



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**“Clonación y caracterización del gen *fliC*
de *Avibacterium paragallinarum*”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

ANGÉLICA SERRANO VÁZQUEZ

TUTOR: DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL

COMITÉ TUTORAL:

DR. VICTOR RUBEN TENORIO GUTIÉRREZ

DR. SERGIO VACA PACHECO



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.

**El presente trabajo fue financiado por los programas de apoyo
PAPIIT/IN219203-3 y por CONACYT con número de becario 194261**

DEDICATORIA

**A TODAS ESAS PERSONAS QUE YA NO ESTÁN PERO QUE FUERON MUY
IMPORTANTES Y QUE NO PUDE AGRADECERLES.**

A MI FAMILIA Y AMIGOS.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Erasmo Negrete, por su asesoría y por todo lo que pude aprender de él en la realización de este trabajo.

Al Dr. Sergio Vaca por los buenos consejos, observaciones, asesoría y sobre todo por el apoyo que me brindó.

Al Dr. Víctor Tenorio el conocimiento, asesoría, consejos y paciencia que me brindó durante esta etapa de maestría.

A los doctores José Abel Ciprián Carrasco y Susana Elisa Mendoza Elvira, miembros del jurado, por haber hecho contribuciones importantes en este trabajo.

Al laboratorio de Microscopía electrónica del CINVESTAV-Zacatenco por toda la cooperación, atención y tiempo que dieron a esta investigación.

A los M en C Alberto Chantes Guerra y Octavio Patricio García González por haberme brindado su apoyo en el desarrollo de los experimentos y por ayudarme a aclarar muchas dudas.

A mi familia, por que confiaron en mí y me apoyaron en todo momento.

A Misael, el office boy, porque me brindó su apoyo y amistad incondicional siempre.

A Alina por brindarme su amistad, por sus consejos, apoyo y platicas que me ayudaron a crecer como persona.

A todas mis amigas de la carrera de Biología Eli, Gaby, Ara y Magali por no olvidar nunca la amistad y estar siempre pendientes de mí.

A mis amigos del laboratorio de Genética Ale, Carlos, Karina, Alberto, Isis, Marce y todos los que han estado o están, por que aprendí mucho de todos y disfrute con ellos de mi estancia en este laboratorio.

A todos mis amigos Cecy, Vianey, Martha, Usy, Gabriel, Oscarín, ... por todos los buenos momentos y a todas esas personas que sin saberlo fueron importantes.

A todos mis excelentes profesores de la maestría y licenciatura por haber logrado que me fascinara mi carrera y especialmente al Dr. Diego por que nunca dudó en ayudarme.

A Tere, por haberme ayudado cuando lo necesité y brindarme su amistad y haberme regalado un poquito de sus conocimientos.

Al Dr. Salvador por abrirme una nueva puerta para seguir adelante.

ÍNDICE

	PAG
RESUMEN.....	01
1. INTRODUCCIÓN.....	02
1.1 Coriza infecciosa	
1.2 Descripción del organismo	
1.3 Etiología	
1.4 Clasificación serológica	
1.5 Factores de virulencia	
1.6 Flagelo procarionte	
2. JUSTIFICACIÓN.....	20
3.HIPÓTESIS.....	21
4. OBJETIVOS.....	22
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
5.1 Microorganismos	
5.2 Medios de cultivo	
5.3 Selección de cepas motiles de <i>A. paragallinarum</i>	
5.4 Obtención de la posible flagelina de <i>A. paragallinarum</i>	
5.5 SDS-PAGE	
5.6 Inmunoreconocimiento con sueros anti-flagelina	
5.7 Secuenciación amino terminal	
5.8 Cromatografía de intercambio iónico	
5.9 Microscopía electrónica	

5.10 Obtención de ADN cromosómico de <i>A. paragallinarum</i>	
5.11 Amplificación y clonación del gen <i>fliC</i>	
5.12 Secuenciación del gen <i>fliC</i> de <i>A. paragallinarum</i> y análisis <i>in silico</i>	
6. RESULTADOS	33
6.1 Selección de cepas móviles de <i>A. paragallinarum</i>	
6.2 SDS-PAGE e inmuno reconocimiento	
6.3 Secuencia amino terminal	
6.4 Microscopía electrónica	
6.5 Cromatografía de intercambio iónico	
6.6 Obtención de ADN cromosómico de <i>A. paragallinarum</i>	
6.7 Amplificación y clonación del gen <i>fliC</i> de <i>A. paragallinarum</i> y análisis <i>in silico</i>	
7. DISCUSIÓN	57
8. CONCLUSIONES	63
9. BIBLIOGRAFÍA	64

RESUMEN

Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum es el agente causal de la coriza infecciosa, una enfermedad aguda del tracto respiratorio de los pollos. Es una bacteria gram-negativa de la familia *Pasteurellaceae*, considerada como no mótil e incapaz de formar flagelo; sin embargo, recientemente se reportó que presenta motilidad bajo ciertas condiciones *in vitro*. Se ha descrito que *Haemophilus influenzae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida*, miembros también de la familia *Pasteurellaceae*, tienen los elementos genéticos suficientes para sintetizar flagelo. Por lo tanto, en este trabajo se amplificó por PCR el gen *fliC* de *A. paragallinarum* obteniendo un producto de aproximadamente 1500pb, el cual se clonó en el vector de clonación pCR 2.1 utilizando como hospedero la cepa *E. coli* XL1-Blue y se secuenció. Dicha secuencia presentó una identidad de más del 90% con las secuencias *fliC* reportadas para *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *E. coli*. A partir de cepas mótils de *A. paragallinarum* se obtuvo, por centrifugación diferencial, una posible flagelina de aproximadamente 73 KDa, la cual, al realizarse Western Blot, presentó reacción cruzada con diferentes sueros anti-flagelinas. Por medio de microscopía electrónica se logró observar, que *A. paragallinarum* posee un flagelo polar, además, se observaron filamentos flagelares a partir de muestras de la posible flagelina purificada. Los resultados de este trabajo pueden aportar nuevos elementos que nos ayuden a comprender tanto el proceso infeccioso de *A. paragallinarum*, como los mecanismos de interacción con su hospedero.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Coriza infecciosa

Coriza infecciosa (CI) es una enfermedad respiratoria aguda, causada por *Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum*. Esta enfermedad afecta principalmente los pasajes nasales de pollos (Blackall, *et al.*, 1997).

El síndrome clínico de la CI incluye: inflamación edematosa de la cara, alrededor de los ojos y la barbilla; descarga nasal, senos paranasales inflamados; disminución en el consumo de agua y alimento y diarrea (Blackall, 1999) (Fig. 1).



Figura 1: Ave que presenta signos clínicos de CI.

La CI se puede clasificar en dos tipos:

a) Coriza infecciosa clásica que afecta únicamente el tracto respiratorio superior de los pollos causando sinusitis y conjuntivitis. Este tipo de CI se caracteriza por ser una enfermedad aguda de curso corto que abarca aproximadamente dos semanas y tiene curación espontánea (Terzolo, 2000).

b) Coriza infecciosa complicada en donde *A. paragallinarum* se asocia con otros microorganismos como *Escherichia coli*, *Pasteurella gallinarum*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Manhemia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Manhemia synoviae*, *Salmonella enterica* y algunos virus. En estos casos, el curso de la enfermedad se agrava y los pollos pueden presentar neumonía, aerosaculitis, septicemia y artritis (Blackall, 1999). Además, se prolonga el curso de la enfermedad por lo que puede llegar a tener una duración de siete semanas. La CI complicada no se cura fácilmente y suelen quedar secuelas diversas, siendo común el sacrificio de un número importante de aves.

Los casos de CI clásica causan alta morbilidad y baja o nula mortalidad sin embargo en el caso de CI complicada se puede producir alta mortalidad (Fig. 2) (Terzolo, 2000).



Figura 2: Ave muerta por CI complicada

Los brotes de CI aparecen comúnmente con la introducción de aves portadoras de *A. paragallinarum* al lote. La transmisión de la infección es por contacto directo, por el aire, el polvo, las descargas respiratorias o por beber agua contaminada con exudados nasales. Las aves desarrollan los síntomas generalmente 3 días después de la exposición al agente etiológico (Jacobs, *et al.*, 2003).

La CI es una enfermedad con una gran importancia a nivel mundial ya que produce grandes pérdidas económicas, debido a que hay un crecimiento pobre de los pollos y disminución en el consumo de agua. Esto ocasiona que aumente la cantidad de pollos de engorda que no alcanzan las tallas requeridas (Fig. 3) y además hay una marcada reducción en la producción del huevo de hasta el 50% en las aves ponedoras (Ueda, *et al.*, 1982).

La enfermedad está principalmente limitada a los pollos, por lo que no tiene importancia en salud pública (Blackall, *et al.*, 1990).



Fig 3: Aves que presentan baja conversión alimenticia a consecuencia de
CI.

Se ha informado la presencia de coriza infecciosa, en Argentina, Australia, Bulgaria, Canadá, Egipto, Gran Bretaña, Guatemala, Holanda, India, Indonesia, Irak y Suiza, entre otros países. Estos informes corroboran la amplia distribución de *A. paragallinarum* en el mundo, principalmente en países con industria avícola intensiva (Blackall, *et al.* 1997).

En Estados Unidos de América se han informado brotes de coriza infecciosa en California, Alabama y Óregon. En México, han reportado brotes en Sonora, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Puebla y Yucatán (Soriano *et al.*, 2004).

1.2 Descripción del organismo

Avibacterium paragallinarum es una bacteria Gram-negativa que anteriormente había sido clasificada en el género *Haemophilus*, pertenece al super reino *Procaryotae*; al reino *Eubacteria*; a la división *Gracilicutes*; a la clase *Protobacteria*; a la familia *Pasteurellaceae*; (Killian, *et al.*, 1984) y actualmente fue reclasificada en el género *Avibacterium* (Blackall, *et al.*, 2005).

Son organismo de 1 a 3 μm de largo y de 0.4 a 0.8 μm de ancho. Pueden aparecer individualmente, en pares, o como cadenas cortas (Fig. 4). Son pleomórficos, ya que puede observarse en cultivos de 24 h como bacilos cortos o cocobacilos, con una tendencia a la formación de filamentos, pero, después de 48 h, el organismo sufre degeneración que muestran fragmentos y sus formas subsecuentes (Blackall, 1999).



Figura 4: Tinción de Gram de *A. paragallinarum*

Las colonias tienen forma de gotas diminutas de 0.3 mm a 1 mm de diámetro (Blackall, *et al.*, 1997) (Fig. 5). Las colonias de cepas virulentas se observan lisas, convexas, con bordes regulares, semiopacas. Las cepas no virulentas crecen como colonias planas, rugosas y de bordes irregulares. Existen también formas coloniales intermedias entre lisas y rugosas y ligeramente convexas con bordes irregulares (Sawata, *et al.*, 1983).



Figura 5: Morfología colonial de Avpg

La forma reducida de NAD (factor V) (1.56-2.5 $\mu\text{g/ml}$ en el medio) o su forma oxidada (20-100 $\mu\text{g/ml}$) es necesaria para el crecimiento *in vitro* de la mayoría de los aislamientos de *A. paragallinarum*. Las excepciones son algunos aislamientos descritos en Sudáfrica y en México que son NAD independientes (Bragg, 2002; 2004; García, *et al.*, 2004).

El NAD requerido para el crecimiento *in vitro* de *A. paragallinarum* puede ser proporcionado por algunas especies bacterianas, como *Staphylococcus aureus*, las cuales actúan como cepas nodriza. Todas la cepas de *A. paragallinarum* requieren para su crecimiento de NaCl al 1 o 1.5%.

El suero de pollo (1%) es requerido por algunas cepas para su crecimiento. El medio de infusión cerebro corazón, el agar de triptosa, y la infusión de carne de pollo son algunos medios de cultivo usados como medios base para el crecimiento de *A. paragallinarum* (Soriano, *et al.*, 2004).

Avibacterium paragallinarum crece comúnmente en una atmósfera de 5% de CO₂; sin embargo, éste no es un requisito esencial (Blackall, 1999). Las temperaturas mínimas y máximas de crecimiento son 25 y 40 °C, respectivamente, y su temperatura óptima es 37°C (Blackall, *et al.*, 1997).

1.3 Etiología

El agente etiológico de la CI eludió su identificación por varios años debido a que esta enfermedad era a menudo enmascarada por diferentes infecciones.

En 1932 De Blicck aisló y propuso el nombre de *Bacillus haemoglonophilus coryza gallinarum* para el agente causal del catarro contagioso de los pollos.

Por otra parte, otros investigadores, en 1934, propusieron el nombre de *Haemophilus gallinarum* basados en estudios bacteriológicos y en la nomenclatura binomial (en Blackall, *et al.*, 1989).

Originalmente se reportaba el requerimiento de los factores X (hemina) y V (NAD) para el cultivo *in vitro* de *H. gallinarum*. Sin embargo, Page y colaboradores (en Blackall, *et al.*, 1997) encontraron que todos los aislamientos eran independientes del factor X, por lo que Biberstein y White (1969) propusieron la nomenclatura *Haemophilus paragallinarum* para los microorganismos causantes de la CI dependientes exclusivamente del factor V.

Más recientemente, en pollos con CI en África del Sur y México se encontraron aislamientos de *A. paragallinarum* NAD independientes, los cuales obtienen esta propiedad por la inserción de un plásmido (Mifflin, *et al.*, 1995; Bragg, 2004 & García, *et al.*, 2004).

Basados en estudios taxonómicos genotípicos y fenotípicos, Blackall y colaboradores en el 2005 propusieron cambiar a *H. paragallinarum* al nuevo género *Avibacterium*, por lo que la nueva nomenclatura sería *A. paragallinarum*.

1.4 Clasificación serológica

El primer estudio serológico de *a. paragallinarum* fue realizado por Page en 1962 en los Estados Unidos, quien mediante pruebas de aglutinación en placa describió tres serogrupos: A, B y C. En el año 1965 en Japón, Kato, Tsubahara y Okuma reportaron los serogrupos I, II y III usando la misma prueba.

Sawata y colaboradores, en 1978 extendieron los estudios de Kato y Tsubahara, e indicaron que el serogrupo II era variante del serogrupo I, proponiendo los serogrupos 1 y 2. Posteriormente se encontró que los serogrupos 1 y 2 correspondían a los serogrupos de Page A y C (Blackall, *et al.*, 1990).

Kume y colaboradores en 1983 propusieron una clasificación de cepas de *A. paragallinarum* utilizando bacterias sonicadas y tratadas con tiocianato de potasio mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. Se encontró que los serovares A, B y C de Page correspondían a los serogrupos I, III y II, respectivamente, y fueron reconocidos nueve serovares hemoaglutinantes (Avpg A1-A4, Avpg B1, Avpg C1-C4).

Soriano y colaboradores en el 2004 encontraron que existen diferencias en virulencia entre los nueve serovares de *A. paragallinarum* descritos por Kume al evaluar la capacidad de estas cepas para causar los signos clínicos típicos de la CI utilizando gallinas no vacunadas y desafiadas por vía nasal.

1.5 Factores de virulencia de Avpg

Se reconocen tres tipos de antígenos: 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). Los antígenos L se encuentran en tres formas (L1, L2 y L3). Los antígenos L1 y L2 son responsables de la especificidad de los serogrupos de Page A y C, respectivamente. El resto de los antígenos son comunes a todas las cepas (Sawata *et al.*, 1979).

El determinante antigénico considerado como más importante de las cepas patógenas de *A. paragallinarum* es el antígeno hemoaglutinante ya que les da la capacidad de adherirse a las células que tapizan al tracto respiratorio (Terzolo, 2000). Esto se debe a que los eritrocitos y las células del epitelio respiratorio comparten antígenos comunes. Este antígeno hemoaglutinante no siempre es detectado con facilidad, ya que algunas cepas lo tienen enmascarado por antígenos capsulares superficiales que impiden su detección (Terzolo, 2000).

Fernández y colaboradores (2000) determinaron el efecto de los anticuerpos sérico inhibidores de la hemoaglutinación contra las serovariedades A-1, B-1 y C-2 de *A. paragallinarum* sobre la adherencia *in vitro* a células epiteliales traqueales de pollo. Sus resultados sugieren que las hemoaglutininas de *A. paragallinarum* actúan como adhesinas y que los anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación actúan como neutralizantes de la adherencia a las células del tracto respiratorio.

Otros antígenos de *A. paragallinarum* que se han descrito son: (i) la cápsula

(Sawata, *et al.*, 1984), una envoltura externa ubicada fuera de la pared celular, que le permite a la bacteria adherirse a las células, evita la desecación, la fagocitosis y en *A. paragallinarum* las cepas que no cuentan con esta estructura son avirulentas; (ii) el lipopolisacárido, una estructura que únicamente presentan las bacterias gram-negativas, es llamado endotoxina, ya que el lípido A, que es su porción tóxica, se encuentra inmerso en la membrana. Esta estructura ha sido poco estudiada en *A. paragallinarum* pero se ha encontrado que le permite colonizar y producir la enfermedad; (iii) proteínas de membrana externa que tienen capacidad inmunogénica (Iritani, *et al.*, 1980; Blackall, *et al.*, 1990; Bragg, *et al.*, 1996). Además, se están caracterizando proteínas de membrana externa de *A. paragallinarum* que son capaces de captar Hierro (Larios, 2007).

Avibacterium paragallinarum también cuenta con antígenos secretados de 20-120 KDa. Una probable RTX (protein cross reacted) (Mena-Rojas *et al.*, 2004), (una proteína formadora de poro) la cual juega un papel importante en la virulencia de algunas bacterias gram-negativas patógenas para animales y humanos. Incluidas en las proteínas secretadas por *A. paragallinarum* se han reportado proteasas. Estas son enzimas degradativas que catalizan la hidrólisis parcial o total de las proteínas, rompen sus enlaces peptídicos y originan péptidos. Además las proteasas se consideran factores de virulencia ya que le permiten a las bacterias obtener nutrimentos y elementos esenciales para su desarrollo como el hierro, destruyen componentes tisulares para facilitar la invasión de órganos y/o tejidos, y contribuyen a que las bacterias evadan la respuesta inmune, entre otras funciones (Rivero *et al.*, 2005). También *A. paragallinarum* libera al medio que le

rodea vesículas de membrana (Ramón, *et al.*, 2006), las cuales contienen en su interior diversos factores de virulencia como son la probable RTX, y diferentes proteínas con capacidad inmunogénica.

Avibacterium paragallinarum había sido descrita como no motil y sin capacidad de expresar flagelo (Killian, *et al.* 1984) pero en un estudio reciente, encontramos que esta bacteria es capaz de moverse bajo ciertas condiciones *in vitro* (Serrano, *et al.*, 2005).

Las bacterias tienen una gran variedad de mecanismos para controlar la expresión de sus genes, con lo cual logran que el producto de un gen determinado solo se sintetice cuando es necesario y en lo posible, en la cantidad óptima. Esto les permite una sorprendente capacidad de adaptación a cualquier cambio en la concentración de nutrientes del medio en que habitan, activando solo cuando es necesario, determinadas vías metabólicas.

1.6 Flagelo procarionte

La motilidad puede jugar un papel muy importante a lo largo del ciclo infeccioso de una bacteria. El flagelo es el principal órgano locomotor en bacterias, es un largo filamento helicoidal que es impulsado por un motor rotatorio embebido en la superficie celular. Puede llegar a medir de 15 a 20 μm de longitud y aproximadamente 20 nm de diámetro (Gavín, *et al.*, 2003).

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 (González-Pedrajo, *et al.*, 2003) (Fig. 6).

El cuerpo basal: Es un complejo multiprotéico que consiste de: un anillo, que se encuentra en la membrana interna, llamado anillo MS, también cuenta con una barra que atraviesa el espacio periplásmico, un anillo P del espacio periplásmico y un anillo L que se encuentra en la membrana externa.

El gancho: Es una estructura cilíndrica construida en forma similar al filamento, funciona como una unión entre el filamento y el cuerpo basal (Macnab, 2003).

El filamento flagelar: Es una estructura cilíndrica, larga, delgada, que es de forma helicoidal y que gira como hélice. Se extiende desde la base de la superficie celular hasta el extremo distal, donde se encuentra una proteína que actúa como capuchón. El filamento es un cilindro rígido y hueco constituido por la

polimerización de la proteína denominada flagelina, la cual está codificada por el gen *fliC* (Gavín, *et al.*, 2003; Macnab, 2003).

Las flagelinas de bacterias patógenas son altamente inmunogénicas y variables en secuencia, aunque muestran una clara distribución de dominios que permanecen en la cara interna de la proteína plegada, siendo las responsables de definir la estructura y la variabilidad antigénica del flagelo (Penn, *et al.*, 1992; Gavín, *et al.*, 2003).

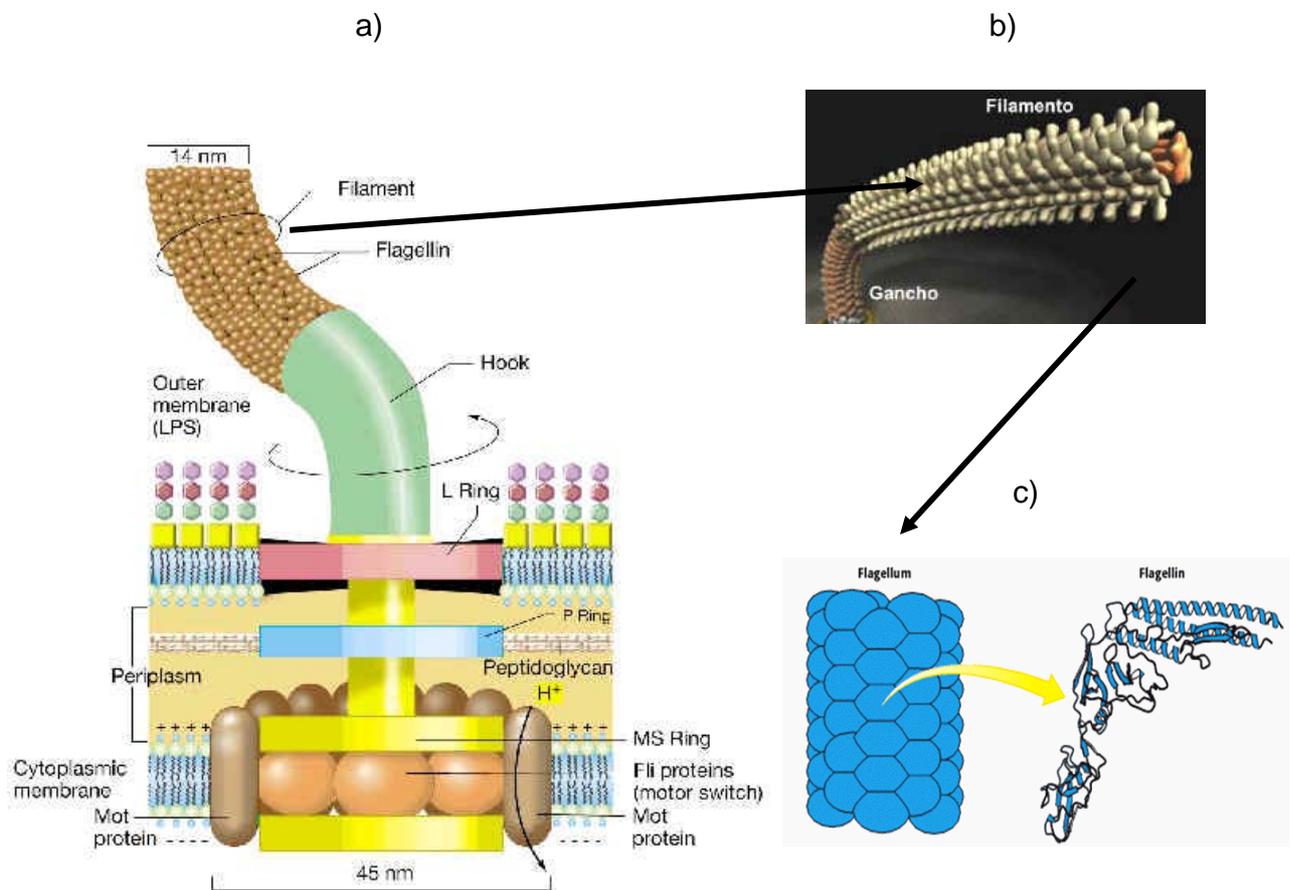


Fig. 6: a) Estructuras flagelares en bacterias Gram negativas, b) Filamento y c) Flagelina.

En la síntesis del flagelo, el ensamblaje inicia del extremo proximal al distal, y consiste en la adición de monómeros de proteínas y no de estructuras preformadas. El anillo MS que es la estructura estable más temprana, 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 para formar el filamento (Soutourina, *et al.*, 2003).

La secreción de los componentes flagelares se lleva a cabo a través de un sistema semejante al Sistema de Secreción tipo III, por lo que se podría decir que el flagelo bacteriano podría utilizarse también para la secreción de factores de virulencia (González -Pedrajo, *et al.*, 2003).

La morfogénesis flagelar y la expresión genética se encuentran estrechamente acopladas, en este proceso participan más de 50 genes estructurados en el llamado regulón flagelar, el cual está formado por diversos operones (Gavín, *et al.*, 2003).

Cada flagelo se mueve por rotación, conducida por potenciales iónicos tales como protones de modo más frecuente o iones de sodio en algunas especies (Larsen, *et al.*, 2004). El movimiento flagelar no siempre es el mismo, sino que depende del número y disposición de flagelo o flagelos, así como de la especie bacteriana (Ueda, *et al.*, 1982). La disposición del flagelo puede ser en uno de los polos llamado flagelo polar o monótrico en caso de que sea uno solo y, lofótrico en caso de que sean dos o más; en ambos polos llamado flagelo anfítrico y alrededor de toda la célula o perítricos (Fig. 7).

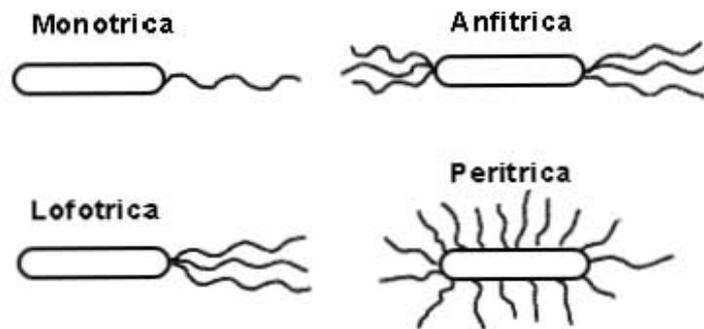


Fig. 7: Distribución de flagelos bacterianos

Hay dos tipos de motilidad bacteriana dada por flagelos, a) *swimming*: es el desplazamiento de las bacterias en forma individual y al azar en medios líquidos o viscosos en especies cuyo flagelo se encuentre de manera axial; b) *swarming*: es una forma de motilidad que se caracteriza por una rápida progresión coordinada de una población bacteriana sobre superficies con el fin de colonizarlas. Este tipo de motilidad es, a menudo, asociado con la formación de biofilms. El *swarming* es habilitado por la producción de numerosos flagelos peritricos en algunas bacterias (Connelly, *et al.*, 2004; Gavín, *et al.*, 2003 & Girón, 1995)

Penn y colaboradores (1992) encontraron que algunas de las formas estructurales y su expresión genética están relacionadas con los tipos flagelares y su posible significado en la patogenicidad de algunas bacterias con importancia de salud pública como *E. coli*, *S. 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.

Muchas bacterias patógenas poseen flagelo y su papel es importante para la taxia y la colonización (McCarter, 2004).

Sintetizar un flagelo es metabólicamente costoso (Penn, *et al.*, 1992), 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 esta estructura incluyen la formación de biopelículas, la migración, eficiencia en la adquisición de nutrientes, evasión de sustancias tóxicas, la habilidad de traslocación a hospederos preferidos y la facilidad de acceso a los sitios de colonización y dispersión en el medio ambiente durante el curso de la transmisión (Ottemann, *et al.*, 1997; McCarter, 2004).

Tanto la motilidad como la expresión del flagelo bacteriano están reguladas por factores genéticos y, a menudo, por los factores del medio ambiente (Ottemann, *et al.*, 1997).

Hay condiciones medioambientales óptimas para la expresión del flagelo, por esto, algunas bacterias pueden no expresar motilidad o flagelo bajo condiciones inapropiadas de crecimiento *in vitro* (Adler, 1996; McCarter, 2004).

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*.

Uno de estos miembros es *A. pleuropneumoniae*, que produce un flagelo compuesto de una proteína de 65 kDa, la cual presenta homología en su secuencia amino terminal con la secuencia reportada para otras secuencias (de flagelinas) FliC de diferentes bacterias. Su motilidad fue observada en medios TSB

y BHI con baja concentración de agar y se encontró que era influenciada por la temperatura (Negrete-Abascal, *et al.*, 2003).

En otro estudio se determinaron las condiciones de movilidad *in vitro* de *P. multocida* y demostró que esta bacteria cuenta con los elementos genéticos suficientes para la expresión de un sistema flagelar, ya que expresa una flagelina compuesta por subunidades de 38 kDa y expresa flagelos polares. Sus secuencias de aminoácidos y nucleótidos presentan homología con la flagelina de *A. pleuropneumoniae* y otras flagelinas. La motilidad de *P. multocida* también se vio influida por las condiciones microambientales (García, 2007).

Por otra parte se demostró que *H. influenzae* produce uno o dos flagelos polares cuya expresión se ve influenciada por condiciones microambientales. También encontró que el filamento flagelar esta constituido de una proteína de aproximadamente 40 KDa. Finalmente logró amplificar por PCR el gen *fljC* obteniendo un producto de aproximadamente 1500pb, el cual presentó una alta identidad (> 90%) con las secuencias de ADN de los genes correspondientes a *A. pleuropneumoniae* y *E. coli* (Campos, 2006).

Previo al presente estudio, se encontró que *A. paragallinarum* es capaz de moverse en condiciones *in vitro* usando como medio de cultivo TSB con 0.2% de agar y suplementado con 0.01% de NAD, 43 mM de K_2HPO_4 , a un de pH 7, y temperatura de incubación de 37°C en condiciones de microaerofilia (Serrano, *et al.*, 2005).

2. JUSTIFICACIÓN

Dado que *A. paragallinarum* es una bacteria patógena de pollos que causa grandes pérdidas económicas en la industria avícola; que recientemente se demostró que es capaz de moverse en condiciones *in vitro* y tomando como antecedentes que se ha demostrado que el flagelo, el principal órgano locomotor en bacterias, es considerado un factor de virulencia y además es sintetizado por algunos miembros de la familia *Pasteurellaceae*; el propósito de este trabajo fue clonar y caracterizar el gen *fliC*, responsable de la síntesis del filamento flagelar o antígeno H, de *A. paragallinarum* como punto de partida para estudiar la participación de este organelo en el proceso infeccioso.

3. HIPÓTESIS

Basados en los antecedentes de organismos de la misma familia de expresar flagelos y en la capacidad con que cuenta *A. paragallinarum* para moverse en condiciones *in vitro*, es posible que esta bacteria también posea los elementos suficientes para expresar dicha estructura.

4. OBJETIVOS

GENERAL:

- Demostrar que *A. paragallinarum* posee flagelo (s).

PARTICULARES:

- Obtener la proteína flagelina de *A. paragallinarum*.
- Determinar la reactividad cruzada de la proteína flagelina de *A. paragallinarum* con sueros anti-flagelina de diferentes microorganismos.
- Obtener la secuencia N-terminal de la flagelina.
- Determinar la distribución de flagelo (s) en *A. paragallinarum* por microscopía electrónica.
- Amplificar, clonar y secuenciar el gen *fliC* de *A. paragallinarum*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Microorganismos:

En el presente trabajo se utilizaron las cepas de referencia *A. paragallinarum* (0083 y Modesto) serogrupos A y C respectivamente, y los aislados de campo *A. paragallinarum* a5, a6 (cepario del laboratorio de Genética de la UMF FES-I, UNAM).

E. coli enteropatógena E2348/69 como control positivo de motilidad.

Hospedero para clonación: *E. coli* XL1-Blue.

5.2 Medios de cultivo:

Medios de cultivo utilizados: Caldo de Soya Tripticaseína (TSB) (Bioxón), GC, y Luria Bertani (LB); Agar bacteriológico deshidratado (Bioxón).

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

5.3 Selección de cepas móviles de *A. paragallinarum*:

La selección de cepas móviles se realizó en placas de medio TSB al 0.4% de agar, suplementado con 0.01% de NAD e incubadas a 37°C en condiciones de microaerofilia y humedad. Las placas fueron inoculadas por punción y se incubaron durante una semana, observándose un crecimiento radial a partir del punto de inoculación. Las bacterias fueron reinoculadas a partir de la parte más alejada de la punción, seleccionando así cepas móviles

5.4 Obtención de la posible flagelina de *A. paragallinarum*

Bacterias inducidas a motilidad de la cepa 0083 fueron inoculadas en 35 ml de caldo TSB con NAD al 0.01% y, se incubaron durante 24 horas en agitación, para la obtención de la posible flagelina.

El cultivo anterior fue utilizado para inocular medios líquidos (TSB y GC), los cuales se incubaron en agitación durante 24 h a 37 °C; o placas de medio TSB y GC con 0.4, 0.5 y 0.7% de agar adicionadas con 0.01% de NAD y 1% de suero de ternera, incubándolas durante 48 h a 37°C en condiciones de microaerofilia y humedad.

Las bacterias crecidas en medios semisólidos se cosecharon con ayuda de un portaobjetos y en el caso de caldo, se cosecharon por centrifugación (5000rpm/30min). En ambos casos las células se resuspendieron en Tris-HCl (20 mM) con NaCl (25mM). Se agitaron en vortex para hacer una mezcla homogénea y se agitaron vigorosamente durante 10 minutos para desprender los flagelos. Se realizó una centrifugación diferencial a: 5000rpm (20 min) y a 8000 rpm (30 min) para eliminar los restos celulares, quedando la proteína que interesa en el sobrenadante; los sobrenadantes libres de células se centrifugaron a 18000 rpm (3 hrs); finalmente las proteínas sedimentadas se resuspendieron en Tris HCl 20mM con NaCl 25mM.

El mismo procedimiento descrito anteriormente fue realizado para la obtención de flagelina de *E. coli* enteropatógena E2348/69 (control positivo), creciendo a la bacteria en caldo LB con glucosa al 0.5%, incubada durante 24 hrs en agitación a 37°C.

5.5 SDS-PAGE

Las muestras obtenidas por centrifugación diferencial de *A. paragallinarum* A y de EPEC E2348/69 se calentaron durante 5 minutos con buffer de muestra y β -mercaptoetanol al 5%. Las proteínas se separaron electroforéticamente en SDS-PAGE al 10% según Laemmli (1970) pero debido a que algunas proteínas de alto y bajo peso molecular no se separaron bien se realizaron SDS-PAGE al 8 y 12%. Todos los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

Debido a que la flagelina no se encontraba como única proteína en las muestras, se procedió a purificarla por medio de cromatografía de intercambio iónico.

5.6 Inmunoreconocimiento con sueros anti-flagelina

A partir de geles SDS-PAGE al 10% se realizaron transferencias a membranas de nitrocelulosa durante 110 minutos a 80 volts. Terminada la transferencia las membranas fueron bloqueadas durante una hora con leche semi-descremada al 5% en PBS-Tween 0.5%. Después, las membranas, se lavaron con PBS-Tween 0.5% tres veces en agitación, de 5 a 10 minutos cada vez.

Posteriormente, las membranas se incubaron durante 2 horas con anticuerpos policlonales IgG de conejo dirigidos contra el flagelo de *S. typhi*, 1:1000, *E. coli*, 1:1000, *Proteus mirabilis* 1:1000 y *A. pleuropneumoniae*, 1:1000 (Negrete-Abascal, *et al.*, 2003). Se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.5% de 5 a 10 minutos cada vez.

El anticuerpo secundario que se utilizó fue de cabra anti IgG de conejo peroxidado. Las membranas se incubaron con este anticuerpo durante 2 horas. Posteriormente se lavaron las membranas 3 veces con PBS-Tween 0.5% y 2 veces con

PBS 1X y se revelaron con diaminobencidina reaccionando con peróxido de hidrógeno. La reacción se detuvo con agua.

5.7 Secuencia amino-terminal

Se realizó SDS-PAGE al 10% con la muestra que produjo mayor reacción cruzada con los diferentes sueros antiflejelina, posteriormente se transfirió a una membrana de Polifluoruro de vinilideno (PVDF por sus siglas en inglés); las bandas obtenidas se cortaron y se mandaron a secuenciar al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM.

5.8 Cromatografía de intercambio iónico

La resina de intercambio iónico (DEAE-celulosa) se activo tratándola con NaOH 1M, enseguida se lavó con abundante agua, posteriormente se trató con HCl 0.5M y el exceso de ácido se eliminó con lavados con agua destilada. Posteriormente se trató nuevamente con NaOH 1M, y el exceso de NaOH se eliminó con agua destilada. Finalmente la resina fu equilibrada con Tris HCl 20mM-NaCl 25mM y se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

Para preparar la columna cromatográfica, se colocó papel filtro en el fondo de una jeringa de 5 ml y se le agregó 3ml de resina. Dicha columna se equilibró con Tris HCl 20mM con NaCl 25mM. Posteriormente se aplicó 500µl de la muestra de proteínas y se lavo con el mismo buffer para eluir las proteínas que no interaccionaron con la resina. Las proteínas que fueron retenidas en la columna se eluyeron utilizando Tris HCl con diferentes concentraciones de NaCl (.25mM, 0.2M, 0.4M, 0.6M, 0.8M y 1M), obteniendo

dos fracciones por cada cambio en la concentración de NaCl. Las fracciones obtenidas se corrieron electroforéticamente y los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

5.9 Microscopía electrónica

Para observar y determinar la distribución de flagelos se utilizaron bacterias previamente seleccionadas como motiles crecidas en las diferentes condiciones microambientales antes mencionadas. También se observaron las muestras de proteínas obtenidas por centrifugación a 18000rpm/3hrs de bacterias crecidas en los diferentes medios de cultivo.

Las suspensiones fueron contrastadas utilizando la técnica de tinción negativa. Para esto, una gota de la suspensión bacteriana se colocó sobre una rejilla de níquel durante cinco minutos, previamente recubierta con una resina Formvar®, que se utiliza para formar una película de soporte. El exceso de muestra se retiró colocando papel filtro en los bordes. Posteriormente se realizó la tinción negativa con una solución de fosfotungstato de potasio al 2%, pH 7.4. Para ello se colocó una gota del contrastante sobre la rejilla con la muestra y se retiró de inmediato el exceso de contrastante, se le agregó una segunda gota de la cual fue retirado también el exceso a los 30 segundos y finalmente otra durante tres minutos, el exceso de agente contrastante se eliminó con papel filtro. Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEM 2000 EX a 80 V en el laboratorio de Microscopía electrónica del CINVESTAV-Zacatenco.

5.10 Obtención de ADN cromosómico de *A. paragallinarum*

Se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Chen y colaboradores (1993) la obtención de ADN de *A. paragallinarum* a partir de cepas crecidas en medio TSB con NAD al 0.01% incubadas a 37°C en agitación 24hrs. Brevemente, ésta técnica consiste en cultivar la bacteria en 5ml de medio LB, que es el medio que se indicaba en la técnica, y 5ml TSB con NAD al 0.01% durante toda la noche a 37°C en agitación. La masa celular se recuperó por centrifugación en un tubo eppendorf y se resuspende en 200 µl de regulador de lisis (Tris-acetatos 40mM pH 7.8, NaAc 20mM, EDTA 1mM, SDS 1%, RNasa 1(mg/ml)). La suspensión se incubó durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente se le agregó 66 µl de NaCl 5M y se mezcló por inversión. Después se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se pasó a un tubo nuevo donde se le agregó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1); se agitó por inversión hasta formar una suspensión y se centrifugó a 12000 rpm durante 3 minutos a 4°C. La fase acuosa se pasó a un tubo nuevo y se precipitó con dos volúmenes de etanol al 100%. Se centrifugó en las condiciones antes mencionadas y la pastilla se lavó 2 veces con etanol al 70% y se puso a secar. Finalmente, el ADN se resuspendió en agua desionizada.

5.11 Amplificación y clonación del gen *fliC*

El ADN de *A. paragallinarum* A obtenido se utilizó como ADN molde y se establecieron las condiciones apropiadas para la amplificación del gen *fliC* por medio de PCR.

Se utilizaron los *primers* reportados por Negrete-Abascal y colaboradores (2003) y los reportados por Campos (2006) (Tabla 1).

La mezcla con la que se logró la amplificación fue la siguiente:

3 μ l de Buffer libre de Mg

0.2 mM de dNTPs

1.5 mM de Cloruro de Magnesio

De 25 pmol de *primer upper*

De 25 pmol de *primer lower*

De 200 a 300 ng del ADN molde

1.25 U de T4 DNA polimerasa

Se llevó a 50 μ l con H₂O libre de sales estéril

También se utilizaron perlas para reacción en cadena pure Taq® para realizar la PCR y amplificar el gen *fliC* de *A. paragallinarum* A. En este caso se le agregó a las perlas 300 ng del ADN molde, 25 pmol de *primer upper*, 25 pmol de *primer lower* y se llevó a 25 μ l con agua desionizada de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

TABLA 1. *Primers* utilizados para la amplificación del gen *fliC* de *A. paragallinarum*

NOMBRE	TAMAÑO (PB)	GC (%)	Tm (°C)	SECUENCIA DE 5'---3'	LOCALIZACIÓN DEL INICIADOR	TAMAÑO DEL FRAGMENTO	REFERENCIA
fliC D0	18	55.6	44	AGAGACAGAACCTGCTGC	15-32	1636 pb	Negrete <i>et al.</i> , 2003
fliC R0	20	50	50.7	AATACCAACAGCCTCTCGCT	1630-1651		
fliC D1	20	60	56.6	CATCTCCGCCAGTTTGACC	430-449	857 pb	Campos, 2006
fliC R1	21	61.9	57.1	GTATCCGGCCAGACCCAGTTC	1269-1287		
fliC D2	20	65	60.1	GGCCTGCTGGATGATCTGCG	72-91	1590 pb	Campos, 2006
fliC R2	27	44	58.3	GCACAAGTCATTAATACCAACAGCCTC	1636-1662		

La PCR se realizó en un termociclador Corbett Research modelo CG1-96 serie C010501 utilizando las siguientes condiciones:

72°C 5 min. 1 ciclo

- | | |
|-------------------------------------|-------------|
| 1) Desnaturalización: 95 °C 30 seg. | } 30 ciclos |
| 2) Alineación: 58.4 °C | |
| 3) Síntesis: 72°C 2 min. | |

72°C 5 min. 1 ciclo

4°C 1 min. 1 ciclo

El fragmento amplificado se observó al realizar una electroforesis en un gel de agarosa al 1% con el producto obtenido de la PCR.

El fragmento amplificado se clonó en el vector pCR2.1 (Invitrogen), el cual posee dos marcadores de selección (ampicilina y kanamicina), interrumpiendo el gen *lacZ*. Se utilizó la cepa de *E. coli* XL1-Blue como hospedero de la construcción pCR®2.1-*fliC A. paragallinarum*. La clonación se realizó de la siguiente forma: Se colocaron 4µl del producto de PCR fresco + 1µl de solución salina + 1µl del vector TOPO pCR®2.1, se mezcló cuidadosamente y se incubó por cinco minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la transformación en células competentes de *E. coli* XL1-Blue (Sambrook *et al.*, 1989).

Las colonias LacZ- que fueron portadoras del producto amplificado se identificaron basados en la ausencia del fenotipo resultante de la α -complementación, en presencia del sustrato cromogénico 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol β -D-galactosido (X-gal) (40µg/ml) y de ampicilina (100 µg/ml).

Se extrajo ADN plasmídico de algunas colonias LacZ- con el sistema de purificación de ADN Wizard® Plus SV Minipreps Promega, se verificó si portaba el fragmento clonado mediante una PCR utilizando una combinación de *primers* D2, R2 (Campos, 2006) y universales *upper* y *lower* (Invitrogen).

5.12 Secuenciación del gen *fliC* de *A. paragallinarum* y análisis *in silico*:

Se obtuvo la secuencia de nucleótidos a partir de una muestra de DNA plasmídico (pCR2.1-*fliC* *A. paragallinarum*) con un secuenciador ABI 3100 de 16 capilares que utiliza el método *BIG DYE Terminator fluorescence based sequencing* en el Laboratorio de bioquímica molecular de la UBIPRO, FES-Iztacala, UNAM. A dicha secuencia se realizó análisis *in silico* con el programa NCBI/Blast nucleotide¹, y posteriormente se realizó la traducción de un fragmento del gen con el programa EXPASY para determinar la composición de aminoácidos y se analizó para verificar si dicha secuencia correspondía a una flagelina².

¹ www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/

² www.expasy.org/tool/

6. RESULTADOS

6.1 Selección de cepas móviles de *A. paragallinarum*

Todas las cepas de *A. paragallinarum* que se seleccionaron en placa de medio TSB con 0.4% de agar incubadas a 37°C en condiciones de microaerofilia presentaron motilidad (Fig. 7). De las cuatro cepas probadas, las del serogrupo A mostraron mayor motilidad que la del serogrupo C.

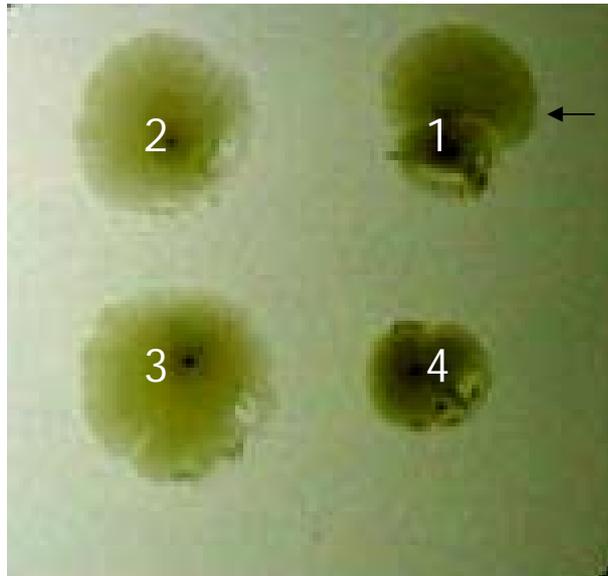


Fig. 7: Cepas de *A. paragallinarum* seleccionadas como motiles en placas de medio TSB con 0.4% de agar .

1: A; 2: a5; 3:a6 y 4: C

6.2 SDS-PAGE e inmuno reconocimiento

Por medio de corrimiento electroforético, se pudo observar cuales eran las proteínas presentes en las muestras que contenían la posible flagelina (Fig. 8A y 9A). Para distinguir a aquellas que fuesen posibles flagelinas, se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa, las cuales se pusieron a reaccionar con suero antflagelina de *E. coli*.

El western blot nos permitió observar inmuno reconocimiento de bandas de 20, 40 y 73 KDa obtenidas de bacterias crecidas en medio TSB al 0.5% y 4% de agar (Fig. 8B, carriles 1 y 2) y se observó una más de 60KDa en TSB al 0.7% de agar (Fig. 8B, carril 1). En el caso de muestras obtenidas a partir de bacterias crecidas en medio GC y TSB líquidos se pudo observar únicamente una reacción cruzada con la proteína de 40 KDa (Fig. 8B, carriles 3 y 4). En muestras provenientes de medio GC semisólido (0.4, 0.5 y 0.7% de agar), se observó un reconocimiento inmune de bandas de 40 y 42 KDa (Fig. 9B carriles 3 y 4) y muy tenuemente de una banda de 73KDa en el caso de muestras de medio GC al 0.5% de agar (Fig. 9B, carril 4).

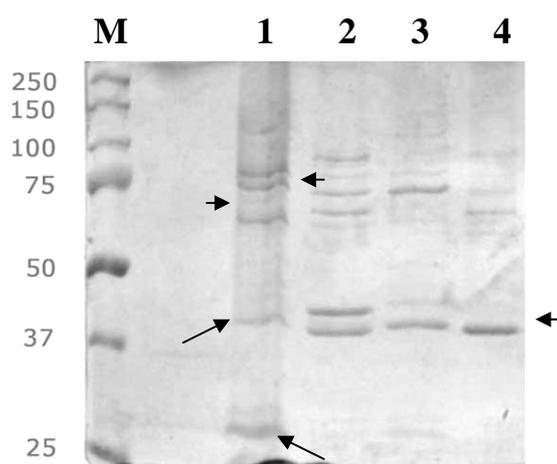


Fig. 8A: SDS-PAGE 10% donde se muestra el patrón de proteínas de *A. paragallinarum* A obtenidas a 18000rpm/3hrs. (M) MPM, *A. paragallinarum* A (1): TSB 0.7% de agar; (2): GC 0.7% de agar; (3) GC; (4): TSB.

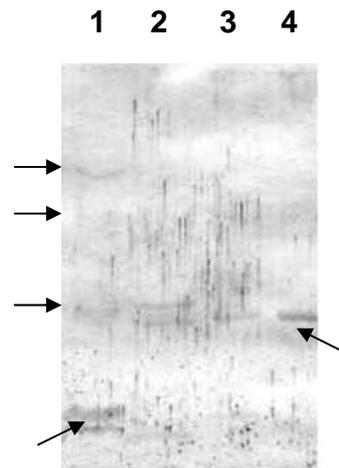
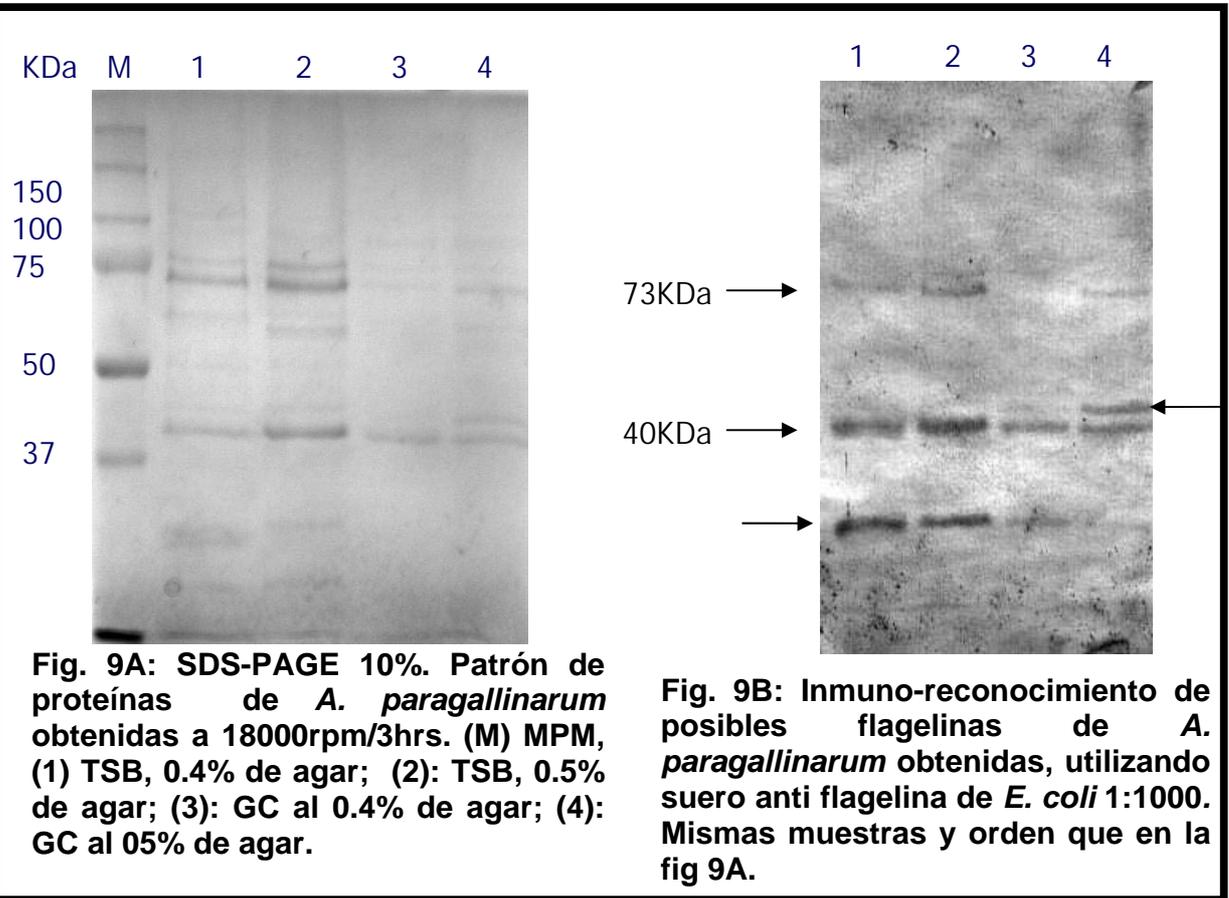


Fig. 8B: W. Blotting donde se muestra el inmuno reconocimiento de posibles flagelinas de *A. paragallinarum* utilizando suero anti-flagelina de *E. coli* 1:1000. Mismas muestras y orden que en la fig. 8A.



6.3 Secuencia amino-terminal

Se corrió un gel de acrilamida al 10 % con la muestra obtenida de bacterias crecidas a partir de medio TSB 0.7% de agar. Dicho gel se transfirió a una membrana de PVDF y se enviaron a secuenciar las bandas de 73, 60 y 40 KDa que eran las que habían dado reacción cruzada con el suero antiflagelina de *E. coli*.

Las secuencias de aminoácidos que se obtuvieron a partir de estas proteínas no presentaron homología alguna con las flagelinas reportadas en otros organismos. Únicamente la proteína de 60 KDa mostró una baja identidad con una proteína FliG del motor flagelar.

6.4 Microscopía electrónica

En las muestras de proteínas obtenidas a partir de bacterias crecidas en medio TSB al 0.7% de agar y concentradas por centrifugación a 18000rpm/3hrs, se pudo observar la presencia de filamentos flagelares purificados (Fig. 10). La presencia de flagelos polares, también pudo ser observada por microscopía electrónica en muestras de bacterias de *A. paragallinarum* A, crecidas en medio TSB al 0.7% de agar (Fig. 11).

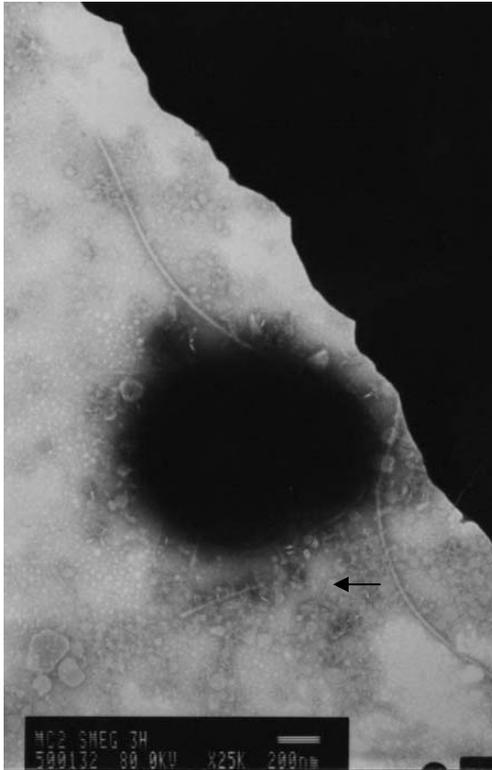


Fig. 10: Microscopía electrónica que muestra filamentos flagelares de *A. paragallinarum*.



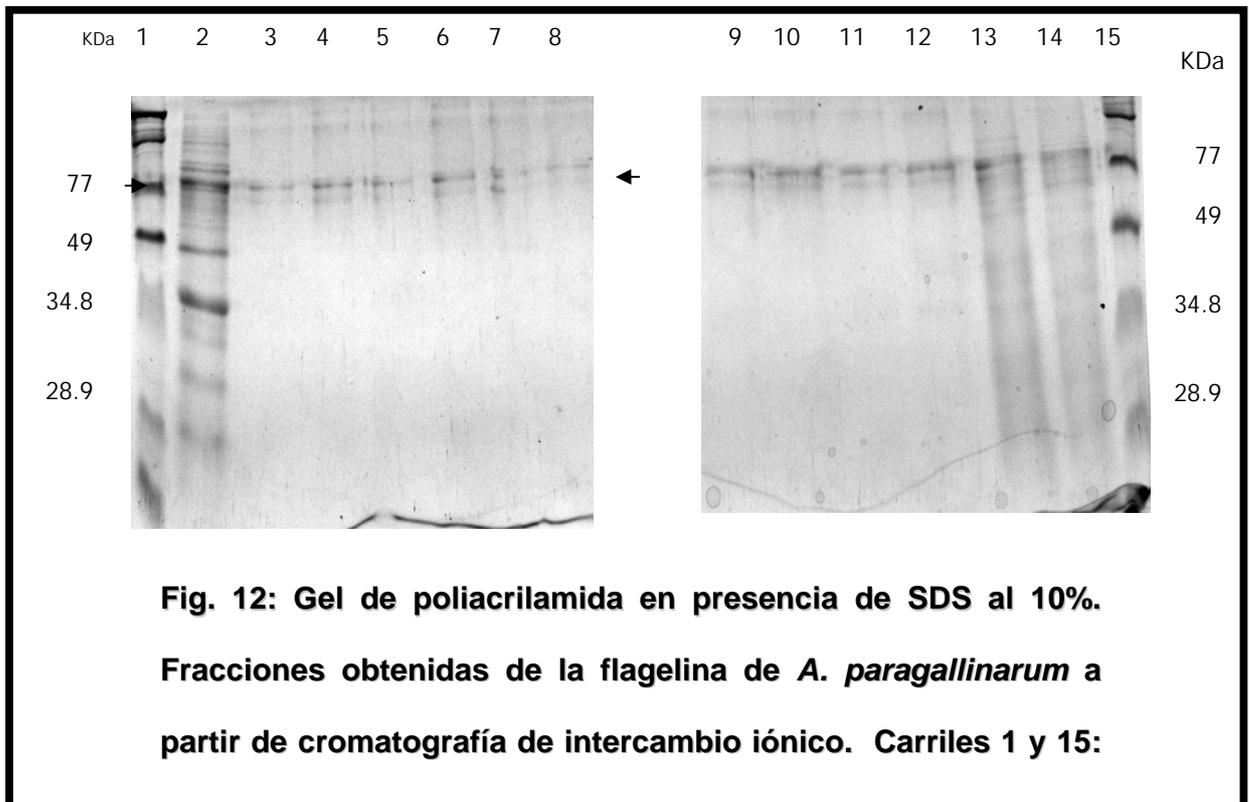
Fig. 11: Microscopía electrónica que muestra un flagelo polar en la superficie de *A. paragallinarum*.

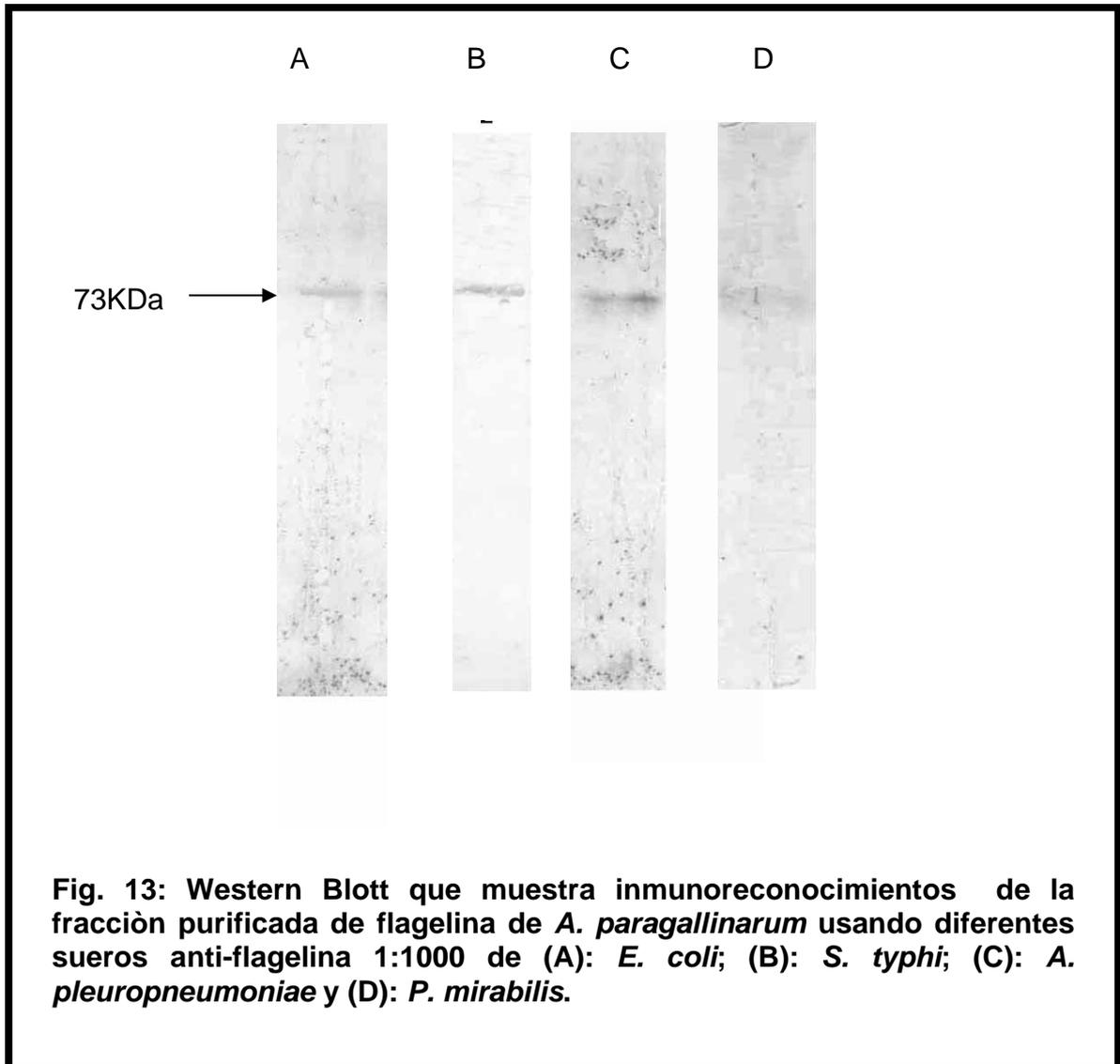
6.5 Cromatografía de intercambio iónico

Con el fin de purificar la posible flagelina, la muestra obtenida a partir de bacterias crecidas en TSB con 0.7% de agar se cargó en una columna cromatográfica de intercambio iónico eluyéndose una banda una de aproximadamente 73 kDa (Fig. 12, Carriles 3-14).

De las muestras eluidas, la fracción 4 se separó electroforéticamente y se transfirió a membranas de nitrocelulosa. La banda de aproximadamente 73 kDa fue reconocida por los sueros policlonales anti-flagelina de *E. coli*, *S. typhi*, *A. pleuropneumoniae* y *P. mirabilis* (Fig. 13, carriles A, B, C y D, respectivamente). Por lo tanto, estos resultados nos sugieren que probablemente se trate de la flagelina expresada por *A. paragallinarum*.

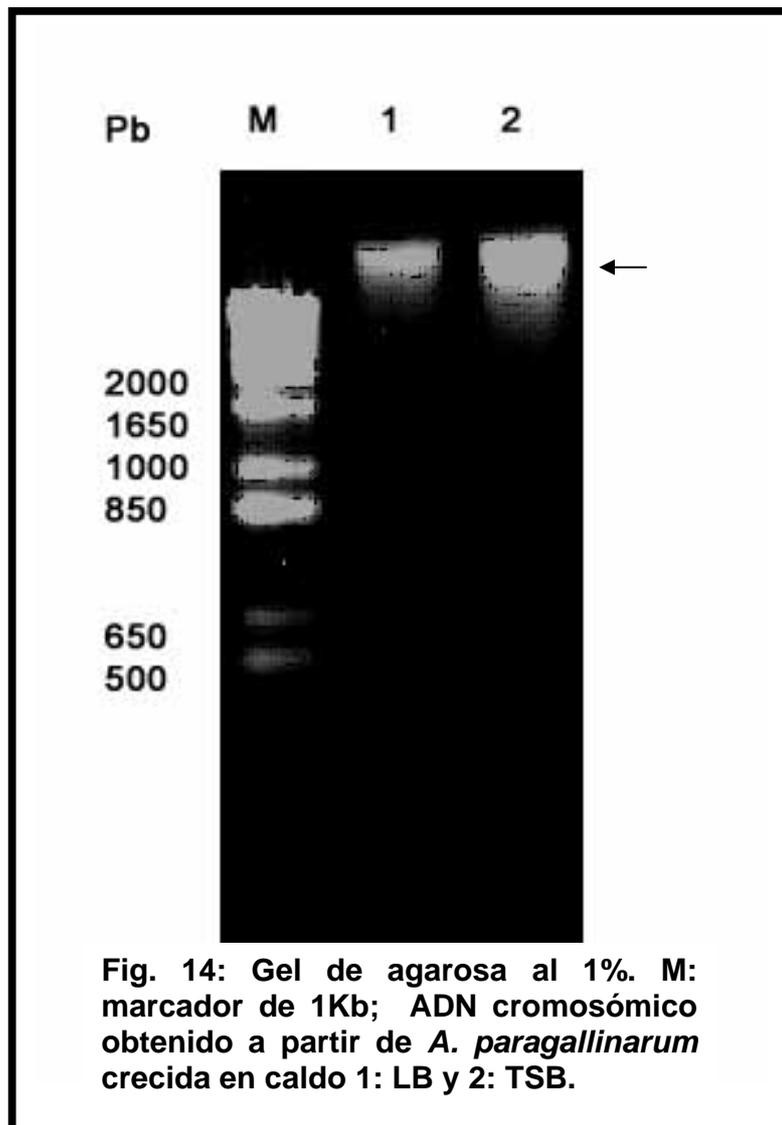
A dicha proteína se le obtendrá su secuencia de aminoácidos y se le realizará un análisis *in silico* para verificar que se trate de la flagelina de *A. paragallinarum*.





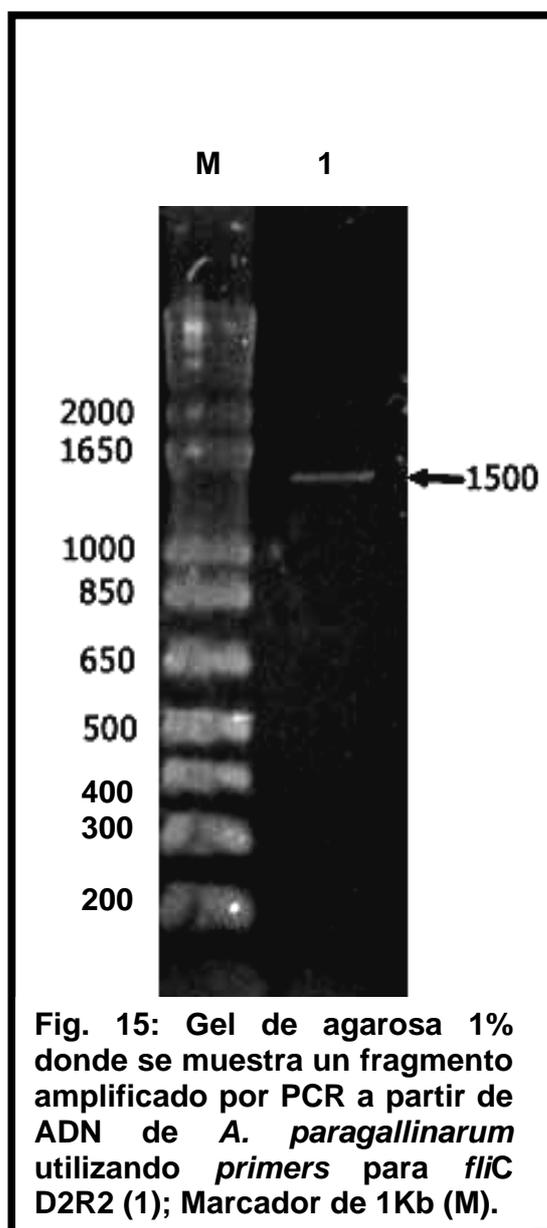
6.6 Obtención de DNA cromosómico de *A. paragallinarum*

Se obtuvo una mayor cantidad de ADN cromosómico cuando la bacteria fue crecida en medio TSB con NAD al 0.01% que en medio LB igualmente suplementado (Fig. 14), por lo que fue esa muestra (carril 2) la que se utilizó como templado para la reacción de amplificación del gen *fliC* de *A. paragallinarum*.

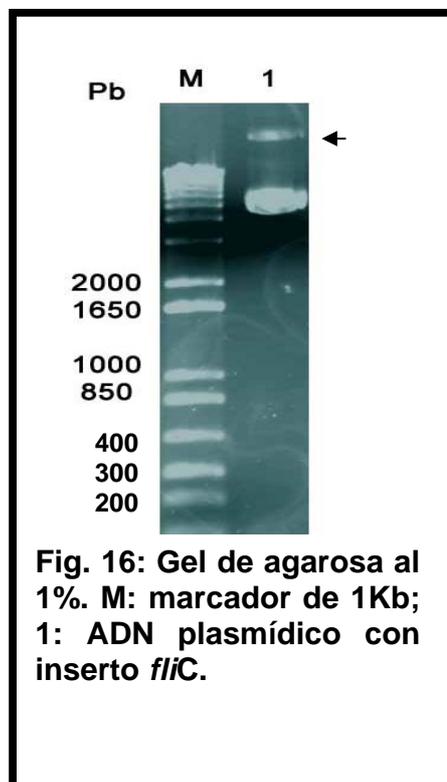


6.7 Amplificación y clonación del gen *fliC*

A partir del ADN purificado de *A. paragallinarum* y utilizando los oligonucleótidos propuestos por Campos (2006) D2 y R2 se logró amplificar un fragmento de aproximadamente 1500 pb (Fig. 15, carril 2).



El fragmento amplificado se clonó en el vector TOPO pCR®2.1, utilizando como hospedero a *E. coli* XL1-Blue, se seleccionaron colonias que mostraran el fenotipo LacZ- como portadoras del fragmento amplificado y se obtuvo ADN plasmídico (Fig. 16). A partir de este ADN se realizó una reamplificación en la cual se obtuvo nuevamente una banda de 1500 pb (Fig. 17). Para verificar que se tratara de un amplificado del fragmento clonado se realizó PCR con 1 *primer* universal de cada sentido, combinado con los D2R2 y se comparó con ADN plasmídico sin inserto (Fig. 18). En este caso se pudo observar que, de el ADN plasmídico que se obtuvo a partir de cepas que presentaron la fenología Lac Z-, se obtenía un producto amplificado de 1500pb y en el caso del ADN plasmídico obtenido a partir de cepas con fenotipo Lac Z+ no se observó ningún amplificado de ese tamaño.



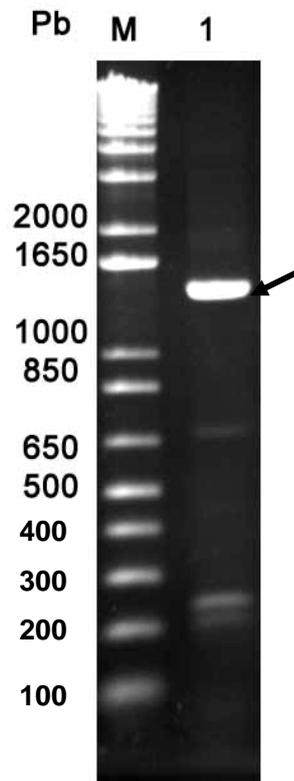


Fig. 17: Gel de agarosa al 1%. M: marcador de 1Kb; 1: Fragmento amplificado por PCR a partir de ADN plasmídico utilizando *primers* para *fliC* D2R2.

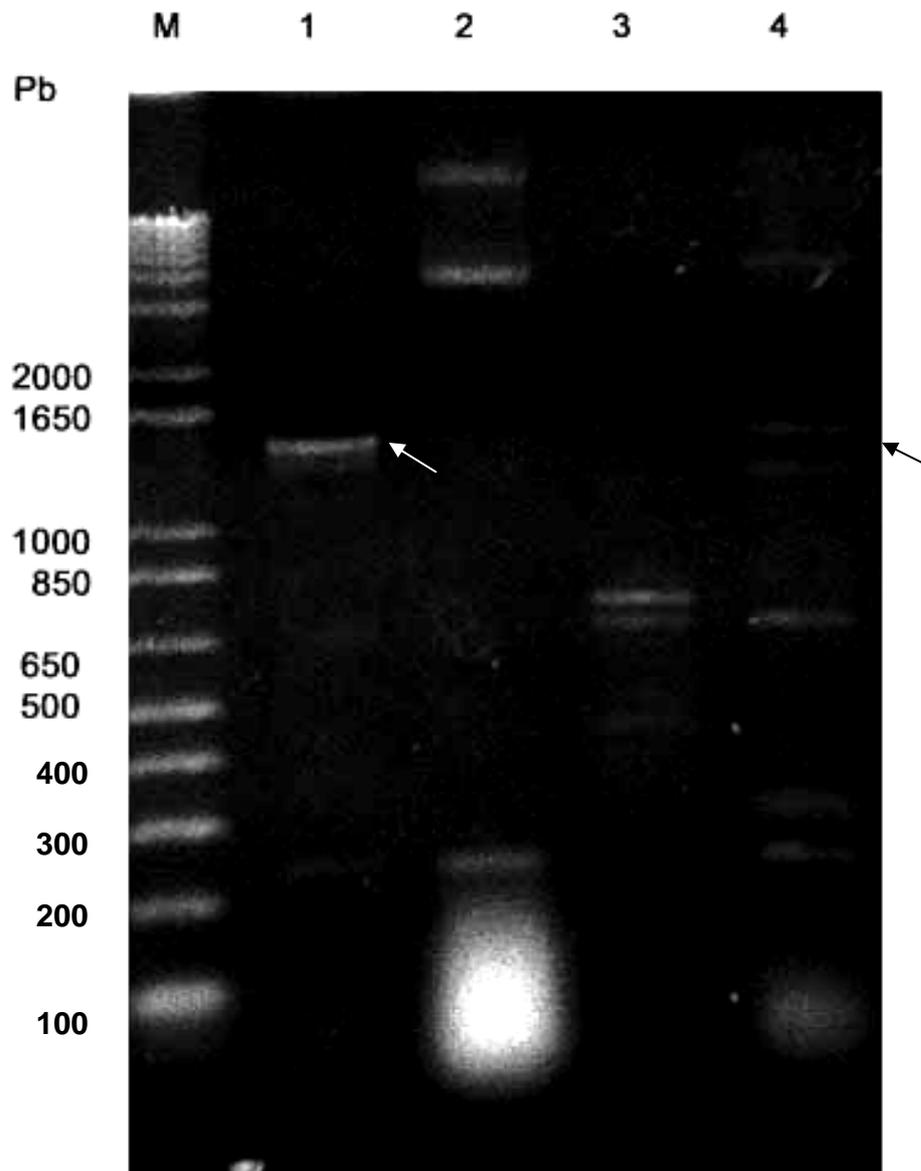


Fig. 18: Gel de agarosa al 1% donde se muestran productos de PCR utilizando como templado ADN plasmídico con inserto (1 y 4) y sin inserto (2 y 3). Se utilizaron iniciadores: D1 y *lower* universal (1 y 2); *upper* universal y R2 (3 y 4); M: marcador de 1Kb.

6.8 Secuenciación del gen *fliC* de *A. paragallinarum* y análisis *in silico*

Una vez que se comprobó que el fragmento amplificado de 1500 pb correspondía al fragmento clonado, se obtuvo la secuencia de nucleótidos por el método de Edman a partir de una muestra de ADN plasmídico (pCR2.1-*fliC* *A. paragallinarum*) purificado.

La secuencia obtenida fue de 820 nucleótidos en el extremo 5' y 940 nucleótidos en el extremo 3'. A dicha secuencia se le retiraron los nucleótidos que correspondían al plásmido y se analizó con el programa NCBI / BLAST.

Se realizó un alineamiento de la secuencia obtenida del gen de *A. paragallinarum* con las secuencias del gen *fliC* *A. pleuropneumoniae* like 2, *A. pleuropneumoniae* 5238 y *E. coli* W3110. Este resultado muestra que la secuencia de DNA del fragmento clonado presenta una homología de más del 90% con las secuencias del gen *fliC* reportadas en *E. coli* y *A. pleuropneumoniae* (Fig. 19).

a) *E. coli* W3110, *A. pleuropneumoniae*like2, y la de Avpg A con empalme final

```

Consensus      ATGGCACAAAGTCATTAATACCAACAGCCTCTCGCTGATCACTCAAATAATATCAACAAG 60
                -----I-----I-----I-----I-----I-----I-----I
EcoliW3110     ATGGCACAAAGTCATTAATACCAACAGCCTCTCGCTGATCACTCAAATAATATCAACAAG 60
A. paragallinarum  -----I-----I-----I-----I-----I-----I-----I
Apleurolike2    -AGAAATTCGGCTTAATACCAACAGCCTCTGGTTGATCACGTCAAATAATATCCCACAAG 59

Consensus      AACCAAGTCTGCGCTGTCGAGTCTATCGAGCGTCTGT-CTTCTGG-CTTGCGTATTAACA 118
                -----I-----I-----I-----I-----I-----I-----I
EcoliW3110     AACCAAGTCTGCGCTGTCGAGTCTATCGAGCGTCTGT-CTTCTGG-CTTGCGTATTAACA 118
A. paragallinarum  ---AGTCTGCGCTGTCGAGTCTATCGAGCGTCTGT-CTTCTGG-CTTGCGTATTAACA 54
Apleurolike2     AACCAAGTCTGCGCTGTCGAGTCTATCGAGCGTCTGTACTTCTGGACTTGCGTATTAACA 119
                *****

Consensus      GCGCGAAGGATGACGCAGCGGGTCAGGCGATTGC-TAACCGTTTCACCTCTAACATTAAA 177
                -----I-----I-----I-----I-----I-----I-----I
EcoliW3110     GCGCGAAGGATGACGCAGCGGGTCAGGCGATTGC-TAACCGTTTCACCTCTAACATTAAA 177
A. paragallinarum  GCGCGAAGGATGACGCAGCGGGTCAGGCGATTGC-TAACCGTTTCACCTCTAACATTAAA 113
Apleurolike2     GCGCGAAGGATGACGCAGCGGGTCAGTTCGATTGCATAACCGTTTCACCTCTAACATTAAA 179
                *****

Consensus      GGCTGACTCAGCGGCCCGTAACGCCAACGACGGTATCTCCGT-GCGCAG-ACCACCG 235
                -----I-----I-----I-----I-----I-----I-----I
EcoliW3110     GGCTGACTCAGCGGCCCGTAACGCCAACGACGGTATCTCCGT-GCGCAG-ACCACCG 235
A. paragallinarum  GGCTGACTCAGCGGCCCGTAACGCCAACGACGGTATCTCCGT-GCGCAG-ACCACCG 171
Apleurolike2     GGCTGACTCAGCGGCCCGTAACGCCAACGACGGTATCTCCGTAGGCACAGGACCACCG 239
                *****

Consensus      AAGGCGCGCTGTCCGAAATCAACAACAACCTACAGCGTGTGCGTGAACGTGACGGTACAGG 295
                -----I-----I-----I-----I-----I-----I-----I
EcoliW3110     AAGGCGCGCTGTCCGAAATCAACAACAACCTACAGCGTGTGCGTGAACGTGACGGTACAGG 295
A. paragallinarum  AAGGCGCGCTGTCCGAAATCAACAACAACCTACAGCGTGTGCGTGAACGTGACGGTACAGG 231
Apleurolike2     AAGGCGCGCTGTCCGAAATCAACAACAACCTACAGCGTGTGCGTGAACGTGACGGTACAGG 299
                *****

Consensus      CCACTACCGGTACTAACTCTGAGTCTGATCTGTCTTCTATCCAGGACGAAATTAATCCC 355
                -----I-----I-----I-----I-----I-----I-----I
EcoliW3110     CCACTACCGGTACTAACTCTGAGTCTGATCTGTCTTCTATCCAGGACGAAATTAATCCC 355
A. paragallinarum  CCACTACCGGTACTAACTCTGAGTCTGATCTGTCTTCTATCCAGGACGAAATTAATCCC 291
Apleurolike2     CCACTACCGGTACTAACTCTGAGTCTGATCTGTCTGCTATCCAAGACGAAATTAATCCC 359
                *****

Consensus      GTCTGGATGAAATTGACCGCGTATCTGGTCAGACCCAGTTCAACGGCGTGAACGTGCTGG 415
                -----I-----I-----I-----I-----I-----I-----I
EcoliW3110     GTCTGGATGAAATTGACCGCGTATCTGGTCAGACCCAGTTCAACGGCGTGAACGTGCTGG 415
A. paragallinarum  GTCTGGATGAAATTGACCGCGTATCTGGTCAGACCCAGTTCAACGGCGTGAACGTGCTGG 351
Apleurolike2     GTCTGGATGAAATTGACCGCGTATCTGGTCAGACCCAGTTCAACGGCGTGAACGTGCTGG 419
                *****

Consensus      CAAAAATGGCTCCATGAAAATCCAGGTGGCGCAAATGATAACCAGACTATCACTATCG 475
                -----I-----I-----I-----I-----I-----I-----I
EcoliW3110     CAAAAATGGCTCCATGAAAATCCAGGTGGCGCAAATGATAACCAGACTATCACTATCG 475
A. paragallinarum  CAAAAATGGCTCCATGAAAATCCAGGTGGCGCAAATGATAACCAGACTATCACTATCG 411
Apleurolike2     CAAAAATGGCTCCATGAAAATCCAGGTGGCGCAAATGATAACCAGACTATCACTATCG 479
                *****

```


b) Continuación del alineamiento pero substituyendo a Apleurolike2 por Apleuro5238

```

Consensus      GATACCGATACATATGCGCTTAAAGATACAAATGGCAATCTTTAC-GCTGCG-GATGTGA 997
               -----I-----I-----I-----I-----I-----I
EcoliW3110     GATACCGATACATATGCGCTTAAAGATACAAATGGCAATCTTTAC-GCTGCG-GATGTGA 997
A. paragallinarum GATACCGATACATATGCGCTTAAAGATACAAATGGCAATCTTTACCGCTGCG-GATGTGA 931
Apleuro5238     -----GCAATCTTTACGCTGCGCGATGTGA 26
               *****  *****  *****

Consensus      AT--GAAACTACTGGTG-CTGTTTCTGTTAAAACTATTACCTATACTGACTCTTCCGGTG 1054
               -----I-----I-----I-----I-----I-----I
EcoliW3110     AT--GAAACTACTGGTG-CTGTTTCTGTTAAAACTATTACCTATACTGACTCTTCCGGTG 1054
A. paragallinarum AT--GAAACTACTGGTG-CTGTTTCTGTTAAAACTATTACCTATACTGACTCTTCCGGTG 988
Apleuro5238     AATGNAAACCACTGGTGGCTGTTTCTGTTAAAACTATAACCTATAGTGCTCCCTCCGGTG 86
               *      ****  *****  *****  *****  *****  *****

Consensus      CCGCCAGTTCTCCAACCGCGGTCAAACCTGGGCGGAGATGATGGCAAACAGAAGTGGTGC 1114
               -----I-----I-----I-----I-----I-----I
EcoliW3110     CCGCCAGTTCTCCAACCGCGGTCAAACCTGGGCGGAGATGATGGCAAACAGAAGTGGTGC 1114
A. paragallinarum CCGCCAGTTCTCCAACCGCGGTCAAACCTGGGCGGAGATGATGGCAAACAGAAGTGGTGC 1048
Apleuro5238     CCGCCAGTTCTCCAACCGCGGTCAAACCTGGGCGGAGATGATGGCAAACAGAAGTGGTGC 146
               *****  *****  *****  *****  *****  *****

Consensus      ATATTGATGGTAAACATACGATTCTGCCGATTTAAATGGCGGTAATCTGCAAACAGGTT 1174
               -----I-----I-----I-----I-----I-----I
EcoliW3110     ATATTGATGGTAAACATACGATTCTGCCGATTTAAATGGCGGTAATCTGCAAACAGGTT 1174
A. paragallinarum ATATTGATGGTAAACATACGATTCTGCCGATTTAAATGGCGGTAATCTGCAAACAGGTT 1108
Apleuro5238     ATATTGATGGTAGAACATACCACTTCTGCCGATTTAAATGGCGGTAATTTGCAAGCAGGTT 206
               *****  *****  *****  *****  *****  *****

Consensus      TGACTGCTGGTGGTGAGGCTCTGACTGCTGTGTC-AAATGGTAAAACACCGGATCCGCTG 1233
               -----I-----I-----I-----I-----I-----I
EcoliW3110     TGACTGCTGGTGGTGAGGCTCTGACTGCTGTGTC-AAATGGTAAAACACCGGATCCGCTG 1233
A. paragallinarum TGACTGCTGGTGGTGAGGCTCTGACTGCTGTGTC-AAATGGTAAAACACCGGATCCGCTG 1167
Apleuro5238     TGACTGCTGGTGGTGAGGCTCTGACTGCTGTGTC-AAATGGTAAAACACCGGATCCGCTG 266
               *****  *****  *****  *****  *****  *****

Consensus      AAAGCGCTGGACGATGCTATCGCATCTGTAGACAAATCCGTTCTTCCCTCGGTGCGGTG 1293
               -----I-----I-----I-----I-----I-----I
EcoliW3110     AAAGCGCTGGACGATGCTATCGCATCTGTAGACAAATCCGTTCTTCCCTCGGTGCGGTG 1293
A. paragallinarum AAAGCGCTGGACGATGCTATCGCATCTGTAGACAAATCCGTTCTTCCCTCGGTGCGGTG 1227
Apleuro5238     AAAGCGCTGGACGATGCTATCGCATCTGAAGACAAATCCGTTCTTCCCTCGGTGCGGTG 326
               *****  *****  *****  *****  *****  *****

Consensus      CAAAACCGTCTGGATTCCGCGGTTACCAACCTGAACAACACCCTACCAACCTGT-CTGA 1352
               -----I-----I-----I-----I-----I-----I
EcoliW3110     CAAAACCGTCTGGATTCCGCGGTTACCAACCTGAACAACACCCTACCAACCTGT-CTGA 1352
A. paragallinarum CAAAACCGTCTGGATTCCGCGGTTACCAACCTGAACAACACCCTACCAACCTGT-CTGA 1286
Apleuro5238     CAAAACGTCTGGATTCCGCGGTTACCAACCTGAACAACACCCTACCAACCTGTCTGA 386
               *****  *****  *****  *****  *****  *****

Consensus      -AGCGCAGTCCCGTATTTCAGGACGCCGACTATGCGACCGAAGTGTTCCAATATGTCGAAAG 1411
               -----I-----I-----I-----I-----I-----I
EcoliW3110     -AGCGCAGTCCCGTATTTCAGGACGCCGACTATGCGACCGAAGTGTTCCAATATGTCGAAAG 1411
A. paragallinarum -AGCGCAGTCCCGTATTTCAGGACGCCGACTATGCGACCGAAGTGTTCCAATATGTCGAAAG 1345
Apleuro5238     TAGCGCAGTCCCGTATTTCAGGACGCCGACTATGCGACCAAAGTGTTCCAATATGTCGAAAG 446
               *****  *****  *****  *****  *****  *****

```

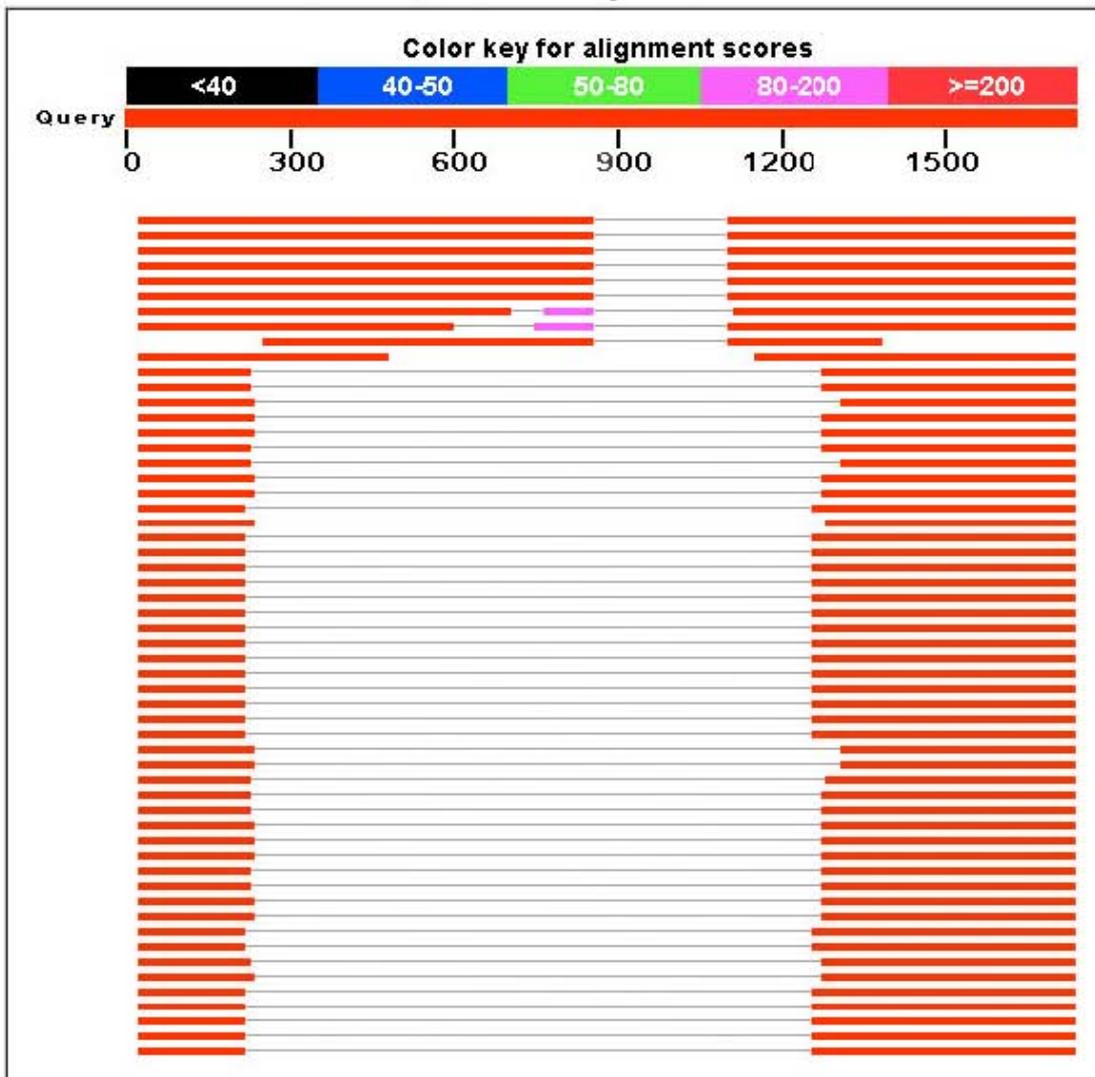



Fig. 20: Alineamiento de las secuencias de *fliC* de *A. paragallinarum* con la de diferentes bacterias utilizando el programa NCBI/BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). El hueco en gris indica que no hubo secuencia suficiente para cubrir toda la secuencia reportada.

La secuencia de nucleótidos que se obtuvo del gen *fliC* de *A. paragallinarum* se analizó en el programa ExPASy para ser traducido y se obtuvo una secuencia de 180 aminoácidos (Fig. 21).

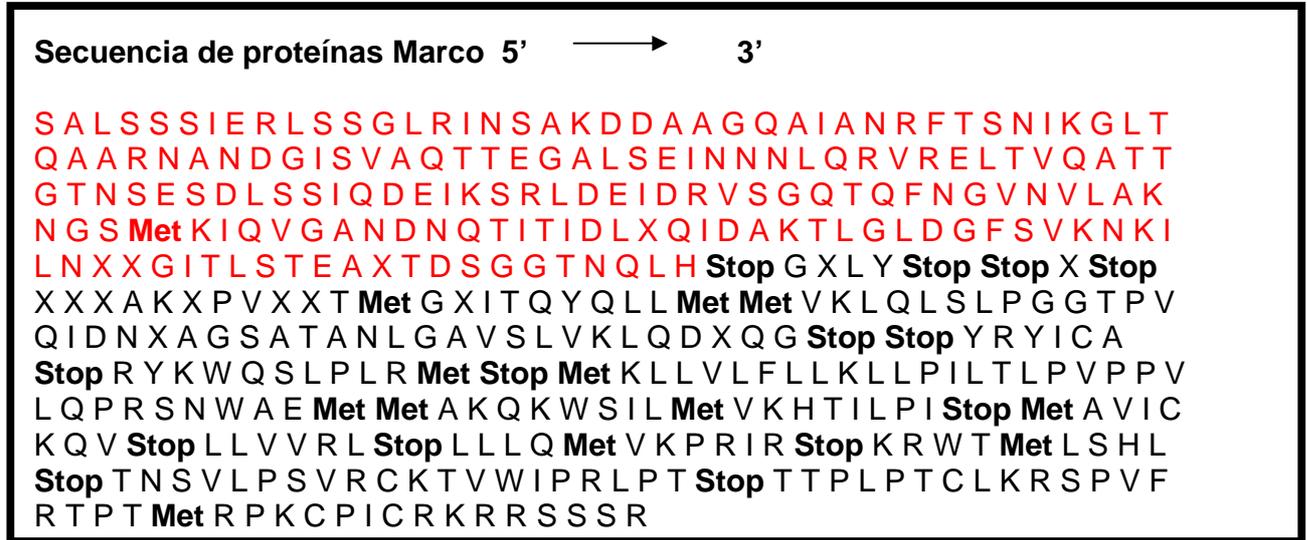


Fig. 21: Lo que se observa en rojo es la secuencia de aminoácidos que se comparó con las secuencias de flagelina de otras bacterias.

De dicha secuencia se seleccionaron los primeros 80 aminoácidos, debido a que después de estos aminoácidos había muchos *stop*'s, y se compararon con las secuencias de aminoácidos de flagelinas de otras bacterias. Las flagelinas de P04949FLIC_ECOLI Flagellin [FliC] [*Escherichia coli*] y Q0T3K4 _SHIF8 Flagellin [FliC] [*Shigella flexneri* serotype 5b, y la parte de la secuencia de aminoácidos de *A. paragallinarum* seleccionada, fueron alineadas y comparadas utilizando el programa Blast alignment protein. Se encontró que la secuencia de aminoácidos de *A. paragallinarum*, una alta identidad con las proteínas flagelinas de *E. coli* y *S. flexneri* (Fig. 22 a y b respectivamente).

[P04949](#)
FLIC_ECOLI

Flagellin [FliC] [Escherichia coli]

Score = 277 bits (709), Expect = 2e-73
Identities = 154/183 (84%), Positives = 156/183 (85%), Gaps = 20/183 (10%)

```
A.par: 15  RINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAARNANDGISVAQTTEGALSEINNNLQRVRELT 74
          *****
E.col: 37  RINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAARNANDGISVAQTTEGALSEINNNLQRVRELT 96

A.par: 75  VQATTGTNSEDLSIQDEIKSRLDEIDRVSGQTQFNGVNVLAKNGSMKIQVGANDNQT I 134
          *****
E.col: 97  VQATTGTNSEDLSIQDEIKSRLDEIDRVSGQTQFNGVNVLAKNGSMKIQVGANDNQT I 154

A.par: 135 TIDLXQIDAKTLGLDGFVKN-----KILNXXGITLSTEAXTDSGGTN 179
          *****
E.col: 155 TIDLKQIDAKTLGLDGFVKNNDTVTTSAPVTAFGATTTNNIKLTGITLSTEAAATDTGGTN 217
```

22a. Alineamientos con la secuencia de aminoácidos de *A. paragallinarum* y la flagelina de *E. coli*.
Las regiones que tienen asteriscos son las idénticas entre las dos secuencias. El color negro en la región se refiere a zonas donde no fueron idénticos los aminoácidos.

[Q08860](#)
FLIC_SHIFL

Flagellin [FliC] [Shigella flexneri]

Score = 241 bits (616), Expect = 1e-62
Identities = 131/157 (83%), Positives = 140/157 (89%), Gaps = 7/157 (4%)

```
A.par: 15  RINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAARNANDGISVAQTTEGALSEINNNLQRVRELT 74
          *****
S.file: 37  RINSAKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAARNANDGISVAQTTEGALSEINNNLQRIRELT 96

A.par: 75  VQATTGTNSEDLSSIQDEIKSRLDEIDRVSGQTQFNGVNVLAKNGSMKIQVGANDNQ 134
          ***  *****  ***  *****
S.file: 97  VQASTGTNSDSLDSIQDEIKSRLDEIDRVSGQTQFNGVNVLAKDGSMKIQVGANDGQ 154

A.par: 135  TITIDLXQIDAKTLGLDGFVKNKILNXXGITLSTEA 171
          *****  **  *****  *  *  *  *  *  *
S.file: 155  TITIDLKKIDSDLGLNGFNV-----NGGAVANTAA 186
```

22b. Alineamientos con la secuencia de aminoácidos de *A. paragallinarum* y la flagelina de *S. flexneri*.
Las regiones que tienen asteriscos son las idénticas entre las dos secuencias. El color negro en la región se refiere a zonas donde no fueron idénticos los aminoácidos.

7. DISCUSIÓN

Avibacterium paragallinarum, al infectar pollos, despierta el interés de investigadores debido a que tiene repercusión en una de las industrias más importantes de México, la industria avícola (Glisson, 1998).

En la actualidad los métodos de producción de huevo y carne de pollo han logrado mayor eficiencia a menor costo, lo que permite que la fuente de proteína animal con mayor acceso sea la de ave (Castañeda, 2002).

Sin embargo, muchas bacterias que se encuentran asociadas con las aves tienen gran importancia debido al impacto económico negativo que producen a la avicultura, esto puede ser, en algunos casos, por la capacidad que tienen de producir enfermedades en sus hospederos, de las cuales la que tienen mayor importancia son las de tipo respiratorio y entérico (Castañeda, 2002).

Entre los factores de virulencia que poseen algunas de estas bacterias patógenas se encuentran los flagelos. Los flagelos procariontes típicos son largos apéndices filamentosos extracelulares, helicoidales y son los responsables del desplazamiento de la mayor parte de las bacterias móviles (Ottemann, *et al.*, 1997). Pero, la expresión de flagelo en algunas bacterias no está relacionada con la patogenicidad, sin embargo en *P. mirabilis*, *S. entérica*, *Y. enterocolítica* y otras, la participación del flagelo en adherencia e invasión ya ha sido demostrada, así como la formación de biofilms en *E. coli*, los géneros de *Pseudomonas* y *Vibrio* (O' Toole *et al.*, 1999).

La motilidad flagelar bacteriana y la quimiotaxis ayuda a las células a alcanzar los más favorables ambientes y a competir exitosamente con otros microorganismos en respuesta a estímulos externos (Zhao, *et al.*, 2007).

El flagelo, además de participar en la locomoción de las bacterias, también aumenta la adhesión a células del hospedero, la invasión y también es elemento clave en la formación de biofilms (Adler, 1996).

En *Helicobacter pylori* tanto la motilidad como el flagelo son esenciales para la colonización de la mucosa gástrica en humanos. Se ha demostrado que mutantes de *H. pylori* flageladas no móviles o no flageladas son menos eficientes e incapaces de establecer infección en el hospedero (Skene, *et al.*, 2007).

En aislamientos de *Bacillus subtilis* se encontró una conducta multicelular conocida como swarming, producida por flagelos, la cual le confiere grandes beneficios en la formación de biopelículas (Conelly, *et al.*, 2004). En condiciones *in vitro*, *Aeromonas* spp produce un flagelo lateral, el cual le permite la interacción con la superficie de células eucariontes (Gavín, *et al.*, 2003). Estos datos nos dan una idea de la importancia que tiene el que un microorganismo exprese flagelos aún con un costo energético elevado.

En una investigación anterior demostramos que *A. paragallinarum* presenta motilidad en condiciones *in vitro* (Serrano, *et al.*, 2005), lo que nos llevó a pensar que esta característica podría ser causada por la presencia de flagelos. Habiéndose reportado previamente también que algunos otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* presentaban uno o dos flagelos polares, como es el caso de *A. pleuropneumoniae*, *H. influenza* y *P. multocida* (Negrete, *et al.*, 2003;

Campos, 2006 & García, 2007), en el presente trabajo se obtuvieron bacterias motiles utilizando las condiciones que habían sido reportadas para esta bacteria (Serrano, *et al.*, 2005). Con los resultados obtenidos se muestra la capacidad de *A. paragallinarum* para desplazarse en superficies semisólidas.

Por lo tanto, se trató de demostrar que *A. paragallinarum* poseía los elementos suficientes para expresar un flagelo bacteriano; éste es una estructura cilíndrica fina, hueca y rígida, con aspecto helicoidal.

Dicha estructura pudo ser observada por medio de microscopía electrónica en la superficie bacteriana de *A. paragallinarum*. El flagelo de *A. paragallinarum* presentó una distribución polar monótrica, de manera similar a como se ha descrito para otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* (Negrete, *et al.*, 2003; Campos, 2006 & García, 2007). Esta distribución y número de flagelos difiere con respecto a lo reportado para *Proteus*, *Vibrios*, *Bacillus*, *Clostridium*, y *E. coli* ya que estas bacterias suelen presentar flagelos peritricos (McCarter, *et al.*, 1989). El patrón de flagelación varía entre especies y reviste interés en la determinación taxonómica (Ottemann, *et. al.*, 1997).

Aún no se sabe cómo participa esta estructura en el proceso infeccioso de *A. paragallinarum* pero, como ya se mencionó, se sabe que el flagelo le confiere muchas ventajas a las bacterias que lo poseen (Socket, 1998).

El filamento flagelar, que es la parte mas estudiada del flagelo, está constituido por el enrollamiento de miles de subunidades idénticas de una proteína llamada flagelina. La flagelina es una proteína globular relativamente elongada, con pesos moleculares variados, que van de aproximadamente 30 KDa hasta 100

KDa, según las especies¹.

Las subunidades de flagelina se disponen formando una matriz cilíndrica hueca.

Con el fin de obtener la flagelina de *A. paragallinarum*, a partir de la selección de cepas de motiles en medios semisólidos, se obtuvieron proteínas de su superficie por agitación mecánica y centrifugación diferencial. De estas proteínas por medio de Western blot se seleccionaron las de 40, 60 y 73 KDa ya que presentaron reacción cruzada con los diferentes sueros antiflagelina con los que se pusieron a reaccionar, por lo que se consideró que alguna de ellas pudiera ser la flagelina de *A. paragallinarum*. Dichas proteínas se transfirieron a membranas de PVDF y se mandaron secuenciar. Sin embargo, a pesar de la reactividad cruzada con los diferentes sueros anti-flagelina, ninguna de las proteínas presentó homología con las flagelinas reportadas de otras bacterias, únicamente se encontró que la proteína de 60 KDa presenta una baja homología con la proteína FliG de *E. coli*. Esta proteína se encuentra en el cuerpo basal, otra estructura del flagelo. Debido a los resultados no satisfactorios de la secuenciación, se trató de purificar la posible flagelina por medio de cromatografía de intercambio iónico obteniéndose una banda de 73 KDa y, por electroelución se logró purificar la proteína de aproximadamente 60 kDa (datos no mostrados). Las bandas de menor peso molecular que habían presentado reactividad cruzada con los diferentes antisueros, no fueron obtenidas durante la purificación. De estas dos bandas purificadas, la de 75 kDa presentó reacción cruzada con los diferentes sueros antiflagelina. Estos resultados sugieren que probablemente esta proteína

¹ <http://www.ugr.es/~eianez/microbiologia/08flagelos.htm>

es la flagelina de *A. paragallinarum*, por lo que se obtendrá su secuencia y se comparará con las secuencias de aminoácidos de flagelinas de otras bacterias para verificar que se trate del mismo tipo de proteína ya que las flagelinas se encuentran altamente conservadas entre las distintas especies de bacterias flageladas.

El gen *fliC* que es el encargado de codificar para la proteína flagelina, se encuentra altamente conservado en los extremos 5' y 3' en su secuencia de nucleótidos entre bacterias gram negativas. Los resultados de este trabajo demuestran que contrariamente a lo que era descrito con anterioridad, *A. paragallinarum* cuenta en su genoma con el gen *fliC*, ya que por medio de PCR se logró amplificar un fragmento de aproximadamente 1500 pb utilizando los cebadores para *fliC* D2R2, un resultado similar al obtenido por Campos (2006) con *H. influenzae* utilizando los mismos oligonucleótidos.

Este fragmento amplificado se clonó en células de *E. Coli* XL1-Blue con el fin de utilizarlo en estudios posteriores y, además, a partir de las células que portaban el inserto *fliC* de *A. paragallinarum* clonado, se obtuvo ADN plasmídico.

Con este ADN se realizó una secuenciación de los extremos 5' y 3' para conocer el patrón de nucleótidos que presentaba este gen y se comparó con secuencias *fliC* reportadas en *E. coli*, *A. pleuropneumonie* y otros microorganismos. Se encontró que todas estas secuencias presentaban una identidad de más del 90%, lo que nos indicó que son altamente conservadas entre las diferentes especies de bacterias.

Con estos resultados se demostró que *A. paragallinarum* cuenta con los elementos genéticos suficientes para sintetizar flagelo, pero, esto no nos indica que siempre lo esté expresando y tampoco no muestra cual es el papel que desempeña el flagelo de esta bacteria en el proceso infeccioso. Sin embargo, estos resultados son esenciales como punto de partida para poder responder estas nuevas interrogantes.

Se utilizó la secuencia de nucleótidos obtenida del fragmento amplificado por PCR del gen *fliC* de *A. paragallinarum* para realizar una traducción *in silico* y así poder conocer la composición de aminoácidos correspondiente a la flagelina de dicho organismo, se observó que parte de la secuencia podía ser traducida adecuadamente (aproximadamente 550 nt), y que dicha secuencia presentaba alta identidad con las secuencias de aminoácidos reportadas para las flagelinas de *E. coli* y *Shigella flexneri*, entre otras.

Aunque la secuencia de nucleótidos del gen *fliC* de *A. paragallinarum* presenta una alta identidad con las secuencias de nucleótidos del gen *fliC* de otras bacterias, es muy probable que haya ocurrido algún error durante el alineamiento ya que la secuencia del fragmento amplificado no se logró obtener completa, lo que pudo haber producido un cambio en el marco de lectura del gen, y por consiguiente, no se pudo obtener la secuencia de aminoácidos completa ni se pudo determinar su peso molecular de la proteína.

Se tendrán que diseñar, por lo tanto, un par de *primers* para obtener la secuencia nucleotídica del fragmento del gen que nos falta y así corregir ese error, así como también poder enviarla al Genbank.

Con base en las anteriores evidencias genéticas, bioquímicas y de microscopía, del presente trabajo, podemos concluir que *A. paragallinarum* posee los atributos genéticos necesarios para poder expresar flagelo, y por consiguiente, esta bacteria debe ser considerada móvil; característica que le podría conferir ventajas al momento de colonizar e invadir a su hospedero.

8. CONCLUSIONES

- En base a los resultados obtenidos se puede concluir que *A. paragallinarum* contrariamente a como era descrito, es capaz de expresar flagelos polares.
- En el genoma de *A. paragallinarum* existe un gen *fliC* de aproximadamente 1500 pb del cual se logró obtener la secuencia de 1365pb.
- La secuencia de nucleótidos del gen *fliC* de *A. paragallinarum* presenta una alta identidad con las secuencias *fliC* reportadas para otras bacterias.
- *Avibacterium paragallinarum* expresa una proteína de 73 kDa que presenta reacción cruzada con diferentes sueros anti-flagelina.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adler, J. 1996. Chemotaxis in bacteria. Motile *Escherichia coli* migrate in bands that are influenced by oxygen and organic nutrients. *Science* **153**:708-716.
- Biberstein, E. & White, D. 1969. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. *Journal Medical Microbiology*. **2**:75-78.
- Blackall, P. 1999. Infectious Coryza: Overview of the disease and New Diagnostic options. *Clinical Microbiology Review* **12**: 627-632.
- Blackall, P., Chistensen, H., Beckenham, T., Blackall, L. & Bisgaard, M. 2005. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov., and *Avibacterium volantium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 353-362.
- Blackall, P., Eaves, L. & Rogers, D. 1990. Proposal of a new serovar and altered nomenclature *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin. *Journal of Clinical Microbiology* **28**:1185-1187.

- Blackall, P., Matsumoto, M. & Yamamoto, R. 1997. Infectious Coryza. *Diseases of Poultry Tenth*. Calnek B. W (Edit). Editorial Iowa State University Ames, Iowa, USA. pp: 179-190.
- Blackall., P. & Yamamoto, R. 1989. Whole cell protein profiles of *Haemophilus paragallinarum* as detected by polyacrylamide gel electrophoresis. *Avian Diseases*. **33**: 168-173.
- 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.
- 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.
- Bragg, R., Purdan, G., Coetzee, I. & Verschoor, J. 1995. Effects of transformation on the hemagglutinins of *Haemophilus paragallinarum*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. **62**: 261-270.
- Campos, E. 2006. Estudio de la movilidad y expresión del flagelo en *Haemophilus influenzae*. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias

Microbiológicas. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

- Castañeda, A. 2002. Tipificación de aislamientos de *Manhnheimia (Pasteurella) haemolytica*-like obtenidos de aves con enfermedad reproductiva y respiratoria. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México D. F.
- Chen, W. P. & Kuo, T. T. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research* **21**:2260.
- Conelly, M., Young, G. & Sloma, A. 2004. Extracellular proteolytic activity plays a central role in swarming motility in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. **186**: 4159-4167.
- De Blicck, L. 1932. An haemoglobinophilic bacterium as the cause of contagious catarrh of the fowl (coriza infectious *gallinarum*). *Journal of Veterinary*. **88**:9-13.
- Fernández, R., Soriano, V., Dabo, S., Blackall, P. & García, D. 2000. Serotipificación de aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* de México mediante un esquema de hemoaglutininas. XXV Convención Anual ANECA, Cancún, México.

- García, A., Angulo, E., Blackall, P. & Ortiz, A. 2004. The presence of nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Haemophilus paragallinarum* in Mexico. *Avian Diseases* **48**: 425-429.
- García, R. 2007. Determinación de las condiciones de movilidad *in vitro* para *Pasteurella multocida*. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gavín, 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.
- Girón, J. 1995. Expression of flagella and motility by *Shigella*. *Molecular Microbiology*. **18**: 63-65.
- González-Pedrajo, B. & 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.
- Glisson, J. 1998. Bacterial respiratory diseases of poultry. *Poultry Science*. **77**:1139-1142.

- Iritani, Y., Katagiri, K. & Arita, H. 1980. Purification and properties of *Haemophilus paragallinarum* hemagglutinin. *American Journal Veterinary Research*. **41**:2114-2118.
- Jacobs, A., Berg, K. & Malo, A. 2003. Efficacy of a new tetravalent coryza vaccine against emerging variant type B strains. *Avian pathology* **32**: 265-269.
- Kato, K., Tsubahara, H. & Okuma, S. 1965. Infectious coryza of chickens. VI. Hemagglutinating properties of *Haemophilus paragallinarum*. *Jpn Journal of Veterinary Science*. **27**:457.
- Killian M. & Biberstein, E. 1984. *Haemophilus*. In: Krieg NR, Holt JG, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore: Williams & Wilkins pp: 568-569.
- Kume, K., Sawata, A., Nakari, T. & Matsumoto, M. 1983. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *Journal of Clinical Microbiology* **17**:958-964.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.

- Larios, A. 2007. Expresión de proteínas reguladas por hierro en *Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores, Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Larsen, M., Blackburn, N., Larsen, J. & Olsen, J. 2004. Influences of temperature, salinity and starvation on the motility and chemotactic response of *Vibrio anguillarum*. *Microbiology*. **150**: 1283-1290.

- Macnab, R. 2003. How bacteria assemble flagella. *Annual Review Microbiology* **57**:77-100.

- McCarter, L. 2004. Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. *Journal Molecular Microbiology and Biotechnology* **7**:18-19.

- Mena-Rojas, E., Vázquez, C., Vaca, S., García, O., Pérez-Márquez, V, Pérez-Méndez, A., Ibarra-Caballero, J., de la Garza, M. Zenteno, E. & Negrete-Abascal, E. 2004. Antigenic secreted proteins from *Haemophilus paragallinarum*. A 110-KDa putative RTX protein. *FEMS Microbiology Letters* **232**:83-87.

- Mifflin, J., Horner, R., Blackall, P., Chen, X., Bishop, G., Morrow, C., Yamaguchi, T. & Irritan, Y. 1995. Phenotypic and molecular characterization

of V-factor (NAD)-independent *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Diseases*. **39**: 304-308.

- Negrete-Abascal, E., Reyes, E. M., García, M. R., Vaca, S., Girón, A. J., García, O., Zenteno, E. & de la Garza, M. 2003. Flagella and motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of Bacteriology* **185**:664-668.
- Ottemann, K. M. & Miller, J. F. 1997. Roles for motility in bacterial-host interactions. *Molecular Microbiology* **24**:1109-1117.
- O'Toole, R., Lundberg, S., Fredriksson, S., Jansson, A., Nilsson, B. & Wolf-Watz H. 1999. The chemotactic response of *Vibrio anguillarum* to fish intestinal mucus is mediated by a combination of multiple mucus components. *Journal Bacteriology*. **181**(14):4308-17.
- Page, L. 1962. *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *American Journal Veterinary Research*. **23**:85-95
- Penn, C. W & Luke, C. J. 1992. Bacterial flagellar diversity and significance in pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters* **100**:331-336.

- Ramón, M., García O., Perez A., Ibarra J., Pérez M., Vaca S., & Negrete-Abascal, E. Membrane vesicles released by *Avibacterium paragallinarum* contain putative virulence factors. 2006. *FEMS Microbiology Letters* **257**: 63-68.
- Rivero-García, P., Vázquez, C., Sánchez, P., Vaca, S. & Negrete-Abascal, E. 2005. *Haemophilus paragallinarum* secretes metalloproteases. *Canadian Journal of Microbiology* **51**: 893-896.
- Sawata, A. & Kume, K. 1983. Relationships between virulence and morphological or serological properties of variants dissociated from serotype I *Haemophilus paragallinarum* strains. *Journal Clinical Microbiology*. **18**:49-55.
- Sawata, A. & Kume, K. 1984. Relationship between virulence and morphological or serological properties of variants dissociated from serotype *Haemophilus paragallinarum*. *Journal of Clinical Microbiology*. **18**:49-55.
- Sawata, A., Kume, K. & Nakase, Y. 1978. *Haemophilus* infections in chickens. 2. Types of *Haemophilus paragallinarum* isolates from chickens with infectious coryza, in relation to *Haemophilus gallinarum* strain No. 221. *Jpn Journal Veterinary Science*. **40**:645-652.

- Sawata, A., Kume, K. & Nakase, Y. 1979. Antigenic structure and relationship between serotypes 1 and 2 of *Haemophilus paragallinarum*. *American Journal Veterinary Research*. **40**:1450-1453.
- Serrano, A., García, R., Vaca, S. & Negrete-Abascal, E. Motilidad *in vitro* de *Haemophilus paragallinarum*. 2005. Avances de Biotecnología Agropecuaria y Forestal en México. ANABAF: 229-236.
- Skene, c., Young, A., Every, A. & Sutton, P. 2007. *Helicobacter pylori* flagella: antigenic profile and protective immunity. *FEMS Immunology Medical Microbiology*. **50**: 249-256.
- Sockett, R. 1998. Characterizing flagella and motile behaviour. *Methods in Microbiology*. **27**: 227-238.
- Soriano, E. & Terzolo, H. 2004. *Haemophilus paragallinarum*: Etiología de la coriza infecciosa. *Veterinaria México*. **35**(3):245-259
- Soutourina, O. A. & Bertin, P. N. 2003. Regulation cascade of flagellar expression in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **27**:505-523.

- Terzolo, H. R. 2000. Revisión sobre coriza infecciosa: Propuesta de investigación para su diagnóstico y control. *Revista de Medicina Veterinaria*. **81**:262-269.

- Ueda, S., Nagasawa, & Suzuki, T. and Tajima, M. 1982. Adhesion of *Haemophilus paragallinarum* to cultured chicken cells. *Microbiology and Immunology* **26**:1007-1016.

- Zhao, K., Liu, M. & Burgess, R. 2007. Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: from regulon members to 'foraging'-like behavior in *E. coli*. *Nucleic Acids Research*. **35**(13): 4441-4452.