



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CAMPUS IZTACALA

**“CONDICIONES DE MOTILIDAD *in vitro*
DE *Haemophilus paragallinarum*”**

T E S I S

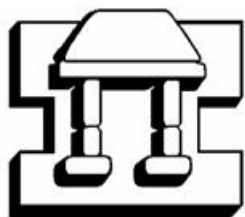
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

ANGELICA SERRANO VÁZQUEZ

ASESOR: DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL



IZTACALA

Los Reyes Iztacala, Edo. de México.

2004.



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.

A mi familia por apoyarme siempre.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sergio Vaca, al Dr. Erasmo Negrete, y Al Dr. Diego por haberme aceptado en su laboratorio y por despejar muchas de mis numerosas dudas durante la realización de esta tesis.

A los M. en C. Gloria Luz, Erick e Irma Delfín por haber hecho contribuciones importantes en la realización de este proyecto.

Este trabajo fue apoyado por los programas PAPIIT/IN219203-3, y PAPCA-UNAM.

Al Dr. Erasmo Negrete, por su dirección, por haberme asesorado y por tenerme tanta paciencia.

A mi mamá, a mis hermanas: Mary, Meche y Vicky, al fili y a mi abue Marce por haberme ayudado durante toda la carrera.

A mis amigos Mary, Marycarmen, Ivonne, Magali, Eli, Ara, Gaby, Misael, Gabriel, Judith, Usiel, ... por estar siempre conmigo.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Genética y de Microbiología.

ÍNDICE

1. RESUMEN

2. INTRODUCCIÓN

Coriza Infecciosa

- i. Formas de Transmisión
- ii. Síntomas Clínicos
- iii. Mortalidad y Morbilidad
- iv. Importancia Económica
- v. Etiología

Haemophilus paragallinarum

- i. Requisitos de crecimiento
- ii. Propiedades bioquímicas
- iii. Morfología colonial
- iv. Estructura antigénica
- v. Caracterización serológica
- vi. Resistencia a antibióticos
- vii. Vacunas

Motilidad bacteriana

3. ANTECEDENTES

4. ANTECEDENTES DIRECTOS

5. JUSTIFICACIÓN

6. OBJETIVOS

7. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

8. MATERIAL Y MÉTODOS

a. Bacterias

b. Medios de cultivo

c. Determinación de la motilidad

d. Atmósfera microaerofílica

e. Selección de bacterias móviles

f. Selección de las condiciones óptimas para la motilidad

g. Obtención de una posible flagelina

i. SDS-PAGE

ii. Western Blotting

9. RESULTADOS

10. DISCUSIÓN

11. CONCLUSIONES

12. APÉNDICES

13. REFERENCIAS

1. RESUMEN

Coriza infecciosa (CI) es una enfermedad respiratoria aguda de gallinas que causa grandes pérdidas económicas en la industria avícola. El agente causal es *Haemophilus paragallinarum*, una bacteria de la familia *Pasteurellaceae* que ha sido descrita como no motil y sin flagelo. La motilidad juega un papel muy importante a lo largo del ciclo infeccioso de una bacteria, por tanto, la motilidad y la presencia de flagelo en *H. paragallinarum* pueden ser puntos clave en su patogenicidad. El objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones microambientales que permitieran observar la motilidad de *H. paragallinarum in vitro*, e identificar la proteína responsable de la motilidad, utilizando diferentes cepas de *H. paragallinarum*. Los resultados muestran que *H. paragallinarum* es capaz de moverse *in vitro* y que las condiciones óptimas para su motilidad son: medio TSB, concentración de agar de 0.2%, microaerofilia y temperatura de incubación de 37°C. La motilidad se ve favorecida a pH 7 y a una concentración de 43mM de K_2HPO_4 y se inhibe a pH de 5 y 10 y por la presencia de $MgSO_4$ y NaCl a partir de 4 y 171mM respectivamente. Se observó que a 24, 39 y 40°C la motilidad disminuye. El $CaCl_2$, el suero, el NAD y la glucosa no influyeron en la motilidad de *H. paragallinarum*. Se encontró un tenue inmuno-reconocimiento de una proteína de aproximadamente 70 kDa utilizando un anticuerpo dirigido contra el flagelo de *Salmonella typhi* diluido 1:500.

2. INTRODUCCIÓN

Las bacterias patógenas juegan un papel importante en las enfermedades respiratorias de pollos domésticos. Una de estas enfermedades es la Coriza Infecciosa (21).

a. Coriza infecciosa (CI)

CI es una enfermedad respiratoria aguda de pollos causada por *Haemophilus paragallinarum* (Hpg) (3). El síndrome clínico se ha descrito en la literatura como un catarro contagioso o infeccioso (2, 3 y 4).

La CI clásica afecta únicamente el tracto respiratorio superior causando sinusitis y conjuntivitis (21). Cuando Hpg se asocia con otros agentes bacterianos como *Escherichia coli*, *Pasteurella gallinarum*, *Mycoplasma gallisepticum*, *P. avium*, *P. volantium*, *Pasteurella* sp A y *Ornithobacterium rhinotracheale* y menos frecuentemente con *P. haemolitica*, *P. multocida*, *M. synoviae* y *Salmonella enterica*, se agrava el curso de la enfermedad y se pueden encontrar lesiones de neumonía, aerosaculitis, septicemia y artritis, a esto se le denomina CI complicada (47).



Figura 1: Aves con Coriza infecciosa

i. Formas de Transmisión

Los brotes aparecen usualmente con la introducción de aves portadoras en el lote (47). La transmisión de la infección es por contacto directo, por el aire, el polvo, las descargas respiratorias o el agua de bebida contaminada con exudados nasales (4). Las aves susceptibles desarrollan los síntomas generalmente a los 3 días después de la exposición al agente microbiano (6).

ii. Síntomas clínicos

Los síntomas clínicos más característicos de la CI incluyen la inflamación edematosa de la cara, alrededor de los ojos y la barbilla, descarga nasal, senos paranasales inflamados, anorexia y diarrea (5, 47, 49). La descarga líquida de los ojos hace que muchas veces se peguen los párpados (47). La visión es afectada por la inflamación (6).



Figura 2: Ave infectada por Hpg con lesión edematosa

iii. Mortalidad y morbilidad

Los casos de CI no complicada causa alta morbilidad y baja o nula mortalidad. Sin embargo si la cepa infectante es muy patógena o se encuentra asociada con otros agentes infecciosos puede producir alta mortalidad (47).

iv. Importancia económica

Las más grandes pérdidas económicas son el resultado de la actuación de un crecimiento pobre en los pollos, una disminución en el consumo de agua y marcada reducción en la producción del huevo (4). La enfermedad está principalmente limitada a pollos y no tiene importancia de salud pública (3, 6).

Entre los países con más alta incidencia de la enfermedad se encuentran: Australia, Alemania, África, Argentina, Brasil, Japón, China, México y Estados Unidos (2, 3, 4, 5, 6, 17 y 40).

v. Etiología

El agente etiológico de CI eludió su identificación por varios años, porque la enfermedad era a menudo enmascarada por diferentes infecciones (47).

De Blicek aisló el agente causal en 1932, y lo nombró el *Bacillus hemoglobinophilus coriizae gallinarum* (6).

Basado en estudios dirigidos durante los años treinta, el agente causal de CI fue clasificado como *Haemophilus gallinarum* (Hg) debido a que requería de los factores de crecimiento hemina (factor X) y NAD (factor V) (5). En 1962, Page y cols. encontraron que todas las cepas aisladas de aves con CI requerían sólo el factor V para el crecimiento. Esto llevó a la propuesta y la aceptación general de una nueva especie: *Haemophilus paragallinarum* (Hpg) (6).

Estas observaciones, además del cambio abrupto claro en el requisito del factor X de todos los aislamientos recuperados mundialmente desde 1962, llevó a algunos investigadores a cuestionar la validez de las pruebas usadas por los primeros investigadores en la clasificación de sus aislamientos como Hg y se sugirió que las descripciones de que el agente causal de CI era un organismo dependiente del factor X y V era incorrecto (3, 5, 6 y 47).

Más recientemente, en pollos con CI en África del Sur y en México se han encontrado aislamientos de Hpg NAD independientes, las cuales obtienen esta propiedad mediante la inserción de un plásmido (7, 8, 17 y 40).

Kilian y Biverstein propusieron que la clasificación de *Haemophili*, la cual se basó estrictamente en requerimientos de factores de crecimiento *in vitro* fue incorrecta (2, 47).

b. *Haemophilus paragallinarum* (Hpg)

El género *Haemophilus* son bacterias Gram negativas, las cuales junto con los géneros *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Gallibacterium*, *Manhemia* pertenecen a la familia *Pasteurellaceae* (37).

Hpg es una bacteria no mótil, e incapaz de formar flagelo (37). Las cepas virulentas pueden presentar una cápsula. Es pleomórfica, ya que se puede observar que en cultivos de 24 horas, aparece como bacilos cortos o cocobacilos de uno a tres μm de longitud y de 0.4 a 0.8 μm de anchura, con una tendencia para la formación de filamentos. Después de 48-60 h, el organismo sufre degeneración que muestran fragmentos y sus formas consecuentes (6). Esta bacteria sobrevive sólo pocas horas fuera del ave por lo cual es recomendable desarrollar un medio de transporte para hisopados del seno infraorbitario (21). Los subcultivos a medio fresco en esta fase volverán a la morfología típica. Los bacilos pueden aparecer individualmente, en pares, o como cadenas cortas (3, 5).



Figura 3: *Haemophilus paragallinarum*.

i. Requisitos de crecimiento

La forma reducida de NAD (NADH) (1.56-2.5 $\mu\text{g/ml}$ en el medio) o su forma oxidada (20-100 $\mu\text{g/ml}$) es necesario para el crecimiento *in vitro* de la mayoría de los aislamientos de Hpg (6). Las excepciones son los aislamientos descritos en África del Sur y en México que son NAD independientes (7, 8 y 17).

El cloruro de sodio (NaCl) (1.0-1.5%) es esencial para el crecimiento; el suero de pollo (1%) es requerido por algunas cepas para un crecimiento óptimo(5).

El medio de infusión cerebro corazón, el agar de triptosa, y la infusión de carne de pollo son algunos medios de cultivo en que se agregan los suplementos. Se usan los medios de cultivo más complejos para obtener crecimiento denso de organismos para los estudios de caracterización (6).

Varias especies bacterianas excretan factor V que apoya el crecimiento de Hpg sirviéndole como cepas nodrizas (47).

El organismo es comúnmente crecido en una atmósfera de 5% de CO_2 ; sin embargo, el CO_2 no es un requisito esencial (6). El organismo puede crecer bajo tensión de oxígeno (47).

Las temperaturas mínimas y máximas de crecimiento son 25 y 45 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente, el rango óptimo es 34-42 $^{\circ}\text{C}$. El organismo normalmente crece a 37-38 $^{\circ}\text{C}$ (5).

ii. Propiedades Bioquímicas (47)

Cuadro 1: Pruebas bioquímicas diferenciales de Hpg.

Pruebas	<i>O.</i> <i>rhinotracheale</i>	<i>H.</i> <i>paragallinarum</i>	<i>P.</i> <i>avium</i>	<i>P.</i> <i>volantium</i>	<i>Pasteurella</i> sp A
Catalasa	- ^a	-	+	+	+
Pigmento	-	-	+	+	-
Microaerofilia	+	+	-	-	-
b-galactosidasa	+	+ ^b	-	+	V
Arabinosa	-	-	-	-	+
Galactosa	+	-	+	+	+
Maltosa	+	+ ^b	-	+	V
Manitol	-	+	-	+	V
Sorbitol	-	V	-	V	-
Sacarosa	-	V	+	+	+
Trehalosa	-	-	+	+	+

-^a: el 90% de las cepas *O. Rhinotracheale* son catalasa negativas.

+^b: Los Hpg NAD independientes son negativos a la prueba de b-galactosidasa y fermentación de maltosa.

iii. Morfología colonial.

Las colonias se observan como gotas de 0.3 mm de diámetro, mucosas, que pueden presentar o no iridiscencia y van desde lisas hasta rugosas, observándose formas intermedias (3).

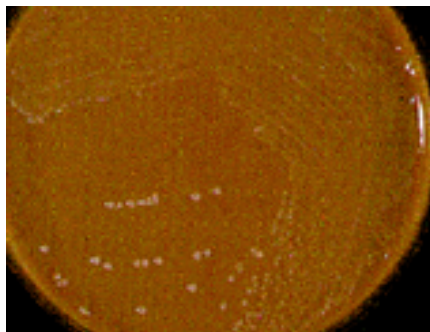


Figura 4: Morfología colonial de Hpg en placa de agar sangre

iv. Estructura Antigénica

Se han descrito varios antígenos de Hpg, entre los que encontramos: los antígenos reportados por Sawata y cols. en 1979 que fueron clasificados como antígeno L (sensible al calor y a la tripsina), HL (sensible al calor y resistente a la tripsina) y HS (estable al calor y resistente a la tripsina) (9). Los antígenos L existen en tres formas (L1, L2 y L3). Los antígenos L1 y L2 son respectivamente responsables de la especificidad de serovariedades de Page A y C; el resto de los antígenos (L3, HL y HS) son comunes a todas las cepas (9, 10, 26 y 47).

Por otro lado, Hinz en 1973 describió un antígeno termolábil de tipo específico y un antígeno termoestable de tipo común entre cepas de los serogrupos A y B (15, 16).

El antígeno más importante de las cepas patógenas es el antígeno hemoaglutinante (AgHem). Esto es debido a que se considera que una cepa de Hpg es patógena cuando es capaz de adherirse a las células que tapizan el epitelio respiratorio. El requisito de adherencia al tracto respiratorio tiene estrecha relación con la hemoaglutinación. Esto se debe a que los eritrocitos y las células del epitelio respiratorio comparten antígenos comunes; de hecho las cepas que pierden su capacidad de hemoaglutinar dejan de ser patógenas.

Este antígeno hemoaglutinante no siempre es detectado con facilidad, ya que algunas cepas lo tienen enmascarado por antígenos capsulares superficiales que impiden su detección (5, 6 y 47).

Ya que se ha demostrado que los antígenos hemoaglutinantes de Hpg son indispensables en la patogenicidad, Fernández y cols. determinaron el efecto de los anticuerpos séricos inhibidores de la hemoaglutinación contra las serovariedades A-1, B-1 y C-2 de Hpg sobre la adherencia *in vitro* a células epiteliales traqueales de pollo. Sus resultados sugieren que las hemoaglutininas de Hpg actúan como adhesinas y que los anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación actúan como neutralizantes de la adherencia a las células del tracto respiratorio (13).

Al estudiar el efecto de las condiciones de crecimiento y los tiempos de incubación en la expresión de antígenos de Hpg que fueron detectados por

anticuerpos monoclonales, se encontró que las alteraciones de las condiciones de crecimiento afectan de manera significativa los niveles de expresión de los antígenos detectados por los anticuerpos monoclonales (9).

v. Clasificación serológica

Page en 1962 realizó el primer estudio serológico de Hpg en Estados Unidos, mediante pruebas de aglutinación en placa, donde se describieron tres serogrupos: A, B y C (6). También en 1962 Kato y Tsubahara mediante la misma prueba realizada con aislamientos de Japón, reportaron los serogrupos I, II y III (47). Sawata y cols. en 1978 extendieron los estudios de Kato y Tsubahara, e indicaron que los serogrupos II y III eran variantes del serogrupo I, proponiendo los serovares 1 y 2 (33).

Kume y cols. en 1983 propusieron una clasificación de cepas de Hpg utilizando bacterias sonicadas y tratadas con tiocianato de potasio en una prueba de inhibición de la hemoaglutinación. Se encontró que los serogrupos A, B y C de Page correspondieron a los serogrupos I, II y III, respectivamente, y fueron reconocidos siete serovares hemoaglutinantes (HA-1 a HA-7) (33).

Actualmente los tres serogrupos de Page pueden ser reconocidos por pruebas de inhibición de hemoaglutinación. Las cepas del serogrupo A son muy hemoaglutinantes mientras que las cepas de los serogrupos B y C necesitan tratamientos previos de los antígenos para realizar la prueba (7).

En un estudio de caracterización de aislamiento de Hpg en pollos de la India, Blackall y cols. informaron que un total de 17 aislamientos no podían asignarse confiadamente a un serogrupo y que la ausencia del serogrupo B era notable. Este estudio proporcionó una base legítima de conocimiento para construir programas de prevención eficaz para CI (4)

Zhang y cols. en el 2003 reportaron que el serogrupo B se ha encontrado en varios países asiáticos como China, Indonesia y Filipinas. También hacen mención que este serogrupo nunca se ha encontrado en las cepas aisladas de Hpg de Australia (27).

Como las vacunas de CI actualmente disponibles para el uso en Australia sólo contienen serogrupo A y C, cualquier entrada del serogrupo B produciría fracasos de la vacuna. El punto de entrada principal para el serogrupo B en Australia sería por pollos vivos importados (tanto en forma legal como ilegal) de Indonesia que sean portadores del microorganismo (44).

Fernández y cols. en el 2000, examinaron 42 aislamientos de Hpg de México bajo el esquema de inhibición de la hemoaglutinación de Kume. Los antígenos hemoaglutinantes que obtuvieron mediante extracción con tiocianato de potasio y sonicación se probaron contra antisueros de nueve cepas de referencia, identificándose las serovariedades A-1, A-2, B-1 y C-2, y un total de 6 aislamientos no pudieron ser serotipificados (14).

vi. Resistencia a antibióticos

Blackall en 1988 estudió la resistencia a drogas antimicrobianas y la ocurrencia de plásmidos en Hpg. Utilizó un método de microdilución en caldo para examinar la sensibilidad de 75 cepas de Hpg hacia seis drogas antimicrobianas (ampicilina, eritromicina, neomicina, penicilina, estreptomycinina y tetraciclina). 55 de las cepas fueron sensibles a las seis drogas mientras que las cepas restantes fueron resistentes a la estreptomycinina y una de las cepas también fue resistente a la tetraciclina y otra a la neomicina. Las cepas que no mostraron resistencia a las drogas antimicrobianas pertenecieron a la serovariante de aglutinina C, siendo esta la serovariedad más frecuente en el estudio (27 de 75). No se detectaron plásmidos en ninguna de las 75 cepas (2).

vii. Vacunas

Las primeras bacterinas contra CI fueron elaboradas inoculando Hpg en los sacos vitelinos de huevos embrionados de 5-7 días de edad. En varios ensayos se ha demostrado que estas bacterinas son incapaces de proteger a las aves vacunadas contra los síntomas clínicos de la CI, a pesar de que disminuyen las lesiones secundarias de septicemia y aerosaculitis y reducen la caída en la producción de huevos. Por este motivo se han dejado de utilizar y en cambio

tienen alta difusión las vacunas elaboradas en caldo de cultivo. Los medios más utilizados son la infusión de carne de pollo, el medio Casman y el caldo cerebro-corazón.

La prevención de enfermedades infecciosas a través de la vacunación con las vacunas emulsionadas es un método eficaz de proteger a los pollos (15).

Se estudió en pollos la relación entre la liberación del antígeno de formulaciones *in vitro* y la respuesta de anticuerpos después de la administración de una bacterina emulsionada que contenía Hpg. En las bacterinas contra CI emulsionadas, las formulaciones de baja liberación de antígeno indujeron y mantuvieron niveles altos de anticuerpos de inhibición hemoaglutinante contra Hpg (10).

Actualmente las vacunas comerciales son todas inactivadas y debido a que actualmente se admite que el serogrupo B debe ser incluido, puede asegurarse que todas son trivalentes ya que anteriormente se podían encontrar también vacunas bivalentes para los serogrupos A y C. Los laboratorios que elaboran estas vacunas las preparan con cepas estándar internacionalmente reconocidas que aseguran la efectividad de las vacunas; sin embargo, tanto en Argentina como en Sudáfrica se han registrado y publicado evidencias de fallas de protección por parte de estas, por lo que en Argentina existen algunos laboratorios locales que comercializan bacterinas elaboradas con cepas regionales (48).

Varias cepas de Hpg aisladas de brotes de CI en pollos de Zimbabwe, fueron serotipificados utilizando antisuero policlonal producido contra serovares de cepas de referencia de Hpg. Se encontró que pertenecían al serovar C-3. En este caso, el antisuero policlonal producido por las cepas de referencia fue usado específicamente contra 46 cepas del serovar C-3. Al usar el último suero a una dilución 1 en 50 no se encontró ninguna reacción cruzada con otros miembros del serovar C. La severidad de los brotes de la enfermedad en Zimbabwe, la historia de la vacunación de las bandadas infectadas en este sitio y el aislamiento del singular serovar sudafricano C-3, crean la necesidad para hacer vacunas compuestas de aislamientos locales para controlar CI en regiones donde ocurren fracasos en la vacunación (4).

c. Motilidad bacteriana

La motilidad puede jugar un papel muy importante a lo largo del ciclo infeccioso de una bacteria (37). Una gran variedad de genes de movilidad son encontrados en islas de patogenicidad. (24).

El tipo más común de motilidad bacteriana se da a través del flagelo, un largo filamento helicoidal que puede llegar a medir hasta 15-20 μ m de longitud y aproximadamente 20nm de diámetro. Es impulsado por un motor rotatorio embebido en la superficie celular (43).

El flagelo procarionte se puede dividir en tres estructuras principales: el filamento que es el componente propulsor, el gancho que es una estructura de acoplamiento entre el filamento y la superficie celular, y el cuerpo basal que es un complejo multiprotéico que contiene el motor flagelar (19).

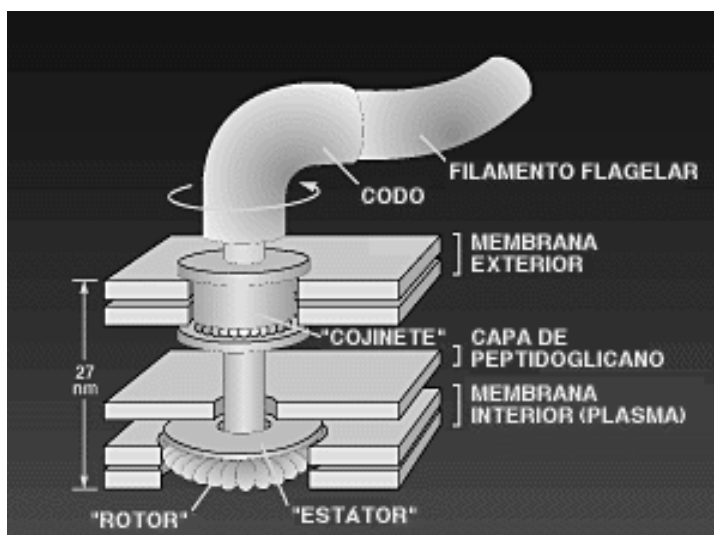


Ilustración 1: Motor flagelar de *E. Coli*.

La secreción de los componentes flagelares, es llevada a cabo a través del sistema de secreción tipo III, el cual es una vía Sec-independiente (no presentan intermediario periplasmático ni una secuencia señal en el extremo amino terminal). La secreción de estos componentes ocurre en un solo paso desde el citosol hasta el exterior celular. El sistema de secreción tipo III desempeña un papel central en la patogenicidad de muchas bacterias gramnegativas (22).

En la síntesis del flagelo, el ensamblaje procede en una secuencia lineal del extremo proximal al distal y se lleva a cabo por adición de monómeros y no de estructuras preformadas. El anillo MS es la estructura estable más temprana, este se inserta en la membrana interna y forma el núcleo sobre el que se acoplarán todos los demás componentes, y concluye con la adición de subunidades de flagelina (*fliC*) para formar el filamento (22, 37).

La morfogénesis flagelar y la expresión genética se encuentran estrechamente acopladas. En este proceso se ven involucrados más de 50 genes (20, 43).

Cada flagelo se mueve por rotación conducida por potenciales iónicos tales como protones de modo más frecuente o iones de sodio en algunas especies (35).

El movimiento flagelar no siempre es el mismo, sino que depende del número y disposición del flagelo así como de la especie bacteriana (49).

Hay dos tipos de motilidad bacteriana: el swimming y el swarming. El swimming o natación es el desplazamiento de las bacterias de forma individual y al azar en medios líquidos o viscosos en el caso de especies cuyo flagelo se encuentre de manera axial. El swarming o enjambrado es una forma de motilidad que es caracterizada como una rápida progresión coordinada de una población bacteriana sobre superficies con el fin de colonizarlas. Como un proceso bacteriano colectivo, el swarming es a menudo asociado con la formación de biopelículas (biofilms) y se ha unido a la expresión de otros factores de virulencia en las bacterias patógenas. (11, 12, 19,20, 46 y 47). El swarming es habilitado por la producción de numerosos flagelos peritricos en algunas bacterias (32).

Muchas de las bacterias patógenas poseen flagelo y su papel en la motilidad es importante para la quimiotaxis y la colonización (1, 39).

Sintetizar un flagelo es metabólicamente costoso (39); sin embargo, la presencia de esta estructura le confiere ventajas considerables a una célula con respecto a otra que no lo expresa. Los beneficios potenciales de la motilidad incluyen la formación de biopelículas, la migración, el incremento en la eficiencia de la adquisición de nutrientes, mayor posibilidad de evadir el efecto de sustancias tóxicas, la habilidad de traslocación a hospederos de preferencia y la optimización

de la facilidad de acceso a los sitios de colonización y dispersión en el medio ambiente durante el curso de la transmisión (14, 21, 35).

Tanto la motilidad como la expresión del flagelo bacteriano están reguladas por factores genéticos y, a menudo, por los factores del medio ambiente (20). Se ha demostrado que existe una relación estrecha entre el papel de la motilidad y la relación ecológica entre la bacteria y el hospedero, así como una regulación de los diferentes puntos del ciclo infeccioso (39).

Hay condiciones medioambientales óptimas para la motilidad (temperatura, pH, nutrientes, oxigenación, etc). Algunas bacterias pueden no presentar motilidad o expresar flagelo bajo condiciones inapropiadas de crecimiento *in vitro* (1, 41).

3. A NTECEDENTES

Los flagelos son organelos extremadamente efectivos de locomoción utilizados por una gran variedad de bacterias y archaeas. Algunas bacterias, incluyendo *Aeromonas*, *Azospirillum*, *Rhodospirillum* y especies de *Vibrio*, poseen dos sistemas flagelares que están preparadas para el movimiento bajo diferentes circunstancias. El flagelo polar se produce continuamente mientras que los flagelos laterales son producidos bajo condiciones que desactivan la función del flagelo polar. Así a veces se encuentran los dos tipos de flagelos son ensamblados simultáneamente (32).

En aislamientos de *Bacillus subtilis* se encontró una conducta multicelular conocida como swarming la cual le confiere grandes beneficios en la formación de biopelículas (11).

Penn y cols. en 1992 concluyeron que algunas de las formas estructurales y contenido genético están relacionados con los tipos flagelares y su posible significado en la patogenicidad de algunas bacterias de importancia médica como son *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Helicobacter pylori* y diferentes espiroquetas, entre otras. Estos autores también encontraron que el flagelo contribuye significativamente en el establecimiento de infecciones causadas por bacterias patógenas (44).

En *Vibrio vulnificus* se evaluó el papel del flagelo y la motilidad en la patogenicidad con un mutante *flgE*-anulado y se encontró que se disminuía la adhesión y no había motilidad, y esto provocaba que se redujera su papel en la formación de biopelículas (12).

Jeon y cols. sugieren que el Quórum sensing (comunicación entre diferentes especies de bacterias) puede jugar un papel en la regulación de la motilidad y en la formación de estructuras de la superficie en *Campylobacter jejuni* (28)

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes para todos los procesos vitales (35). Generalmente, conforme la temperatura aumente o disminuya se van a ver afectadas las reacciones químicas y enzimáticas de la

bacteria. Las células de *Yersinia enterocolitica*, cuando son cultivadas a 30°C o por debajo de esa temperatura, son flageladas y motiles; pero cuando las células son cultivadas a 37°C o por encima de ésta, carecen de flagelo y son no mótils (30).

Se encontró que en *E. coli*, la motilidad es influenciada por oxígeno, minerales y nutrientes orgánicos (1). También que la transcripción del gen *fliC* de *E. coli* es regulada por iones metálicos como son el aluminio, hierro y níquel (23).

Se estudió si el fosfato inorgánico es requerido para la motilidad de bacterias patógenas habiéndose encontrado que en muchas de estas bacterias el gen *ppk* codifica para la principal enzima responsable de la síntesis de fósforo inorgánico para ATP y que es un elemento crucial en la patogénesis bacteriana (45).

Las bacterias en ambientes acuáticos pueden alcanzar o quedarse cerca de los nutrientes utilizando la motilidad. La motilidad normalmente se logra girando el motor flagelar, el cual obtiene su energía por el potencial electroquímico de H⁺ o Na⁺. En *Halomonas* spp se energizó el motor flagelar por H⁺ y Na⁺ a diferentes concentraciones y se encontró que la naturaleza bimodal de la motilidad de *Halomonas* con respecto a la fuente de energía puede reflejar la versatilidad ecofisiológica para adaptarse a una gama amplia de condiciones de sal del ambiente marino (32).

Larsen y cols. determinaron el papel de la salinidad e inanición en la motilidad y la quimiotaxis del patógeno de peces *V. anguillarum*, ya que tanto la motilidad como la quimiotaxis son factores importantes en la virulencia de esta bacteria. Se encontró que la inanición no interfiere con la habilidad del organismo de causar infección en la trucha arcoiris, y la velocidad de natación no se veía reducida con las temperaturas bajas. Pero el fenamil, un inhibidor específico de Na⁺ del flagelo reduce la motilidad, por lo que concluyen que el Na⁺ es el que impulsa o da la fuerza al flagelo en esta bacteria (35).

Estudios anteriores han mostrado que la presencia de glucosa a una concentración de 27.8mM, afecta tanto la movilidad quimiotáctica como la expresión del flagelo en *E. coli* (25).

Lai y colaboradores estudiaron el efecto que tenía la glucosa sobre la motilidad en diferentes miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y concluyeron que éste no es un fenómeno común por lo menos para esta familia de bacterias (25).

Yokoto y Gots reportaron que el AMPc es absolutamente requerido para la formación del flagelo y, por lo tanto, de la motilidad en *E. coli*. Actualmente se piensa que un incremento en la concentración de glucosa, disminuye la concentración de CRP/AMPc intracelular. Esto manda un efecto inhibitorio en la expresión del operón Flh D, el operón principal para la síntesis del flagelo (26).

4. ANTE CEDENTES DIRECTOS

Se ha encontrado que algunos miembros de la familia *Pasteurellaceae* que habían sido descritos como no mótils, tienen la capacidad de producir flagelo y de moverse *in vitro*. Entre estos se encuentra *Actinobacillus pleuropneumoniae*, el cual produce un flagelo que está compuesto de una proteína de 65KDa la cual presenta homología en su secuencia aminoácido-N terminal con la secuencia reportada para otras secuencias fliC en diferentes bacterias. La secuencia de ADN fue obtenida mediante PCR del gen fliC. Su motilidad fue observada en medios TSB y BHI con baja concentración de agar y se encontró que es influenciada por la temperatura (32).

García Pérez y cols. (manuscrito en preparación), determinaron las condiciones de movilidad *in vitro* y clonaron el gen fliC de *Pasteurella multocida*, una bacteria que pertenece también a la familia *Pasteurellaceae*, la cual había sido descrita como inmóvil e incapaz de producir filamentos locomotores. Ellos concluyeron que *P. multocida* cuenta con los elementos genéticos suficientes para la expresión de un sistema flagelar (18).

5. JUSTIFICACIÓN

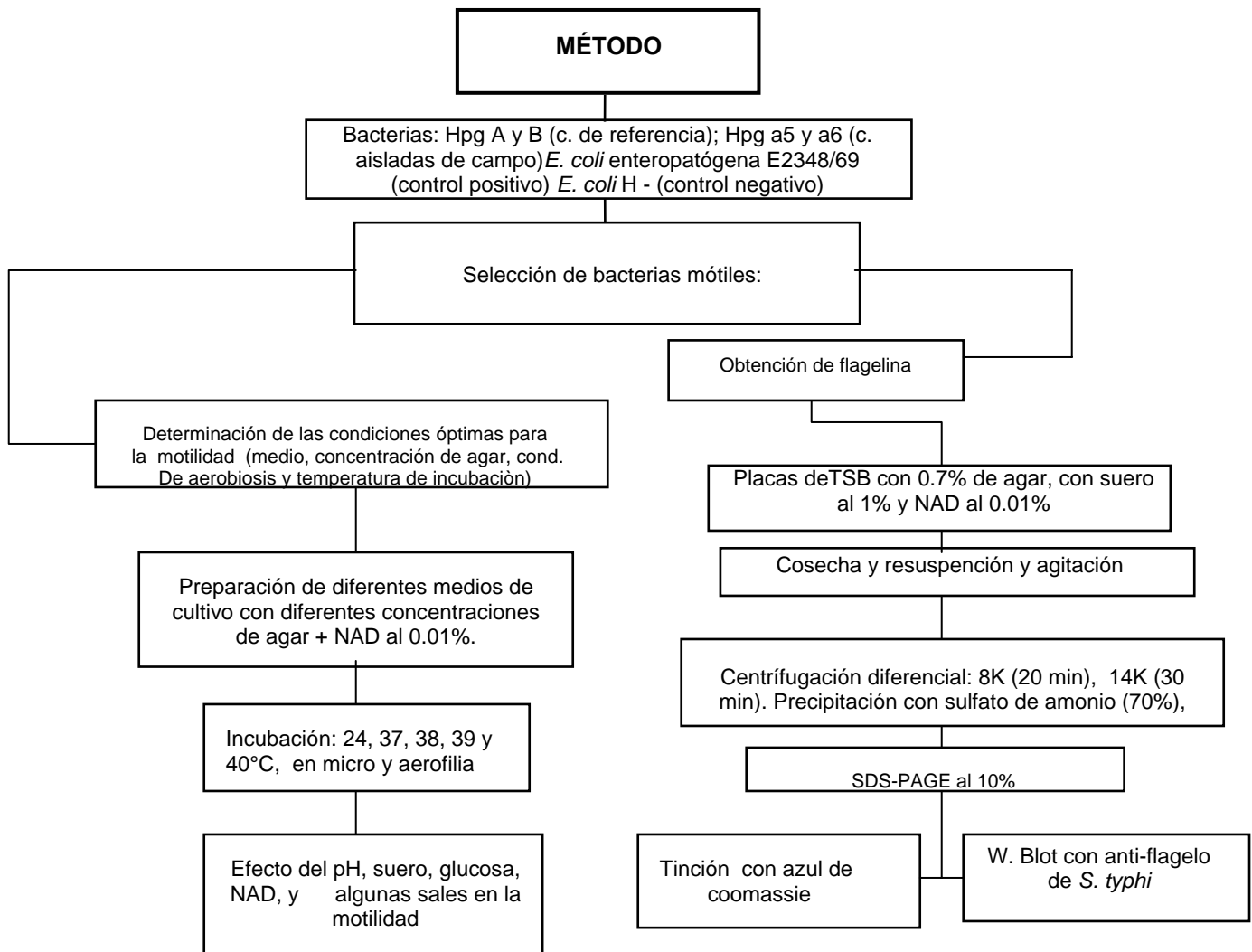
Haemophilus paragallinarum es una bacteria patógena del tracto respiratoria de las aves de corral que ha sido descrita como no mótil y sin flagelo y causa grandes pérdidas económicas en la industria avícola.

Tanto la motilidad como la presencia de flagelo son factores de virulencia que poseen la mayoría de las bacterias patógenas. Por lo tanto, la presencia de estos factores en *H. paragallinarum* nos ayudarían a entender mejor el proceso infeccioso que provoca esta bacteria, y pueden ser puntos clave de su patogenicidad.

6. OBJETIVOS

- Determinar las condiciones de motilidad *in vitro* de *H. paragallinarum* encontrando el medio, la concentración de agar, las condiciones aerobias y la temperatura óptimos para la motilidad.
- Determinar el efecto del pH, suero, glucosa, NAD y algunas sales (NaCl, CaCl₂, K₂HPO₄ y MgSO₄), en la motilidad de *H. paragallinarum*.
- Identificar la proteína responsable de la motilidad.

7. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



8. MATERIAL Y MÉTODOS

a. Bacterias :

Cepas de referencia: *H. paragallinarum* (Hpg) A 0083 y B 0222; donadas por el laboratorio de Biotecnología Veterinaria de Tehuacán, Puebla.

Cepas aisladas de campo: Hpg a5 y Hpg a6; donadas por el laboratorio de Biotecnología Veterinaria de Tehuacán, Puebla.

Control positivo: *E. coli* enteropatógena (EPEC) E2348/69, donada por la Dra. Pérez Estrada CINVESTAV-IPN.

Control negativo: EPEC H-, donada por el Laboratorio de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM.

b. Medios de cultivo utilizados :

Caldo de soya tripticaseína (TSB) (Bioxon) e Infusión cerebro-corazón (BHI) (Bioxón). Agar Bacteriológico deshidratado (Bioxón).

Sales: NaCl (Amresco); MgSO₄, Dextrosa, CaCl₂ y K₂HPO₄.(J. T. Baker).

Suplementos: Suero fetal de Ternera (Gibco) y β-nicotin adenin dinucleótido (Sigma).

c. Determinación de la motilidad :

Se sembraron en medio semisólido por picadura central profunda sin llegar al fondo del tubo o placa. En tubos los microorganismos móviles crecen a lo largo de la punción y se difunden a toda la masa del medio, adquiriendo estos un aspecto turbio y en placa el crecimiento es radial a partir de la punción. Si los microorganismos son no móviles sólo se observa el crecimiento a lo largo de la picadura y el medio permanece claro.

d. Atmósfera microaerofílica

Se obtuvo mediante el clásico método de la vela que consiste en incubar las placas o los tubos en un recipiente herméticamente cerrado con una superficie

húmeda para crear vapor de agua y una vela que se mantiene encendida hasta que se apaga al consumirse parte del oxígeno contenido en el recipiente (48).

e. Selección de bacterias móviles

Se realizó en placas de BHI y TSB, con 0.3 y 0.4% de agar y NAD al 0.01%. Se inoculó con las cepas de referencia y las cepas aisladas de campo por punción y se incubó a 37°C en condiciones de aerofilia y microaerofilia, durante una semana. Después de este periodo se hizo resiembra continua de las bacterias que se encontraban en la parte mas alejada de la punción (las bacterias motiles tienen un crecimiento radial y las no motiles solo crecen sobre la punción), asumiendo que eran las más motiles y se seleccionaron las condiciones en que se veía favorecida la motilidad. Las condiciones seleccionadas se utilizaron para realizar una resiembra continua de las cepas seleccionadas.

f. Selección de las condiciones óptimas para la motilidad

Se prepararon medios de cultivo TSB y BHI con 0.2, 0.25, 0.3 y 0.4% de agar agregando NAD al 0.01% en tubo. Se inoculó por punción con cepas Hpg A y Hpg B seleccionadas. Se incubaron a diferentes temperaturas (34, 37, 38, 39 y 40°C) en condiciones de aerofilia y microaerofilia durante una semana. Se seleccionaron las condiciones microambientales donde se observó mayor motilidad de las bacterias. Una vez seleccionadas las condiciones, se determinó el efecto del pH, suero, NAD, glucosa y de las sales: NaCl, CaCl₂, K₂HPO₄ y MgSO₄ en la motilidad.

g. Obtención de una posible flagelina

Se utilizaron placas de TSB con 0.7% de agar, suero de ternera al 0.1% y NAD al 0.01%. Se realizó siembra masiva con cepas motiles Hpg A seleccionadas.

Se cosecharon las bacterias y se resuspendieron con Tris-HCl (20mM) por agitación en vortex y agitación mecánica durante 10 minutos. Se realizó centrifugación diferencial a: 5K (10 min), 8K (20 min) y 14K (30 min) (20). El

sobrenadante de la última centrifugación se precipitó con sulfato de amonio (70%), durante 24 hrs a 4°C y se centrifugó a 8K (20 min).

i. SDS-PAGE

Con las muestras obtenidas de la centrifugación diferencial se prepararon 25µl de muestra, 5µl de buffer de muestra (Apéndice 1) y 1.5µl de β-mercapto etanol y se hirvieron durante 5 minutos. Se realizaron SDS-PAGE al 10% según Laemmli (34) a 80volts durante 1 hora y media y se utilizó el marcador de pesos moleculares Bench Mark™ Protein Ladder (Invitrogen). Para finalizar se hizo la tinción con azul de coomassie Apéndice 2) de 15 a 30 minutos en agitación y se destiñó con solución desteñidora (Apéndice 3).

ii. Western Blotting (inmunoreconocimiento)

Con geles obtenidos por electroforesis (sin teñir), se hizo la transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa durante 1 hora 10 minutos a 80 volts con buffer de transferencia (Apéndice 4).

Después se procedió a bloquear 1 hora con leche descremada (5%) en PBS-Tween (Apéndice 5). Transcurrido ese tiempo se lavó la membrana durante 5 minutos con PBS-Tween y se incubó con un anticuerpo primario (anti-flagelo de *S. typhi*; 1:500) durante 2 horas en agitación o durante toda la noche a 4°C. Terminado ese tiempo se lavó nuevamente la membrana tres veces con PBS-Tween de 5 a 10 minutos por cada vez y se agregó el anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra α-conejo-perioxidado) y se incubó durante dos horas en agitación. Se lavó la membrana tres veces con PBS-Tween y dos veces con Tris HCl 20mM y se reveló la membrana con solución reveladora (Apéndice 6) y la reacción se detuvo con agua destilada.

9. RES ULTADOS

Previo a los ensayos de caracterización, las diferentes cepas de Hpg fueron seleccionadas por resiembras sucesivas en medio con baja concentración de agar (Fig. 4). Este desplazamiento se puede observar por su crecimiento radial a partir del punto de inoculación.

Hpg presento mayor motilidad cuando fue cultivada en condiciones de microaerofilia usando el medio TSB.

Hpg a6 fue la cepa que presentó mayor motilidad en placa, independientemente de las condiciones a las que fueron sometidas.

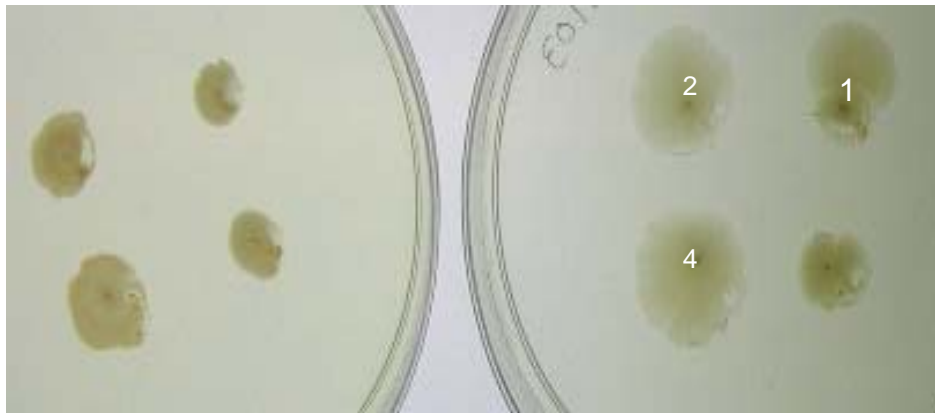


Figura 5: Motilidad de cepas seleccionadas por resiembra en placa de TSB (derecha) y BHI en condiciones de microaerofilia con agar al 0.4% (1- Hpg A, 2- Hpg B, 3-Hpg a5 y 4-Hpg a6).

En ensayos en tubo, Hpg A fue la cepa que presento la mayor motilidad cuando se empleó TSB como medio de crecimiento con 0.2% de agar, e incubado en condiciones de microaerofilia (tabla 2). Conforme la concentración de agar se incrementaba, la motilidad disminuía, no observándose más a una concentración de 0.4 % de agar.

Se observó que la temperatura óptima que favorece la motilidad de Hpg A es de 37°C y que a temperatura ambiente se disminuye considerablemente la motilidad, pero no se inhibe por completo.

A temperaturas superiores a 37°C la motilidad también disminuyó, pero en ninguno de los casos se vio totalmente inhibida (Cuadro 3, Figura 5).

Cuadro 2: Ensayos para la obtención de condiciones óptimas para la motilidad de *Haemophilus paragallinarum*.

Cepa [] agar		Hp A		Hp B	
		Microaerofilia	Aerofilia	Microaerofilia	Aerofilia
0.2	TSB	+++	++	+++	+
	BHI	+	++	++	-
0.25	TSB	++	+	++	-
	BHI	++	+	++	+/-
0.3	TSB	+	-	+	+/-
	BHI	+	+/-	+/-	-
0.4	TSB	+/-	-	-	-
	BHI	-	-	-	-

Se incubaron a 37° C. +++muy mótil, ++ moderadamente mótil, + mótil, +/- escasamente mótil y – no mótil.

Cuadro 3: Efecto de la temperatura en la motilidad de *Haemophilus paragallinarum*.

34°C	37°C	38°C	39°C	40°C
+	+++	++	+	+

Se inoculó con Hpg A. +++muy mótil, ++ moderadamente mótil, + mótil, +/- escasamente mótil y – no mótil.

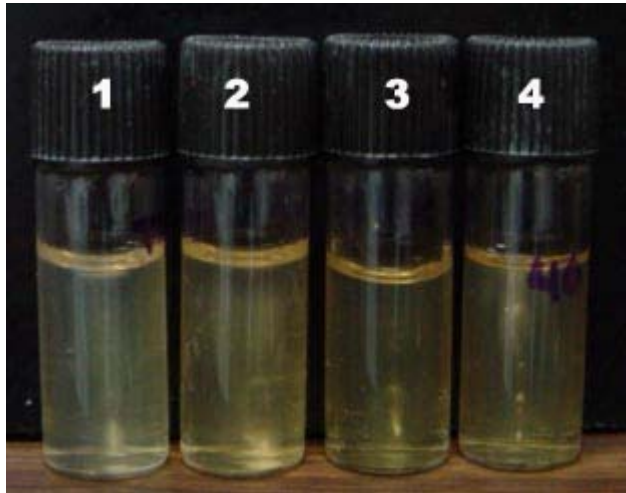


Figura 6: Efecto de la temperatura en la motilidad de Hpg A. 1: 24°C, 37°C, 39°C y 40°C.

Uno de los factores que influyeron en la motilidad es el pH, ya que a pH 7, la motilidad se vio favorecida, pero a pH 5 y 10 se inhibió; otro factor importante fue el K_2HPO_4 , que en su ausencia, la motilidad disminuía y la concentración óptima fue 43 mM. Tanto el NaCl (figura 5) como el $MgSO_4$ inhiben la motilidad a concentraciones iguales o superiores de 171 y 4 mM, respectivamente. La presencia de glucosa, NAD, suero y $CaCl_2$ no afectó la motilidad de Hpg A (Cuadro 4).

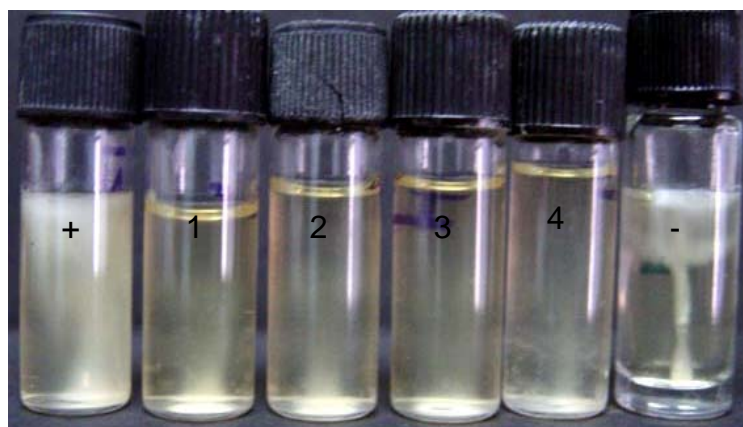


Figura 7: motilidad de Hpg A, 1: S/NaCl, 2:85, 3:171, 4:256 mM, Control positivo izquierda y control negativo derecha (en TSB, 0.2% de agar e incubado a 37°C en condiciones de microaerofilia).

Cuadro 4: Efecto de algunas sustancias en el medio sobre la motilidad de *Haemophilus paragallinarum*

pH		Suero (%)		Glucosa (mM)		NAD (%)	
5	-	S/s	++	S/G	+++	0.005	+++
6	+/-	0.1	++	13	+++	0.01	+++
7	+++	0.2	++	27	+++		
8	++			40	+++		
9	+			55	+++		
10	-						
CaCl ₂ (mM)		K ₂ HPO ₄ (mM)		MgSO ₄ (mM)		NaCl (mM)	
S/	+++	S/	+/-	S/	++	S/	++
2.5	+++	14	+	2	++	85	++
5	+++	29	++	4	+	171	+
7	+++	43	+++	6	+/-	256	+/-
		57	+++			342	+/-

Cepas Hpg A en TSB, agar al 0.2% (a 37°C); +++ muy mótil, ++ moderadamente mótil, + mótil, +/- escasamente mótil y – no mótil.

A partir de las proteínas obtenidas de bacterias Hpg A que fueron inducidas a expresar motilidad, por SDS-PAGE (10%) se observa una proteína de aproximadamente 70KDa muy parecida a la del control positivo (Figura 8).

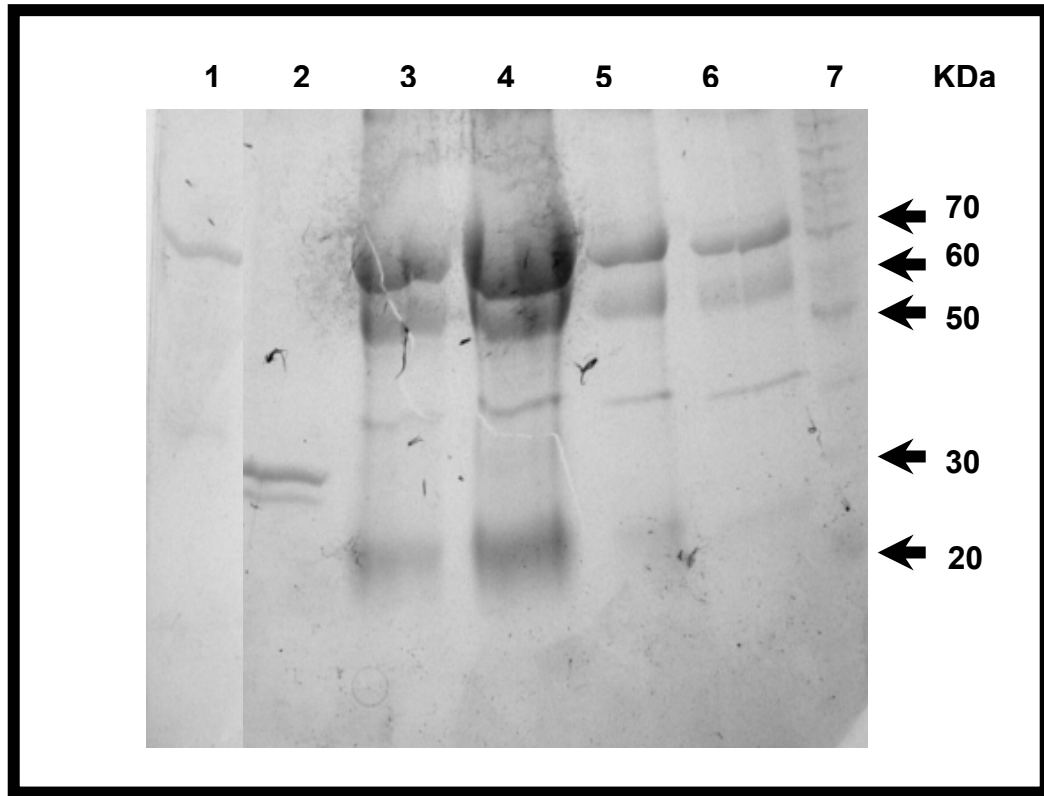


Figura 8: SDS-PAGE (10%) de proteínas obtenidas de Hpg A. 1: H+ 0119:H6; 2: Controle positivo; Hpg A: 3, 4: Precipitado con sulfato de amonio y 5, 6: 14K, 8K. 7: Marcador.

Por medio de Wester blotting se obtuvo inmuno reconocimiento tenue de proteínas de aproximadamente 70, 30 y 20 KDa al usar un anticuerpo dirigido contra el flagelo de *S. typhi* diluido 1:500, siendo la primera muy parecida a la flagelina del control positivo (Figura 8).

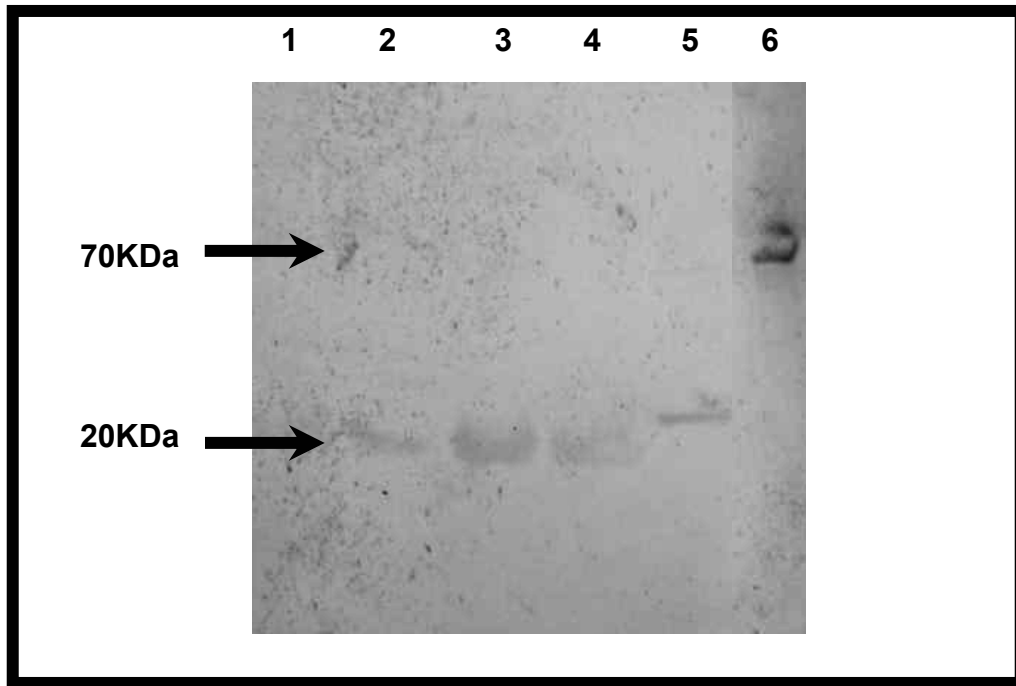


Figura 9: Inmuno reconocimiento tenue de una posible flagelina de Hpg A con anticuerpo dirigido contra *Salmonella typhi* 1:500. 1, 2, 3 y 4: Hpg A; 5 y 6: Controles positivos.

10. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que Hpg, que había sido descrita como una bacteria no mótil y sin flagelo (36), si es capaz de moverse *in vitro* bajo las condiciones ambientales adecuadas que fueron: medio TSB, con una concentración de agar de 0.2% e incubación en condiciones de microaerofilia a 37°C. En otros casos como el de *A. pleuropneumonia* y *P. multocida* que son de la misma familia de *Haemophilus paragallinarum*, que también habían sido descritas como no móviles se encontró que bajo algunas condiciones también presentan motilidad (18, 40). Esto se repite para 4 especies de *Shigella*, anteriormente descritas como inmóviles, las cuales fueron capaces de expresar tanto motilidad como flagelo y esto es regulado por diferentes factores genéticos y ambientales (19). Esto nos demuestra que tanto la motilidad como la expresión de flagelo de Hpg se ven influenciados por factores ambientales, ya que la síntesis de flagelo le resulta sumamente costoso a las bacterias y solo lo expresan en algunos casos si les va a proporcionar beneficios potenciales, o le va a permitir sobrevivir en condiciones de estrés (1).

Las condiciones que se encontraron como óptimas para la motilidad difieren un poco con las obtenidas para *A. pleuropneumoniae* en cuanto a la concentración de agar, ya que en ese estudio reportan que la concentración óptima es de 0.3% y para Hpg fue del 0.2%; esto se debe a que cuando el medio se encuentra menos sólido, las bacterias pueden moverse con mayor facilidad (19).

El medio TSB fue el medio en que mejor se apreció la motilidad, un resultado similar al reportado para *P. multocida*.

Se encontró que el oxígeno si es un factor que determina la motilidad de Hpg, ya que cuando las condiciones de oxígeno son mínimas las bacterias se ven obligadas a migrar hacia donde se encuentra un aporte de éste. Como es el caso de *E. coli*, donde la motilidad es influenciada por oxígeno, minerales y nutrientes orgánicos (1).

La temperatura es otro factor que influye en la motilidad (48) de Hpg ya que ésta se ve favorecida a 37°C y a 34 y 39°C la motilidad disminuye notablemente; estos resultados se pueden observar también en *A. pluropneumoniae* y *P. multocida* (18).

Yersinia enterocolitica también se ve influenciada por la temperatura, pero en su caso cuando es cultivada a 30°C o por debajo de esa temperatura, es flagelada y mótil; pero cuando ésta es cultivada a 37°C o más, carece de flagelo y es no mótil (29).

La glucosa no influye sobre la motilidad de Hpg, al igual que en diferentes miembros de enterobacterias, donde la glucosa no tiene efecto sobre su motilidad (24). No es así el caso de *P. multocida*, ya que ésta sí se ve favorecida por la presencia de glucosa (18), de la misma manera que *E. coli*, la cual requiere de glucosa para la síntesis de flagelo (24).

Tampoco se encontró efecto alguno probando diferentes concentraciones de suero y NAD en Hpg.

El efecto que tienen algunas sales sobre *P. multocida* no son iguales al que tienen en Hpg, como es el caso de NaCl que favorece la motilidad en *P. multocida* y en Hpg a partir de 171mM la inhibe, pero en ambas bacterias, cuando no se encuentra presente K_2HPO_4 se ve disminuida la motilidad. También el CaCl y el $MgSO_4$, no tienen participación alguna en ninguno de los dos casos. Estos resultados pueden deberse a que las condiciones de expresión del flagelo varían de cepa a cepa (18).

El pH sí es un factor que influye en la motilidad de Hpg, ya que a pH 10 se ve inhibida por completo, y a pH 7 se ve favorecida, y este es el pH óptimo reportado para su crecimiento.

Hpg produce una posible flagelina que es la proteína responsable del ensamblaje del filamento (21). Esta proteína tiene un peso de aproximadamente 70 KDa muy parecida a la de los controles positivos EPEC E2 348/69 y a la de H+ 0119:H6, las cuales fueron reconocidas por un anticuerpo dirigido contra el flagelo de *S. typhi* diluido 1:500. Este resultado difiere con *A. pleuropneumoniae* la cual produce un flagelo compuesto por una proteína de aproximadamente 65 KDa, y fue idéntica en el extremo amino terminal en un 100% con *E. coli*, *S. enterica* y *Shigella*.

11. CONCLUS IONES

- *Haemophilus paragallinarum* es capaz de moverse en condiciones *in vitro*.
- Hpg a6 fue la cepa que presentó mayor motilidad en placa.
- Las condiciones óptimas para la motilidad de Hpg A fueron TSB, con 0.2% de agar, incubadas a 37°C en microaerofilia.
- El pH en el que se ve favorecida la motilidad de Hpg A es 7, y a pH 5 y 10 esta motilidad se inhibe.
- La Glucosa, NAD, suero y CaCl₂, no influyen en la motilidad de Hpg A.
- El NaCl a partir de 171mM y MgSO₄ a partir de 4mM, inhiben la motilidad de Hpg A.
- El K₂HPO₄ a una concentración de 43mM favorece la motilidad de Hpg A.
- Hpg produce una posible flagelina de aproximadamente 70KDa.

12. APE NDICES

Apéndice 1

Buffer de muestra:

Azul de bromofenol	0.02g
Glicerol	0.2ml
Agua destilada	c.b.p.

Apéndice 2

Azul de coomassie:

Metanol 40% ácido acético	10%
Colorante azul brillante	0.25%
Agua destilada	50%

Apéndice 3

Solución desteñidora:

Metanol	200ml
Ácido acético	35ml
Agua destilada	500ml

Apéndice 4

Buffer de transferencia:

Tris 25mM	6.05g
Glicina 192mM	28.85g
Metanol	400ml
Agua destilada	2000ml

Apéndice 5

PBS-Tween:

PBS 20X	25ml
Tween	12.5ml

Agua destilada	500ml
----------------	-------

Apéndice 6

Solución reveladora:

Diaminobencidina	10mg
------------------	------

H ₃ PO ₄ 50mM pH 7.4	25ml
--	------

Sol. CoCl ₂ y NiCl ₂	500μl
--	-------

H ₂ O ₂	25μl
-------------------------------	------

13. REFERENCIAS

1. Adler, J. 1996. Chemotaxis in bacteria. Motile *Escherichia coli* migrate in bands that are influenced by oxygen and organic nutrients. *Science*. **153**:708-716.
2. Blackall, P. 1988. Antimicrobial drug resistance and the occurrence of plasmids in *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Diseases*. **32**:742-744.
3. Blackall, P. 1999. Infectious coryza: Overview of the disease and new Diagnostic options. *Clinical Microbiology Review*. **12**:627-632.
4. Blackall, P., Eaves, L. and Rogers, D. 1990. Proposal of a new serovar and altered nomenclature *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin. *Journal of Clinical Microbiology*. **28**:1185-1187.
5. Blackall, P., Matsumoto, M. y Yamamoto, R. 1997. Infectious coriza. *Diseases of Poultry Tenth*. Calnek B. W (Edit). Editorial Iowa State University Ames, Iowa, USA. pp: 179-190.
6. Blackall, P. and Yamamoto, R. 1989. Whole cell protein profiles of *Haemophilus paragallinarum* as detected by poliacrylamide gel electrophoresis. *Avian Diseases*. **33**:168-173.
7. Bragg, R. 2002. Isolation of serovar C-3 *Haemophilus paragallinarum* from Zimbabwe: A further indication of the need for the production of vaccines against infectious coryza containing local isolates of *H. paragallinarum*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. **69**:129-132.

8. Bragg, R. 2004. Evidence of possible evasion of protective immunity by NAD-independent isolates of *Haemophilus paragallinarum* in poultry. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. **71**:53-58.
9. Bragg, R., Coetzee, L. and Verschoor, J. 1997. Effects of growth conditions and incubation times on the expression of antigens of *Haemophilus paragallinarum* which are detected by monoclonal antibodies. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. **64**:57-63.
10. Bragg, R., Purdan, G., Coetzee, L. and Verschoor, J. 1995. Effects of transformation on the hemagglutinins of *Haemophilus paragallinarum*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. **62**:261-270.
11. Connelly, M., Young, G. and Sloma, A. 2004. Extracellular proteolytic activity plays a central role in swarming motility in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. **186**:4159-4167.
12. Donlan, R. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. **8**:881-890.
13. Fernández, R., Navarrete, G., Longinos, G. y Soriano, V. 2000. Efecto de los anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra *Haemophilus paragallinarum* sobre la adherencia *in vitro* a células epiteliales traqueales de pollo. XXV Convención Anual ANECA, Cancún, México.
14. Fernández, R., Soriano, V., Dabo, S., Blackall, P. y García, D. 2000. Serotipificación de aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* de México mediante un esquema de hemoaglutininas. XXV Convención Anual ANECA, Cancún, México.

15. Fukanoki, S., Matsumoto, K., Mori, H. and Takeda, R. 2000. Relationship between antigen release and antibody response of infectious coryza water-in-oil-in-water emulsion vaccines. *Avian Diseases*. **44**:869-873.
16. Fukanoki, S., Matsumoto, K., Mori, H. and Takeda, R. 2000. Relation between antigen release and immune response of oil adjuvanted vaccines in chickens. *Journal of Veterinary Medical Science*. **62**:571-574.
17. Garcia, A., Angulo, E., Blackall, P., Ortiz, A. 2004. The presence of nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Haemophilus paragallinarum* in Mexico. *Avian Diseases*. **48**: 425-429.
18. García, R., Reyes, M., García González, O., Vaca, S., Andrade, A., de la Garza, M., Zenteno, E., and Negrete-Abascal E. Flagella expression by *Pasteurella multocida*. (En preparación).
19. Gavin, R., Merino, S., Altarriba, M., Cavals, R., Shaw, J., Tomás, J. 2003. Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp. *FEMS Microbiology Letters*. **224**:77-83.
20. Girón, J. 1995. Expression of flagella and motility by *Shigella*. *Molecular Microbiology*. **18**:63-65.
21. Glisson, J. 1998. Bacterial respiratory diseases of poultry. *Poultry Science*. **77**:1139-1142.
22. González-Pedrajo, B. and Dreyfus, G. 2003. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias gram negativas: Biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. *Mensaje Bioquímico*. **27**: 45-63.

23. Guzzo, A., Diorio, C., DuBow, M. 1991. Transcription of the *Escherichia coli* fliC gene is regulated by metal ions. *Applied Environmental Microbiology*. **57**: 2255-2259.
24. Hacker, J. And Kaper, J. 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Review Microbiology*. **54**:641-679.
25. Hsin-Chih, L., Jwu-Ching, S., Sunny, A., Meng-Jiun, L., Birei, F. and Shiming, L. 1997. Effect of glucose concentration on swimming motility in enterobacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **231**:692-695.
26. Iratini, Y. and Hidaka, S. 1976. Enhancement of hemagglutinating activity of *Haemophilus gallinarum* by tripsin. *Avian Diseases*. **20**:614-616.
27. Jacobs, A., Berg, K. and Malo, A. 2003. Efficacy of a new tetravalent coryza vaccine against emerging variant type B strains. *Avian Pathology*. **32**:265-269.
28. Jeon, B., Itoh, K., Misawa, N. and Ryu, S. 2003. Effects of quorum sensing on flaA transcription and autoagglutination in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology Immunology*. **47**:833-839.
29. Jones, B., Young, R., Mahenthiralingam, E. and Stickler, D. 2004. Ultrastructure of *Proteus mirabilis* swarmer cell rafts and role of swarming in catheter-associated urinary tract infection. *Infection and Immunology*. **72**:3941-3950.
30. Kapatral, V. and Minnich, S. 1995. Co-ordinate, temperature-sensitive regulation of the three *Yersinia enterocolitica* flagellin genes. *Molecular Microbiology*. **17**:49-56.

31. Kirov, S., Castrisios, M. and Shaw, J. 2004. *Aeromonas* flagella (polar and lateral) are Enterocyte adhesions that contribute to biofilm formation on surfaces. *Infection and immunity*. **72**:1939-1945.
32. Kita-Tsukamoto, K., Wada, M., Yao, K., Nishino, T. And Kogure, K. 2004. Flagellar motors of marine bacteria *Hallomonas* are driven by both protons and sodium ions. *Canadian Journal for Microbiology* **50**:369-374.
33. Kume, K., Sawata, A. Nakari, T. and Matsumoto, M. 1983. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *Journal of Clinical Microbiology*. **17**:958-964.
34. Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**:680-685.
35. Larsen, M., Blackburn, N., Larsen, J. and Olsen, J. 2004. Influences of temperature, salinity and starvation on the motility and chemotactic response of *Vibrio anguillarum*. *Microbiology*. **150**:1283-1290.
36. Lee, J., Rho, J., Park, K., Kim, C., Han, Y., Choi, S. Lee, K. and Pasrk, S. 2004. Role of flagellum and motility in pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Infection and Immunology*. **72**:4905-4910.
37. Macnab, R. 2003. How bacteria assemble flagella. *Annual Review Microbiology*. **57**:77-100.
38. Mannheim, W. 1984. En Bergys *Manual of sistematic Bacteriology*. Krieg, N. R y Holt, G. J.(Eds). Vol. 1. Editorial Williams & Wilkins. pp: 550-575.

39. McCarter, L. 2004. Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **7**:18-19.
40. Mena-Rojas, E., Vázquez, C., Vaca, S., García, O., Pérez-Méndez, A., Ibarra-Caballero, J., de la Garza, M., Centeno, E. Negrete-Abascal, E. 2004. Antigenic secreted proteins from *Haemophilus paragallinarum*. A 110-Kda putative RTX protein. *FEMS Microbiology Letters*. **232**: 83-87.
41. Miflin, J., Horner, R., Blackall, P., Chen, X., Bishop, G., Morrow, C., Yamaguchi, T. and Iritani, Y. 1995. Phenotypic and molecular characterization of V-factor (NAD)-independent *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Diseases*. **39**:304-308.
42. Negrete-Abascal, E., Reyes, E. M., García, M. R., Vaca, P. S., Girón, A. J., García, O., Zenteno, E. y de la Garza, M. 2003. Flagella and motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Bacteriology*. **185**:664-668.
43. Ottemann, K. M. y Miller, J. F. 1997. Roles for motility in bacterial-host interactions. *Molecular Microbiology*. **24**:1109-1117.
44. Penn, C. W and Luke, C. J. 1992. Bacterial flagellar diversity and significance in pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters*. **100**:331-336.
45. Rashid, M. H., Rao, N. N. and Kornberg, A. 2000. Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *Journal of Bacteriology*. **182**:225-227.
46. Sockett, R. E. 1998. Characterizing flagella and motile behavior. *Methods in Microbiology*. **27**:227-238.

47. Soutourina, O. A. and Bertin, P. N. 2003. Regulation cascade of flagellar expression in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. **27**:505-523.
48. Terzolo, H. R. 2000. Revisión sobre coriza infecciosa: Propuesta de investigación para su diagnóstico y control. *Revista de Medicina Veterinaria*. **81**: 262-269.
49. Turner, L., Caplan, S. R. and Berg, H. C. 1996. Temperature induced switching of the bacterial flagellar motor. *Biophysical Journal*. **71**:2227-2233.
50. Ueda, S., Nagasawa, Y., Suzuki, T. And Tajima, M. 1982. Adhesion of *Haemophilus paragallinarum* to cultured chicken cells. *Microbiology and Immunology*. **26**:1007-1016.
51. Zhang, P-J., Miao, M., Sun, H., Gong, Y. and Blackall, P.J. 2003. Infectious coryza due to *Haemophilus paragallinarum* serovar B in China. *Australian Veterinary Journal*. **81**:96-97.