



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

ADHERENCIA DE *Gallibacterium anatis* SOBRE SUPERFICIES INERTES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

CARLOS ADÁN SÁNCHEZ ESPINOSA

DIRECTOR DE TESIS: DR. SERGIO VACA PACHECO

2010





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Genética de la UMF
de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Financiado por

PAPIIT IN 216-010

PAPCA-FES- I

*Nama om visnupadaya Krsna-presthaya bhutale
srimate bhaktivedanta-swamin iti namine*

*Namas te sarasvate deve gaura-vani-pracharine
nirvisesa-sunyavadi-paschatya-desa-tarine*

*(jaya) sri-krsna-caitanya prabhu nityananda
sri-advaita gadadhara
srivasadi-gaura-bhakta-vrnda*



Agradezco a Dios por su misericordia sin causa, por permitirme vivir en una familia tan hermosa como la que tengo, por conocer a las increíbles personas que me han acompañado en diferentes etapas de mi vida, y sobre todo por dejarme conocer su Santos Nombres y sus trascendentales pasatiempos Radha-Krsna ki Jay!!!

DEDICATORIAS

A mis padres por su interminable apoyo y cariño, porque nunca han dejado de creer en mí, por todas las enseñanzas que me han dado, por sus enormes ejemplos de humildad, perseverancia, fortaleza, nunca se han rendido por nosotros, siempre han estado a nuestro lado, no tengo manera de agradecerles todo cuanto han hecho por mí. Los Amo.

A mis hermanas Diana y Brenda por ser grandes mujeres, dignas de toda mi admiración, cariño y respeto, por todas las gratas vivencias que he tenido con ustedes, por sus consejos, por su apoyo y paciencia, han sido parte esencial en mi formación como persona y siempre serán un ejemplo a seguir, Las amo.

A mis padres y hermanas, no conozco a personas más valiosas que ustedes.

A mis abuelos q.e.p.d, a todos mis tíos y tías a mis primos especialmente a Víctor, Omar, Diego y Nadia por la increíble infancia que viví a su lado y por toda la confianza que han depositado en mí, y a todos mis sobrinos.

A Karina por el invaluable apoyo que me diste a lo largo de la carrera, por tu tiempo y paciencia, por todo el cariño que compartiste conmigo y la hermosa experiencia que viví a tu lado.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de todo corazón a mis entrañables amigos, Indupati Das, Carlos, Rubén (Chimi), Moacy, Joanna, Jazmín Lizeth, Panchito, Johnatan, Juanito, Diego, Edmundo, Oscar (Fercho), Penelope, Alicia, Nancy, Paulina, Mónica R, Saúl, Jorge (Pelón), por su confianza, por su gran apoyo, porque me han acompañado en momentos de tristeza y de gran alegría y por ser mis cómplices en esta aventura.

A mis actuales compañeros de laboratorio y a los que también han sido parte de él, (Angélica, Alberto, Alina, Octavio) por su valiosa amistad, y los agradables momentos, por todos los conocimientos que de ustedes recibí.

A mis compañeros del grupo 552 que estuvieron conmigo a lo largo de esta etapa, especialmente a Mónica, Yaz, Cindy, Memo, Axel, Fernando, Carlos, José, por ser la banda conmigo, por los excelentes momentos de las prácticas y todo el aprendizaje que generaron en mí. Y a mis amigos de la facultad, Horacio, Abid, Juan de Dios, Saúl, Roberto, por su grata compañía.

Al Doctor Sergio Vaca Pacheco por sus atinados consejos, por su apoyo y comprensión en la realización de este trabajo y por ser una fuente de admiración para mí.

Al Doctor Erasmo Negrete Abascal por permitirme ser partícipe de sus proyectos por darme su confianza, por toda la paciencia que me ha tenido, por su gran apoyo, por sus enseñanzas y asesoría, y su amistad, es una gran inspiración.

Y a todos aquellos que por mi limitada de memoria podría estar omitiendo ¡gracias!

INDICE

1. RESUMEN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. DESCRIPCIÓN DEL ORGANISMO

2.2. DISTRIBUCIÓN

2.3. PROPIEDAS BIOQUÍMICAS

2.4. CLASIFICACIÓN

2.5. FAMILIA *PASTEURELLACEAE*

2.6. PATOGÉNESIS

2.7. VIRULENCIA, MORBILIDAD Y MORTALIDAD

2.8. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

2.9. FORMACIÓN DE BIOFILM

3. ANTECEDENTES

4. JUSTIFICACIÓN

5. OBJETIVOS

5.1. GENERAL

5.2. PARTICULARES

6. ESQUEMA DE TRABAJO

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. CEPAS

7.2. MEDIOS DE CULTIVO

7.3. ENSAYOS DE ADHESIÓN EN PLACAS DE MICROTITULACIÓN

7.4. ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES

7.5. ENSAYOS DE ADHESIÓN POR EXOPOLISACÁRIDOS

8. RESULTADOS

9. CONCLUSIÓN

10. DISCUSIÓN

11. PERSPECTIVAS

12. GLOSARIO DE TÉRMINOS

RESUMEN

El género *Gallibacterium* incluye bacterias aisladas de una gran variedad de aves, entre ellas *Gallibacterium anatis*, la cual ha sido descrita como una bacteria del tracto respiratorio superior así como del tracto genital inferior de gallinas sanas, aunque también existen reportes que la asocian a diferentes condiciones patológicas. En este trabajo se evaluó la adhesión de 12 cepas de *G. anatis* a superficies inertes, como un posible mecanismo que promueve la formación de biofilm. Tres cepas formaron biofilms robustos sobre plástico, dos se adhirieron débilmente y siete fueron incapaces de adherirse al plástico; sin embargo todas se adhirieron al vidrio a 37°C. Las cepas mostraron un comportamiento errático en la adhesión al plástico a 40°C.

La adhesión no se observó en presencia de tripsina, lo que sugiere la participación de proteínas en este proceso. Mediante microscopía electrónica de barrido se observó la adhesión de *G. anatis* a superficies de vidrio después de 3 horas de incubación. Se observó material exudado, micro vesículas, canales, estructuras tubulares y estructuras parecidas a filamentos, formando parte de un biofilm. La adhesión al tejido y la persistencia dentro de un hospedero podría garantizar el éxito de un patógeno.

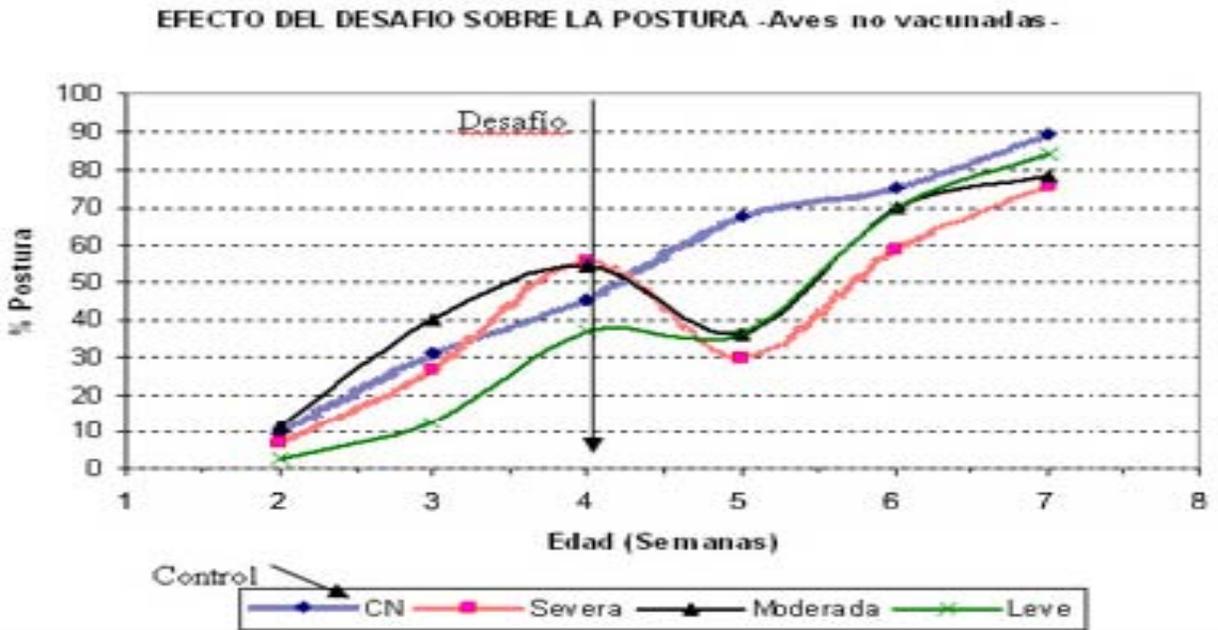
INTRODUCCIÓN

Múltiples son las enfermedades producidas por microorganismos patógenos que padecen las aves, estos padecimientos pueden ser causados por bacterias o virus entre otros, ya sea de forma mixta o secuencial. Para el caso de la industria avícola estas infecciones representan pérdidas económicas considerables, debido al tratamiento, la prevención, la baja en la producción de huevos o los decesos de las aves debidos a los patógenos.

A menudo, la interacción de las bacterias con sus células hospederas y otros agentes patógenos es mediada por factores que se encuentran localizados sobre la superficie bacteriana, o por productos secretados al espacio extracelular. Los microorganismos patógenos son capaces de secretar diversas sustancias al medio, no solo como resultado de su metabolismo, sino también para realizar otras funciones, como la comunicación entre ellos, la liberación de sustancias toxicas; por ejemplo, bacterocinas, exotoxinas o enzimas extracelulares que participan en la adhesión e invasión de los tejidos del huésped (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003).

Uno de los microorganismos considerado como importante agente causal de padecimientos en gallinas es *G. anatis*. Una de las principales consecuencias tras la infección del aparato reproductor de las aves por *G. anatis* es la disminución en la postura de huevos (Gráfica 1); sin embargo, también es posible encontrar a este microorganismo alojado en el tracto respiratorio superior de sus hospederos sanos o enfermos.

GRÁFICA 1. Se muestra el efecto ocasionado en la postura de huevos tras un ensayo en el que se desafiaron gallinas con cepas de *G. anatis* de virulencia baja, moderada y severa, bajo condiciones controladas. (<http://www.gallibacterium-anatis.com.mx/>)



DESCRIPCIÓN DEL ORGANISMO

G. anatis es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Pasteurellaceae*, no motil, con forma de bacilo o pleomórfica, encapsulada. En agar sangre forma colonias circulares de color grisáceo y semitransparentes en la periferia, que miden de 1 a 2 mm de diámetro después de 24 a 48 horas de incubación a 37°C; y puede causar o no hemólisis dependiendo del biovar. No forma endoesporas, su crecimiento es mesofílico y anaeróbico facultativo o microaerofílico. A diferencia de otros miembros de la familia *Pasteurellaceae*, *G. anatis* no requiere del factor V (NAD) ni el factor X (Hemina) para su crecimiento (Christensen *et al.*, 2003).

DISTRIBUCIÓN

G. anatis puede ser considerado como un agente patógeno cosmopolita ya que se han aislado cepas de este microorganismo en casos clínicos de aves infectadas en diferentes partes del mundo, siendo Noruega, Estados Unidos, Suiza, Dinamarca, Canadá y México los países en donde se han realizado más estudios.

En el caso de México la mayor parte de los reportes clínicos han sido realizados en los estados de Puebla, Nuevo Leon, Yucatán y Jalisco, aunque también se han reportado casos en otros estados de la república (<http://www.gallibacterium-anatis.com.mx/>).

PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE *G. anatis*.

Algunas de las diferencias bioquímicas que distinguen a *G. anatis* de otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* son: Catalasa, oxidasa y fosfatasa positivo, reducción de nitrato. Las Pruebas de porfirina y alanina aminopeptidasa son positivas. D-ribosa (-), D-xilosa (+), D- manitol (-), D-fructuosa(-), D-galactosa (+), D-glucosa (+), D-manosa, sacarosa y rafinosa (+). La reacción de orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) es positiva. No requiere de simbiosis para su crecimiento (Christensen *et al.*, 2003).

Tabla 1. Características bioquímicas que diferencian a miembros del género *Gallibacterium*.

Característica	<i>G. anatis</i>	<i>G. anatis</i>	<i>Gallibacterium</i>	<i>Gallibacterium</i>
	<i>bv. haemolytica</i>	<i>bv. anatis</i>	<i>genomonoespecies 1</i>	<i>Genomoespecies 2</i>
Hemólisis	+	-	+	+
Producción de ácido a partir de :				
(-) D-Arabinosa	(+)	-	(+)	d
(+)L-Arabinosa	-	-	d	d
m-Inositol	d	d	-	d
(-)D-Sorbitol	d	d	-	-
(-)L-Fucosa	(+)	-	+/(+)	d
Maltosa	d	-	+	+
Trehalosa	d	+	+	d
Dextrina	d	-	+/(+)	+

Las características reportadas son: + ≥ 90% de las cepas son positivas en 1-2 días; (+) ≥ 90% de las cepas son positivas en 3-14 días; - <10% de las cepas son positivas en 14 días; d 11-89% de las cepas son positivas.

CLASIFICACIÓN

Las bacterias hemolíticas parecidas a *Pasteurella* fueron reportadas por primera vez por Kjos-Hansen (1950) aisladas de aves con salpingitis y peritonitis. Organismos similares fueron clasificados posteriormente como *P. salpingitidis* por Kohlert (1968). Mráz *et al.*, (1976) sugirieron que estos organismos deberían de

ser reclasificados como *Actinobacillus salpingitidis*, debido a sus características fenotípicas. Para 1979 Mushin *et al.*, aislaron *P. haemolytica* reportándola en pollos sanos con una incidencia del 97%, sin embargo este organismo no fue tan frecuente o estuvo ausente en la tráquea de aves silvestres.

En publicaciones subsecuentes sobre la identificación de bacterias aisladas de aves, dichas bacterias fueron nombradas ya sea como *P. haemolytica* o *A. salpingitidis*.

Después de los estudios moleculares realizados por Christensen y colaboradores en el 2003 los microorganismos anteriormente clasificados como *P. haemolytica*, *A. salpingitidis* y *P. anatis*, fueron reagrupados bajo el género *Gallibacterium* e incorporados a la familia *Pasteurellaceae*.

Dentro de la especie *G. anatis* existen dos biovarios, hemolítica y anatis y dos genomoespecies (1 y 2) que son comúnmente reconocidos como *Gallibacterium spp.*

FAMILIA PASTEURELLACEAE

La familia *Pasteurellaceae* se compone de 65 especies identificadas que se distribuyen en 13 géneros (<http://www.the-icsp.org/taxa/Pasteurellaceaelist.htm>). Del total de estas especies se cree que una tercera parte ha sido mal nombrada basándose en taxonomía filogenética dentro de los 4 mayores géneros de la familia (*Haemophilus*, *Pasteurella*, *Actinobacillus* y *Manhemia*) mezclados en diferentes clados. (Christensen *et al.*, 2003)

A continuación se muestra la clasificación de la familia *Pasteurellaceae*.

Tabla 2. Clasificación de la familia *Pasteurellaceae*, actualmente comprende 13 géneros.

NÚMERO	GÉNERO
1	<i>Pasteurella</i>
2	<i>Actinobacillus</i>
3	<i>Haemophilus</i>
4	<i>Lonepinella</i>
5	<i>Manhemia</i>
6	<i>Phoconoenobacter</i>
7	<i>Gallibacterium</i>
8	<i>Histophilus</i>
9	<i>Volucribacter</i>
10	<i>Avibacterium</i>
11	<i>Nicoletella</i>
12	<i>Aggregatibacter</i>
13	<i>Bibersteinia</i>

PATOGÉNESIS

Este microorganismo puede ser parte de la flora normal del tracto respiratorio superior así como del tracto genital inferior de los pollos aunque también es considerado como patógeno oportunista, no obstante está asociado a lesiones patológicas, incluyendo salpingitis con o sin peritonitis, ooforitis, enteritis, septicemia, pericarditis, hepatitis y lesiones en el tracto respiratorio de gallinas de postura (Christensen *et al.*, 2003). *Gallibacterium* produce lesiones consideradas

como no patognomónicas, ya que no se presentan los síntomas característicos de una enfermedad determinada, con los cuales se pueda hacer un diagnóstico adecuado, complicando esto su detección e identificación (Bojesen *et al.*, 2003). Por otra parte este organismo es considerado como responsable de originar una disminución en la producción de huevo debido a las afecciones que produce tanto en las gallinas de postura comercial como en las reproductoras; ocasionando considerables lesiones en el aparato reproductor tales como; atrofia de ovario con hemorragias y regresión del mismo, ruptura y deformación de folículos ováricos, oviducto no funcional con hemorragias y postura abdominal, peritonitis, nefromegalia entre otros (Christensen *et al.*, 2003).

Además de gallinas, estos microorganismos también han sido aislados de pavos, palomas, faisanes, aves acuáticas, así como también de algunas aves migratorias y otras no migratorias (Christensen *et al.*, 2003; Bojesen *et al.*, 2003).

VIRULENCIA, MORBILIDAD Y MORTALIDAD

Actualmente las diferentes cepas de *G. anatis* han sido clasificadas según su virulencia en: severa, moderada y leve. Las cepas catalogadas como de virulencia severa son capaces de disminuir la producción en la postura en un 85 % mientras que las de virulencia leve sólo en un 12%.

Desde las 22 a las 35 semanas las gallinas de postura parecen ser más susceptibles para contraer las enfermedades producidas por *G. anatis*, mientras que en las gallinas reproductoras esto ocurre alrededor de las 40 semanas de edad.

La mortalidad causada por *G. anatis* se asocia comúnmente con las cepas de virulencia moderada y severa, pero no con las cepas de virulencia leve. Sin embargo, lesiones entre las que se encuentran hemorragias en el oviducto y oviductos no funcionales han sido asociadas únicamente con las cepas de virulencia leve, pero no con cepas de virulencia severa (<http://www.gallibacterium-anatis.com.mx/>).

Al realizar ensayos en gallinas de postura de 30 semanas de edad se determinó que la calidad y el tamaño del huevo también pueden ser afectados dependiendo de la virulencia de la cepa. Esto se demostró después de desafiar gallinas con diferentes cepas de *G. anatis*, tras lo cual, los huevos puestos por las gallinas desafiadas con las cepas más virulentas tuvieron un menor tamaño, presentando deformidades y una consistencia porosa y delgada en la cascara.

DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

Hoy en día se cuenta en México con la tecnología para poder llevar a cabo un diagnóstico más confiable de los padecimientos causados por *G. anatis*, algunas de estas pruebas disponibles son Gal-Latex y la Gal-Elisa. En materia de prevención, se cuentan con diversas vacunas en el mercado, siendo el principal inconveniente de estas su inespecificidad (<http://www.gallibacterium-anatis.com.mx/>).

BIOFILM

Un biofilm es una agregación de organismos: bacterias, algas, hongos o protozoarios asociados a una superficie viva o inerte, los cuales se encuentran inmersos en una matriz autoproducida (Costerton *et al.*, 1999). Para el caso de las bacterias este biofilm puede estar formado por una sola especie o bien por diferentes géneros.

Dicha matriz está formada principalmente por agua, células bacterianas, exopolisacárido, elementos de lisis bacteriana, sustancias poliméricas, ácidos nucleicos y proteínas, así como también sales minerales, partículas y sedimento en menor cantidad (Dickschat, 2010). Dentro del biofilm se encuentran canales que permiten el transporte de nutrientes y la eliminación de los desechos producidos.

El 99% de las bacterias conocidas forman biofilm, este confiere a los microorganismos protección en contra de fagos, compuestos biocidas y agentes antimicrobianos; también permite la evasión de la respuesta inmune del hospedero, y reduce las posibilidades de ser eliminado. Gran cantidad de enfermedades crónicas han sido asociadas a la presencia de biofilm en el organismo enfermo debido a que este retarda la difusión de biocidas y tratamientos alternos dirigidos a erradicar la enfermedad.

La formación del biofilm comprende tres etapas: la adhesión, el crecimiento y la separación. La adhesión representa un paso crítico en la patogénesis ya que asegura la colonización de las células del hospedero, este proceso se lleva a cabo a través de macromoléculas denominadas adhesinas que tienen la capacidad de unirse a los ligandos o receptores específicos en la superficie de la célula huésped, lo cual define el tropismo (Costerton *et al.*,1999).

Existen diferentes tipos de adhesinas: las adhesinas fimbriales que incluyen pili y fimbrias; y las no fimbriales como el lipopolisacárido y la cápsula.

La adhesión tiene como objetivo que el microorganismo no sea removido del tejido a través de las secreciones corporales como saliva, lágrimas, moco, flujo de sangre u orina, también asegura un contacto más íntimo con la célula del hospedero, que permita una mejor absorción de nutrientes y un proceso más exitoso de la infección. Por tanto podríamos deducir que la adhesión es sinónimo de resistencia. El Biofilm aumenta la resistencia a biocidas de 150 a 300 veces más, esto dependiendo de factores como la edad del biofilm, la encapsulación, las condiciones de crecimiento y los factores multiplicativos (Costerton *et al.*,1999).

La segunda fase de la formación de un biofilm la constituye el crecimiento del mismo, el cual está dado por la comunicación que se presenta entre las bacterias a través del Quorum sensing; proceso dependiente de densidad celular, mediante este las bacterias se comunican y controlan la expresión de genes involucrados con el crecimiento o la expresión de factores de virulencia que permitan asegurar su sobrevivencia (Waters & Bassler, 2005).

El Quorum sensing se da a través de moléculas señalizadoras o autoinductores; para las bacterias Gram (-) la familia más estudiada es la que comprende las homoserinlactonas (Dickschat, 2010).

Finalmente, la última etapa corresponde a la separación de parte del biofilm con el objetivo de poder colonizar una mayor variedad de tejido o superficies celulares.

ANTECEDENTES

Como agente patógeno de las mucosas, *G. anatis* debe contar con diversos factores de virulencia, que favorecen la colonización dentro del hospedero, la invasión y la toxicidad, evitando la respuesta inmune y promoviendo la obtención de nutrientes, sin embargo, sólo han sido descritos la secreción de Inmunoglobulinas de tipo G (IgG) degradadoras de proteasas (García Gómez *et al.*, 2005) la capacidad de hemaglutinar glóbulos rojos de conejo (Zepeda *et al.*, 2009) y las proteínas GTXA que son toxinas RTX presentes en *G. anatis* (Kristensen *et al.*, 2009). A pesar de esto no se han realizado estudios sobre otros posibles factores de virulencia. No obstante estudios realizados sobre *Haemophilus parasuis* (miembro de la familia *Pasteurellaceae*) demostraron que los serovares no virulentos producen una mayor formación de biofilm comparados con los serovares virulentos (Jin *et al.*, 2006).

Sin embargo, diversos trabajos realizados con diferentes agentes patógenos de animales pertenecientes a la familia *Pasteurellaceae* tales como *Pasteurella* spp., *Mannheimia haemolytica* (Olson *et al.*, 2002), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Kaplan & Mulks, 2005), *Haemophilus parasuis* (Jin *et al.*, 2006), *A. actinomycetemcomitans* (Kaplan *et al.*, 2003), *H. influenzae* (Webster *et al.*, 2006) o *Histophilus somni* (Sandal *et al.*, 2007) demuestran que estos microorganismos poseen la capacidad de formar biofilm.

JUSTIFICACIÓN

G. anatis es un agente causal de enfermedades en el tracto respiratorio superior así como también del aparato reproductor inferior de diversas aves. Esta bacteria se ha distribuido ampliamente en el país y alrededor del mundo representando una gran pérdida económica para la industria avícola. A pesar de esto no han sido estudiados todos sus posibles factores de virulencia.

En la actualidad no se han reportado trabajos en los que se estudie la adhesión a superficies inertes, sin embargo se han hecho estudios con otros organismos de la familia *Pasteurellaceae* en los que se demuestra la capacidad de fijarse *in vitro* a superficies inertes bajo condiciones controladas.

Debido a la escasez de conocimiento que se tiene sobre este tema el propósito de este trabajo fue describir la adhesión y la formación de biofilm de *G. anatis*, con la intención de contribuir al desarrollo posterior de un tratamiento más eficaz para combatir las infecciones que causa este microorganismo.

OBJETIVOS

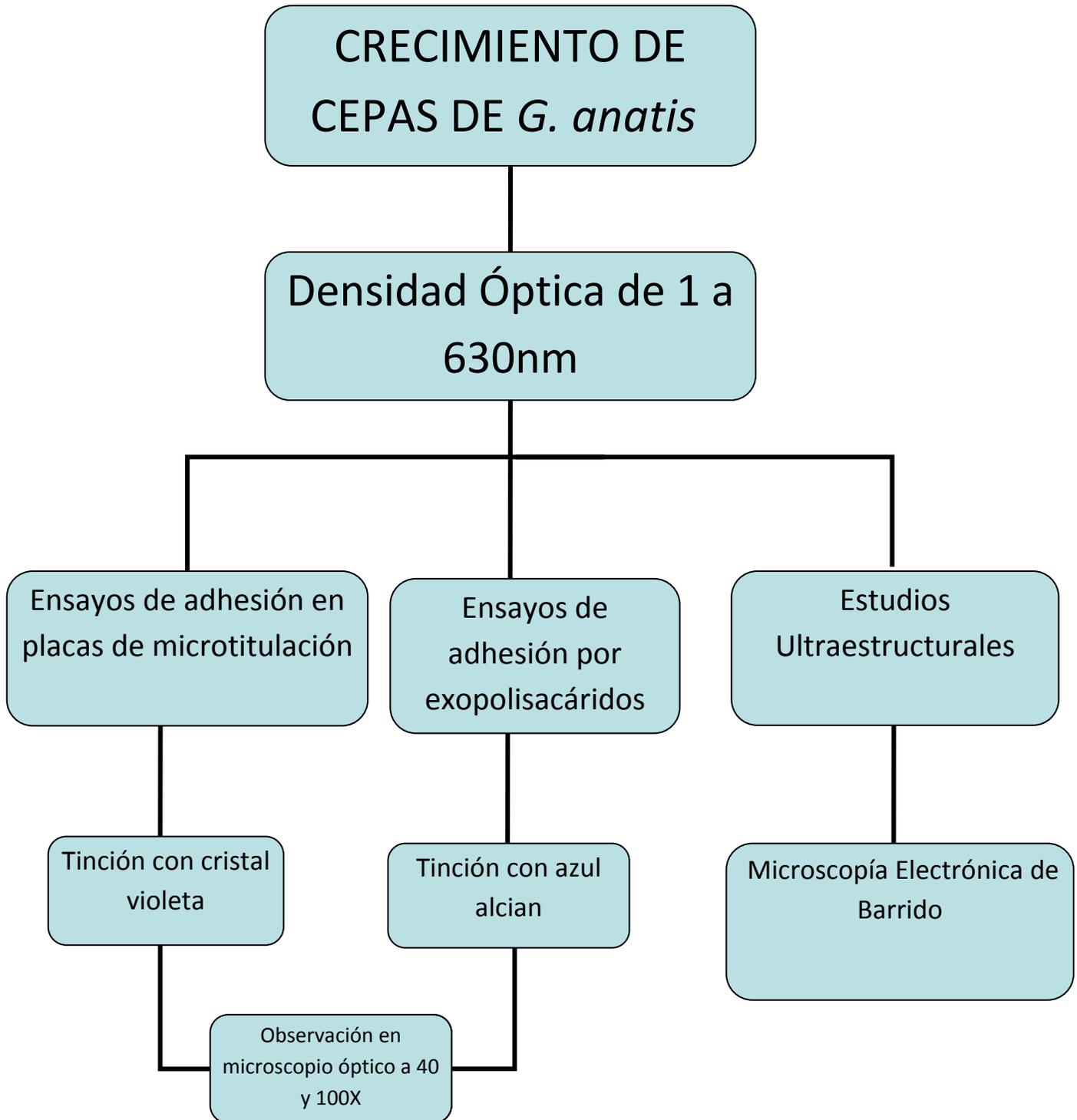
GENERAL

- Determinar la capacidad de *G. anatis* para formar biofilms *in vitro*.

PARTICULARES

- Determinar la capacidad de diferentes cepas de *G. anatis* de formar biofilms *in vitro*
- Evaluar el efecto de la temperatura en la formación de estos biofilms (37°C y 40°C).
- Averiguar si en la formación del biofilm participan proteínas y carbohidratos.
- Identificar, mediante microscopía electrónica de barrido, estructuras de *G. anatis* que participen en la formación del biofilm

ESQUEMA DE TRABAJO



MATERIALES Y MÉTODOS

CEPAS

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizaron cepas de referencia de *G. anatis*. Las cepas tipo de *G. anatis* biovar F149T (ATCC 43329T), 12158/5 Salp., 10162/6 Salp. (F114) y 12656-12 de hígado, se incluyeron diferentes biovars representativas de *G. anatis* biovar hemolítica. Las cepas CCM 5974 y CCM 5976 representan las genomoespecies 1 y 2 respectivamente. Tres cepas aisladas de campo (Dinamarca) biovar hemolítica 14K10, 23K10 y 23T10, las dos últimas corresponden a aislados de poblaciones cloacales y traqueales de la misma ave respectivamente, así como las cepas ESV-34, ESV-61 y ESV-69 que corresponden también a casos clínicos (Zepeda *et al.*, 2009).

MEDIOS DE CULTIVO

Las cepas bacterianas que presentan β -hemólisis fueron cultivadas en agar de sangre de borrego al 5% (BD Bioxon, Becton Dickinson, Cuautitlán Izcalli, México México) a 37 °C e incubadas durante toda la noche en presencia de CO₂; las bacterias no hemolíticas fueron crecidas bajo las mismas condiciones empleando medio Agar de Infusión de Cerebro y Corazón (BD Bioxon, Becton Dickinson, Cuautitlán Izcalli, México México). Para la propagación, mantenimiento y desarrollo de los diferentes ensayos las bacterias se crecieron en Caldo de Infusión de Cerebro y Corazón (BD Bioxon).

ENSAYOS DE ADHESIÓN EN PLACAS DE MICROTITULACIÓN

Todas las cepas de *G. anatis* fueron cultivadas durante una noche en caldo de Infusión de Cerebro y Corazón (BHI) y posteriormente fueron llevadas a una Densidad Óptica (DO) de 1 a 630 nm.

Con el objetivo de determinar la adherencia bacteriana a las placas de microtitulación, se emplearon cajas de poliestireno estériles con 96 pozos (Sarsted, Barcelona, España), cada uno de los cuales fue llenado con 180 μ l de medio BHI e inoculado con 20 μ l de células de *G.anatis*, por triplicado. Como control negativo se empleó caldo BHI sin inocular o PBS en cada uno de los ensayos, mientras que *Staphylococcus aureus* ATCC RN4220 fue usado como control positivo (Cramton *et al.*, 1999). Las placas fueron incubadas en condiciones estacionarias a 37 o 40°C por 24 horas. Los contenidos de cada pozo fueron aspirados, lavados tres veces con 250 μ l de PBS estéril, y las células que quedaron pegadas fueron fijadas con 200 μ l de metanol al 200% por 15 min. Posteriormente se dejaron secar al aire y a continuación cada pozo se tiñó con 150 μ l de cristal violeta Hucker's al 2% por 5 minutos. El exceso de tinción fue eliminado con lavados en agua corriente. El colorante retenido por las bacterias adheridas fue extraído con 150 μ l de ácido acético glacial al 33% (v/v). Se midió la DO de las soluciones de cada pozo a 630 nm usando un lector de placas de microtitulación (Microplate Reader model 680; BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) Los ensayos fueron realizados por triplicado en 3 ocasiones separadas, y los resultados fueron promediados (Fredheim *et al.*, 2009).

Con el objetivo de determinar si los componentes proteicos participaban en la adhesión a superficies plásticas, las bacterias fueron incubadas en presencia de 1 mg de tripsina por ml de medio. Después de la incubación, las placas fueron procesadas como se describió anteriormente.

ENSAYOS DE ADHESIÓN POR EXOPOLISACÁRIDOS

Para determinar la naturaleza del material exudado, diferentes muestras de *G. anatis* fueron teñidas con un colorante catiónico (azul alcian), el cual tiñe específicamente mucopolisacáridos saturados o polisacáridos aniónicos glicosaminoglicanos (Pompilio *et al.*, 2008).

Se utilizaron los precultivos bacterianos de las cepas F149T, 12158/5 y CCM5974 de *G. anatis* crecidas durante toda la noche en medio BHI, con los cuales fueron inoculadas cajas de Petri (1% de inóculo v/v) de 60 x 15 con 5 ml de medio con cubreobjetos estériles dentro. Las cajas de Petri fueron incubadas a 37° C durante 24 h y con una concentración de 10% de CO₂.

Posteriormente las bacterias adheridas a los cubreobjetos fueron fijadas por calor. Con el propósito de determinar la presencia de exopolisacáridos como componentes del biofilm se utilizó azul alcian para teñir durante 30 min a las bacterias adheridas al vidrio. Después de este lapso las muestras fueron lavadas con agua corriente para retirar los excesos de colorante y fueron observadas al microscopio óptico con objetivos de 50X y 100X.

ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES

Los precultivos fueron utilizados para inocular cajas de Petri de 60 x 15 con 5ml de medio, con cubreobjetos estériles dentro (1% de inóculo v/v). Las cajas de Petri fueron incubadas a 37°C durante 3, 6, o 24 h o a 40 °C durante 6 h. Después de estos tiempos, las bacterias sobre los cubreobjetos de vidrio fueron fijadas con glutaraldehído al 2.5% durante 1 h, se lavó 3 veces con Tris-HCl 25 mM pH 8.0; después se postfijó con tetróxido de osmio al 1% durante 1h. Se lavaron 3 veces y se procesaron para observar mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM). modelo JEOL 1200 EX a 25 kV.

RESULTADOS

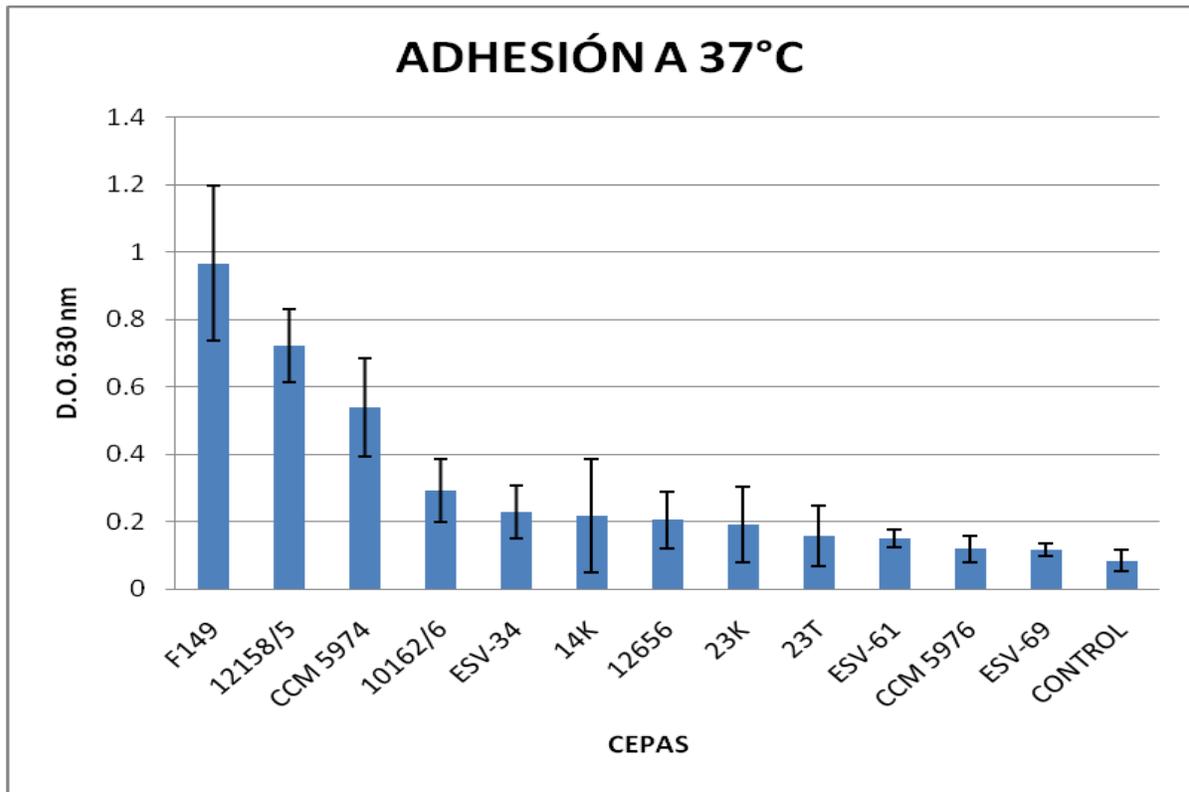
ENSAYO DE ADHESIÓN EN PLACAS DE MICROTITULACIÓN.

La adhesión de *G. anatis* a superficies inertes (plástico) fue evaluada en el presente trabajo considerándose como adhesión positiva a aquellas cepas que presentaron una DO ≥ 0.12 al ser medidas a 630 nm.

Los valores más bajos fueron incluidos como comparativo respecto a las cepas que mostraron mayor adhesión al plástico; se muestran además los valores de DO para los controles negativos incluidos en cada experimento (Fredheim *et al.*, 2009).

En la gráfica 2 puede observarse que 3 cepas formaron biofilms robustos (F149T, 12158/5 y CCM5974), dos cepas se adhirieron débilmente (10672/6 y ESV-34) y las siete restantes no pudieron formar biofilms sobre la superficie de plástico (14 K10, 12656-12, 23K10, 23T10, ESV-61, CCM5976 y ESV-69).

GRAFICA 2. Adhesión de las diferentes cepas de *G. anatis* después de 24 h incubadas a 37°C.

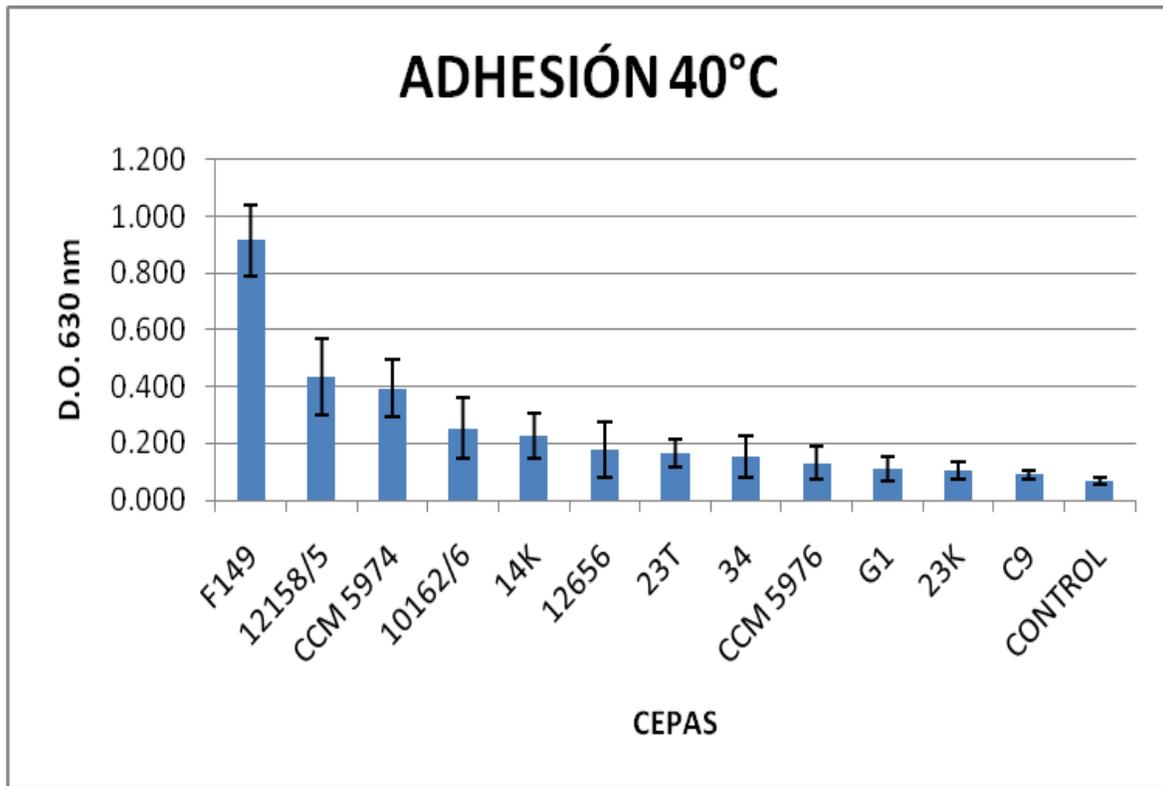


Se observan de mayor a menor las absorbancias obtenidas a 630 nm de las diferentes cepas de *G. anatis* y el control. Se muestran también, desviación estándar obtenidos de cada cepa.

La adhesión a plástico fue menor cuando las bacterias fueron crecidas a 40°C como se muestra en la gráfica 3, en la cual se presenta una clara disminución de los valores de DO respecto a las muestras incubadas a 37°C; las cepas F149T, 12158/5 y CCM 5974 continuaron siendo las más adherentes (0.915, 0.434 y 0.393).

En el ensayo a 40°C se presentaron tres valores de σ_{12} , los cuales corresponden a las cepas 23K10, ESV-61 y ESV-69, siendo esta última incapaz de adherirse al plástico (gráfica 3).

GRAFICO 3. Adhesión de las diferentes cepas de *G. anatis* después de 24 h incubadas a 40°C

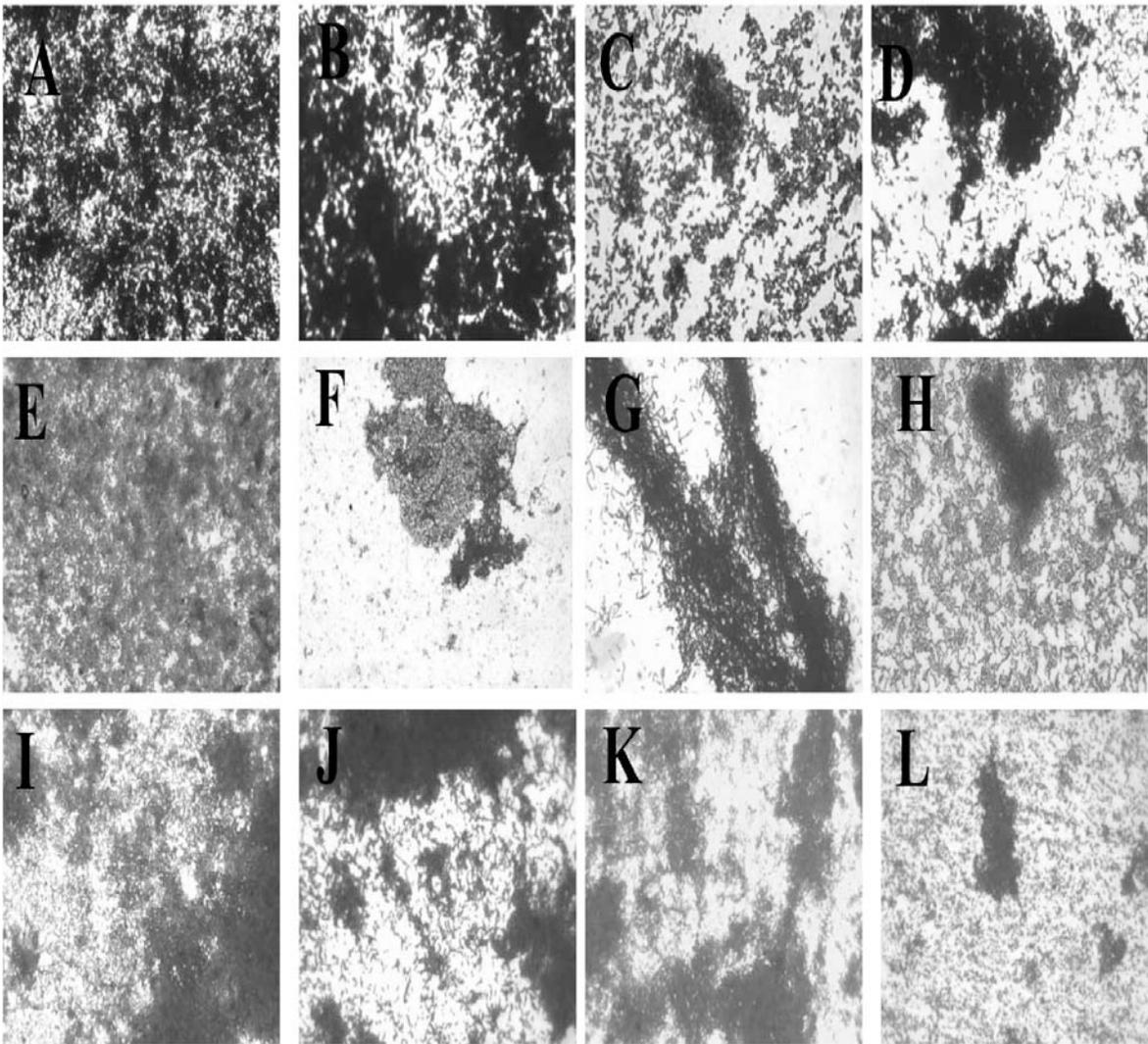


Se observan de mayor a menor las absorbancias obtenidas de las diferentes cepas de *G. anatis* y el control. Se muestran también los valores de desviación estándar obtenidas de cada cepa (líneas negras).

La capacidad de adhesión de *G. anatis* a vidrio también fue evaluada en el presente estudio. Para ello, los biofilms formados por las cepas se tiñeron con cristal violeta y se observaron al microscopio óptico. Todas las cepas estudiadas fueron capaces de adherirse al vidrio (Figura 1).

Las cepas que presentaron una mayor adhesión fueron F149T, 12158/5 y ESV-34, mientras que la cepa ESV-69, al igual que en plástico, mostró una menor adhesión.

Figura 1. Biofilms de *G. anatis* sobre vidrio observados al microscopio óptico.

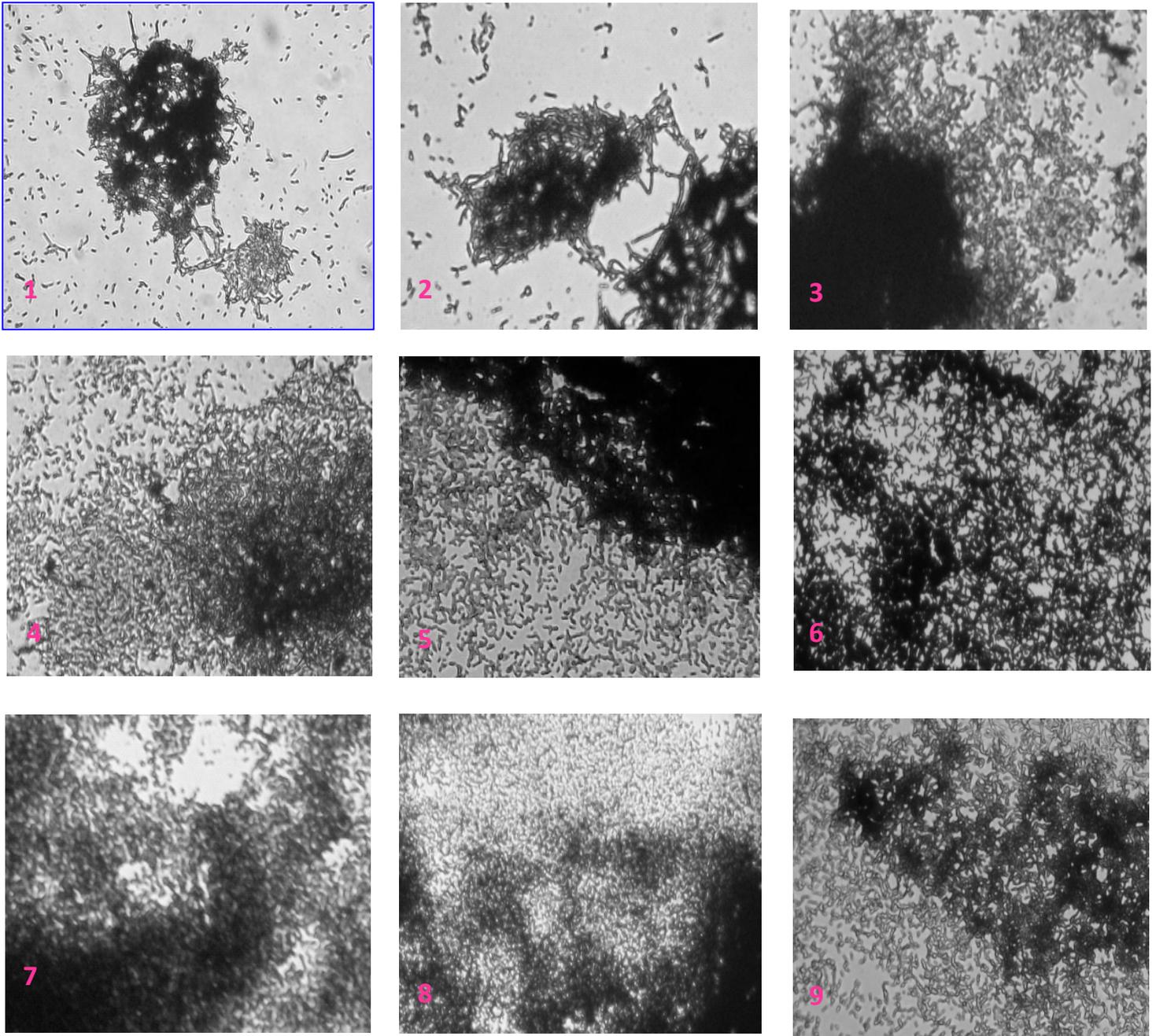


A:F149T; B:12158/5; C:14K10; D:CCM 5974; E:ESV-34; F:ESV-61; G:CCM 5976; H:12656-12; I:10162/6; J:23K; K:23T; L:ESV-G9. Todas las muestras fueron observadas con un objetivo óptico a 40X, excepto la muestra 6 que fue observada a 100X

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE EXOPOLISACÁRIDOS.

Para averiguar si los biofilms de *G. anatis* contenían polisacáridos, biofilms de 24 h a 37°C de las cepas 12158/5 y F149T se tiñeron con el colorante específico de polisacáridos azul alcian y se observaron al microscopio óptico. Las células bacterianas de ambas cepas se tiñeron, lo que sugiere fuertemente la presencia de exopolisacárido en el biofilm (Figura 2).

Figura 2. Biofilms de *G. anatis* 12158/5 y F149T teñidos con azul alcian y observados al microscopio óptico.



Biofilms de 24 h teñidos con azul alcian. Las imágenes 1-3 corresponden a la cepa 12158/5; las 4-9 a la cepa F149T (ATCC 43329T).

Las cepas F149T, CCM 5974, y 12158/5 que presentaron una mayor adhesión a plástico fueron incubadas en presencia de tripsina, con el fin de determinar la participación de componentes proteicos en este proceso. Estas cepas crecieron, pero no fueron capaces de unirse al plástico, a diferencia de las mismas cepas en ausencia de tripsina. Los valores de DO a 630 nm fueron similares a los del control negativo (≤ 0.12) .076, .076 y .065 respectivamente. Sugiriendo con esto, que las proteínas están involucradas en el proceso de adhesión a las superficies de plástico.

ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES

Los biofilms formados por las muestras 12158/5, CCM 5974 y F149T fueron estudiados por microscopia electrónica de barrido. Se utilizaron preparaciones de 3, 6 o 24 h de incubación a 37°C con el fin de conocer las interacciones que suceden entre las bacterias y las superficies inertes en los primeros instantes de interacción.

En la Figura 3 se muestra un biofilm producido por *G. anatis*, en el cual se pueden observar conglomerados celulares, embebidos en una matriz autoproducida, la cual mantiene unidas entre sí a las bacterias, también se puede observar la presencia de estructuras filamentosas, tubulares y canaloides (flechas).

En preparaciones de 3 h de incubación se observó la presencia de componentes exudados por las bacterias los cuales presentaron una apariencia mucóide, estos parecían favorecer su adhesión a la superficie y la adhesión de otras bacterias sobre el sustrato secretado, lo cual representa una ventaja al unirse a una superficie de vidrio, tras dicho período de incubación también fue posible observar microvesículas asociadas al material exudado (Figura 3, 1).

Figura 3. Estructuras presentadas por diferentes cepas de *G. anatis* durante la formación del biofilm

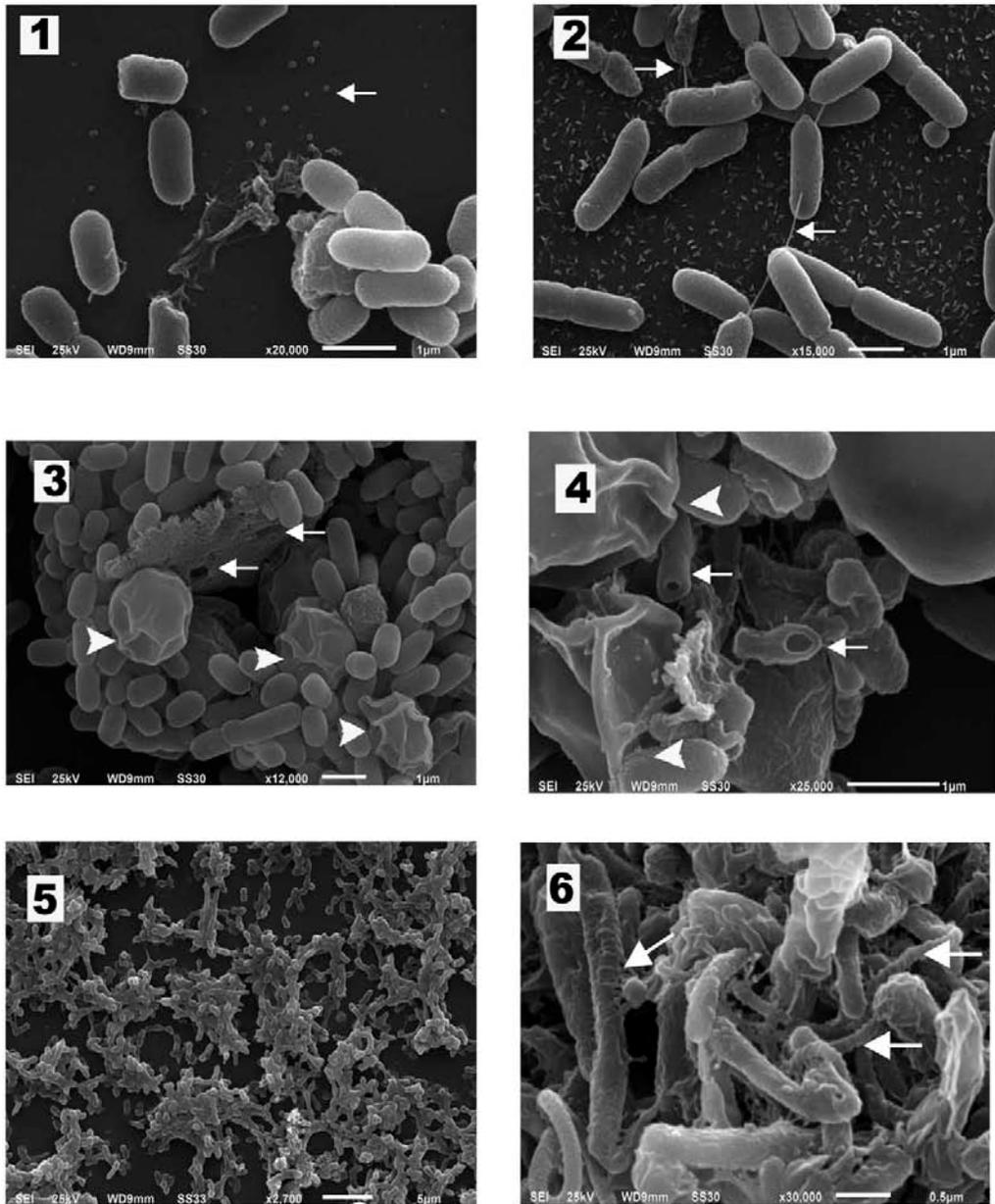


Imagen 1, *G. anatis* cepa F149T a las 3 horas de incubación, liberando productos extracelulares asociados microvesículas; imagen 2, Cepa 12158/5 después de 6 horas de incubación, se observan largas estructuras filamentosas que unen a diferentes bacterias, su naturaleza y función no ha sido reportada; imagen 3, Cepa 12158/5 a las 12 h de incubación se muestran estructuras canaloides (flechas) y globulares (flechas cortas); imagen 4, *G. anatis* CCM 5974 estructuras no identificadas (cabezas de flecha) y componentes tubulares (ilustración C); imagen 5 se observa a baja amplificación el biofilm formado por *G. anatis*, las puntas de flecha señalan diferentes estructuras filamentosas que unen a las bacterias; imagen 6, formación de biofilm de mayor complejidad por la cepa F149T, presencia de cordones filamentosos .

Como se muestra en la (Figura 3, 2) a las 6 horas de incubación se observaron estructuras de apariencia filamentosa las cuales unían a las células bacterianas entre sí. La longitud de estas estructuras fue variable. Algunas bacterias presentaron un material semejante a un apéndice el cual formaba puentes entre las bacterias.

Luego de 12 h de incubación *G. anatis* presenta una formación de biofilms más compleja (Figura 3, 5), en la cual se destaca la presencia de redes acanaladas (flechas) así como también de estructuras globulares (Figura 3, 3) (cabezas de flecha). Se observa también una distribución más cerrada de las células bacterianas, formando conglomerados.

Además de los componentes ya mencionados, se presentaron en el biofilm estructuras no identificadas las cuales se muestran en la Figura 3, 4 (cabezas de flecha), se observaron igualmente canales completamente formados. También fueron observados cordones filamentosos como componentes de los biofilms de mayor complejidad (Figura 3, 6).

DISCUSIÓN

La adhesión de las bacterias ha sido considerada como el primer paso de la patogénesis en la infección de la superficie mucosa. Una adhesión exitosa podría promover la colonización de diferentes tejidos dentro del hospedero. La formación de biofilm hace persistente la infección debido a que este confiere protección contra fagos, biocidas, agentes antimicrobianos así como también favorece la evasión de la respuesta inmune del hospedero (Costerton *et al.*, 1999).

El proceso de formación de Biofilm comprende múltiples pasos que generalmente requieren de la participación de extremidades estructurales, tales como flagelo y pili de tipo IV (O'Toole & Kolter, 1998; De Oliveira-Garcia *et al.*, 2003, Pompilio *et al.*, 2008) u otras proteínas bacterianas (Rohde *et al.*, 2005, Webster *et al.*, 2006).

La formación de Biofilm se cree juega un importante papel en la infección, inmunidad y protección ante los agentes antimicrobiales (Costerton *et al.*, 1999). El estudio de los biofilms es de gran importancia y actualmente es el centro de múltiples investigaciones debido a que están involucrados en un gran número de enfermedades infecciosas crónicas. (Vu *et al.*, 2009).

Diferentes agentes patógenos de la familia *Pasteurellaceae* tales como *Pasteurella spp.*, *Mannheimia haemolytica* (Olson *et al.*, 2002), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Kaplan & Mulks, 2005), *Haemophilus parasuis* (Jin *et al.*, 2006), *A. actinomycetemcomitans* (Kaplan *et al.*, 2003), *H. influenzae* (Webster *et al.*, 2006) o *Histophilus somni* (Sandal *et al.*, 2007) tienen la capacidad de formar biofilm.

G. anatis, demostró tener la capacidad de adherirse a superficies *in vitro*, lo cual puede sugerir que dicha capacidad puede presentarse *in vivo*, facilitando la adhesión y colonización del tracto respiratorio superior y/o del aparato reproductor.

Esto podría sugerir una posible relación entre la adhesión y la patogenicidad de diferentes cepas, en este estudio, dos de las tres cepas de *G. anatis* que presentaron mayor adhesión (12158/5 y CCM5974) fueron relacionadas con salpingitis y lesiones en el hígado respectivamente; sin embargo F149 T no fue relacionada a ninguna lesión (Zepeda *et al.*, 2009).

Se ha descrito que los biofilms se forman por EPS y diferentes proteínas, además de DNA. La proporción de EPS en biofilms puede comprender aproximadamente entre el 50 al 90% del total de la materia orgánica natural (Vu *et al.*, 2009).

Acorde a esto, en el presente trabajo, se determinó la presencia de exopolisacárido por tinción con azul alcian el cual tiñó las superficies bacterianas que presentaban adhesión al vidrio (Figura 2). En cada una de las tinciones se presentó una coloración sobre la mayor parte de la muestra de *G. anatis* corroborando esto lo reportado por Vu *et al.*, quienes reportaron al EPS como uno de los componentes mayoritarios del biofilm.

La presencia de proteínas como componentes del biofilm formado por *G. anatis* también fue determinada en este estudio, ya que las cepas que presentaron mayor adhesión a superficies inertes (F149T, 12158/5 y CCM 5974), disminuyeron su capacidad de adhesión al ser cultivadas en presencia de tripsina. Lo cual sugiere la participación de proteínas varias en el proceso adhesión.

La caracterización y participación de las OMV en *G. anatis* no ha sido descrita, aun, sin embargo, la habilidad de hemaglutinar fue demostrada recientemente (Zepeda *et al.*, 2009). Los antígenos hemaglutinantes son parte de la membrana externa, consecuentemente, la presencia de estas estructuras en OMV puede ser cierta. Se ha demostrado en *Staphylococcus epidermidis*, un importante patógeno de los hospitales, que su propiedad de hemaglutinar correlacionada con la adherencia de las bacterias al plástico y a los catéteres intravenosos (Rupp & Archer, 1992).

En algunos microorganismos ha sido descrita la presencia de vesículas de membrana externa (OMV) como componentes del biofilm, las cuales han sido relacionadas con las bacterias Gram negativas.

Este último componente fue demostrado en *Helicobacter pylori*. En *H. pylori* la presencia de OMV en los biofilms fue observada por SEM. Yonezawa *et al.*, 2009 además reportaron que la adhesión de OMV permite la formación de biofilm.

En *Avibacterium paragallinarum* (familia *Pasteurellaceae*) el estudio de las OMV indicó que entre sus componentes se encontraban proteínas inmunogénicas, proteasas, proteínas RTX, hemaglutininas y ácido nucleico. (Ramón Rocha *et al.*, 2006).

A través de los estudios ultraestructurales realizados con las diferentes cepas de *G. anatis*, fue posible la identificación de microvesículas en las imágenes obtenidas en el microscopio electrónico de barrido (SEM). Estas microvesículas se presentaban luego de 6 h de crecimiento y en todos los casos se encontraban asociadas a productos extracelulares.

Además de estas estructuras identificadas en los biofilms han sido reportados canales, a través de los cuales, el oxígeno y los nutrientes pueden circular o bien facilita la eliminación de desechos (Costerton *et al.*, 1999; Sandal *et al.*, 2007). Dichas estructuras fueron observados en este trabajo luego de 12 h de crecimiento, tras las cuales fue posible identificar canales, (Figura 3,3) o estructuras tubulares (Figura 3,4) en las muestras de las diferentes cepas, adicionalmente a esto se presentaron estructuras no identificadas (Figura 3, 3,4 y 6).

CONCLUSIONES

- Las cepas de *G. anatis* F149T, 12158/5, 12656-12, CCM 5974, CCM 5976, 14K10, 23 K10, 23 T10, ESV-61 y ESV-34 tienen la capacidad de adherirse a superficies inertes luego de 24 h de crecimiento.
- La formación de biofilm por *G. anatis* se ve influenciada por la temperatura, a 37°C se obtuvieron valores de D.O. más elevados.
- La adición de tripsina al medio de cultivo, disminuye la adhesión, sugiriendo la participación de componentes proteicos en la formación del biofilm.
- Las muestras de *G. anatis* teñidas con azul alcian, demostraron la presencia de exopolisacáridos en la formación de biofilm.
- El biofilm formado por *G. anatis*, presenta estructuras tubulares, canales y otras estructuras filamentosas, posibles adhesinas fimbriales.

PERSPECTIVAS

- Identificar las diferentes estructuras que forman parte del Biofilm.
- Analizar las señales bioquímicas que favorecen la formación del Biofilm
- Realizar ensayos de adhesión *in vivo*.
- Determinar la composición del Biofilm.

BIBLIOGRAFÍA

Addo PB & Mohan K (1985) Atypical *Pasteurella haemolytica* type A from poultry. Avian Dis **29**: 214-217.

Bisgaard M (1977) Incidence of *Pasteurella haemolytica* in the respiratory tract of apparently healthy chickens and chickens with infectious bronchitis. Characterization of 213 strains. Avian Pathol **6**: 285-292.

Bisgaard M (1993) Ecology and significance of *Pasteurellaceae* in animals. Zentral Bakteriell **229**:7-26.

Bojesen AM, Nielsen OL, Christensen JP & Bisgaard M (2004) In vivo studies of *Gallibacterium anatis* infection in chickens. Avian Pathol **33**: 145-152.

Bojesen AM, Nielsen SS & Bisgard M (2003) Prevalence and transmission of haemolytic *Gallibacterium* species in chicken production systems with different biosecurity levels. Avian Pathol **32**:503-510.

Christensen H, Bisgaard M, Bojesen AM, Mutters R & Olsen JE (2003) Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus salpingitidis* or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. Int J Syst Evol Microbiol **53**: 275-287.

Christensen H & Bisgaard M (2008) Taxonomy and biodiversity of members of *Pasteurellaceae*. In: P. Kuhnert and H. Christensen, Editors, *Pasteurellaceae: Biology, Genomics and Molecular Aspects*, Caister Academic Press, Fredericksberg, Denmark , pp. 5–22.

Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M & Marrie TJ (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann Rev Microbiol* **41**: 435-464.

Costerton JW, Stewart PS & Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.

Cramton SE, Gerke C, Schnell NF, Nichols WW, & Götz F (1999) The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect Immun* **67**: 5427-5433.

De Oliveira-Garcia D, Dall'Agnol M, Rosales M, Azzuz AC, Alcantara N, Martinez MB & Girón JA (2003) Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cell Microbiol* **5**: 625–636.

Dickschat J.S (2010). Quorum sensing and bacterial biofilms. *Nat. Prod. Rep.* **27**:343–369.

Donlan RM (2002) Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **8**: 881-890.

Fredheim EG, Klingenberg C, Rohde H, Frankenberger S, Gaustad P, Flaegstad T & Sollid JE (2009) Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*. J Clin Microbiol **47**: 1172-1180.

García Gómez E, Vaca S, Pérez-Méndez A, Ibarra-Caballero J, Pérez-Márquez V, Tenorio VR & Negrete-Abascal E (2005) *Gallibacterium anatis*-secreted metallo proteases degrade chicken IgG. Avian Pathol **34**: 426-429.

González-Pedrajo B. & Dreyfus G (2003) Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. En Mensaje Bioquímico. Vol. XXVII. Flores H. O., Riveros R. H., Sosa P. A., Vázquez C. E. (eds). México.

Jin H, Zhou R, Kang M, Luo R, Cai X & Chen H (2006) Biofilm formation by field isolates and reference strains of *Haemophilus parasuis*. Vet Microbiol **118**: 117–123.

Kaplan JB, Meyenhofer MF & Fine DH (2003) Biofilm growth and detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Bacteriol **185**: 1399–1404.

Kaplan JB & Mulks MH (2005) Biofilm formation is prevalent among field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Vet Microbiol **108**: 89–94.

Kjos-Hansen B (1950) Oviduct peritonitis in hens due to pathogenic "cloacal bacteria". Nordisk Veterinær Medicin **2**: 523-531.

Kohlert R (1968) Untersuchungen zur Ätiologie der Eileiterentzündung beim Huhn. Monatshefte für Veterinärmedizin **23**: 392-395.

Kristensen MB, Frees D & Bojesen MA (2009). GtxA from *Gallibacterium anatis*, a cytolytic RTX-toxin with a novel domain organization. Vet. Res. **4**:1-25.

Mráz O, Vladík P & Boháček J (1976) *Actinobacilli* in domestic fowl. Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene Orig. **236**: 294-307.

Mushin R, Weisman Y & Singer N (1979) *Pasteurella haemolytica* found in the respiratory tract of fowl. Avian Dis **24**: 162-168.

Olson, ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG & Read RR (2002) Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. Can J Vet Res **66**: 86–92.

O'Toole GA & Kolter R (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol Microbiol **30**: 295–305.

Pompilio A, Piccolomini R, Picciani C, D'Antonio D, Savini V & Di Bonaventura G (2008) Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility. FEMS Microbiol Lett **287**: 41–47.

Ramón Rocha M, García González O, Pérez Méndez A, Ibarra Caballero J, Pérez Márquez V, Vaca S & Negrete Abascal E (2006) Membrane vesicles released by *Avibacterium paragallinarum* contain putative virulence factors. FEMS Microbiol Lett **257**: 63-68.

Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA, Knobloch JKM, Heilmann C, Herrmann M & Mack D (2005) Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. Mol Microbiol **55**: 1883–1895.

Rupp ME & Archer GL (1992) Hemagglutination and adherence to plastic by *Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun **60**: 4322-4327.

Sandal I, Hong W, Swords WE, & Inzana TJ (2007) Characterization and comparison of biofilm development by pathogenic and commensal isolates of *Histophilus somni*. J Bacteriol **189**: 8179–8185.

Shaw DP, Cook DB, Maheswaran SK, Lindeman CJ & Halvorson DA (1990) *Pasteurella haemolytica* as a co-pathogen in pullet and laying hens. Avian Dis **34**: 1005 -1008.

Vu B, Chen M, Crawford RJ & Ivanova EP (2009) Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* **14**: 2535-2554.

Waters CM & Bassler BL (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**:319–346.

Webster P, Wu S, Gomez G, Apicella M, Plaut AG & St. Geme III JW (2006) Distribution of bacterial proteins in biofilms formed by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *J Histochem Cytochem* **54**: 829-842.

Yonezawa H, Osaki T, Kurata S, Fukuda M, Kawakami H, Ochiai K, Hanawa T & Kamiya S (2009) Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol* **9**:197

Zepeda A, Ramírez S, Vega V, Morales V, Talavera M, Salgado-Miranda C, Simón-Martínez J, Bojesen AM & Soriano-Vargas E (2009) Hemagglutinating activity of *Gallibacterium* Strains. *Avian Dis* **53**: 115-118.

REFERENCIAS DE INTERNET

<http://www.gallibacterium-anatis.com.mx/>

<http://www.the-icsp.org/taxa/Pasteurellaceaelist.htm>

GLOSARIO DE TÉRMINOS

ATCC: (American Type Culture Collection) Son denominadas así las bacterias tipo ó de referencia.

Biovar: Es una variantes de una cepa que difiere fisiológicamente y/o bioquímicamente de otras cepas de una especie en particular

Cepa: Es una variante genotípica de una especie o, incluso, de un taxón inferior.

Enteritis: inflamación del intestino delgado, puede provocar; dolor abdominal, cólicos, diarrea, fiebre y deshidratación.

IgG: La inmunoglobulina tipo G es una de de las cinco clases de anticuerpos humorales producidos por el organismo.

Ooforitis: Inflamación del ovario que habitualmente se asocia a la salpingitis (infección de la trompa de Falopio).

Pericarditis: es una enfermedad producida por la inflamación del pericardio, la capa que cubre al corazón.

Peritonitis: Es la inflamación aguda o crónica del peritoneo, la membrana serosa que recubre parte de la cavidad abdominal y las visceras allí contenidas.

Polisacárido: Son biomoléculas formadas por la unión de una gran cantidad de monosacáridos. Se encuadran entre los glúcidos, y cumplen funciones diversas, sobre todo de reservas energéticas y estructurales.

Salpingitis: Inflamación del oviducto, que puede dar como resultado una baja en la producción de huevos.

Septicemia: Es la presencia de bacterias en la sangre (bacteriemia) y suele estar asociada con infecciones graves.

Serovares. Se conoce de esta manera a un grupo de microorganismos, virus o células, que se clasifican en un mismo grupo debido a los antígenos de su superficie celular.

Tripsina es una enzima peptidasa, que rompe los enlaces de las proteínas mediante hidrólisis para formar péptidos de menor tamaño y aminoácidos.