas fueron 86%, 58% y 25% respectivamente. Al microscopio electrónico, encontraron bacterias adheridas a los cultivos celulares en dos formas diferentes. En una, la membrana externa de *H. paragallinarum* pareció estar en contacto directo a la membrana plasmática de los fibroblastos, y en la otra forma, la adherencia de las bacterias a los fibroblastos pareció estar mediada por un material denso sobre la superficie de *H. paragallinarum*. Sin embargo, no pudieron diferenciar si las formas de adherencia observada en la asociación entre las bacterias y los fibroblastos de embrión de pollo representan diferentes estados de adhesión o si son mecanismos de adherencia diferentes.

De forma similar, Sawata *et al.* (1985) estudiaron las lesiones inducidas por cepas capsuladas y no capsuladas, observando que las primeras produjeron lesiones en el

tracto respiratorio superior a diferencia de las no capsuladas. Mencionan que la adherencia y la colonización por las cepas capsuladas sobre la mucosa respiratoria parecen ser el primer paso en la infección.

1.2 Justificación

Como se ha referido anteriormente, la infección causada por *Haemophilus paragallinarum*, la coriza infecciosa, crea pérdidas económicas a la industria avícola, tanto en la producción de carne como de huevo para plato

En México, existen pocos trabajos de investigación científica respecto a *H. paragallinarum* o la enfermedad que este agente ocasiona. De tal forma que se desconocen aspectos bioquímicos y serológicos básicos de *H. paragallinarum*. Así mismo, se carecen de estudios de susceptibilidad a antimicrobianos, por lo que se desconoce la presencia de resistencia a los mismos, lo cual puede tener impacto en el tratamiento de brotes clínicos de coriza infecciosa.

Es muy importante el grado de reproducibilidad de cada método de tipificación (fermentación de carbohidratos, susceptibilidad antibacteriana y pruebas serológicas), para facilitar la integración de biovariantes. La combinación de los métodos antes descritos, constituyen una herramienta disponible para estudios epizootológicos de la coriza infecciosa.

1.3 Hipótesis

Dadas las características patológicas y el importante historial epizootológico de la coriza infecciosa en nuestro país, se presume la existencia de una variedad de biotipos de *Haemophilus paragallinarum*.

Es posible establecer y aplicar un esquema de biotipificación basado en la relación de fermentación de carbohidratos, susceptibilidad a los antimicrobianos, aglutinación en placa, inhibición de la hemoaglutinación, pruebas de adherencia del *Haemophilus paragallinarum* a células epiteliales del tracto respiratorio de aves.

Existe una capacidad variable de adherencia de los aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* a células epiteliales traqueales de las aves.

1.4 Objetivos

1.- Determinar los patrones de fermentación de carbohidratos de los aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* de casos en México.

2.- Determinar la susceptibilidad de los aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* frente a diferentes antimicrobianos.

3.- Tipificar a los aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* mediante la prueba de aglutinación en placa, utilizando cepas de referencia del esquema de Page.

4.- Tipificar los aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, utilizando cepas de referencia del esquema de Page.

5.- Establecer una ruta de diagnóstico para *Haemophilus paragallinarum*

6.- Evaluar los índices de adherencia *in vitro* de los aislamientos de *H. paragallinarum*, en células epiteliales traqueales de pollos de ocho semanas de edad.

Todos los objetivos propuestos por sus características de estudio son de tipo experimental, prospectivo, longitudinal y comparativo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.- MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 40 aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* obtenidos de casos clínicos de siete estados de la República Mexicana. Los especímenes objeto de estudio fueron aislados en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, de la Universidad Autónoma del Estado de México. Dichos aislamientos fueron mantenidos en congelación en nitrógeno líquido hasta su utilización.

2.1 Método de fermentación de carbohidratos.

2.1.1 Medio de cultivo. El medio de cultivo empleado fue el TMA (por sus siglas en inglés, test medium agar) sin glucosa o almidón, suplementado con 1 % de suero inactivado de caballo por calor y esterilizado por filtración, con adición de 25 µg de NAD. Este fue utilizado para el cultivo de todos los aislamientos de *H. paragallinarum* como medio de mantenimiento (Blackall, 1983). (anexo 1)

Técnica de placa según el método de Blackall (1983):

1 - El medio para la prueba de fermentación de carbohidratos (TMA) fue suplementado con 0.004 % de rojo de fenol y 2 % del carbohidrato. El suplemento fue ajustado a pH 7.0, y esterilizado por filtración y vaciado en cajas de Petri de 90 mm (20 ml/por caja).

2 - Las placas para las pruebas de fermentación fueron inoculadas con un cultivo de 48 h sin centrifugar, de cada uno de los aislamientos y suspendido en PBS y aplicado con micropipeta. Una placa sin carbohidrato fue inoculada en cada prueba como control.

3 - Después de la incubación a 37° C durante 48 h las placas fueron retiradas de la atmósfera conteniendo 5 % de CO₂ y mantenidas a 37° C durante 2 h bajo condiciones atmosféricas normales antes de la lectura.

4 - La producción de ácido fue indicada por la presencia de una zona amarilla distintiva y por debajo del crecimiento bacteriano.

5.- Los carbohidratos probados fueron: galactosa, glucosa, lactosa, manosa, maltosa, manitol, sucrosa, trehalosa y xilosa. Cada carbohidrato fue probado seis veces.

2.2 Susceptibilidad *in vitro* a antibacterianos.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria se utilizó la técnica de microdilución en caldo en el medio TMB (por sus siglas en inglés, test medium broth) de acuerdo a lo reportado por Blackall (1988). (anexo 2)

Los aislamientos de *H. paragallinarum* fueron probados con los siguientes antibióticos: ampicilina, eritromicina, neomicina, penicilina, estreptomycin y tetraciclina. Las soluciones stock de los antibióticos excepto la eritromicina fueron preparadas como lo describen en común Anhalt y Washington (1985) y conservadas a -20° C hasta por dos semanas. La solución stock de eritromicina fue preparada, usada y descartada el mismo día (Jones *et al.*, 1985).

Las diluciones de trabajo de los antibacterianos fueron preparadas por dilución de las soluciones stock a 128 µg / ml en TMB. Posteriormente se realizaron diluciones dobles seriadas de 128 µg / ml a 0.125 µg/ ml de los antibacterianos en volúmenes de 100 µl de TMB en filas de la 1 a la 11 en microplacas estériles de 96 pozos fondo redondeado, utilizando una pipeta de 8 canales. La hilera 12 incluyó sólo 100 µl de TMB para determinar la viabilidad del inóculo. Las placas fueron almacenadas a -20° C hasta por dos semanas.

Los aislamientos de *H. paragallinarum* fueron cultivados durante toda la noche en TMB y diluidos a 5×10^5 UFC (unidades formadoras de colonias)/ml en TMB. 100 µl de esta dilución se agregaron a cada pozo. Las placas inoculadas fueron colocadas en un recipiente de plástico sellado e incubadas aeróbicamente a 37° C por 24 h.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue la concentración más baja del antibiótico que evitó el crecimiento bacteriano.

2.3 Aglutinación en placa.

Técnica de Yamamoto y Somersett (1964):

1 - El antígeno de cada uno de los aislamientos de *H. paragallinarum*, fue ajustado al doble del tubo 10 del nefelómetro de MacFarland en PBS (pH 7.0).

2.- A 0.01 ml de antisuero se agregó a 0.05 ml de antígeno en una placa de vidrio. La placa fue agitada y la lectura de la reacción fue tomada después de tres minutos bajo una luz fluorescente contra un fondo oscuro.

3.- La prueba se consideró como positiva si los cúmulos del antígeno fueron visibles después de tres a cinco minutos. En una prueba negativa la mezcla del antígeno y suero no mostraron ningún agregado.

4 - Los títulos de aglutinación del suero fueron determinados realizando diluciones dobles seriadas y efectuando la prueba de la manera descrita. Las reacciones positivas con sueros sin diluir fueron consideradas significativas.

2.4 Inhibición de la hemoaglutinación.

2.4.1 Técnica para serovar A.

1.- Para la elaboración del antígeno hemoaglutinante de *H. paragallinarum*, las bacterias se cosecharon y fueron suspendidas en PBS conteniendo 0.01 % de timerosal (pH 7.0). 0.2 décimas de ml de este antígeno (conteniendo 20 unidades hemoaglutinantes/ml) es agregado a 0.2 ml de suero diluido en forma seriada (con dilución inicial 1:5). Después de incubar a temperatura de laboratorio por 10 min, es agregado 0.4 ml de una suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5% (conteniendo 0.02% de gelatina). Los títulos HI son determinados después de incubar por 30 a 40 min. a temperatura ambiente. Como la actividad hemoaglutinante de las células bacterianas no tratadas está presente sólo en microorganismos serovar A, la prueba sólo detectó anticuerpos para el mismo serovar.

2.4.2 Técnica para los serovares B y C.

1.- Una segunda técnica fue descrita por Yamaguchi *et al.* (1990) con células de *H. paragallinarum* tratadas con hialuronidasa, empleando para la prueba eritrocitos fijados con glutaraldehído en lugar de eritrocitos frescos. El tratamiento consistió en el empleo de bacterias completas ajustadas a 10 veces la densidad óptica 0.4 a 540 nm y fueron tratadas con hialuronidasa 50 μ /ml en PBS (pH 6.0). Posteriormente fueron mantenidas en baño María a 37° C por 2 h. El antígeno tratado fue lavado 2 veces en PBS y resuspendido al volumen original.

2.- Los eritrocitos se prepararon colectando sangre fresca de pollo en un volumen igual de solución de Alsever. La suspensión fue centrifugada y los eritrocitos fueron lavados tres veces con una solución de cloruro de sodio 0.15 M. Posteriormente, los eritrocitos fueron suspendidos en una solución de glutaraldehído al 1 % y mantenidos a 4° C / 30 minutos.

La solución de sales de glutaraldehído se preparó diluyendo una solución de glutaraldehído al 25% hasta una concentración de 1 % de: 1 volumen de 0.15 M Na_2HPO_4 (pH 8.2), 9 volúmenes de 0.15 M NaCl y 5 volúmenes de agua destilada.

Los eritrocitos fijados se colectaron por centrifugación y fueron lavados 5 veces con agua destilada y finalmente fueron resuspendidos al 30 % en agua destilada con 0.01% de timerosal. (anexo 3)

3.- Este stock de eritrocitos fijados fue almacenado a 4° C y se preparó una dilución de trabajo al 1 % en PBS (pH 7.0) con albúmina sérica bovina (0.1 %) y gelatina (0.001 %). La prueba de inhibición de la hemoaglutinina fue similar a la utilizada con células bacterianas completas (técnica para serovar A), el suero fue pretratado con 10 % de eritrocitos fijados con glutaraldehído para eliminar hemoaglutininas no específicas y PBS utilizado como diluyente (con 0.1 % de albúmina sérica bovina) y 0.01 % de gelatina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.5 Prueba de adherencia *in vitro* de *H. paragallinarum* a células epiteliales traqueales.

2.5.1 Preparación de suspensiones bacterianas.

1.- Los aislamientos de *H. paragallinarum* se inocularon en medio modificado de Rimler modificado, con adición de suero inactivado de caballo (10 % vol/vol) y esterilizado por filtración. Además 25 µg de NAD / ml y se incubó a 37° C /18 h. (anexo 4)

2.- Se ajustó la cuenta bacteriana con el tubo número 4 de MacFarland, equivalente a 1.2×10^9 bacterias por ml (Bonilla-Ruz *et al.*, 1993; González, 1993)

2.5.2 Preparación de células epiteliales traqueales de pollo.

1.- Se sacrificaron pollos de 8 semanas de edad y se expuso el tejido epitelial traqueal, el cual se lavó con PBS.

2.- Se raspó con un cepillo el epitelio en sentido unidireccional, cosechando las células en solución amortiguadora lisa-eritrocitos con 1 % de bromhexina y mantenida 4° C (anexo 5)

3.- Se dejó reposar por 3 h y se decantó el sobrenadante, el cual fue resuspendido en solución Hank-gelatina (Hank-G) (Glorioso *et al.*, 1982). (anexo 6)

2.5.3 Exposición de bacterias a células epiteliales traqueales.

(Estos ensayos se realizaron por triplicado).

1.- Se mezcló 1 ml de suspensión bacteriana con 1 ml de la suspensión celular y se incubó en baño María a 37° C durante una hora con 20 oscilaciones por minuto.

2.- Se centrifugó la mezcla a 200 r.p.m durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Posteriormente se resuspendió en solución Hank-G (Este proceso se repitió dos veces).

3.- El sedimento se colocó en porta objetos, fijando las células con calor ligero y luego con metanol puro.

4.- El frotis se tiñó con el colorante de Giemsa-MayGrünwald por 1 minuto y fucsina básica por 15 segundos

5.- Se contaron las bacterias adheridas a los cilios de 25 células por cepa

2.6 Método estadístico.

Los datos obtenidos se organizaron en cuadros de frecuencia.

La habilidad discriminadora de los métodos de tipificación utilizados fue analizada mediante el índice de diversidad de Simpson bajo la siguiente ecuación (Hunter y Gaston, 1988).

$$D = 1 - \left(\frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1) \right)$$

El análisis estadístico de la prueba de adherencia se efectuó mediante la prueba Tukey ($p > 0.01$) (Steel y Torrie, 1981).

3.- RESULTADOS

3.1 Prueba de fermentación de carbohidratos.

Todos los aislamientos produjeron ácido a partir de glucosa y manosa. Todos los aislamientos fueron negativos a la fermentación de galactosa, lactosa, trehalosa y xilosa. Hubo variación en la producción de ácido a partir de manitol, maltosa y sucrosa. La biovariante más frecuente fue el tipo I (20 aislamientos, 50%), seguido por el tipo II (10 aislamientos, 25%), el tipo IV (6 aislamientos, 15%) y la menos frecuente la biovariante III (4 aislamientos, 10%) (Cuadro 1)

3.2 Prueba de susceptibilidad *in vitro* a antimicrobianos.

Los criterios utilizados para definir susceptibilidad, susceptibilidad intermedia y resistencia, para la interpretación de los valores de la concentración mínima inhibitoria fueron los siguientes: $\leq 2 \mu\text{g/ml}$, susceptibilidad; 4 a 8 $\mu\text{g/ml}$, susceptibilidad intermedia y $\geq 16 \mu\text{g/ml}$, resistencia. Los criterios anteriores fueron propuestos por Fales *et al.* y modificados por Blackall *et al.* (1989).

Todos los aislamientos mostraron susceptibilidad a la ampicilina y penicilina, y para el caso de la eritromicina la susceptibilidad fue intermedia (Cuadro 2).

Los valores de la CMI para la neomicina, estreptomycin y tetraciclina mostraron variación, lo que permitió detectar 5 biovariantes o biovariantes de susceptibilidad a los antimicrobianos empleados. De los 40 aislamientos estudiados 25 correspondieron al biovariante I, 5 al biovariante II, 2 al biovariante III, y 4 para cada uno de los biovariantes IV y V (Cuadro 2)

3.3 Prueba de aglutinación en placa.

La tipificación por la técnica de aglutinación en placa con suero, proporcionó los siguientes resultados: 24 aislamientos (60%) pudieron ser tipificados; 10 no pudieron ser

tipificados (25%) y 6 aislamientos autoaglutinaron (15%). De los 24 aislamientos que pudieron ser tipificados, 20 correspondieron al serovar A (83.3%), 1 al serovar B (4.1%) y 3 al serovar C (12.5%) (Cuadro 3).

3.4 Prueba de inhibición de la hemoaglutinación.

Todos los aislamientos pudieron ser tipificados por la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. De los 40 aislamientos probados, 21 correspondieron al serovar A (52.5%), 5 al serovar B (12.5%) y 14 correspondieron al serovar C (35%) (Cuadro 4).

3.5 Poder discriminatorio de los métodos.

El poder discriminatorio de los métodos para distinguir entre aislamientos, está determinado por el número de tipos reconocidos, así como por la frecuencia relativa de esos tipos en un estudio.

Para cuantificar los resultados de este trabajo, se realizó la habilidad discriminatoria de los métodos de tipificación mediante el índice de diversidad de Simpson (Hunter y Gaston, 1988). Se ha sugerido que un índice de 0.90 o mayor es adecuado para ser utilizado en un sistema de tipificación.

Se determinaron los índices de discriminación de los métodos en forma individual y las combinaciones posibles de los métodos (Cuadro 5). No se incluyeron los resultados de aglutinación en placa debido a problemas de aglutinación espontánea o bien inaglutinabilidad.

Se encontró que el serovar A fue el más prevalente, seguido por el serovar C, entre 24 aislamientos del estado de Morelos. Del estado de México se reconocieron los serovares A, B y C entre 8 aislamientos, proporcionalmente (Cuadro 6).

3.6 Prueba de adherencia *in vitro* de *H. paragallinarum* a células epiteliales traqueales.

Los resultados de adherencia de 40 aislamientos nacionales de *H. paragallinarum* probados, se muestran en forma de promedios, luego de realizarse por triplicado (Cuadro 7).

Los promedios de adherencia de las cepas de referencia 0083 (serovar A) y Modesto (serovar C) se encontraron muy similares: 43.760 ± 11.659 y 42.000 ± 2.813 , respectivamente. La cepa 0222 (serovar B) mostró una adherencia menor: 17.400 ± 9.018 (Cuadro 8).

Se realizó la tabla de análisis de varianza para los promedios de adherencia de *H. paragallinarum* a células epiteliales traqueales de pollo (Cuadro 9).

Los promedios de la adherencia de 40 aislamientos de *H. paragallinarum* se agruparon en serovares, donde los aislamientos correspondientes al serovar A obtuvieron un promedio de 36.182 ± 6.785 ; los del serovar B, 32.200 ± 4.404 y los del serovar C, 33.957 ± 5.965 (Cuadro 10).

Se realizó la comparación de los promedios de adherencia de las cepas de referencia de *H. paragallinarum* a células epiteliales traqueales de pollo, donde se encontró una diferencia estadísticamente significativa al comparar la cepa 0083 y 0222 ($p < 0.01$), lo mismo que entre la cepa 0222 y Modesto. Entre la cepa 0083 y la cepa Modesto se observó una adherencia similar y no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) (Cuadro 11).

Al comparar los promedios de adherencia de las cepas de referencia y los aislamientos de campo de *H. paragallinarum*, en todas las comparaciones se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) (Cuadro 12)

Cuadro 1. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS DE 40 AISLAMIENTOS DE *Haemophilus paragallinarum*.

NO. DE AISLAMIENTOS	%	MANITOL	MALTOSA	SUCROSA	BIOVARIANTE BIOQUÍMICO DE BLACKALL
20	50	+	+	+	I
10	25	+	-	-	II
4	10	-	+	+	III
6	15	+	+	-	IV

Todos los aislamientos produjeron ácido a partir de glucosa y manosa.

Todos fueron negativos a la fermentación de galactosa, lactosa, trehalosa y xilosa

Cuadro 2. SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE 40 AISLAMIENTOS DE *Haemophilus paragallinarum*.

NO. DE AISLAMIENTOS	NEOMICINA	ESTREPTOMICINA	TETRACICLINA	BIOVARIANTE ANTIBACTERIANO DE BLACKALL
25	S (≤ 2)	S (≤ 2)	S (≤ 2)	I
5	S (≤ 2)	R (≥ 16)	S (≤ 2)	II
2	S (≤ 2)	R (≥ 16)	R (≥ 16)	III
4	R (≥ 16)	R (≥ 16)	S (≤ 2)	IV
4	I (4 - 8)	I (4 - 8)	S (≤ 2)	V

Susceptibilidad (S) $\leq 2 \mu\text{g} / \text{ml}$

Susceptibilidad Intermedia (I) 4 a $8 \mu\text{g} / \text{ml}$

Resistencia (R) $\geq 16 \mu\text{g} / \text{ml}$

Todos los aislamientos mostraron susceptibilidad a: ampicilina, eritromicina y penicilina

Variación : Neomicina, estreptomicina y tetraciclina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 3. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN EN PLACA CON SUERO OBTENIDOS DE 40 AISLAMIENTOS DE *Haemophilus paragallinarum*.

No. De Aislamientos	Serovar A	Serovar B	Serovar C	No tipificables
40	20 (83 %)	1 (4.1 %)	3 (12.5 %)	16 (40%)

Cuadro 4. RESULTADOS OBTENIDOS DE 40 AISLAMIENTOS DE *Haemophilus paragallinarum* SOMETIDOS A LA PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN.

SEROVARES	NO DE AISLAMIENTOS	%
A (Cepa de referencia 0083)	21	52.5
B (Cepa de referencia 0222)	5	12.5
C (Cepa de referencia Modesto)	14	35.0
Total	40	100.0

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Cuadro 5. ÍNDICES DE DISCRIMINACIÓN DE LOS MÉTODOS DE TIPIFICACIÓN UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO.

MÉTODOS	NUMERO DE BIOVARIANTES IDENTIFICADOS	PORCENTAJE DEL BIOVARIANTE	INDICE DISCRIMINATORIO
Serovares IH	3	52.5	0.601
Biovariante Bioquímico	4	50.0	0.671
Biovariante Antibacteriano	5	62.5	0.585
Serovar IH + Biovariante Bioquímico	7	30.0	0.851
Serovar IH + Biovariante Antibacteriano	8	37.5	0.819
Biovariante Bioquímico + Biovariante Antibacteriano	9	45	0.760
Serovar IH + Biovariante Bioquímico + Biovariante Antibacteriano	12	25.0	0.906

Cuadro 6. FRECUENCIA DE SEROVARES ENCONTRADOS POR ESTADO DE LA REPÚBLICA MEXICANA.

Estados	Serovar A	Serovar B	Serovar C	Total por Estado
Morelos	15	1	8	24
México	2	3	3	8
Jalisco	1	1	1	3
Michoacán	2	0	0	2
Puebla	0	0	1	1
Guanajuato	0	0	1	1
Hidalgo	1	0	0	1
Total	21	5	14	40

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Cuadro 7. PROMEDIO DE ADHERENCIA DE 40 AISLAMIENTOS DE *Haemophilus paragallinarum* A CÉLULAS EPITELIALES TRAQUEALES.

AISLAMIENTO	SEROVAR	PROMEDIO DE ADHERENCIA A 25 CÉLULAS
FR001	A	28.0
FR002	C	32.2
FR003	C	39.0
FR004	A	35.0
FR005	A	22.6
FR006	A	42.0
FR007	A	33.2
FR008	A	47.0
FR009	C	47.4
FR010	A	36.6
FR011	A	28.6
FR012	A	31.6
FR013	C	31.4
FR014	A	29.6
FR015	C	27.6
FR016	B	30.0
FR017	B	33.0
FR018	C	30.0
FR019	C	38.4
FR020	A	42.0
FR021	C	38.2
FR022	C	28.0
FR023	A	35.0
FR024	A	42.0
FR025	A	39.0
FR026	A	33.0
FR027	A	38.6
FR028	C	33.4
FR029	A	45.0
FR030	A	37.0
FR031	A	29.0
FR032	C	29.4
FR033	A	42.0
FR034	C	29.0
FR035	B	31.4
FR036	B	28.2
FR037	C	36.0
FR038	A	43.0
FR039	B	38.4
FR040	C	35.4

Control positivo (Cepa Modesto)	42.0
Cepa 0083	43.76
Cepa 0222	17.4
Control negativo (<i>Pasteurella avium</i>)	2.5

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Cuadro 8. PROMEDIO DE ADHERENCIA DE CEPAS TIPO DE *Haemophilus paragallinarum* A CÉLULAS EPITELIALES TRAQUEALES DE POLLO (25 observaciones por cepa).

Cepa Tipo	Media	Desviación Estándar
0083	43.760	11.659
0222	17.400	9.018
Modesto	42.000	2.813

Cuadro 9. TABLA DE ANOVA DE MEDIAS DE ADHERENCIA DE *Haemophilus paragallinarum* A CÉLULAS EPITELIALES TRAQUEALES DE POLLO.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio
Serovar	5	41.954	8.390 **
Error	1069	88.391	0.082
Total	1074	130.345	

** p < 0.01

Cuadro 10. PROMEDIO DE ADHERENCIA DE 40 AISLAMIENTOS DE *Haemophilus paragallinarum* A CÉLULAS EPITELIALES TRAQUEALES DE POLLO.

Aislamiento	No	Media	Desviación Estándar
Serovar A	21	36.182	6.785
Serovar B	5	32.200	4.404
Serovar C	14	33.957	5.965

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Cuadro 11. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE ADHERENCIA DE CEPAS TIPO DE *Haemophilus paragallinarum* A CÉLULAS EPITELIALES TRAQUEALES DE POLLO. PRUEBA DE TUKEY.

Cepa Tipo vs Cepa Tipo	Diferencia entre Medias	Intervalo de Confianza (99 %)	Significancia Estadística (p < 0.01)
Cepa 0083 vs Cepa 0222	1.4804	1.2061 - 1.7547	***
Cepa 0083 vs Cepa Modesto	0.0147	-0.2597 - 0.2890	N.S.
Cepa 0222 vs Cepa Modesto	-1.4657	-1.7401 - 1.0140	***

***= Estadísticamente significativo (p<0.01)

**TESES CON
FALLA DE ORIGEN**

Cuadro 12. COMPARACIÓN DE MEDIAS DE ADHERENCIA DE *Haemophilus paragallinarum* A CÉLULAS EPITELIALES TRAQUEALES DE POLLO. PRUEBA DE TUKEY.

Cepa Tipo vs Aislamientos De campo	Diferencia Entre Medias	Intervalo de Confianza (99 %)		Significancia Estadística (p < 0.01)
Cepa 0083 vs Serovar A	0.2538	0.0553	0.4523	***
Cepa 0083 vs Serovar B	0.4081	0.1956	0.6206	***
Cepa 0083 vs Serovar C	0.3400	0.1392	0.5408	***
Cepa 0222 vs Serovar A	-1.2266	-1.4251	1.0281	***
Cepa 0222 vs Serovar B	-1.0723	-1.2848	-0.8598	***
Cepa 0222 vs Serovar C	-1.1404	-1.3412	-0.9396	***
Cepa Modesto vs Serovar A	0.2391	0.0406	0.4377	***
Cepa Modesto vs Serovar B	0.3934	0.1810	0.6059	***
Cepa Modesto vs Serovar C	0.3254	0.1246	0.5261	***

***= Estadísticamente significativo (p<0.01)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1 Discusión

Los resultados de la prueba de fermentación de carbohidratos obtenidos por el método de placa (Blackall, 1983), constituyen un método seguro y reproducible y es adecuado para estudios que involucren un gran número de aislamientos. Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con los obtenidos por Blackall (1983), quien realizó un estudio de 92 aislamientos procedentes de los cinco continentes, en dicho estudio se incluyeron aislamientos de *H. paragallinarum* con una historia amplia de manipulación de laboratorio, así como aislamientos recientes de campo (Blackall, 1983; Blackall *et al.*, 1989). A pesar de la diversidad de las muestras los aislamientos de *H. paragallinarum* fueron bastante uniformes en los patrones de fermentación de carbohidratos. Los resultados obtenidos en nuestro estudio coinciden con los obtenidos por Blackall (1983) ya que hubo producción de ácido a partir de glucosa y manosa en todos los aislamientos y hubo variación en la fermentación de manitol, maltosa y sucrosa

En un estudio realizado con aislamientos de Brasil (Blackall *et al.*, 1994), en el cual se manejaron 27 aislamientos de *H. paragallinarum*, se obtuvieron resultados similares a los que aquí se describen, con la diferencia de que no se probaron maltosa y manosa. Adicionalmente se obtuvieron resultados de variación con el sorbitol. Los aislamientos no produjeron ácido a partir de arabinosa, celobiosa, melezitosa, rafinosa, rhamnosa, ribosa, trehalosa y xilosa.

En un trabajo de caracterización de 24 aislamientos de *H. paragallinarum* en Argentina (Terzolo *et al.*, 1993), todos produjeron ácido a partir de glucosa, maltosa, sucrosa y manitol, y 3 aislamientos de 24 mostraron actividad alfa glucocidasa. Ningún aislamiento fermentó galactosa y trehalosa. De forma similar, en el presente trabajo se encontró que aislamientos de *H. paragallinarum* de México, no fermentaron galactosa y trehalosa.

En cuanto a la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, los resultados del presente trabajo mostraron que la mayoría de los aislamientos fueron susceptibles a la

neomicina, estreptomina y tetraciclina (25 de 40 aislamientos) (Cuadro 2). 8 aislamientos del serovar A y 2 del serovar C fueron resistentes a la estreptomina, lo cual coincide con los resultados obtenidos en otros trabajos (Blackall, 1988; Blackall *et al.*, 1989). Los resultados obtenidos en ese estudio con 92 aislamientos procedentes de todo el mundo, los valores de CMI para ampicilina, eritromicina y penicilina fueron similares para todos los aislamientos. En contraste, hubo variación considerable en los valores de CMI para neomicina, estreptomina y tetraciclina (186). En el estudio anterior se utilizó el criterio de Fales *et al.* (1986) para definir la susceptibilidad, susceptibilidad intermedia y resistencia para esos tres antimicrobianos con los niveles de CMI < 4 , 8 ó > 16 mg/ml, excepto que la susceptibilidad fue definida como < 4 mg/ml, la susceptibilidad intermedia como 4 a 8 mg/ml y la resistencia 16 mg/ml, con lo cual se identificaron 5 biovariantes antimicrobianos (Kume *et al.*, 1980). De forma similar, en el presente estudio se determinaron 5 tipos de biovariantes antimicrobianos (Cuadro 2), los cuales corresponden a los determinados por Blackall *et al.* (1989).

Con relación a la prueba de aglutinación en placa, en el presente estudio sólo pudieron ser tipificados 24 aislamientos de un total de 40, (Cuadro 3). Donde 20 correspondieron al serovar A, 1 correspondió al serovar B y 3 al serovar C. 16 aislamientos no pudieron ser tipificados. Lo anterior coincide con los resultados obtenidos con otros trabajos donde tampoco se logró la tipificación de todos los aislamientos probados, aún después de tratar los antígenos con hialuronidasa (Terzolo *et al.*, 1993). La técnica de aglutinación en placa, no permite ser utilizada con eficacia en la tipificación de aislamientos de *H. paragallinarum* (Kume *et al.*, 1980).

Respecto a la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, en el presente trabajo se confirmó lo realizado en otros estudios (Kume *et al.*, 1983; Blackall *et al.*, 1989) ya que es un método adecuado para serotipificar un gran número de aislamientos de *H. paragallinarum*, de acuerdo al esquema de Page (serovares A, B y C). El método de inhibición de la hemoaglutinación resuelve el problema de aislamientos no tipificables bajo el esquema de Page cuando se utiliza la prueba de aglutinación en placa. El estudio realizado en este trabajo con aislamientos de México, procedentes de 7 Estados (Morelos, México, Jalisco, Michoacán, Puebla, Guanajuato e Hidalgo; Cuadro 6) El serovar más frecuente fue el serovar A (21 aislamientos, 52.5 %), seguido del serovar C con (14

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

aislamientos, 35 %) y el menos frecuente, el serovar B (5 aislamientos, 12.5 %). Estos hallazgos son similares a los obtenidos en Brasil (Blackall *et al.*, 1994) en cuanto a la proporción de las cepas. En Argentina los serovares A y B fueron los más frecuentes (Terzolo *et al.*, 1993). A la fecha, se han identificado los tres serovares A, B y C en Brasil (Blackall *et al.*, 1994), Argentina (Terzolo *et al.*, 1993), Estados Unidos (Page, 1962), España (Pagés y Costa, 1986). Los serovares A y C en Japón (Kume *et al.*, 1978), Australia y Sudáfrica (Blackall y Eaves, 1988), Malasia (Zaini *et al.*, 1992) e Indonesia (Takagi *et al.*, 1991). Únicamente el serovar A en China y el serovar C en Taiwán (Chen *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1995). Kume *et al.* (1983) observaron una relación entre los serovares identificados y el origen geográfico de las cepas. En el presente trabajo, se pudo observar que el serovar A es el más prevalente en aislamientos procedentes de Morelos, siendo el estado del cual se contaron con más aislamientos.

Para cuantificar la capacidad discriminatoria de los métodos de tipificación empleados, en el presente trabajo se utilizó el índice de diversidad de Simpson (Hunter y Gaston, 1988). Se ha sugerido que un índice de 0.90 o mayor es conveniente para que un sistema de tipificación sea utilizado. Los resultados obtenidos en este trabajo (Cuadro 5) muestran que el índice discriminatorio más bajo fue para el método de tipificación de susceptibilidad a antibacterianos (0.585) y el más alto fue para la combinación de métodos de tipificación por serotipificación, inhibición de la hemoaglutinación, fermentación de carbohidratos y susceptibilidad a antibacterianos (0.906). Lo anterior concuerda por los resultados obtenidos por Blackall (1989) quien obtuvo resultados similares en la combinación de métodos de tipificación con un índice discriminatorio de 0.860.

Un hecho importante en cada esquema de tipificación es la reproducibilidad. Los métodos utilizados en los estudios de fermentación de carbohidratos y determinación de susceptibilidad a antibacterianos han mostrado ser altamente reproducibles (Blackall, 1988; Blackall *et al.*, 1989). Como ejemplo de ello, en un trabajo realizado en Australia (Blackall *et al.*, 1990) se utilizaron cepas de diferente laboratorio y éstos fueron los casos de las cepas 0222 y IPDH 2403 las cuales se manejaron en forma doble, con lo cual se evidenció que las dos cepas identificadas como 0222 correspondieron a un biovariante bioquímico IV, biovariante antibacteriano I y hemoaglutinina VII, mientras que ambas

cepas de IPDH 2403 fueron identificadas como biovariante bioquímico I, biovariante antibacteriano II y hemoaglutinina II.

La adherencia bacteriana es el primer paso en la colonización de las superficies mucosas del hospedero (Beachey, 1981). Las bacterias adhieren a las células vía adhesinas, las cuales tienen el potencial para interactuar específicamente con los receptores de la superficie de las células epiteliales (Jacques, 1996). Muchos receptores supuestos están localizados en la superficie de las células epiteliales y en la sobrecapa de moco, cuando el grado de invasión bacteriana del gel mucoso y/o el grado de multiplicación bacteriana dentro de ese gel mucoso excede al grado de moco removido de las superficies epiteliales, grandes poblaciones de bacterias pueden acumularse dentro del gel mucoso e inducir enfermedad (Beachey, 1981). Las superficies mucosas respiratorias están bañadas por gel mucoso, y parece que algunas bacterias muestran afinidad por esta capa mucosa. *Pasteurella multocida* es el agente etiológico de la rinitis atrófica del cerdo, y se adhiere al moco del tracto respiratorio. Una caracterización preliminar identificó componentes proteínicos de bajo peso molecular como receptores potenciales de moco para *Pasteurella multocida* (Jacques *et al.*, 1993). Posteriormente se ha demostrado que otro miembro de la familia *Pasteurellaceae*, *Actinobacillus pleuroneumoniae* y causante de la pleuroneumonía porcina, también mostró afinidad para una preparación cruda de moco del tracto respiratorio (Dom *et al.*, 1994). La afinidad de *A. pleuroneumoniae* para el moco crudo del tracto respiratorio fue resistente al calor y a la proteasa K e involucró un polisacárido que después de extraído de *A. pleuroneumoniae* fue capaz de unirse a esta preparación (Jacques *et al.*, 1996). Además se ha demostrado que el lipopolisacárido de *A. pleuroneumoniae* es la adhesina más importante involucrada a la adherencia de anillos traqueales de cerdo.

Los resultados de adherencia obtenidos para las cepas de referencia (Cuadro 8) y la comparación de medias (Cuadro 11) indican que entre la cepa 0083 (Serovar A) y la cepa Modesto (Serovar C) no hubo diferencia estadísticamente significativa utilizando la prueba de Tukey ($p < 0.01$), pero sí hubo diferencia entre éstas y la cepa 0222 (Serovar B) la cual mostró menor adherencia. En los promedios de adherencia de los 40 aislamientos estudiados todos mostraron adherencia y en la comparación de medias con las cepas de referencia, hubo diferencias estadísticamente significativas por la prueba de Tukey ($p < 0.01$) (Cuadro 12).

A diferencia de la cepa 0222 (serovar B) todos los aislamientos del serovar B estudiados mostraron una adherencia más alta y hubo diferencias estadísticamente significativas al realizar la comparación de medias entre la cepa de referencia citada y todos los aislamientos del serovar B, mediante la prueba de Tukey $p < 0.01$ con una diferencia entre medias - 1.0723 (I.C. - 1.2848 -0.8598).

La adherencia menor observada en la cepa 0222 es probable que sea una particularidad de cepa y no de serovar como se observa en los resultados (Cuadros 10 y 11). En particular la cepa 0222 es una cepa controvertida desde el punto de vista de su patogenicidad de acuerdo a los trabajos de Kume *et al.* (1984), Rimler y Davis (1977) y Yamaguchi *et al.* (1990)

En un trabajo realizado sobre adherencia de *H. paragallinarum*, Ueda *et al.* (1982) en Japón utilizó fibroblastos de embrión de pollo en cultivos primarios y 2 cepas patógenas de *H. paragallinarum* y una apatógena. La adherencia fue registrada como el porcentaje de células que mostraron adherencia después de 150 minutos de exposición en 500 a 700 células observadas. Los resultados obtenidos de células que presentaron adherencia fueron 86 y 58 % para las 2 cepas patógenas mientras que la cepa apatógena mostró una adherencia de 25 %. En este estudio demostraron que existe una relación entre la patogenicidad de las cepas de *H. paragallinarum* para los pollos y la habilidad para adherirse a fibroblastos de embrión de pollo (FEP). Al microscopio electrónico se encontró que los microorganismos se adhirieron en dos formas diferentes a las células cultivadas, en una la membrana externa de los microorganismos parece estar en contacto con la membrana del plasma de FEP directamente y en la otra la adherencia de los microorganismos parece estar mediada por material difuso de la superficie de la bacteria. Sin embargo esta prueba *in vitro* está basada en la habilidad de los microorganismos para unirse a los FEP, no a células epiteliales. Por lo tanto no se puede afirmar que todas esas interacciones estén involucradas en el proceso infeccioso en los huéspedes naturales.

Aún cuando *H. paragallinarum* es el agente causal de una de las enfermedades respiratorias más importantes que afectan a la industria avícola (Blackall *et al.*, 1997), se conoce poco acerca de los factores de virulencia de *H. paragallinarum*. En estudios realizados por Kume *et al.*, (1980), Sawata *et al.* (1984) y Sawata *et al.* (1985),

demonstraron que un antígeno capsular y un antígeno hemoaglutinante son los responsables de la patogenicidad de *H. paragallinarum*. Esto lo determinaron mediante el estudio de mutantes serovar A carentes de sus antígenos. Posteriormente Sawata *et al.* (1984) afirmó que el antígeno capsular es el más importante para la patogenicidad que el antígeno hemoaglutinante. En un trabajo de protección cruzada *in vivo* realizado por Yamaguchi *et al.* (1993), utilizando serovares B y C, se recuperaron cepas mutantes carentes de antígeno hemoaglutinante. Por pruebas de electrofóresis del ADN se determinó que la cepa mutante, correspondió o derivó de una de las cepas utilizada en las pruebas, esto es la cepa S1, serovar C. La cepa mutante referida como S1M, no fue patogénica, tampoco inmunogénica para pollos, en contraste con la cepa isogénica S1. Estos resultados demuestran que el antígeno hemoaglutinante puede jugar un papel importante en la inmunogenicidad como en la patogenicidad. Estos resultados de la prueba de patogenicidad de la cepa mutante sugieren que el antígeno hemoaglutinante específico de serovar C puede ser un factor importante en la colonización por cepas serovar C, tal como se ha sugerido por Kume *et al.* (1980) y Sawata *et al.* (1984) para antígenos hemoaglutinantes específicos del serovar A.

4.2 Conclusiones

Existe una variedad de biovariantes de *H. paragallinarum* en aislamientos de estados de la zona central de México.

Se determinaron 4 biovariantes de fermentación de carbohidratos en 40 aislamientos de *H. paragallinarum* procedentes de estados de la zona central de México.

Se determinaron 5 biovariantes de susceptibilidad a antimicrobianos en 40 aislamientos de *H. paragallinarum* procedentes de estados de la zona central de México.

Se determinó la presencia de los serovares A, B y C de *H. paragallinarum* en 40 aislamientos de estados de la zona central de México. Por lo que sería interesante estudios futuros para determinar los serovares presentes en estos aislamientos de acuerdo al esquema de serotipificación de Blackall.

La utilización combinada de las pruebas de fermentación de carbohidratos, susceptibilidad a antimicrobianos e inhibición de la hemoaglutinación podría ser la práctica más adecuada para la tipificación de aislamientos de *H. paragallinarum* en estudios epizootiológicos de la coriza infecciosa.

Tanto cepas de referencia como todos los aislamientos de *H. paragallinarum*, de los tres serovares, adhirieron a células epiteliales traqueales de pollo. La cepa de *Pasteurella avium*, agente apatógeno para las aves, no adhirió a las células blanco. Lo anterior sugiere una relación entre la habilidad de adherencia con la patogenicidad, por lo cual son necesarios estudios futuros al respecto.

Las diferencias de adherencia de *H. paragallinarum* a células epiteliales traqueales de pollo, parecen ser características de aislamiento en particular más bien que de serovar. Lo anterior puede estar relacionado con lo reportado en la literatura en cuanto a discrepancias en la patogenicidad de aislamientos, lo cual sugiere estudios futuros al respecto.

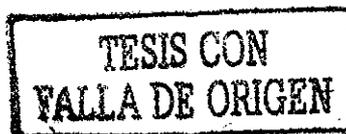
La ruta de diagnóstico útil de coriza infecciosa en México puede basarse en el aislamiento de *H. paragallinarum*, la caracterización bioquímica y la determinación del serovar correspondiente de los aislamientos. En cuanto a la patogenicidad de los mismos, se pueden realizar pruebas desafío y citoadherencia.

5.- LITERATURA CITADA

- Anhalt JP, Washington J A. Preparation and storage of antimicrobial solutions. In: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ, editors. Manual of clinical microbiology, 4th ed. Washington: American Society for Microbiology, 1985:1019-1020.
- Balows A, Isenberg HD. Introduction to biotyping in clinical microbiology. In: Balows A, Isenberg HD, editors. Biotyping in the clinical microbiology laboratory. Illinois: Charles C. Thomas, 1978:3-5.
- Beachey EH. Bacteriana adherence: adhesin-receptor interactions medianting the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J Infect Dis* 1981; 143:325-345.
- Biberstein EI, White DC. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. *J Med Microbiol* 1990; 2:75-78.
- Blackall PJ. An evaluation of methods for the detection of carbohydrate fermentation in avian *Haemophilus* species. *J Microbiol Meth* 1983; 1:275-280.
- Blackall PJ. Antimicrobial drug resistance and the occurrence of plasmids in *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 1988; 32:742-747.
- Blackall PJ. The avian haemofili. A review. *Clin Microbiol Review* 1989; 2:270-277.
- Blackall PJ, Eaves LE. Serological classification of Australian and South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Aust Vet J* 1988; 65:362-363.
- Blackall PJ, Eaves LE, Aus G. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* by the Page Scheme: Comparison of the use of agglutination and hemagglutination-inhibition tests. *Avian Dis* 1990; 34:643-645.
- Blackall PJ, Eaves LE, Rogers DG. Biotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates using hemagglutinin serotyping, carbohydrate fermentation patterns, and antimicrobial drugs resistance patterns. *Avian Dis* 1989; 33:491-496.
- Blackall PJ, Eaves LE, Rogers DG. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* by the Kume hemagglutinin scheme-proposal of a new serovar and altered nomenclature. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1185-1187.
- Blackall PJ, Silva EN, Yamaguchi T, Iritani Y. Characterization of isolates of avian Haemophili from Brazil. *Avian Dis* 1994; 38:269-274.
- Blackall PJ, Yamamoto R. *Haemophilus gallinarum* a re-examination. *J Gen Microbiol* 1989; 135:469-474.

- Blackall PJ, Yamamoto R. Infectious coryza. In: Isolation and identification of avian pathogens. 3th ed. H.G. Purchase, L.H. Arp, C.H. Domermuth, and J.E. Pearson, Eds. Pennsylvania: American Association of Avian Pathologists. Kenneth Square. 1990:27-31
- Bonilla-Ruz LF, García-Delgado GA. Adherence of *Pasteurella multocida* to rabbit respiratory epithelial cell *in vitro*. Rev Lat - Amer Microbiol 1993; 35:361-369
- Bragg RR, Greyling JM, Verschoor JA. Isolation and identification of NAD-independent bacteria from chickens with symptoms of infectious coryza. Avian Pathol 1997; 26:595-606.
- Chen X, Zhang P, Blackall PJ, Feng W. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolates from China. Avian Dis 1993; 37:574-576.
- Dom P, Haesebrouck F, Ducattelle R, Charlier G. *In vivo* association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs. Infect Immun 1994; 62:1262-1267.
- Eaves LE, Rogers DG, Blackall PJ. A comparison of the hemagglutinin and agglutinin schemes for the serological classification of *Haemophilus paragallinarum*, with the proposal of a new hemagglutinin serovar. J Clin Microbiol 1989; 27:1510-1513.
- Glorioso JC *et al*. Adhesion of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infections. Infection Immun 1982; 35:1103-1109.
- González A. Patogenicidad de *Escherichia coli* aisladas de casos clínicos de septicemia aviar en México: Demostración de producción de la toxina letal para pollos por inoculación en pollitos; y adherencia a células epiteliales traqueales (tesis de licenciatura). México, D.F. México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 1993.
- Hinz KH. Differentiation of *Haemophilus* strains isolated from chickens. II. Serologic studies on the plate agglutination test. Avian Pathol 1973; 2:211-229.
- Horner FR, Bishop GC, Jarvis CJ, Coetzee HT. NAD (V-factor)-independent and typical *Haemophilus paragallinarum* infection in commercial chickens: a five study Avian Pathol 1995; 24:453-463.
- Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol 1988; 26: 2465-2466.
- Iritani Y. Separation with trypsin of hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum*. Jpn J Vet Sci 1979; 41:60-71.
- Iritani Y, Hidaka S. Enhancement of hemagglutinating activity of *Haemophilus gallinarum* by trypsin. Avian Dis 1976; 20:614-616

- Iritani Y, Iwaki S, Katagari K. Production of extracellular antigen in culture supernate by *Haemophilus gallinarum*. J Comp Pathol 1978; 88:395-399.
- Iritani Y, Iwaki S, Yamaguchi T. Biological activities of crude polysaccharide extracted from two different immunotype strains of *Haemophilus gallinarum* in chickens. Avian Dis 1981; 25:29-37.
- Iritani Y, Iwaki S, Yamaguchi T. Properties of heat-stable antigen in the culture supernate of *Haemophilus paragallinarum*. Jpn J Vet Sci 1980; 42:635-641
- Iritani Y, Iwaki S, Yamaguchi T, Sueshi T. Determination of types 1 and 2 hemagglutinins in serotypes of *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1981; 25:479-483.
- Iritani Y, Yamaguchi T, Katagari K, Arita H. Hemagglutination inhibition of *Haemophilus paragallinarum* type 1 hemagglutinin by lipopolysaccharide. Am J Vet Res 1981; 42:689-690.
- Jacques M. Role of lipo-oligosaccharides and lipopolysaccharides in bacterial adherence. Trends Microbiol 1996; 4:408-410.
- Jacques M, Kobish M, Bélanger M, Dugal F. Virulence of capsulated and nonencapsulated isolates of *Pasteurella multocida* and their adherence to porcine respiratory tract cells and mucus. Infect Immun 1993; 61:4785-4792.
- Jones RN, Barry AL, Gavan TL, Washington JA. Susceptibility tests: microdilution and macrodilution broth procedures. In: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ, editors. Manual of clinical microbiology, 4th ed. Washington: American Society for Microbiology 1985: 972-977.
- Kume K, Sawata A. Immunologic properties of variants dissociated from serotype 1 *Haemophilus paragallinarum* strains. Jpn J Vet Sci 1984; 46:49-56.
- Kume K, Sawata A, Nakai T. Serologic and immunologic studies on the three types of hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum* serotype 1 organisms. Jpn J Vet Sci 1983; 45:783-792.
- Kume K, Sawata A, Nakai T, Matsumoto M. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. J Clin Microbiol 1983; 17:958-964.
- Kume K, Sawata A, Nakase Y. Immunologic relationship between Page's and Sawata's strains of *Haemophilus paragallinarum*. Am J Vet Res 1980; 41:757-760.
- Kume K, Sawata A, Nakase Y. Relationship between protective activity and antigenic structure of *Haemophilus paragallinarum* serotypes 1 and 2. Am J Vet Res 1980; 41:97-100.



- Lin JA, Shyu C, Yamaguchi T, Takagi M. Characterization and pathogenicity of *Haemophilus paragallinarum* serotype C in local chickens to Taiwan. *J Vet Med Sci* 1995; 58:1007-1009.
- Nakai T, Kume K, Yoshikawa H, Oyamada T, Yoshikawa T. Adherence of *Pasteurella multocida* or *Bordetella bronchiseptica* to the swine nasal epithelial cell *in vitro*. *Infect Immun* 1988; 56:234-240.
- Noel GJ, Love DC, Dosser DM. High-molecular-weight proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* mediated bacteriana adhesion to cellular proteoglycans. *Infect Immun* 1994; 62:4028-4033.
- Page LA. *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *Am J Vet Res* 1962; 23:85-95.
- Pagés MA, Costa QLL. Eficacia de una oleovacuna inactivada polivalente contra el coriza aviar. *Med Vet* 1986; 3:27-36.
- Polotsky Y, Dragunsky E, Khavkin T. Morphologic evaluation of the pathogenesis of bacteriana enteric infections. *Crit Rev Microbiol* 1994; 20:161-208.
- Rimler RB. Studies of the pathogenic avian haemophili. *Avian Dis* 1979; 23:1006-1018.
- Rimler RB, Davis RB. Infectious coryza: In vivo growth of *Haemophilus gallinarum* as a determinant for cross protection. *Am J Vet Res* 1977; 38:1591-1593.
- Rimler RB, Shotts EB, Brown J, Davis RB. The effect of atmospheric conditions on the growth of *Haemophilus gallinarum* in a defined medium. *J Gen Microbiol* 1976; 92:405-409.
- Rimler RB, Shotts EB, Brown J, Davis RB. The effect of sodium chloride and NADH on the growth of six strains of *Haemophilus* species pathogenic to chickens. *J Gen Microbiol* 1977; 98:349-354.
- Sandoval VE, Terzolo HR, Blackall PJ. Complicated infectious coryza in Argentina. *Avian Dis* 1994; 38:672-678.
- Sawata A, Kume K, Nakai T. Hemagglutinins of *Haemophilus paragallinarum* serotype 1 organisms. *Jpn J Vet Sci* 1984; 46:21-29.
- Sawata A, Kume K, Nakai T. Relationship between anticapsular antibody and protective activity of a capsular antigen of *Haemophilus paragallinarum*. *Jpn J Vet Sci* 1984; 46:475-486.
- Sawata A, Kume K, Nakase Y. Antigenic structure and relationship between serotypes 1 and 2 of *Haemophilus paragallinarum*. *Am J Vet Res* 1979; 40:1450-1453.

- Sawata A, Kume K, Nakase Y. *Haemophilus* infections in chickens. 2. Types of *Haemophilus paragallinarum* isolates from chickens with infectious coryza, in relation to *Haemophilus gallinarum* strain No. 221. Jpn J Vet Sci 1978; 39:645-652.
- Sawata A, Kume K, Nakase Y. Hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum* serotype 2 organisms: Occurrence and immunologic properties of hemagglutinin. Am J Vet Res 1982; 43:1311-1314
- Sawata A, Nakai T, Kume K, Yoshikawa H, Yoshikawa T. Intranasal inoculation of chickens with encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*: Electron microscopic evaluation of the nasal mucosa. Am J Vet Res 1985; 46:2346-2353.
- Sawata A, Nakai T, Kume K, Yoshikawa H, Yoshikawa T. Lesions induced in the respiratory tract of chickens by encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*. Am J Vet Res 1985; 46:1185-1191
- Soriano VE, Fernández RP. Estandarización de una prueba de inhibición de la hemoaglutinación para la coriza infecciosa como prueba serológica de monitoreo. Memorias XXXIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria Veracruz (Veracruz) México. 1998:246.
- Steel RGD, Torrie JH. Principles and procedures of statistics. A biometrical approach. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 1981.
- Takagi M, Takahashi T, Hirayama N, Mariana S, Ohta S. Survey on infectious coryza of chickens in Indonesia. J Vet Med Sci 1991; 53:637-642.
- Terzolo HR, Paolicchi FA, Sandoval VE, Blackall PJ, Yamaguchi T, Iritani Y. Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Argentina. Avian Dis 1993; 37:310-314.
- Ueda S, Nagasawa Y, Suzuki T, Tajima M. Adhesion of *Haemophilus paragallinarum* to cultured chickens cells. Microbiol Immunol 1982; 26:1007-1016.
- Yamaguchi T, Blackall PJ, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Pathogenicity and serovar-specific hemagglutinating antigens of *Haemophilus paragallinarum* serovar B strains. Avian Dis 1990; 34:964-968.
- Yamaguchi T, Iritani Y. Occurrence of two hemagglutinins on *Haemophilus paragallinarum* strain 221 and comparison on their properties. Jpn J Vet Sci 1980; 42:709-711.
- Yamaguchi T, Iritani Y, Hayashi Y. Hemagglutinating activity and immunological properties of *Haemophilus paragallinarum* field isolates in Japan. Avian Dis 1989; 33:511-515.
- Yamaguchi T, Iwaki S, Iritani Y. Serological and immunological differences between two hemagglutinins of *Haemophilus paragallinarum* strain 221. Jpn J Vet Sci 1980; 42:713-715.

- Yamaguchi T, Kobayashi M, Masaki S, Iritani Y. Isolation and characterization of a *Haemophilus paragallinarum* mutant that lacks a hemagglutinating antigen. Avian Dis 1993; 37:970-976.
- Yamamoto R. Infectious coryza. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WH, Yoder HW, editors. Diseases of Poultry. 9th ed. Ames: Iowa State University Press, 1991:186-195.
- Yamamoto R, Somersett DT. Antibody response in chickens to infection with *Haemophilus gallinarum*. Avian Dis 1964; 8:441-453.
- Zaini BT, Zai M, Iritani Y. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolated in Malasia. J Vet Med Sci 1992; 54:363-365.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

6.- ANEXOS

Anexo 1. Test medium agar (TMA)

Ingredientes	Cantidad
Biosato de peptona (BBL)	10.0 g
NaCl	10.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
Agar noble	15.0 g
Agua destilada	1000 ml
Suplemento	
Suero de pollo	10 ml
NAD (Solución 1%)	1 ml
Rojo de Fenol	0.004 %

Anexo 2. Test medium broth (TMB)

Ingredientes	Cantidad
Biosato de peptona (BBL)	10.0 g
NaCl	10.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
Almidón	1.0 g
Glucosa	0.5 g
Agua destilada	1000 ml

Suplemento

Suero de pollo	10 ml
NAD (Solución 1%)	1 ml

Anexo 3 Eritrocitos de pollo fijados con glutaraldehído

1. Eritrocitos de pollo obtenidos en solución Alsever (50/50 final ración)
2. Centrifugar -3,000 rpm/15 minutos.
3. Lavar tres veces en una solución al 0.15 M NaCl.
4. Medir el volumen celular.
5. Incubar 1- 2 % de eritrocitos en una solución de sales de glutaraldehído a 4°C / 30 minutos
6. Centrifugar - 2,000 rpm /10 minutos
7. Lavar 5 veces con 0.15 NaCl (2,000 rpm/5 minutos.
8. Lavar 5 veces con agua destilada.
9. Suspender en aguas destilada a una concentración de 30%
10. Adicionar timerosal a una concentración final de 1/10,000
11. Distribuir en pequeños volúmenes
12. Almacenar a 4°C en la oscuridad.

Solución de sales de glutaraldehído

Glutaraldehído al 25%	1 volumen
Solución salina	24 volúmenes

Solución salina

0.15 M Na ₃ PO ₄ (pH 8.3)	1 volumen
0.15 M NaCl	9 volúmenes
Agua destilada	5 volúmenes

Anexo 4. Medio de Rimler

Polipeptona	10 g
Biosato de peptona	10 g
Extracto de carne	2.4 g
Ácido Para-Aminobenzoico	0.05 g
Nicotinamida	0.05 g
Almidón	1.0 g
Glucosa	0.5 g
Cloruro de Sodio	9.0 g
Leptospira Base (Difco)	2.3 g
Agua destilada	1000 ml

Complemento

NADH (Solución al 1%)	1 ml
Suero de Caballo	10 ml

Anexo 5 Solución amortiguadora lisa- eritrocitos

Cloruro de amonio	8 29 g
Carbonato de Potasio	0 8401 g
Ácido etilendiaminotetracético (EDTA)	0 03722 g
Agua destilada	1000 ml
PH	7 3

Anexo 6 Solución Hank gelatina

CaCl ₂	0 14 g
Glucosa	1 0 g
NaCl	8 0 g
KCl	0 4 g
MgSO ₄ -7H ₂ O	0 2 g
KH ₂ PO ₄	0 06 g
Na ₂ HPO ₄ -12H ₂ O	0 2 g
Gelatina bacteriológica	2 5 g
Agua destilada	1000 ml
PH	7 2