



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

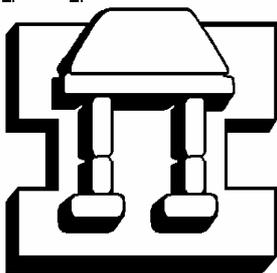
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**“Movilidad in vitro de *Pasteurella  
multocida* y clonación del gen *fliC*.”**

**REPORTE DE LICyT QUE  
PARA OBTENER EL TITULO DE  
BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

**ANGEL ANDRADE TORRES**



**IZTACALA**

**ASESOR:  
DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL**

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.  
AGOSTO DE 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.

## **GRACIAS A LA VIDA**

Gracias a la vida, que me ha dado tanto.  
Me dio dos luceros, que cuando los abro,  
Perfecto distingo lo negro del blanco,  
Y en el alto cielo su fondo estrellado...

Gracias a la vida, que me ha dado tanto,  
Me ha dado el sonido y el abecedario.  
Con él las palabras que pienso y declaro...

Gracias a la vida que me ha dado tanto  
Me dio el corazón, que agita su marco.  
Cuando miro el fruto del cerebro humano...

Violeta Parra

**Madre**, quisiera darte tantas cosas,  
por lo pronto está te la dedico...  
**¡Por mi madre! bohemios**

Faby, gracias por tu inmejorable  
compañía, comprensión y tu apoyo.

Muchas gracias a todos los miembros del  
Lab. de Genética, por darme un lugar dentro  
de su grupo, en especial al Dr. Erasmo  
por su asesoría y paciencia durante  
todo este tiempo y por el desarrollo  
de este escrito con sabor a tesis

Gracias a todo aquel que confió en mí.

Caballeros, Salud.

# INDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
1.1.Pasteurella multocida.....	2
1.2.Flagelo bacteriano .....	3
<b>2.OBJETIVOS.....</b>	<b>6</b>
2.1. Objetivo General.....	6
2.2. Objetivos Particulares.....	6
<b>3.MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>7</b>
3.1.Cepas bacterianas y ensayos de movilidad.....	7
3.2.Amplificación y clonación del gen fliC.....	7
<b>4.RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>10</b>
4.1.Ensayos de movilidad.....	10
4.2.Clonación del gen fliC.....	13
4.3.Análisis de la secuencia clonada.....	15
<b>5.CONCLUSIONES.....</b>	<b>19</b>
<b>6.BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>20</b>

## RESUMEN.

*Pasteurella multocida* es una bacteria patógena gram negativa de gran importancia veterinaria. Tradicionalmente todos los miembros de la familia *Pasteurellaceae* se han considerado como organismos inmóviles e incapaces de expresar un sistema flagelar. Sin embargo, en ocasiones bacterias móviles no son capaces de presentar flagelo si las condiciones microambientales son tales que impidan su expresión, puesto que el ensamblaje de dicha estructura, energéticamente es muy costoso. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue demostrar que *P. multocida* es capaz de expresar flagelo y presentar movilidad *in vitro*. Lo anterior se consiguió creciendo la bacteria en TSB o LBGP con una concentración de agar al 0.3%, se observó que dicha movilidad se encuentra influenciada por la dextrosa, fosfato y cloruro de sodio a 27 mM, 1.4mM y 170 mM respectivamente. Mediante PCR se amplificó un fragmento de 990 pb a partir del DNA cromosómico de *P. multocida*, el cual fue clonado en pCR2.1 y cuya secuencia nucleotídica codifica para un péptido deducido de 329 aminoácidos, la región N-terminal de dicho péptido posee una similitud del 92.3 y 73.4%, con la misma región de flagelinas previamente reportadas de *Pseudomonas aeruginosa* y *P. putida*. En base a los resultados obtenidos se concluye que *P. multocida* posee elementos genómicos que le confieren movilidad.

**Palabras clave:** *Pasteurella multocida*, flagelo, flagelina, PCR.

# 1. INTRODUCCIÓN.

## 1.1. *Pasteurella multocida*

*Pasteurella multocida*, es una bacteria gram-negativa, anaerobia facultativa, capsulada, de amplia distribución en todo el mundo, al igual que el resto de los miembros del género *Pasteurella* se describe como no móvil, incapaz de sintetizar flagelos; la producción de indol, ornitina descarboxilasa, catalasa, oxidasa y una reacción de urea, citrato y lactosa negativa permiten diferenciar a *P. multocida* de las otras especies del género (Carter, 1984).

*P. multocida* forma parte de la microbiota normal de nasofaringe, tracto gastrointestinal y genital de muchos animales salvajes y domésticos (Armstrong, 2000). Como patógeno, *P. multocida* ocasiona diferentes enfermedades entre las que destacan: el cólera en las aves de corral, septicemia hemorrágica en ganado vacuno, rinitis atrófica y neumonía en cerdos (Hunt, *et al.*, 2000), dichas enfermedades alcanzan gran importancia puesto que repercuten económicamente en la industria pecuaria de todo el mundo.

Se puede diferenciar serológicamente a *P. multocida*, mediante antígenos capsulares en serogrupos A, B, D, E y F, la enfermedad causada depende generalmente del tipo capsular, ya que los serogrupos B y E, provocan septicemia hemorrágica; el serogrupo A causa el cólera en las aves y pasteurelisis pneumónica porcina, el serogrupo D causa rinitis atrófica en cerdos y el serogrupo F también provoca cólera en aves (Cheng, *et al.* 2001; DeAngelis and Padgett-McCue, 1998), la cápsula representa un factor de virulencia pues participa en la adherencia y confiere inmunidad a la fagocitosis (Boyce and Adler, 2000).

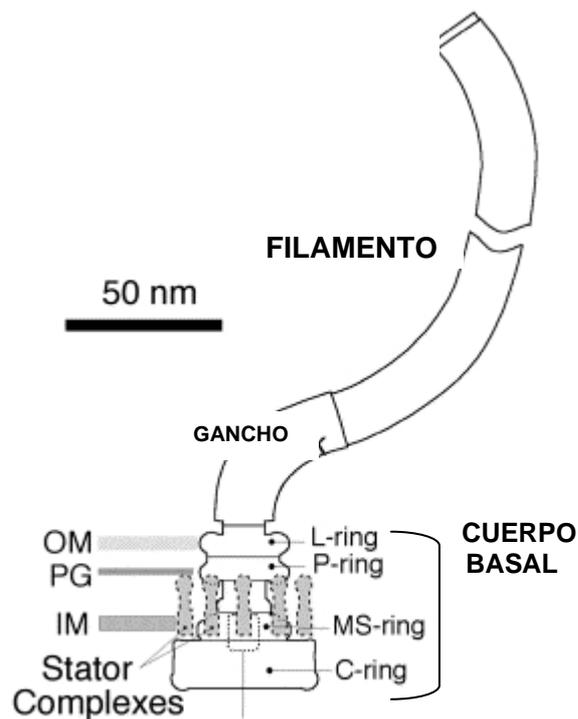
Otros factores de virulencia que posee *P. multocida* son; una toxina que actúa a nivel intracelular e incrementa la permeabilidad endotelial (Essler *et al.* 1998); algunas cepas expresan diferentes fimbrias que les confieren una mayor

capacidad de adhesión a las superficies del hospedero (Jacques and Paradis, 1998); una porina H capaz de formar poros o canales en las células (Bosch *et al.* 2001); sialidasas, enzimas que liberan ácido siálico y que han sido implicadas en la colonización exitosa y mantenimiento sobre las superficies de la mucosa (White, 1995), proteasas, capaces de degradar inmunoglobulinas (Negrete-Abascal *et al.* 1998), entre otros.

## **1.2. Flagelo bacteriano**

La movilidad bacteriana está asociada con la capacidad de producir estructuras filamentosas, llamadas flagelos, estos filamentos tienen un diámetro de alrededor de 15-20 nm y entre 10-20  $\mu\text{m}$  de longitud; la actividad flagelar se encuentra además acoplada a un aparato sensorio que permite el movimiento de la bacteria hacia microambientes atrayentes (Macnab, 1992).

Las estructuras básicas del flagelo bacteriano, como se esquematiza en la figura 1, se pueden subdividir en tres partes: (i) el cuerpo basal, que consiste de una serie de anillos y un eje central, el cual es anclado tanto a la membrana interna como externa de la célula; (ii) el gancho, localizado al exterior de la célula, constituye la conexión entre el cuerpo basal y; (iii) el filamento, que es la porción más larga del flagelo y el componente propulsor del sistema flagelar, consiste de múltiples repetidos de la proteína flagelina en un arreglo helicoidal (Winstanley and Morgan, 1997).



**Fig 1.** Esquema de las estructuras flagelares, tomado de Blair 2003 *FEBS letters* vol. 545.

La rotación de este filamento (según las manecillas del reloj o en contra de las manecillas) es controlada por el motor, estructura energizada por el influjo de protones a través de la membrana interna, impulsado por el potencial electroquímico llamado fuerza protón-motriz, producido por el complejo enzimático de la cadena respiratoria (Namba and Vonderviszt, 1997). El filamento funciona rotando como una propela una vez que la fuerza de torque es transmitida del motor al cuerpo basal. Cada filamento comprende alrededor de 20,000 subunidades de flagelina monomérica, proteína codificada por el gen *fliC* (Auvray, *et al.*, 2001), y cuyo peso varía desde 25 hasta 80 kDa (Shapiro, 1995).

Se sabe que durante la biogénesis flagelar se utiliza un aparato de secreción tipo III para la exportación de la mayoría de las proteínas estructurales (Cheng, *et al.* 2000; Macnab, 1999). El flagelo es uno de los sistemas bacterianos más complejos, más de 50 genes están involucrados tanto en su estructura y función, como en la regulación de su expresión (Macnab, 2003), el gasto

energético de sintetizar y ensamblar todas estas proteínas es muy costoso, es por esto que su expresión genética está altamente regulada y sólo se sintetizan proteínas flagelares cuando las condiciones microambientales favorecen la quimiotaxis y la movilidad (Silva-Herzog and Dreyfus 1995).

El flagelo representa una ventaja adaptativa ya que confiere a la bacteria la capacidad de respuesta a los estímulos que le son atractivos, así como de repulsión a los que le son nocivos (Armitage, 1992). También se considera al flagelo un factor de virulencia, puesto que se ha demostrado para diferentes especies que es fundamental durante la adhesión, invasión, infección y la formación de biopelículas, modo preferido de existencia de las bacterias en superficies ambientales y tejidos celulares (Girón, *et al.* 2002; Josenhans and Suerbaum, 2002; Stoodley, *et al.* 2002).

La mayoría de los patógenos son móviles, a consecuencia de las adaptaciones evolutivas que han desarrollado (Ottemann, 1997). En ocasiones bacterias móviles, son incapaces de expresar flagelo bajo condiciones de crecimiento inapropiadas; Girón en 1995, consiguió observar la expresión flagelar y movilidad de las cuatro especies pertenecientes al género *Shigella*, reportadas hasta entonces como microorganismos inmóviles. Además recientes investigaciones (Negrete, *et al.* 2003), han demostrado que *Actinobacillus pleuropneumoniae*, bacteria reportada como no móvil y perteneciente a la misma familia que *P. multocida*, es capaz de expresar flagelo y presentar movilidad *in vitro*; partiendo de éste antecedente y de que existe una gran similitud entre los géneros *Actinobacillus* y *Pasteurella* tanto en su porcentaje molar de G+C, como en sus características fenotípicas (Holmes, *et al.* 1995) se consideró la hipótesis de que *P. multocida*, al igual que *A. pleuropneumoniae*, pudiese expresar un sistema flagelar y presentar movilidad.

## **2. OBJETIVOS.**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL.**

El objetivo general de este trabajo fue encontrar condiciones de crecimiento *in vitro* y argumentos genéticos que permitiesen poner en evidencia que *P. multocida*, puede expresar flagelo y presentar el fenotipo móvil.

### **2.2. OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Realizar ensayos de movilidad a *P. multocida* bajo diferentes concentraciones de sales y dextrosa, que pudiesen favorecer la expresión del fenotipo móvil.
- Amplificar a partir del DNA cromosómico de *P. multocida* un probable gen *fliC*, clonar dicho producto y obtener su secuencia nucleotídica.
- Comparar la secuencia del producto amplificado con secuencias de genes *fliC* reportados.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Cepas bacterianas y ensayos de movilidad.

Las cepas bacterianas de *P. multocida* (aisladas de aves y cerdos infectados) utilizadas en este trabajo fueron donadas y tipificadas por el laboratorio Biovetsa, de Tehuacan, Puebla.

Los primeros ensayos de movilidad, crecimiento radial a partir de un punto de inoculación, se realizaron en diferentes medios de cultivo TSB, LBGP, MH y BHI (Bioxón) y variando la concentración de agar [0.2, 0.3, 0.35 y 0.4%], incubando a 37°C en microaerofilia. Una vez determinada la [agar] y el medio de crecimiento óptimo para cada cepa, se realizaron nuevos ensayos variando el pH (5-10).

En los últimos ensayos de movilidad se añadieron las siguientes sales, a diferentes concentraciones anteriormente reportadas (Girón, 1995; Hsin-Chih *et al.* 1997): CaCl<sub>2</sub> [2.5, 5.0 y 7.0 mM]; MgSO<sub>4</sub> [2.0 y 4.0 mM]; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [1.4, 2.0 y 4.1 mM]; NaCl [85, 170, 256, 341 mM]; y dextrosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) [13, 27, 55 y 110 mM]. Los resultados de los ensayos se revisaron a las 24, 48 y 72 horas de incubación.

#### 3.2. Amplificación y clonación del gen *fliC*.

La obtención del DNA cromosómico de *P. multocida* se llevo a cabo mediante la técnica descrita por Chen *et al.*, 1993. Éste DNA se utilizó como templado en el PCR para la amplificación del gen *fliC*, utilizando los oligos reportados previamente por Negrete *et al.* 2003; y cuyas secuencias nucleotídicas son:

oligo upper 5´AATACAACAGCCTCTCGCT 3´

oligo lower 5´ AGAGACAGAACCTGCTGC 3´

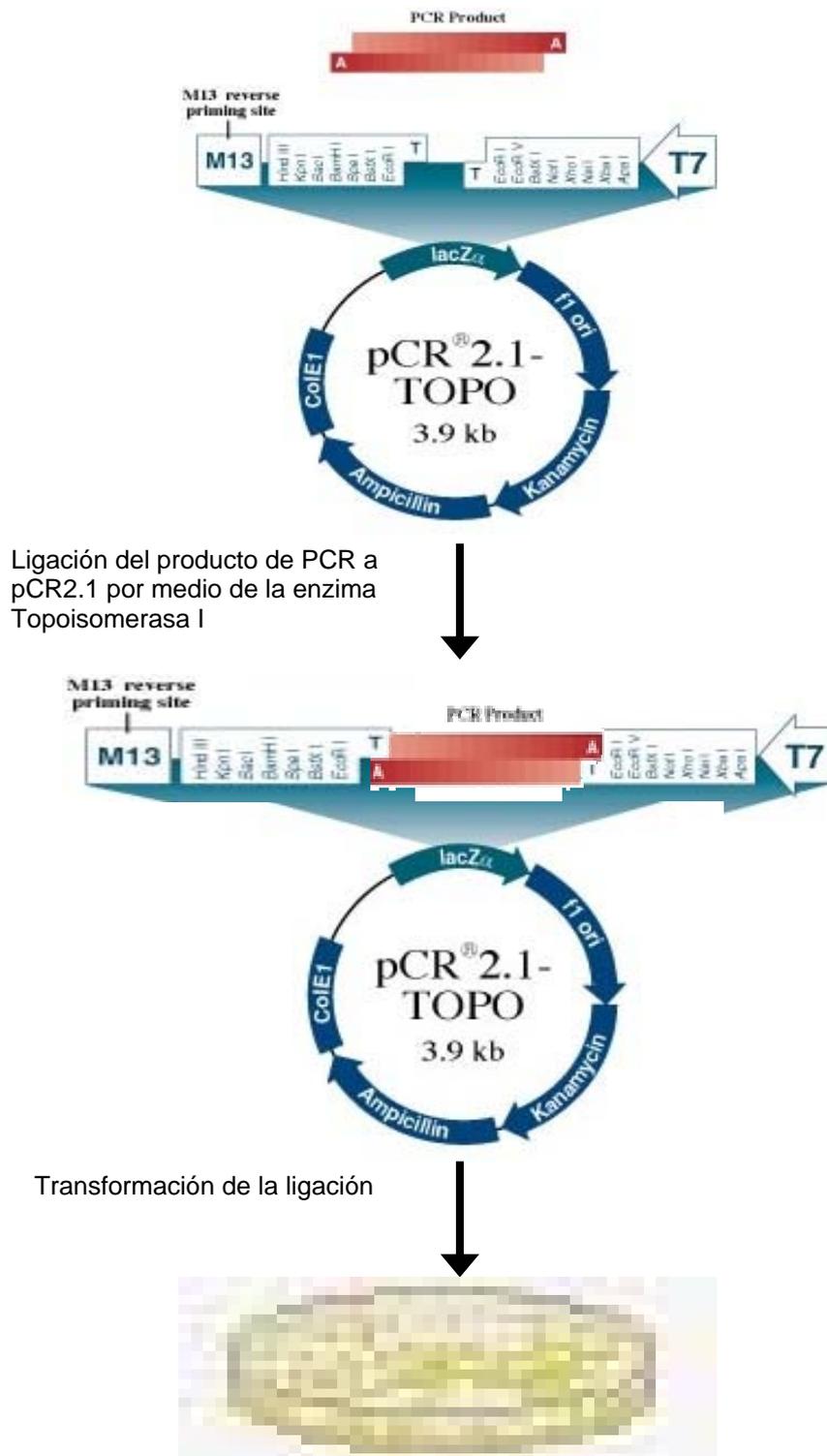
El PCR se realizó en un termociclador Perkin-Elmer modelo 480, bajo las siguientes condiciones; un primer ciclo de 10 min a 94°C, posteriormente 25 ciclos de: 1 min a 94°C; 1 min a 56°C; y 2 min a 72°C; por último un ciclo de 10 min a 72°C.

El producto de la amplificación se clonó en el vector pCR2.1 (Invitrogen), interrumpiendo el gen *lacZ* ( $\alpha$ -complementación), pCR2.1 posee dos marcadores de selección; ampicilina y kanamicina (fig. 2). Se utilizó una cepa de *Escherichia coli* TOP10 como hospedero general para la construcción pCR2.1-*fliC Pm*.

La identificación de las colonias *lacZ*<sup>-</sup>, que fueran portadoras del producto amplificado se realizó en primera instancia en base al fenotipo resultante de la  $\alpha$ -complementación, en presencia del sustrato cromogénico 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol  $\beta$ -D-galactosido (X-gal) y de ampicilina ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), fenotipo colonias blancas ampicilina resistentes.

Se extrajo DNA plasmídico a éstas colonias blancas (*lacZ*<sup>-</sup>), por lisis alcalina (Sambrook, *et al.* 1989), y posteriormente se verificó que portasen el fragmento clonado mediante un análisis de restricción con la enzima *EcoRI* (Promega).

Identificadas las colonias portadoras del fragmento clonado se envió una muestra de DNA plásmidico (pCR2.1-*fliC Pm*) a secuenciar al laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FES-I. Una vez obtenida dicha secuencia, utilizando los programas n-Blast y AliBee Multiple Alignment se realizó la comparación de la misma con diferentes genes *fliC* y flagelinas previamente reportadas,



**Fig. 2.** Procedimiento de la  $\alpha$ -complementación, utilizando el vector pCR2.1.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.1. Ensayos de movilidad.

Partiendo del conocimiento de que la expresión del fenotipo móvil es sensible a condiciones microambientales, se realizaron los ensayos de movilidad (crecimiento radial) bajo diferentes condiciones del medio de crecimiento, y los resultados se muestran en la tabla 1 y 2. La concentración de agar que permitió observar claramente la movilidad de las cepas y no dificultaba su interpretación fue 0.3%, a concentraciones superiores la movilidad se veía atenuada (tabla 1) y el trabajar con una concentración tan baja como la de 0.2% dificultaba la interpretación y manipulación. Por tal motivo todos los ensayos posteriores se realizaron a [0.3%] de agar. Los medios seleccionados como óptimos fueron LBGP y TSB para la cepa de *P. multocida* aislada de ave y de cerdo respectivamente. En cuanto a los ensayos de pH se determinó como óptimo un pH de 7, unidades por arriba o por debajo de éste disminuían el movimiento (tabla 1), esto puede estar relacionado con el pH de los sitios de colonización de *P. multocida*.

**Tabla 1.** Medio, concentración de agar pH óptimo

Medio	[Agar %]	Pm(ave)				Pm(cerdo)			
		0.2,	0.30,	0.35,	0.4	[Agar %]	0.2,	0.30,	0.35,
LBGP		+++	++	+	-	++	++	+	+/-
TSB		++	+	+/-	-	+++	++	+	+/-
MH		++	+	+	+/-	++	+	+	+/-
BHI		++	+	+/-	-	++	+	+	+/-
pH		Pm (ave)				Pm(cerdo)			
5		-				-			
6		+/-				+			
7		+				++			
8		+				++			
9		+/-				+/-			
10		-				-			

Cepas de *P. multocida* (Pm) aislada de ave y cerdo fueron inoculadas en TSB. 37°C, durante 72 hrs en microaerofilia. +++ muy móvil, ++ moderadamente móvil, + móvil, +/- escasamente móvil, - no móvil.

En cuanto al requerimiento de sales y dextrosa (tabla 2), se logró determinar que el NaCl, el K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, y la dextrosa son compuestos que favorecen la movilidad de *P. multocida*, más no ocurre lo mismo con el MgSO<sub>4</sub> ni con el CaCl<sub>2</sub>, incluso este último al incrementar su concentración la movilidad se observaba disminuida. Al parecer el MgSO<sub>4</sub> y el CaCl<sub>2</sub>, son compuestos que no tienen una participación estimulante en la movilidad de ésta bacteria, y es que se sabe que durante la expresión flagelar el fenotipo móvil varía de cepa a cepa y puede encenderse o

**Tabla 2.** Requerimiento de sales y dextrosa en ensayos de movilidad.

	Pm(ave)	Pm(cerdo)
[CaCl <sub>2</sub> mM]		
2.5	+	++
5.0	+/-	+
7.0	+/-	+/-
[MgSO <sub>4</sub> mM]		
2.0	+	++
4.0	+	++
[NaCl mM]		
Sin NaCl	-	-
8.5	+/-	+
17.0	+++	+++
25.6	++	++
34.1	++	++
[KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mM]		
Sin KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	+/-	+/-
1.4	++	+++
2.0	++	++
4.1	+	++
[dextrosa mM]		
13	++	++
27	+++	+++
55	+/-	+
110	+/-	+/-

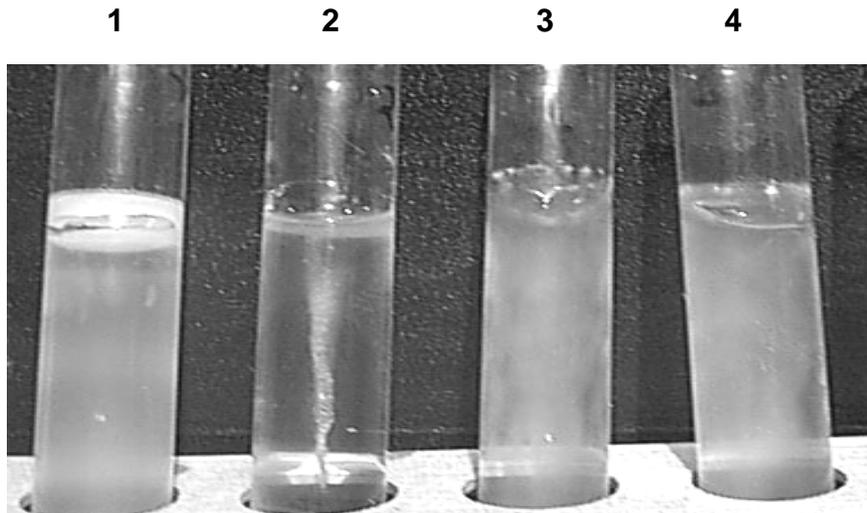
Cepas de *P. multocida* (Pm) aislada de ave y cerdo fueron inoculadas en LBGP y en TSB respectivamente. [agar 0.3%]. 37°C, durante 72 hrs en microaerofilia.  
+++ muy móvil, ++ moderadamente móvil, + móvil, +/- escasamente móvil, - no móvil.

apagarse mediante diferentes factores, como por ejemplo la temperatura, la tensión de oxígeno, osmoralidad, la concentración de aminoácidos, carbohidratos, iones, calcio, etc. (Akerley *et al.*, 1993; Bliska *et al.*, 1993; Harunur, *et al.* 2000; McGroarty, *et al.*1973; Mekalanos, 1992 ; Turner, *et al.* 1996).

Es importante considerar el papel que tienen los iones en la regulación de la movilidad, pues como anteriormente se menciona, los motores flagelares son impulsados por los gradientes del potencial electroquímico de la membrana (Namba and Vonderviszt, 1997). En cuanto al NaCl, representó un requerimiento para ambas cepas y se determinó una concentración óptima de 170 mM para ambas cepas (tabla 2), mientras que el  $K_2HPO_4$ , de igual forma incrementó la movilidad de *P. multocida*, esto se observó a una concentración de 1.4 mM para ambas cepas (tabla 2).

Por otra parte se sabe que la concentración de dextrosa presente en el medio es importante dependiendo de la bacteria, puede actuar como un represor o como un estimulante de la movilidad (Yokota and Gotsi, 1970), para *P. multocida*, la dextrosa incrementó su movilidad, a una concentración de 27 mM en ambas cepas (fig. 3), al incrementar la concentración por arriba de 27mM la movilidad disminuyo

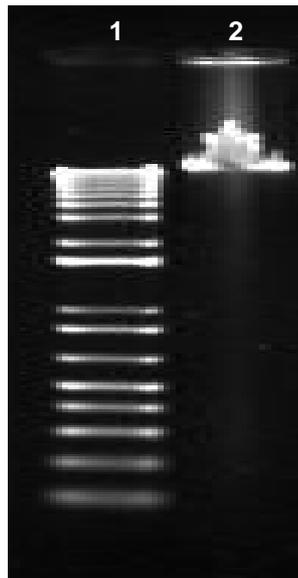
(tabla 2), posiblemente porque al incrementar los niveles de dextrosa, decrece la concentración intracelular de cAMP, éste decaimiento conduce a un efecto inhibitorio en la expresión del gen regulador *flhD*, regulador maestro en la síntesis de flagelo (Hsin-Chih, L. *et al.* 1997).



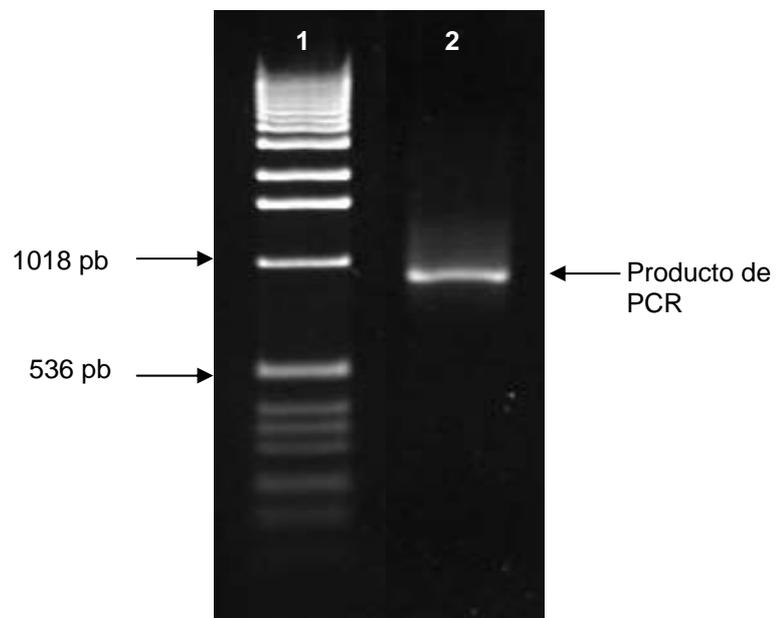
**Fig. 3.** Ensayos de movilidad de *P. multocida* (Pm) en TSB+glucosa [27 mM] y agar 0.3% (1) *E. coli* EPEC; (2) *E. coli* H-; (3) Pm aislada de ave y (4) Pm aislada de cerdo.

#### 4.2. Clonación del gen *fliC*.

Una vez realizados los ensayos de movilidad se extrajo el DNA cromosómico de *P. multocida* y se corroboró su buen estado mediante una electrofóresis en gel de agarosa al 1% (fig 4), posteriormente se llevo a cabo el PCR utilizando los oligonúcleotidos y las condiciones anteriormente descritas, el producto obtenido se visualizo por electrofóresis en gel de agarosa al 1%, y se observó a un peso molecular de aproximadamente 900 pares de bases (fig. 5), éste producto fue clonado al vector pCR2.1. Y una vez obtenida la secuencia nucleotídica se determinó que se constituía por 990 pares de bases, y que codificaba para un péptido deducido de 329 residuos de aminoácidos. La secuencia ya se encuentra en el Genbank bajo el No de acceso AY445112.



**Fig 4.** Electroforesis en gel de agarosa 1%. 1) marcador 1 Kb DNA, 2) DNA cromosómico de *P. multocida*.



**Fig 5.** Electroforesis en gel de agarosa 1%. 1) marcador 1 Kb DNA leader, 2) producto de PCR *fliC* *P. multocida*.

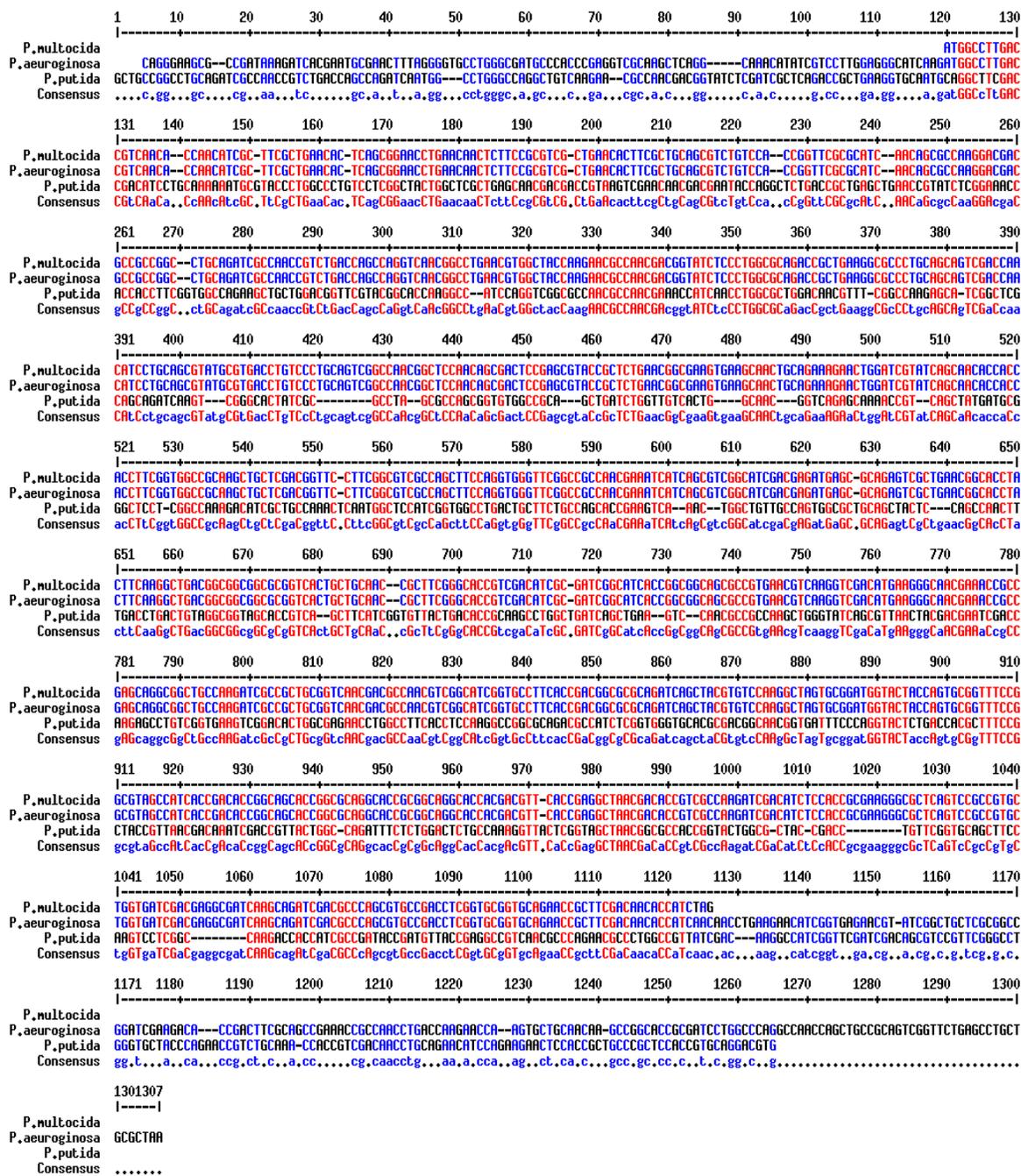
### 4.3. Análisis de la secuencia clonada.

El análisis *in silico* de esta secuencia amplificada, se realizó en primera instancia mediante el programa n-BLAST, revelando una alta identidad (100%, 95% y 93%) con fragmentos de secuencias de genes *fliC* de diferentes especies del género *Pseudomonas*: *aeuroginosa*, *putida* y *syringae* respectivamente, esto puede deberse a que ambos géneros se encuentran en el grupo de las proteobacterias y pertenecen a la alpha- subdivisión, esto de acuerdo al análisis filogenético del Reino Bacteria, basado en el estudio del ARNr de la SSU, subunidad pequeña de los ribosomas (Woese, 1987), y al alto grado de conservación de este gen en las diferentes bacterias. En la figura 6 se muestra un alineamiento entre la secuencia amplificada de *P. multocida* y las secuencias de los genes *fliC* de *P. aeuroginosa* y *P. putida*, el alineamiento se realizó con el programa Multalin, las bases que se marcan en rojo son las bases idénticas entre las tres secuencias y en azul las bases idénticas entre solo dos secuencias. Lo anterior nos indica que efectivamente existe una secuencia nucleotídica para *fliC*, presente en el cromosoma de *P. multocida*.

La estructura de dominios de los genes que codifican para flagelina (*fliC*), la cual consiste en una región N- y C-terminal conservadas y un dominio central que puede variar tanto en la secuencia de aminoácidos como en su tamaño (Joys, 1988; Wilson and Beveridge, 1993), los convierte en candidatos ideales para la amplificación por PCR (Winstanley and Morgan, 1997), ésta característica ha permitido el desarrollo de múltiples aplicaciones basadas en la amplificación de genes *fliC*, como la detección de especies bacterianas (Oyofe and Rollins, 1993; Way *et al.* 1993), además la localización de la flagelina fuera de las células bacterianas, la convierte en un excelente blanco para la detección inmunológica (Morgan, *et al.* 1991).

Usando el programa AliBee Multiple Alignment se realizó una serie de alineamientos múltiples (fig. 7), de la región N-terminal del péptido predicho

**Fig. 6.** Alineamiento nucleotídico entre *fliC* de *P. multocida*, *Ps. aeuroginosa* y *Ps. putida*, realizado con el programa Multalin. Bases en rojo indican bases idénticas, en azul las bases idénticas entre dos secuencias y en negro bases diferentes y (-) ausentes.





Por último en la tabla 3 se marcan los porcentajes de similitud entre la región N-terminal de FliC de *P. multocida* y la región N-terminal de las siete falginas que fueron utilizadas en el alineamiento de la figura 7.

	<i>P. multocida</i>
<i>E. coli</i>	62.6%
<i>P. aeuroginosa</i>	92.3%
<i>P. putida</i>	73.4%
<i>S. typhimurium</i>	64.3%
<i>Y. enterocolitica</i>	63.9%
<i>B. bronchiseptica</i>	62.2%
<i>T. phagedenis</i>	47.4%

**Tabla 3.** Porcentajes de identidad de FliC *P. multocida*, y siete diferentes FliC reportadas, las matrices se realizaron con el programa AliBee Multiple Alignment.

## 5. CONCLUSIONES.

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que *P. multocida* contrariamente a como se describe es capaz de presentar movilidad *in vitro* y probablemente de igual forma lo haga *in vivo*, bajo condiciones microambientales de su hospedero que estimulen dicho movimiento.

La movilidad caracterizada en este trabajo indica un requerimiento de dextrosa, fosfato y cloruro de sodio a las concentraciones de 27 mM, 1.4mM y 170 mM respectivamente.

Además se comprobó la existencia, dentro de su cromosoma, de un gen cuya secuencia tanto nucleotídica como del péptido deducido, tienen altos niveles de similitud con diferentes genes *fliC* y flagelinas reportadas, lo que confirman los primeros resultados obtenidos en los ensayos de movilidad. Siendo este el primer trabajo donde se demuestra la movilidad y la presencia de un gen *fliC* en *P. multocida*. Estos resultados amplían en gran medida el conocimiento sobre este patógeno y abren nuevos marcos de investigación en *P. multocida*, que pueden conducir hacia un mejor entendimiento de los mecanismos de interacción con su hospedero.

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

- Akerley, B., Millar, J. 1993. Flagellin gene transcription in *Bordetella bronchiseptica* is regulated by the BvgAS virulence control system. *J. Bacteriol.* 175: 3468-3479.
- Armitage, J. P. 1992. Behavioral response in bacteria. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 683-714.
- Armstrong, G. R., Sen, R. and J. Wilkins. 2000. *Pasteurella multocida* meningitis in an adult case report. *J. Clin. Pathol.* 53: 234-235.
- Auvray, F., Thomas, J., Fraser, G., Hughes, C. 2001. Flagellin polymerization control by a cytosolic export chaperone. *J. Mol. Biol.* 308: 221-229.
- Blair, D. 2003. Flagellar movement driven by proton translocation. *FEBS letters.* 545: 86-95.
- Bliska, J., Galán, J., Falkow, S. 1993. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry, *Cell.* 73: 903-920.
- Bosh, M., Tarragó, R., Garrido, M., Campoy, S., Fernández, A., Pérez, A., BAdiola, I., Barbé, J. 2001. Expression of the *Pasteurella multocida ompH* gene is negatively regulated by the Fur protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 203: 35-40.
- Boyce, J. D., Adler, B. 2000. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infect. Immun.* 69: 1943-1946.
- Carter, G.R., 1984. Genus *Pasteurella*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. (Krieg and R. and Holt, J.G. ed.) Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- Chen, W. P., Kuo T. T. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 21:2260.
- Cheng, L.W. and Schneewind, O. 2000. Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods. *Trends Microbiol.* 8:214-220.
- Chung, J., Wilkie, I., Boyce, J. D., Townsend, K. Frost, A., Ghodduzi, M. Adler, B. 2001. Role of capsule in the pathogenesis of flow cholera caused by *Pasteurella multocida* serogrup A. *Infect. Immun.* 69: 2487-2492

- DeAngelis, P. L., Padgett-McCue, A. 2000. Identification and molecular cloning of a chondroitin synthase from *Pasteurella multocida* type F. *J. Biol. Chem.* 275: 24124-24129.
- Essler, M., Hermann, K., Amano, M., Kaibuchi, K., Heesemann, J., Weber, P., Acepfelbacher, M. 1998. *Pasteurella multocida* toxin increases endothelial permeability via Rho kinase and myosin light chain phosphatase. *J. Immunol* 161: 5640-5646.
- Girón, J. 1995. Expression of flagella and motility by *Shigella*. *Mol. Microbiol.*18:63-75.
- Girón, J., Torres, A., Freer E., Kaper, J. 2002. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 44: 361-379.
- Harunur, M. R., Rao, N., Kornberg, A. 2000. Inorganic Polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *J. Bacteriol.* 182: 225-227.
- Holmes, B., Pickett, J., and Hollis, D. 1995. Unusual Gram-Negative Bacteria, Including *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Pasteurella* and *Streptobacillus*. in Manual of Clinical Microbiology. 6<sup>ta</sup> edición. ASM Press. Washington, D.C.
- Hsin-Chih, L., Shu, J.C., Ang, S., Lai, M.J., Fruta, B., Lin, S., Lu, K., Ho, S. 1997. Effect of glucose concentration on swimming motility in enterobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 231: 692-695.
- Hunt, M., B., Adler, and K. Townsend. 2000 The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* 72: 3-25.
- Jacques, M., Paradis, S. 1998. Adhesin-receptor interactions in *Pasteurellaceae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 45-59.
- Josenhans, C., Suerbaum, S. 2002. The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 291: 605-614.
- Joys, T.M. 1988. The flagellar filament protein. *Can. J. Microbiol.* 34: 452-458.
- Macnab, R. M.1992. Genetics and biogenesis of bacterial flagella. *Annu. Rev. Genet.* 26:131-158.
- Macnab, R. M. 1999. The bacterial flagellum: reversible rotatory propeller and type III export apparatus. *J. Bacteriol.* 181:7149-7153.

- Macnab, R. M. 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 77-100.
- McGroarty, E., Koffler, H., Smith, R.W. 1973. Regulation of flagella morphogenesis by temperature: Involvement of the bacterial cell surface in the synthesis of flagellin and the flagellum. *J. Bacteriol.* 113: 295-303.
- Morgan, J. A., Winstanley, C., Pickup, R., Saunders, J. 1991. Rapid immunocapture of *Pseudomonas putida* cells from lake water by using bacterial flagella. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 503-509.
- Mekalanos, J. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* 174: 1-7.
- Namba, K. Vonderviszt, E. 1997. Molecular architecture of bacterial flagellum. *Quar. Rev. Biophys.* 30: 1-65.
- Negrete-Abascal, E., Tenorio, V., De la Garza, M. 1998. Secretion of Proteases from *Pasteurella multocida* Isolates. *Curr. Microbiol.* 38: 64-67.
- Negrete-Abascal, E., Reyes M.E., García, R.M., Vaca S., Girón, J.A., García O., Zenteno, E., De la Garza, M. 2003. Flagella and motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Bacteriol.* 185: 664-668.
- Ottemann, K. and Miller, J. 1997. Roles and motility in bacterial-host interaction. *Mol. Microbiol.* 24: 1109-1117.
- Oyofe, B.A., Rollins, D.M. 1993. Efficacy of filter types for detecting *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental water samples by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4090-4095.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning a laboratory manual. second edition. vol. 1 Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shapiro, J. 1995. The bacterial flagellum from genetic network to complex architecture. *Cell.* 80: 525-527.
- Silva-Herzog, E. Dreyfus, G. 1995. El flagelo: organelo locomotor de bacterias. *Ciencia.* 46:46-63.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G. and Costerton, J.W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 187 -209.

- Turner, L., Caplan, R., Berg, H. 1996. Temperature-induced switch in the bacterial flagellar motor. *Biophys. J.* 71: 2227-2233.
- Way, J.S., Josephson, K.L., Pillai, S., Abbaszadegan, M., Gerba, C., Pepper, I. 1993. Specific detection of *Salmonella* spp. By multiplex polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1473-1479.
- White, D., Jolley, W., Purdy, C., Staus, D. 1995. Extracellular neuraminidase production by a *Pasteurella multocida* A:3 strain associated with bovine pneumonia. *Infect. Immun.* 63: 1703-1709.
- Wilson, D.R., Beveridge, T. J. 1993. Bacterial flagellar filaments and their component flagellins. *Can. J. Microbiol.* 39: 451-572.
- Winstanley, C. Morgan, J. 1997. The bacterial flagellin gene as a biomarker for detection, population genetics and epidemiological analysis. *Microbiology.* 143: 3071-3084.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271.
- Yokota, T. Gots, J. 1970. Requirement of adenosine 3'-5'-cyclic phosphate for flagella formation in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 103: 513-516.