



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Determinación de las condiciones de
movilidad *in vitro* de *Gallibacterium anatis***

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
JUAN FERNANDO MONTES GARCIA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL

Proyecto apoyado por PAPIIT IN216010 y PAPCA FESI-UNAM

TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Genética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México. Contando con el apoyo de los proyectos PAPIIT IN216010 y PAPCA FESI-UNAM.

DEDICADA A:

A las personas que siempre me apoyan; a mis padres, Gracias por su apoyo y por comprender el camino que he elegido. Gracias Mamá que en cada momento de mi vida estas conmigo, llegar a esta meta es gracias a ti. Gracias Papá por enseñarme lo valioso que es el trabajo y como es que enaltece el alma.

A mi amiga, novia y esposa Sandra Ruiz por que a pesar de todo siempre estamos juntos apoyándonos en las buenas y en las malas, y en esta parte de mi vida tú siempre estuviste presente con tus consejos y recomendaciones.

A mis amigos de la vida, que lamentablemente no pudieron seguir este camino de aprendizaje, pero se graduaron con honores de la escuela de la vida, de la cual yo también aprendí, siempre que los necesité estuvieron conmigo, saben que cuando me necesiten estaré para ustedes.

A mis hermanos, que aunque no lo crean como dicen: “ arrieros somos y en el camino andamos”; los quiero y estimo Norma y Jorge.

A mis compañeros del laboratorio Brenda, Miguel, Ismael, Mónica, Frank Ymuri, Claudia, Carlos y Karina, por compartir el trabajo arduo y por brindarme un consejo cuando lo necesité.

No veo que la genética ofenda a los dioses porque no pienso que haya dioses de ningún tipo allá arriba.

(James Watson, premio nobel, 1950)

Todos somos muy ignorantes. Lo que ocurre es que no todos ignoramos las mismas cosas.

Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.

Al principio todos los pensamientos pertenecen al amor. Después, todo el amor pertenece a los pensamientos.

(Albert Einstein)

La naturaleza tiene un orden, cuando sepas interpretarlo, habrás creado una regla

(Fernando)

AGRADECIMIENTOS

Al **Doctor Erasmo Negrete** por su total apoyo y confianza, pero sobre todo que haya tenido Fe en mis capacidades y por esta oportunidad que me brindo, que no la desaproveche y espero haber honrado la reputación del Laboratorio de Genética.

Al **Doctor Sergio Vaca** por haberme abierto las puertas de su Laboratorio y por su apoyo incondicional, paciencia y por sus consejos de vida.

A mis revisores:

M. en C. Gloria Paniagua, M. en C. Eric Monroy y el Biólogo Tomás Villamar, por sus comentarios y correcciones que sirvieron para que este trabajo fuese mejor.

A mis padres:

Por apoyarme en mis estudios, hasta donde su economía lo permitió

A mis compañeros del laboratorio:

Por el compañerismo y amistad que me brindaron.

A todos ustedes Gracias.

INDICE

RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
Descripción del microorganismo.....	7
Factores de virulencia descritos para <i>G. anatis</i>	8
Importancia económica.....	10
Flagelo bacteriano.....	11
Eje central	12
Gancho	13
Cuerpo Basal	13
Motor Flagelar	13
Aparato exportador	15
Proteínas auxiliares y de unión	15
Ensamble Flagelar.....	15
Función.....	16
Disposición Flagelar	19
ANTECEDENTES	22
JUSTIFICACIÓN.....	23
OBJETIVOS.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24

Cepa utilizada.....	24
Selección de cepas móviles.....	24
Ensayos de movilidad.....	24
Efecto de temperatura y pH sobre la movilidad.....	24
Efecto de diferentes compuestos químicos sobre la movilidad	25
Purificación de la flagelina de <i>G. anatis</i>	25
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	25
Inmunoreconocimiento (western blotting).....	26
Identificación de la proteína probable flagelina (Análisis MALDI-TOF)	26
Microscopia electrónica.....	27
Anticuerpos policlonales.....	27
RESULTADOS.....	28
DISCUSIÓN.....	38
CONCLUSIONES.....	43
REFERENCIAS.....	44

1.- RESUMEN.

Gallibacterium anatis es un cocobacilo Gram (-) miembro de la familia *Pasteurellaceae*, el cual ha sido reportado como no móvil. A este microorganismo se le considera uno de los causantes de la baja en la postura de huevo, ya que afecta entre otros órganos el aparato reproductor de gallinas de postura comercial, ocasionando grandes pérdidas económicas para el sector avícola. La movilidad bacteriana está asociada con la capacidad de producir estructuras filamentosas llamadas flagelos, estos representan una ventaja adaptativa ya que confieren a la bacteria la capacidad de respuesta a los estímulos que le ofrece su entorno, sin embargo, su expresión tiene un alto costo energético. En este trabajo se determinaron las condiciones de movilidad *in vitro* y la expresión de flagelo de *G. anatis*. Se seleccionaron cepas móviles de *G. anatis* F149^T y 12656-12 por resiembras sucesivas en medio BHI con 0.4% de agar tomándose como movilidad el crecimiento radial. Con estas cepas se hicieron ensayos para determinar las condiciones ambientales *in vitro* que favorecieran la movilidad: medio de cultivo, temperatura, pH, presencia de sales y dextrosa. Usando microscopía electrónica de transmisión, se pudo observar la presencia de flagelo polar en ambas cepas de *G. anatis*. Este microorganismo presenta movilidad en medio BHI adicionado con 0.35% de agar y 1% de suero de ternera. El pH básico (8.0), la presencia de dextrosa (13 mM), NaCl (34mM), KH₂PO₄ (2 mM) y CaCl₂ (7 mM) favorecen su movilidad, que se muestra evidente después de 48 horas de incubación en atmosfera normal a 37°C. De *G. anatis* se ha obtenido una posible flagelina de aproximadamente 60 KDa que es reconocida por anticuerpos anti-flagelo de *Escherichia. coli* y *Salmonella typhimurium*.

(Proyecto apoyado por PAPIIT IN216010 y PAPCA FESI-UNAM)

2.-INTRODUCCION.

Descripción del microorganismo.

Anteriormente la familia *Pasteurellaceae* estuvo constituida por sólo tres géneros: *Haemophilus*, *Actinobacillus* y *Pasteurella*; posteriormente los géneros de *Mannheimia* y *Gallibacterium* fueron agregados a la lista, entre otros (Angen *et al.*, 1999; Jacques *et al.*, 2002; Christensen *et al.*, 2003).

Las bacterias clasificadas como *A. salpingiditis*, *P. haemolytica* like aviar y *P. anatis* se reclasificaron y reubicaron en el nuevo genero *Gallibacterium* el cual incluye a las especies *G. anatis* (biovariedades *haemolytica* y *anatis* y *G.* genomoespecies 1 y 2. *G. anatis* puede diferenciarse de otras especies de *Gallibacterium* por caracterización fenotípica, mientras que las genomoespecies 1 y 2 solo pueden ser diferenciados por métodos genotípicos debido a la heterogeneidad fenotípica que existe entre estos microorganismos (Christensen *et al.*, 2003).

Las bacterias de este género son Gram negativas, descritas como no móviles, en forma de bacilo o pleomórficas, se encuentran aisladas o en pares; en la variedad hemolítica las colonias presentan β - hemolisis sobre agar sangre, son grisáceas, no transparentes, pero eventualmente son transparentes en su periferia, con una consistencia butirosa, elevadas, lisas, brillantes, circulares, con margen entero y con diámetro de 1 a 2 mm después de 48 horas de incubación a 37°C; no forman endosporas; su crecimiento es mesofilico y anaeróbico facultativo o microaerofilico; no requieren NAD para su crecimiento (Christensen *et al.*, 2003).

Las cepas de *Gallibacterium* positivas a las pruebas de la catalasa, oxidasa, fosfatasa, β -galactosidasa y paranitrofenil- β -galactosido, reducen los nitratos. Forman ácido sin producción de gas a partir de glicerol, (-) D-ribosa, (+) D-xilosa, (-) D-manitol, (-) D-fructosa, (+) D-galactosa, (+) D-glucosa, manosa, sacarosa y rafinosa.

Son negativas para las pruebas de crecimiento simbiótico, citrato de Simmons, malonato, H₂S/Hierro triple azúcar, crecimiento en presencia de KCN, Voges-Proskauer a 37°C y ureasa. No producen pigmentos. Se observan variaciones en la reacción del rojo de metilo a 37°C, crecimiento en agar MacConkey y en la producción de ácido a partir de (+) L-arabinosa, (-) D-arabinosa, m-inositol, (-) D-sorbitol, (-) L-fucosa, lactosa, maltosa, trehalosa y dextrina. La especie tipo es *G. anatis* (Christensen *et al.*, 2003).

Las características fenotípicas más importantes para diferenciar a las especies del género *Gallibacterium* se resumen en la tabla 1.

Característica	<i>G. anatis</i> <i>Bv.</i> <i>haemolytica</i>	<i>G. anatis</i> <i>Bv.</i> <i>anatis</i>	<i>Gallibacterium</i> <i>Genomoespecie</i> 1	<i>Gallibacterium</i> <i>Genomoespecie</i> 2
Hemolisis	+	-	+	+
Producción de ácido a partir de:		-	+/(+)	+
Dextrina				
(-) D-arabinosa	(+)	-	(+)	D
(+)L-arabinosa	-	-	D	D
m-inositol	D	D	-	D
(-) D-sorbitol	D	D	-	-
(-)L-fucosa	(+)	-	+/(+)	D
Maltosa	D	-	+	+
Trehalosa	D	+	+	D

Tabla 1.- Características reportadas son: +=90% de las cepas son positivas en 1-2 días; (+)= 90% de las cepas son positivas dentro de 3-14 días; -, <10% de las cepas son positivas dentro de 14 días; D, 11-89% de las cepas positivas. (García-Gómez, 2004)

Factores de virulencia descritos para *G. anatis*.

García-Gómez *et al.* en el 2005 obtuvieron y caracterizaron diferentes metaloproteasas secretadas al sobrenadante del cultivo de cepas de campo y de referencia de *G. anatis*; detectaron proteínas con un peso molecular de más de 100 kDa que mostraban actividad proteolítica. Estas proteasas fueron activas a pH alcalino y se inhibían con EDTA. Su actividad era estable a 50°C, las proteínas

secretadas eran capaces de degradar IgG de pollo tras 24 h de incubación. Las metaloproteasas secretadas podrían jugar algún papel en la infección causada por *G. anatis*.

Zepeda *et al.*, (2009) determinaron la actividad hemoaglutinante de siete cepas de referencia, nueve cepas mexicanas y tres aislamientos daneses de *Gallibacterium*, mediante el uso eritrocitos frescos de diferentes especies que incluyeron pollo (pollo de engorda, gallos, gallinas de postura), pavo, paloma, codorniz, pato, halcón Harris (*Parabuteo unicinctus*), gorrión (*Carpodacus mexicanus*), bovino, oveja, caballo, perro, conejo, cerdo y humano (grupos A, B, AB y O; Rh⁺). Los resultados fueron que algunas cepas de *Gallibacterium* son capaces de aglutinar eritrocitos de ave, o de mamíferos como cerdos y vacas por ejemplo. Sin embargo, los mecanismos y estructuras que median esta hemoaglutinación no se conocen.

Kristensen *et al.*, (2010) determinaron la producción de citotoxinas activas contra diferentes variedades de células de pollo, como los macrófagos (HD11), describieron una toxina que nombraron GtxA y determinaron su homología con toxinas RTX presentes en otros miembros de la familia *Pasteurellaceae*.

Vaca *et al.*, (2011) evaluaron la capacidad de *G. anatis* para adherirse a superficies inertes como posible mecanismo para la formación de una biopelícula y la participación de proteínas en este proceso.

Montes-García *et al.* (2011) (En revisión, Avian Pathol, 2011). Describieron proteínas amiloides en la superficie de *G. anatis*, que pudieran ser fimbrias tipo curli, que además de ser resistentes al ácido fórmico, las altas temperaturas, y la digestión por tripsina, estas relacionadas con la adhesión y formación de biofilm.

Importancia económica.

La industria avícola genera en México 1 millón 140 mil empleos, de los cuales 190 mil son directos y 950 mil indirectos, con amplia influencia en las zonas rurales, sin embargo estos datos solo representan a la industria formalmente establecida, no hay datos exactos acerca de productores que no se encuentran en el padrón de la Asociación Nacional de Avicultores, así como de la práctica avícola para el autoconsumo. Respecto a esta industria hay que comentar que la producción avícola en el año 2009 fue de: 2,354 millones de toneladas de huevo; 2,789 millones de toneladas de carne de pollo y 11 mil 422 toneladas de carne de pavo, este sector industrial aporta el 63.5% del PIB del sector pecuario y este a su vez participa con el 38.5% del PIB nacional (UNA, 2010).

Por lo que, enfermedades que en estado subclínico no presentan ningún tipo de sintomatología, representan una seria amenaza para este sector, por citar un ejemplo; la producción de huevo (donde México es el quinto productor mundial) un estado subclínico afecta a las aves disminuyendo la postura de huevo de un 12 a un 70%, lo que equivaldría, si suponemos una afectación de solo el 10% de la industria; en una pérdida de 230 millones de toneladas de huevo.

Es de sumo interés proteger actividades que participan de manera directa en la producción de alimentos de la canasta básica, se calcula que el consumo per capita de huevo es de 22.19 Kg. Por consiguiente es necesario obtener información de organismos patógenos que representan una fuerte amenaza a la industria avícola (Vázquez *et al*, 2005. Bisgaard *et al*, 2005, Castellanos, 2006)

Flagelo bacteriano.

Es una de las estructuras procariotas mas y mejor estudiadas, compuesta por mas de 20 tipos de proteínas con otras 30 proteínas requeridas para su regulación y ensamble, lo cual lo hace el mas complejo de las estructuras bacterianas, su ensamble sigue un modelo de sistema de secreción tipo III, esta estructura esta relacionada directamente con la movilidad (Aldridge *et al.*, 2002; Macnab, 1999).

El flagelo bacteriano esta formado por tres estructuras principales:

- a) Un filamento largo y helicoidal.
- b) Una estructura corta curvada conocida como gancho.
- c) Un complejo cuerpo basal formado por un cilindro central y una serie de anillos alrededor y debajo del complejo.

El filamento tiene un tamaño por lo general de 20 nm de diámetro y usualmente consiste en cientos de copias de una proteína llamada flagelina, su peso varia de 30 a 80 KDa dependiendo de la especie bacteriana, las flagelinas se ensamblan para formar una estructura tubular con una longitud variable de 5 a 10 μm . este filamento es el propulsor de la bacteria que le permite moverse en el medio. La característica principal de este filamento es que cuenta con un espacio cilíndrico en su interior de aproximadamente 3 nm que se extiende por todo el filamento desde el espacio periplasmico del anillo MS hasta la punta del filamento (Macnab, 2003).

FUNCION	PROTEINA
Motor	MotA, MotB, FlgG (C-term)
Base	FliF, FliG (N-term), FliM/N
Maquinaria de exportación	FliH, FliQ, FliR, FliP, FliI, FliA
Eje de transmisión	FlgB, FlgC, FlgG, FliE
Gancho y adaptadores	FlgE, FlgL, FlgK, FlgD
Filamento	FliC, FliD

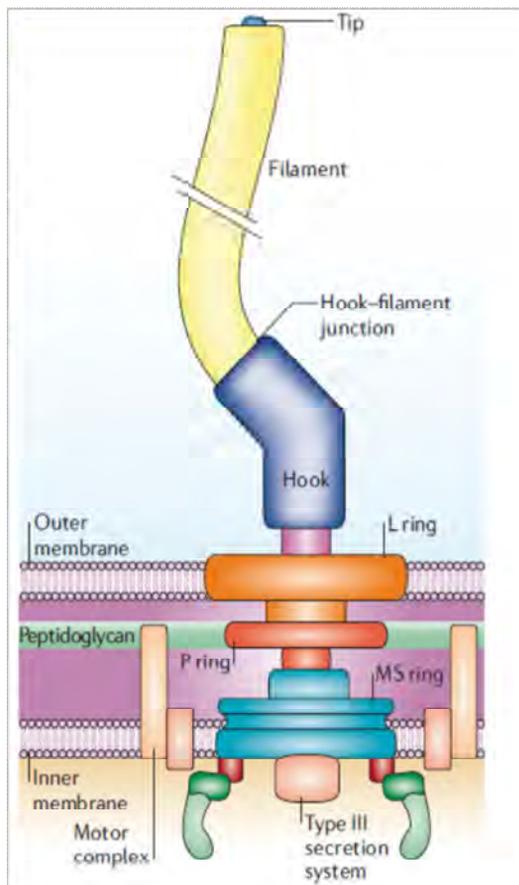


Figura 1.- Esquema general de las estructuras que conforman la estructura flagelar. (Pallen *et al* 2006)

Eje central.

La función del flagelo es generar movilidad, ésta a su vez está bajo el control de las señales ambientales. En *salmonella* se han descrito tres proteínas FliG, FliM y FliN, las cuales componen un eje que sirve para controlar la dirección de rotación del flagelo transmitiendo la rotación en su extremo exterior al gancho, este eje central está embebido en la membrana externa sujeta por el anillo L, en la pared está rodeada por el anillo P y en la membrana interna tiene su base en el anillo MS (Macnab, 2003).

Gancho

Para que la energía transmitida por el eje central se transmita con eficiencia para generar una fuerza impulsora, al complejo flagelar, presenta una estructura llamada gancho, el cual está compuesto por aproximadamente 130 subunidades de la proteína FlgE y su longitud es regulada por la unión de proteínas FlgK y FlgL a la punta del gancho durante el ensamble flagelar, este gancho intensifica la rotación del eje debido a su forma de escuadra con respecto a la superficie celular (Manson *et. al.* 1998).

Cuerpo basal

Es una estructura compleja que comienza en la envoltura celular y termina en el citoplasma. En general consta de un cilindro central que está conformado por los anillos L (membrana externa) compuestos de FlgH polimerizado, el anillo P (peptidoglicano) formado por FlgI y el anillo MS (membrana/ supramembrana) formado por FlgF. Por otro lado el cilindro central está formado por cuatro proteínas (FlgB, FlgC, FlgG y FlgF), siendo el componente principal la proteína FlgG, la cual está presente en 26 copias (Macnab, 2003).

El cuerpo basal es una estructura pasiva que recibe los impulsos del movimiento del motor y los transmite al gancho y de este al filamento (Osawa *et. al.*, 1994; Macnab 2003)

Motor flagelar

El motor opera por un mecanismo rotatorio que puede ser dividido en dos componentes principales: Estator o eje y el rotor. El estator consiste de copias múltiples de dos proteínas: Mot A y Mot B, arregladas alrededor del cuerpo basal. El estator no está unido covalentemente al péptidoglicano y permanece fijo en la célula. Las proteínas Mot forman un anillo de 11 monómeros alrededor del cuerpo basal funcionando no solo como una unión al péptidoglicano sino que también

forman un canal de protones que va del periplasma al citoplasma (Macnab, 2003; Vale, 2003).

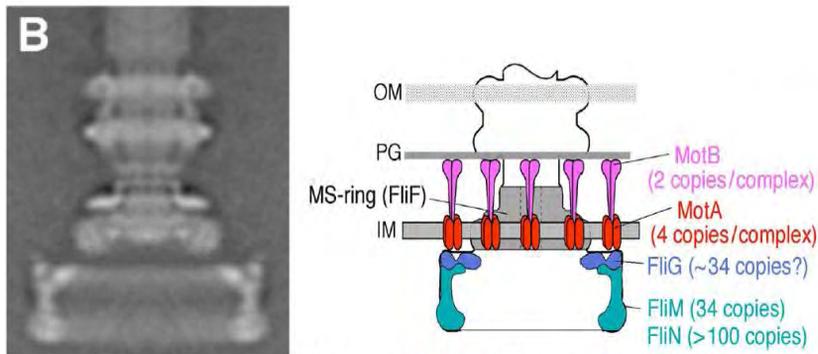


Figura 2:.-microfotografía del motor flagelar y su esquema, mostrando las proteínas estructurales que lo componen (Blair, 2003).

El rotor está conformado por un polímero de proteína FliG, que no está unido covalentemente al anillo MS y junto con las proteínas Mot generan el movimiento flagelar (Zhou *et al.*, 1998; Braun *et al.*, 1999).

El motor está impulsado por la fuerza motriz de una bomba de protones, es decir, por el flujo de protones (iones de hidrógeno) a través de la membrana plasmática bacteriana. Este bombeo se produce debido al gradiente de concentración creado por el metabolismo de la célula. El rotor puede girar a 6.000-17.000 rpm, pero el filamento por lo general sólo alcanza 200-1000 rpm (Atsumi *et al.*, 1992).

Los flagelos no giran a una velocidad constante, sino que aumentan o disminuyen su velocidad de rotación en relación con la fuerza motriz de protones, que se origina por el potencial transmembranal, eléctrico y químico. Las bacterias pueden alcanzar una velocidad de hasta 60 longitudes de célula/segundo a través del medio líquido. Aunque esto representa sólo 0,00017 km/h, al comparar esta velocidad con la de organismos superiores en términos de número de longitudes del cuerpo por segundo, es extremadamente rápido.

El más rápido de los animales terrestres, el guepardo, corre a una velocidad máxima de alrededor de 110 km/h, pero esto representa sólo alrededor de 25 longitudes de cuerpo/segundo. Por tanto, cuando el tamaño se tiene en cuenta, las células procarióticas que nadan a velocidades de 50-60 longitudes de cuerpo/segundo son en realidad mucho más rápidas que los guepardos (Berg, 2003).

Aparato exportador

La maquinaria de exportación está inmersa en la cara citoplasmática del anillo MS. El aparato exportador flagelar secreta las proteínas del gancho y flagelo las cuales se difunden hacia el tubo central del flagelo para su ensamble en la parte distal de la estructura creciente (Macnab, 2003; Vale, 2003).

Proteínas auxiliares y de unión

Proteínas FliD o capping. (fig.3) Estas proteínas se localizan en la punta del filamento en el crecimiento. En una etapa temprana del ensamble, las proteínas se localizan en la punta del gancho. Su función es proteger de la degradación a las estructuras en crecimiento (Macnab, 2003).

La cubierta FliD tiene la apariencia de un anillo de forma pentagonal que se sitúa en el extremo del filamento flagelar hueco. Cada una de las unidades del pentámero FliD, formado por cinco componentes, tiene una extensión que se dirige hacia abajo y que interacciona estrechamente con los monómeros del filamento. Sin embargo, existe una ligera desalineación.

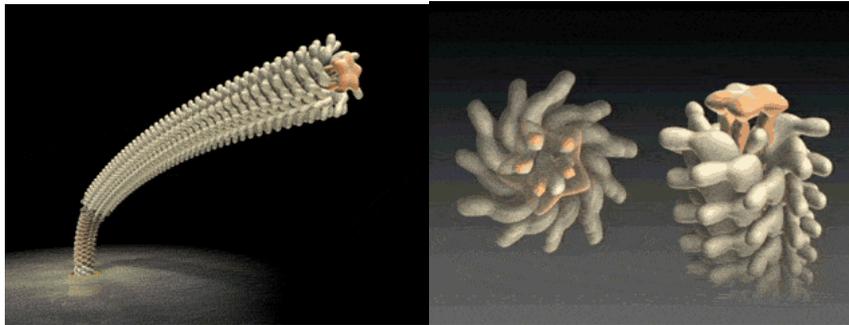


Figura.3:.-modelo computacional de la estructura de la proteína capping, además de su posición en el extremo distal del flagelo, este modelo pone en evidencia la función de la proteína. (<http://www.npn.jst.go.jp/movies/CapZoomUp.gif>)

La cubierta tiene 5 patas, pero el extremo del filamento tiene 5,5 subunidades de flagelina en su circunferencia. De modo que siempre hay una pequeña rendija en un punto entre la cubierta y el filamento. En esta rendija es por donde se añade la siguiente subunidad en el filamento en crecimiento. Al añadirse la siguiente subunidad en el espacio abierto, se imprime un giro a la cubierta de modo que se abre un nuevo espacio adyacente al que se acaba de llenar. Así, mientras la cubierta gira y gira, a 10 rotaciones por segundo, se van añadiendo nuevos monómeros de flagelina (FliC) uno por uno, 50 por segundo (Reidhaar *et al.*, 1990)

Entre el gancho y el filamento existen dos zonas de proteínas que son llamadas proteínas de unión, que funcionan como adaptadores estructurales ya que el gancho y el filamento tiene diferentes propiedades mecánicas, el primero como una unión universal y el segundo como un propulsor (Macnab, 2003).

Ensamble flagelar.

El flagelo bacteriano está relacionado con el complejo de poro y con el sistema de secreción de tipo III, una jeringa molecular que las bacterias utilizan para inyectar toxinas en otras células. Dada esta homología se piensa que tanto el flagelo como el sistema de secreción se han originado a partir del complejo de poro. Además, el sistema de secreción de tipo III parece ser una simplificación del flagelo, pues está formado por un subconjunto de componentes del flagelo (Macnab, 2003)

Los componentes del flagelo bacteriano son capaces de auto ensamblarse sin ayuda de enzimas o de otros factores. Tanto el cuerpo basal como el filamento tienen un hueco central, a través del cual las proteínas del flagelo son capaces de moverse a sus respectivas posiciones. Durante el montaje, las proteínas que forman el filamento se añaden a la punta en lugar de en la base. Figura 4

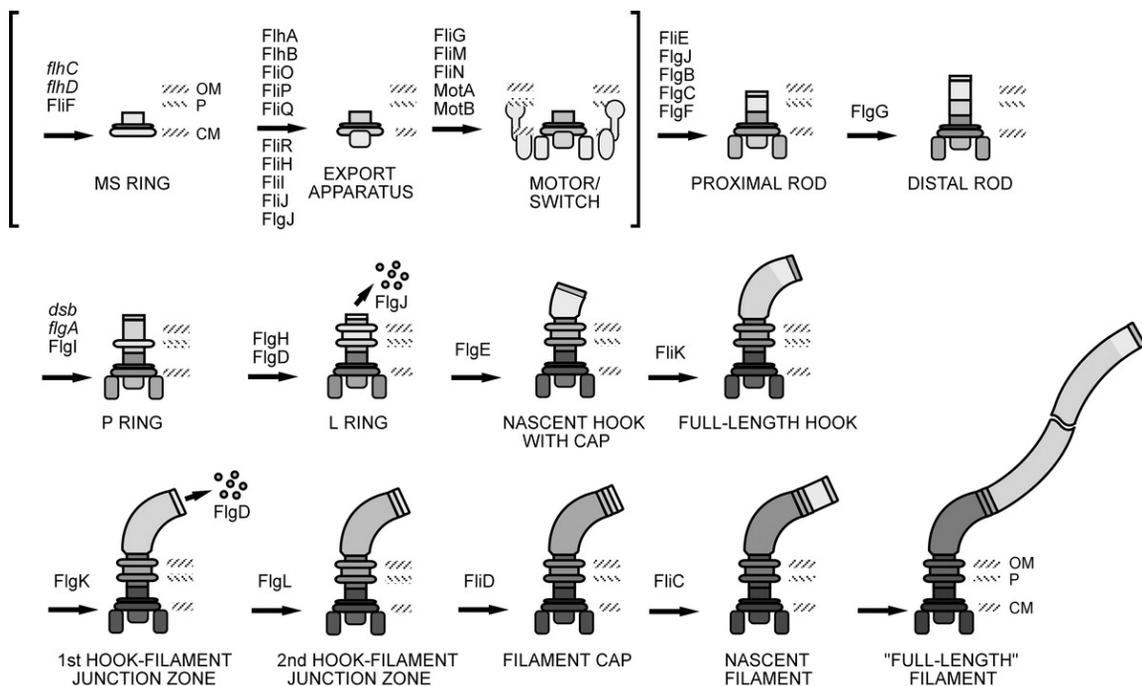


Figura 4.- Proceso de ensamblaje del flagelo bacteriano según Macnab, 2003.

La primera estructura que se forma es el anillo MS del cuerpo basal, el cual se forma por el auto ensamblaje de las sub unidades FliF, posteriormente se forma el anillo C cuyos componentes son FliG, FliM y FliN. Enseguida se forma un cilindro más delgado, formado por los componentes FlgB, FlgC, FlgF y FlgG esto ocurre por el poro formado por el anillo MS (Katayama *et al.*, 1996).

Enseguida se incorpora la proteína FlgD en la punta del cilindro actuando como andamio, el cual permite que la proteína del gancho FlgE inicie su polimerización que termina en la membrana externa, donde continua una vez que se hayan formado los anillo P y L; para eso un precursor de FlgI se ensambla y se une

fuertemente en el centro del cilindro seguido por FlgH el cual se une a la punta de el anillo P (FlgI). El ensamble de los anillos P y L requiere de FlgA y de la oxidación de dos cisteínas de FlgI, es además fundamental para continuar con el proceso que la proteína capping FlgD se exprese (Minamino *et al.*, 2003)

Una vez que el gancho ha sido terminado comienza la adición de sub unidades de flagelina (FliC) por medio de la incorporación con la unión de FlgL-FliD, llevando a la extensión del flagelo, la proteína FliD coordina el ordenamiento de las subunidades de FliC.

Función

El movimiento total de la bacteria es el resultado de la alternancia entre las fases de detención y natatorias. Si alguien observa la bacteria nadando en un entorno uniforme, el movimiento se ve como un paseo arbitrario, con un nado en línea recta interrumpido con detenciones arbitrarias que reorientan a la bacteria. Las bacterias como *E. coli* son incapaces de elegir la dirección en la cual nadan, y son incapaces de nadar en una línea recta por más de algunos segundos, debido a la difusión rotatoria. En otras palabras, las bacterias olvidan la dirección a la cual se dirigen. Dadas estas limitaciones, es extraordinario que las bacterias puedan dirigir sus movimientos y encontrar lugares favorables de alta concentración de atrayentes (habitualmente alimentos) y evadir los repelentes (habitualmente venenos) (Atsumi *et al.*, 1996).

En presencia de gradientes químicos, la bacteria realiza quimiotaxis o dirige su movilidad arbitraria basada en el gradiente. Si la bacteria siente que su movimiento va en la dirección correcta (hacia el atrayente y lejos del repelente) mantendrá su natación en una línea recta por un tiempo más largo antes de detenerse. Si su movimiento va en una mala dirección, se detendrá más rápido e intentará una nueva dirección al azar (aleatoria). De esta manera si encuentra la ubicación con mayor concentración de atrayentes (usualmente la fuente), es mejor. Incluso a altas concentraciones de atrayentes es capaz de distinguir hasta las más pequeñas diferencias en concentraciones (atrayentes/repelentes). La

función de escapar de los repelentes funciona con la misma eficiencia (Gotz *et al.*, 1982).

La naturaleza helicoidal del filamento flagelar individual es importante para que este movimiento ocurra. Así, como la proteína que forma el filamento flagelar, el flagelo es similar entre todas las bacterias flageladas. Sin embargo, hay bacterias que no siguen estas reglas. Muchas bacterias, como *Vibrio*, son monoflageladas y tienen este único flagelo en un polo de la célula. Su método de quimiotaxis es diferente al de bacterias que cuentan con más flagelos en más sitios de la superficie bacteriana. Otros poseen un solo flagelo que se mantiene dentro de la pared de la célula. Esas bacterias se mueven a través de un rodamiento de toda la célula, lo cual se parece al movimiento del sacacorchos (Kawagishi, *et al* 1996; Atsumi *et al* 1992).

Los gradientes químicos son detectados a través receptores transmembranales llamados "methyl accepting chemotaxis proteins" (proteínas quimio-tácticas que aceptan grupos metilo) (MCPs) estos receptores detectan una amplia variedad de moléculas. Estos receptores pueden unir atrayentes o repelentes directa o indirectamente a través de la interacción con proteínas del espacio periplásmico. Las señales de estos receptores son transmitidas a través de la membrana plasmática hacia el citosol, donde las proteínas CheY son activadas. Las proteínas CheY cambian las frecuencias de avance y giro del flagelo (Broek *et al.*, 1998; Bourret *et al*, 2002).

Disposición de los flagelos

Las bacterias tienen diferente número y localización de sus flagelos. Las bacterias monotricas presentan un solo flagelo (por ejemplo, *Vibrio cholerae*). Las bacterias lofotricas tienen múltiples flagelos situados en el mismo punto (o en dos puntos opuestos) que actúan en concierto para conducir a las bacteria en una sola dirección. En muchos casos, las bases de los múltiples flagelos están rodeadas de una región especializada de la membrana plasmática, denominada membrana polar. Las bacterias anfotricas tienen un solo flagelo en cada uno de los dos

extremos opuestos (un solo flagelo opera a la vez, permitiendo a la bacteria revertir rápidamente el movimiento cambiando el flagelo que está activo). Las bacterias peritricas tienen flagelos que se proyectan en todas las direcciones (por ejemplo, *Escherichia coli*) Figura 5. (Hans *et al.*, 1997)

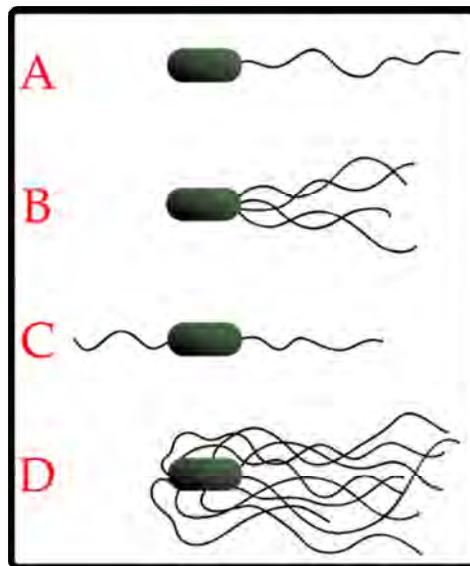


Figura 5.- Los diferentes tipos de disposición de los flagelos bacterianos: A-Monotrico; B-Lofotrico; C-Anfitrico; D-Peritrico. (Hans *et al.*, 1997)

En algunas bacterias, los flagelos se organizan fuera de la célula enroscándose helicoidalmente unos con otros para formar una gruesa estructura denominada fascículo. Otras bacterias como las espiroquetas tienen un tipo especializado de flagelo conocido como filamento axial situado intracelularmente en el espacio periplásmico, que produce la rotación de toda la bacteria para avanzar con un movimiento similar al de un sacacorchos. (Harshey, *et al* 1994, Atsumi *et al* 1992)

La rotación de los flagelos monotricos polares empuja la célula hacia delante con los flagelos atrás. Periódicamente, la dirección de rotación se invierte brevemente, produciendo un viraje en la célula. Esto se traduce en la reorientación de la célula. Cuando la bacteria se desplaza en una dirección favorable, el viraje es poco probable. Sin embargo, cuando la dirección del movimiento es desfavorable (por ejemplo, lejos de un producto químico atrayente), es más probable la realización

de un viraje, con la posibilidad de que la célula se reoriente así en una dirección favorable (Macnab,1999; Atsumi *et al* 1992).

En algunos *Vibrio* (en particular, *Vibrio parahemolyticus* (Kim *et al.*, 2000) y en las formas relacionadas de proteobacterias como *Aeromonas* coexisten dos sistemas flagelares codificados por diferentes conjuntos de genes e impulsados por diferentes gradientes de iones. Los flagelos polares se suelen utilizar cuando nadan en líquidos, mientras que los flagelos laterales entran en funcionamiento cuando los primeros experimentan gran resistencia al giro y proporcionan movilidad en fluidos viscosos o sobre superficies. (McCarter, 2004, Atsumi *et al* 1992).

3.-ANTECEDENTES.

En 1995 Girón JA, demostró por microscopia electrónica que *Shigella* cuenta con flagelos polares constituidos por una proteína de aproximadamente 38 KDa además describió que la expresión de flagelo estaba regulada por factores ambientales.

En 2003 Negrete-Abascal y colaboradores describieron las condiciones de motilidad *in vitro* de *Actinobacillus pleuropneumonie*, reportando una flagelina de 65 KDa que mostro 100% de identidad con las flagelinas de *E. coli*, *S. tiphy* y *Shigella*; además demostraron que contaba con los elementos genéticos necesarios para su expresión clonando y secuenciando el gen *fliC*.

García-Pérez en 2007; Determinó las condiciones de movilidad *in vitro* para *Pasteurella multocida* encontrando que la motilidad es afectada por el pH del medio, la temperatura del ambiente y presenta un requerimiento de dextrosa, fosfato y cloruro de sodio; se identifico una proteína de 38 KDa que tiene una identidad del 95% con otras flagelinas reportadas incluyendo la de *A. pleuropneumonie*.

En 2007 Serrano VA clono y caracterizo el gen *fliC* de *Avibacterium paragallinarum* un producto de aproximadamente 1500 pb que ya secuenciado presento una identidad de mas del 90% con las secuencias del gen *fliC* reportadas para *Actinobacillus pleuropneumonie* y *E. coli*. Además se purifico una posible flagelina de aproximadamente 73KDa, la cual al realizarle Western Blot, presento reacción cruzada con diferentes sueros antflagelinas.

4.- JUSTIFICACION.

Actualmente se ha ido vislumbrando el potencial patógeno que posee *G. anatis* se ha asociado a las grandes pérdidas económicas que sufre año con año la industria avícola nacional, es por ello necesario identificar y caracterizar los factores de virulencia involucrados y los mecanismos que le permiten a este microorganismo establecer una infección y desarrollar la enfermedad .

Dada la importancia del flagelo como factor de virulencia y como órgano de locomoción de las bacterias, además, que en la familia *Pasteurelanceae*, las bacterias *A. pleuroneumoniae*, *Av. paragallinarum* y *P. multocida* que habían sido descritas como no móviles, tienen flagelo, es probable que *G. anatis* exprese flagelo *in vitro* bajo ciertas condiciones ambientales.

5.- OBJETIVOS.

Objetivo general

Determinar las condiciones de movilidad *in vitro* de *Gallibacterium anatis*.

Objetivos particulares

- Determinar las condiciones de movilidad *in vitro* de *G. anatis*.
- Demostrar la presencia de flagelo en la superficie bacteriana por microscopía electrónica.
- Obtener la flagelina de *G. anatis*,
- Determinar la reactividad cruzada de la flagelina con sueros anti-flagelo.
- Determinar la identidad de la probable flagelina por MALDI-TOF.

5.- MATERIALES Y METODOS

Cepas utilizadas

Se utilizaron las cepas de *Gallibacterium anatis* F149^T, 12656-12 variedad hemolítica y un aislado de campo ESV-69 (C9) Para su conservación fue sembrada en placas de infusión cerebro y corazón (BHI) suplementado con agar al 1.5 %.

Selección de cepas móviles.

La selección de cepas móviles se realizó inoculando por punción las cepas de *G. anatis* en cajas con agar semisólido (infusión cerebro corazón (BHI) con 0.4 % de agar y 1% de suero de ternera. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h en condiciones de microaerofilia (Negrete-Abascal *et al.*, 2003). Una vez que se obtuvo un crecimiento radial, las colonias de la periferia fueron reinoculadas en medio semisólido. Este proceso se repitió hasta obtener crecimientos radiales en 2 o 3 días de incubación. Las bacterias obtenidas con estas resiembras fueron usadas para determinar las condiciones de movilidad *in vitro* y para hacer las observaciones en el microscopio electrónico.

Ensayos de movilidad

Primero se eligió el medio más adecuado para los ensayos de movilidad en tubo, para esto, las cepas seleccionadas se inocularon por punción en diferentes medios como BHI, TSB y LB, usando 0.2, 0.3, 0.35 y 0.4% de agar y se adicionó 1% de suero de ternera. Los tubos se incubaron a 37°C durante 72 h en condiciones de microaerofilia o en una atmósfera normal. Los tubos fueron revisados cada día, y el crecimiento fuera de la línea de punción se consideró como movilidad positiva (Adler, 1996).

Efecto de temperatura y pH sobre la movilidad

Una vez que se determinó que el medio BHI suplementado con 0.3% de agar y 1% de suero de ternera incubados en condiciones de atmósfera normal eran las condiciones más apropiadas para observar la movilidad de *G. anatis*, se procedió

a probar el efecto de la variación del pH en el medio en una escala de 5 – 10. También se probó el efecto de la temperatura en la movilidad de *G. anatis* para lo cual, tubos inoculados se incubaron a temperatura ambiente ($23\pm 3^{\circ}\text{C}$), 37, 39, o 40°C (Adler *et al.*, 1967; Girón, 1995; Holst *et al.*, 1997; Negrete-Abascal *et al.*, 2003).

Efecto de diferentes compuestos químicos sobre la movilidad

Al medio seleccionado se le agregaron diferentes sales: CaCl_2 en concentraciones de 2.5, 5.0 y 7.0 mM; MgSO_4 (2.0 y 40 mM); K_2HPO_4 (1.4, 2.0 y 4.1 mM); NaCl (85, 170, 256 y 341 mM) o Dextrosa (13, 27, 55 y 110mM), cada una de las cuales se probó por ensayo independiente en tubo (Lai *et al.*, 1997; Girón, 1995; Kerridge, 1960).

Purificación de la flagelina de *G. anatis*.

Para obtener la flagelina de *G. anatis*, las bacterias seleccionadas como móviles se crecieron en medio BHI por dos métodos diferentes: el primero en caldo adicionado con 1% de suero de ternera, y segundo en cajas adicionadas con 0.7% de agar, se cultivo en condiciones estacionarias a 37°C durante 24 h (Negrete-Abascal *et al.*, 2003). Las células se cosecharon y se resuspendieron en tris-HCl 20 mM con 25 mM de NaCl (pH 8.0). Las células fueron agitadas vigorosamente durante 10 minutos y se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 minutos para separar las células del flagelo liberado. El flagelo fue obtenido por centrifugación diferencial de acuerdo a la metodología descrita por Girón (1995).

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

El peso molecular de la subunidad monomérica del flagelo de *G. anatis* obtenida por centrifugación diferencial se determinó electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10% de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Después del corrimiento electroforético, los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.25% en metanol y ácido acético. Y se destiñeron en una solución de ácido acético al 10%.

Inmunoreconocimiento (western blotting)

Después de realizar el SDS-PAGE, se realizó una transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa durante 2 h a 280 mA con voltaje constante, pasado este tiempo la membrana se incubó toda la noche en el refrigerador en una solución de leche descremada al 5% en PBS-Tween 0.05%, para bloquear las uniones inespecíficas, posteriormente la membrana se lavó en agitación tres veces en PBS-Tween con el fin de retirar el excedente de leche descremada; después se incubaron en agitación durante 2 h con el primer anticuerpo; anti-flagelo de *E. coli* diluido en 1:1000 en PBS-Tween, esto también se realizó con los anticuerpos policlonales de conejo anti-flagelo de *S. typhimurium*, *Proteus mirabilis* y *A. pleuroneumoniae* (Negrete-Abascal et al., 2003).

Terminada la incubación se recuperó el anticuerpo y la membrana se lavó tres veces en agitación durante 10 minutos cada vez con PBS-Tween a temperatura ambiente. Enseguida la membrana de nitrocelulosa se incubó por 2 h en agitación a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa diluido 1:1000 en PBS-Tween, después se lavó 3 veces y se procedió a evidenciar el reconocimiento con una solución de Ácido fosfórico (50 mM, pH 7.4) que contenía Diaminobencidina (10 mg) y CoCl_2 y NiCl_2 , la membrana se sumergió en esta solución y se le agregó 30 μl de peróxido de hidrógeno, la reacción se detuvo con agua destilada; se utilizó como control positivo flagelo purificado de *E. coli* obtenido por el procedimiento descrito para obtener flagelo de *G. anatis*.

Identificación de la proteína probable flagelina.

La proteína purificada se envió para su análisis por espectrometría de masas (MALDI-TOF) a la Unidad de Proteómica del Centro de Investigación en Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto de Salud Pública del estado de Morelos.

Posteriormente se realizó un análisis *in silico* de los fragmentos obtenidos para determinar su identidad con alguna proteína flagelar ya reportada.

Microscopia electrónica.

Las bacterias seleccionadas como móviles y el flagelo purificado de *G. anatis* se fijaron con glutaraldehído al 5% durante 2 h y después se lavaron con PBS, para retirar el excedente de glutaraldehído, las muestras se colocaron en rejillas de cobre recubiertas con carbón y Formvar; se tiñeron negativamente con ácido fosfotúngstico pH 7.4 al 1% P/V y fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión JEM 2000 EX a 80 V (Negrete-Abascal *et al.*, 2003).

Anticuerpos policlonales

Para la obtención de sueros hiperinmunes contra la posible flagelina de *G. anatis* se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, de 0.25 Kg; proporcionadas por el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, las condiciones de mantenimiento fueron de acuerdo a la NOM-062-700-1999. Los roedores se inocularon por vía subcutánea: una inmunización y tres refuerzos cada una a intervalos de 2 semanas, la posible flagelina que se inoculó fue obtenida como se describió anteriormente y se separó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y se evidenció con una solución de KCl 0.5 M, en frío durante 5 minutos (Negrete-Abascal *et al.*, 2003) y se cortaron las bandas con proteínas de bajo peso molecular. Las bandas se trituraron y deshidrataron a 37° C por 24 h; de cada muestra se tomaron 200 µg y se resuspendieron en 150 µl de adyuvante completo de Freund (Sigma) para la inmunización o adyuvante incompleto (Sigma) para los refuerzos y 300 µl de agua destilada estéril (Mena *et al.*, 2004). Dos semanas después del último refuerzo, los roedores se anestesiaron con Pentobarbital sódico (40mg/Kg de peso corporal) administrado por vía intraperitoneal, para la obtención de la sangre de la vena cava, también se realizó un método similar con conejos en el Centro de Investigaciones en Ciencias microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

6. – Resultados

Ensayos de movilidad.

Previo a determinar las condiciones de movilidad *in vitro*, se seleccionaron cepas móviles. Por crecimiento en agar semisólido, observando el crecimiento radial en placa, esto se hizo variando el medio de cultivo y la concentración de agar así como la resiembra continua de las cepas, encontrándose que la forma de mantener a las cepas con el fenotipo móvil, es cultivarlas en medio BHI adicionado con 0.4% de agar y 1% de suero de caballo, resemebrando cada 48 horas (Figura 6), en concentraciones mayores de agar la movilidad se ve disminuida considerablemente.

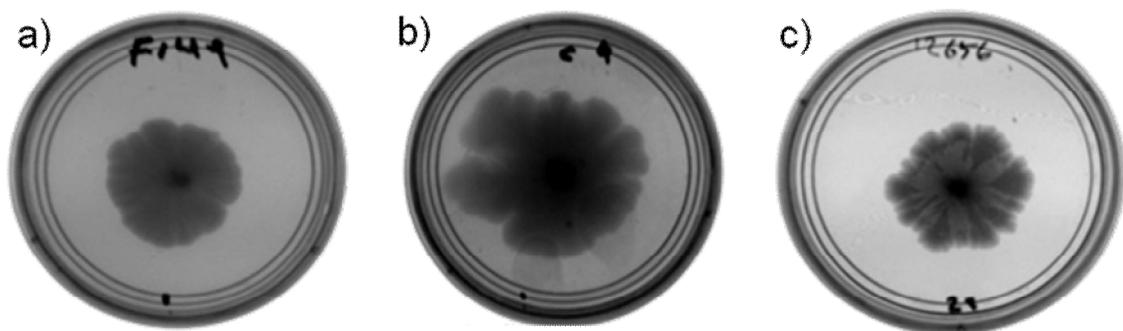


Figura 6.- Crecimiento radial de *G. anatis* (48 h) en medio BHI adicionado con agar al 0.4% y 1% de suero de ternera; a) *G. anatis* F149^T, b) *G. anatis* ESV-69 (C9) y *G. anatis* 12656-12.

Después de encontrar las condiciones para mantener el fenotipo móvil, se realizaron los ensayos para conocer las condiciones micro ambientales que favorezcan la movilidad, estos ensayos se realizaron en tubos, utilizando el siguiente criterio de evaluación: +++ muy móvil, ++ moderadamente móvil, + móvil, +/- escasamente móvil y – no móvil.

Comenzando primero con la concentración de agar en la que se probaron las concentraciones de 0.2%, 0.3%, 0.35% y 0.4%, los tubos se incubaron durante 48 hr revisándolos cada 12 hrs, encontrándose que la cepa ESV-69 mantiene su

capacidad de moverse en el medio aunque aumente la concentración de agar. Mientras que la cepa 12656-12 es la que menos se mueve aún a la más baja concentración de agar probada (tabla2).

Concentración de agar (%)	<i>G. anatis</i> <i>F149^T</i>	<i>G. anatis</i> <i>ESV-69</i>	<i>G. anatis</i> <i>12656-12</i>
0.2	++	++	+
0.3	++	++	±
0.35	+	++	±
0.4	+	+	--

Tabla 2.- movilidad *in vitro* después de 24 horas de incubación a 37°C en medio BHI adicionado con 1% de suero de ternera.

Una vez que se determinó que la concentración de agar del 0.3% es en la que se observa evidente la movilidad, se procedió a determinar como la temperatura influye en la movilidad probando incubar las cepas en temperaturas de 22, 35, 37 y 40 °C, encontrando que la temperatura es un factor importante en la expresión de la movilidad, variar la temperatura alrededor de los 37°C disminuye la movilidad considerablemente (tabla 3).

Temperatura (°C)	<i>G. anatis</i> <i>F149^T</i>	<i>G. anatis</i> <i>ESV-69</i>	<i>G. anatis</i> <i>12656-12</i>
22	--	--	--
35	±	±	--
37	++	++	±
40	±	±	--

Tabla 3.- movilidad *in vitro* después de 24 horas de incubación en medio BHI adicionado con 0.3% y 1% de suero de ternera.

Entre varios factores que se han reportado que favorecen la movilidad bacteriana, también esta la presencia de sales, que pueden funcionar como donantes de electrones, para que la maquinaria molecular que hace que el flagelo rote sobre su eje, funcione, para observar si favorecen a la movilidad se probaron: CaCl₂ en concentraciones de 2.5, 5.0 y 7.0 mM; MgSO₄ (2.0 y 40 mM); K₂HPO₄ (1.4, 2.0 y 4.1 mM); NaCl (85, 170, 256 y 341 mM), encontrando que NaCl y CaCl₂ favorecen de manera importante la movilidad, cada una de estas sales se probó por ensayo independiente en tubo (tabla 4).

Sales	<i>G. anatis</i> F149 ^T	<i>G. anatis</i> ESV-69	<i>G. anatis</i> 12656-12
KH ₂ PO ₄ (mM)			
1.4	+	++	--
2	+	+	--
4.1	±	+	--
NaCl (mM)			
8.5	±	±	--
17	±	±	--
25.6	+	+	--
34.1	++	++	±
Mg ₂ SO ₄ (mM)			
2	±	±	--
4	+	±	--
CaCl ₂ (mM)			
2.5	+	±	--
5	++	+	--
7	++	++	±

Tabla 4.- movilidad *in vitro* después de 24 h de incubación en medio BHI adicionado con 1% de suero de ternera; la cepa 12656-12 no muestra movilidad bajo la mayoría de estas condiciones.

El pH es un factor importante ya que estimula la quimiotaxis en el microambiente, se probó el efecto del pH sobre la movilidad de *G. anatis* variando el pH de 5 a 10 en el medio, encontrando que en pH básico favorece la movilidad en 2 de 3 cepas probadas, pH 7 y 8 son adecuados para ver la movilidad (tabla 5).

pH	<i>G. anatis</i> Cepa F149 ^T	<i>G. anatis</i> Cepa ESV-69	<i>G. anatis</i> Cepa 12656-12
5	±	--	--
6	±	±	--
7	+	++	±
8	+	++	--
9	--	±	--
10	--	±	--

Tabla 5.- movilidad *in vitro*, en la que se observa que el pH 7 es el mas adecuado para ver movilidad en las tres cepas probadas.

Por ultimo se probo la concentración de la dextrosa, que en *E. coli* se vio que era fundamental como fuente de carbono para que expresara flagelos, se probaron las concentraciones de 13, 27, 55 y 110 mM, se observo que a la concentración de 110 se veía disminuida la movilidad en las cepas suponiendo que una saturación de dextrosa no es favorable para la expresión de flagelo; Es una de las pocas variables en las que la cepa 12656-12 expresa movilidad aunque sea poca (tabla 6).

Dextrosa (mM)	<i>G. anatis</i> Cepa F149 ^T	<i>G. anatis</i> Cepa ESV-69	<i>G. anatis</i> Cepa 12656-12
13	++	++	±
27	±	±	--
55	±	--	--
110	--	--	--

Tabla 6.- valores de movilidad *in vitro* a concentraciones variadas de dextrosa.

Todas estas variables nos dan una idea de los factores ambientales que estimulan la expresión del flagelo y su movilidad, los ensayos son interpretables dentro de las 24 hrs de su inoculación, debido que a mas tiempo de incubación el medio tendían a deshidratarse lo que dificultaba su interpretación, como control positivo se utilizo a *E. coli enteropatogénica* como se muestra en la figura 7.

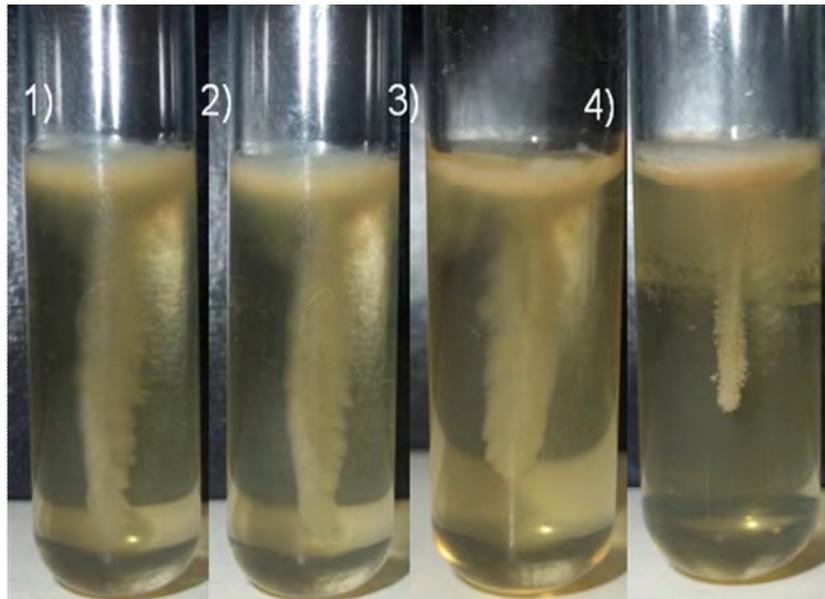


Figura 7.- Movilidad *in vitro* de *G. anatis* a partir de punción en tubo con medio BHI adicionado con agar al 0.4% y 1% de suero de ternera; 1) EPEC, 2) F149^T, 3) ESV-69 y 4)12656-12

Microscopia electrónica.

Para determinar la presencia flagelo en la superficie bacteria, se seleccionaron las cepas F149^T y 12656-12 por ser los representativos no hemolítico y hemolítico respectivamente. Por microscopia electrónica de transmisión se observó que ambas cepas expresan flagelos polares (Fig. 8)

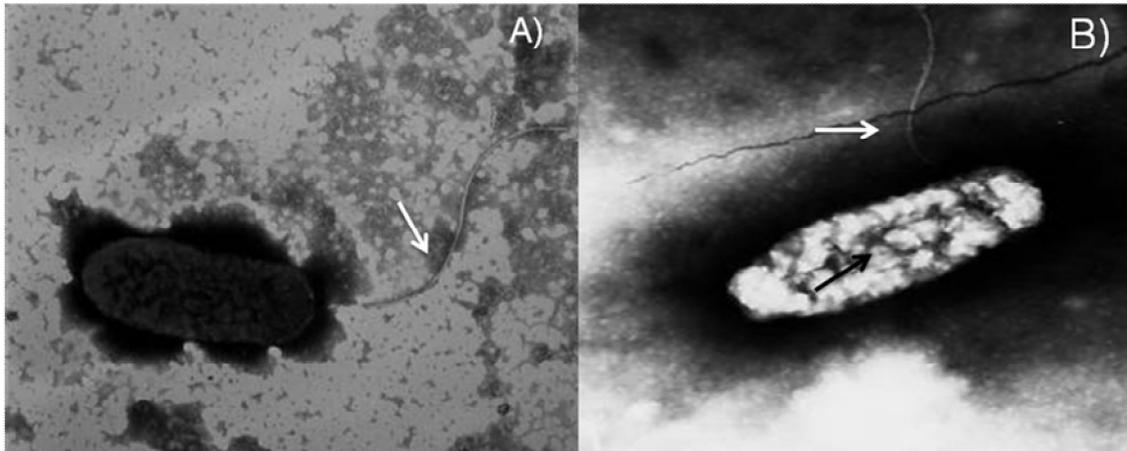


Figura 8.- Imágenes de microscopía electrónica de *G. anatis* teñidas con ácido fosfotúngstico al 1% en las que se observan flagelos polares. A) F149^T y B) 12656-12 variedad hemolítica.

Extracción y purificación del flagelo.

A partir de la cepa F149^T móvil seleccionada por resiembra en medio con baja concentración de agar, se obtuvieron diferentes proteínas en el rango de 20 a 150 kDa. (Fig. 8). De estas bandas, una de 60 kDa fue electroeluida para su posterior caracterización (Fig. 9)

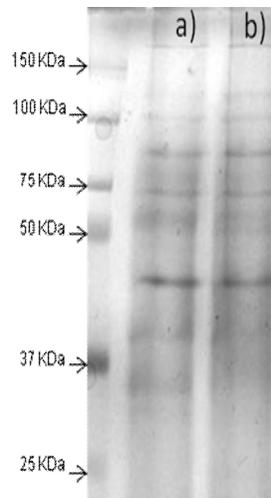


Figura 8. SDS-PAGE 10%: Patrón de proteínas obtenido a partir de la centrifugación diferencial de la cepa *G. anatis* F149^T y ESV-69 (C9); a) y b) respectivamente.

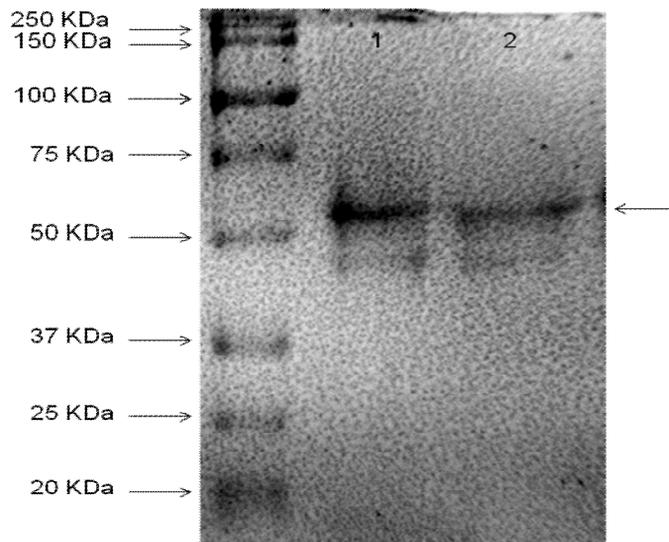


Figura 9.- SDS-PAGE 10% mostrando la posible flagelina de aprox. 60 KDa purificada por elución electroforética: 1) *G. anatis* F149^T y 2) *G. anatis* ESV69 (C9).

Inmunoreconocimiento.

Por electroelución se purifico la posible flagelina que se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para determinar su reactividad con anticuerpos dirigidos contra flagelo de *E. coli*. Encontrando que este antisuero la reconocía de igual manera que a la flagelina de *E. coli* utilizada como control positivo (Fig 10)

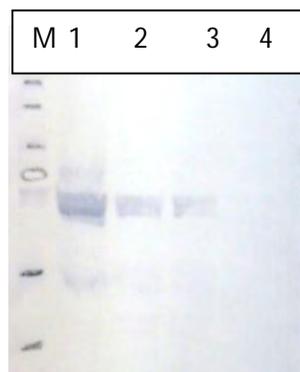


Figura 10.- Western blot de una proteína de aprox. 60kDa, reconocida por un anticuerpo policlonal contra flagelo de *E. coli*; M: marcador de peso molecular, (1): Flagelina de *E. coli*, (2): flagelinas putativas de las cepas de *G. anatis* F149^T, (3):ESV-69 y (4):12656-12.

Al comprobar que la proteína de aprox. 60 kDa es reconocida por el suero anti-flagelo de *E. coli* se procedió a probar el reconocimiento de la proteína por sueros contra flagelo de *Salmonella tiphy*, *Actinobacillus pleuroneumonie* y *Proteus miriabilis*, dado que la cepa 12656-12 no dio reconocimiento y en el gel SDS-PAGE, no se observo alguna proteína en ese peso se omitió de los ensayos posteriores, el resultado del inmunoreconocimiento se observa en la figura 11.

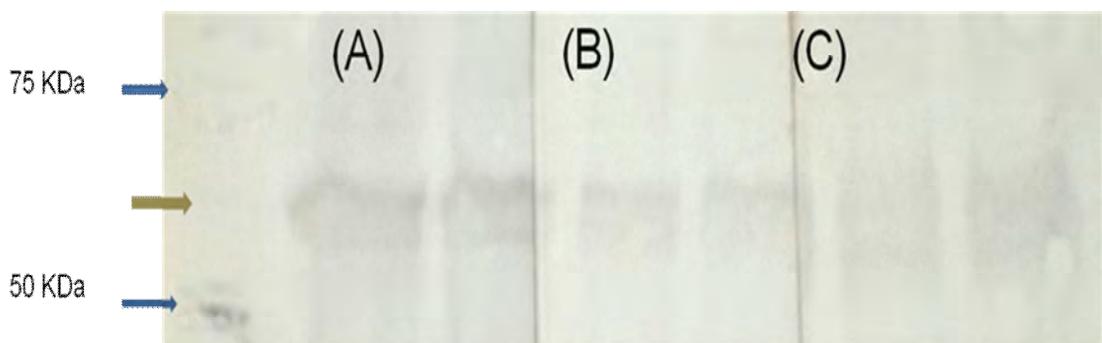


Figura 11.- inmunoreconocimiento de las proteínas de aprox. 60 KDa De *G. anatis F149^T* y *ESV-69* con sueros anti- flagelo de *S. tiphy* (A), *A. pleuroneumonie* (B) y *P. miriabilis* (C).

Por ultimo, después de lograr purificar una buena cantidad de proteína flagelar de *G. anatis F149^T* se inmunizaron ratas y conejos para que formaran anticuerpos contra el posible flagelo. Este anti-suero reconoció las proteínas de 60 kDa de *G. anatis F149^T* y *ESV-69*, así como una proteína de tamaño similar de *E. coli* usada como control positivo (Figura 12). Además de la banda de 60 kDa, también se observó reconocimiento de una banda de aprox. 35 kDa en las tres muestras.

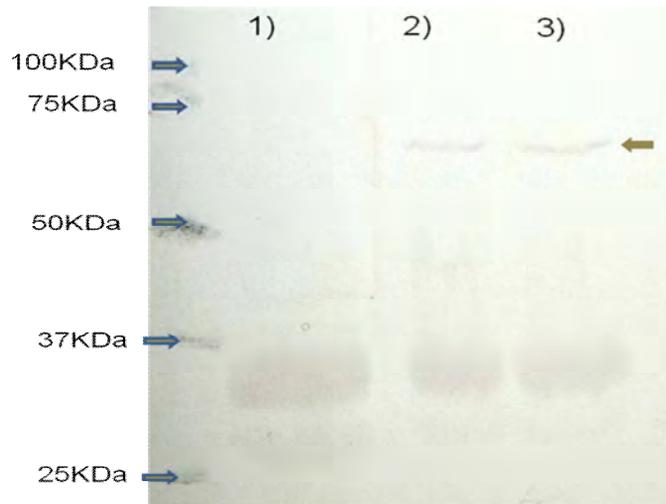


Figura 12.- Inmunoreconocimiento de las proteínas de aprox. 60KDa con suero Anti- proteína de 60KDa de *G. anatis* F149T hecho en conejo; 1) flagelo de EPEC (control positivo), 2) *G. anatis* F149^T y 3) *G. anatis* ESV-69.

Identificación de la posible flagelina y análisis *in silico*.

Después de analizar la muestra por MALDI-TOF se obtuvieron varios fragmentos peptídicos de los cuales los que dieron mejor score se les realizó un análisis *in silico*.

Fragmentos peptídicos con mayor score con la secuencia de FliC de <i>Clostridium chauvoii</i> .
NAQDGISLIQTAEGALSETHSILQR
LEHTINNLNTSSENLTAAESR
NNILSQAQAQAMLGQANQQPQGVLLR

Tabla 7.- fragmentos peptídicos obtenidos por análisis MALDI-TOF de la proteína de 60 kDa de *G. anatis* F149^T

7.- DISCUSION.

Muchos de los factores de virulencia descritos en las bacterias están reguladas por las condiciones que les ofrece su entorno ya sea en el medio ambiente o en las condiciones micro ambientales que le ofrezca su hospedero, también cabe mencionar que un patógeno debe ser capaz de invadir, colonizar y evitar al sistema inmune, muchos de estos factores de virulencia causan daño al hospedero, estos factores se expresan no con el afán de causar daño sino para obtener los nutrientes necesarios para reproducirse, la increíble capacidad de que una bacteria pueda adaptarse de un medio a otro con tanta facilidad es algo que aun sorprende y es motivo de un amplio interés científico (Soutourina *et al.*, 2001; Adler, 1996).

Un factor esencial en las infecciones es la habilidad de un patógeno invasor para multiplicarse exitosamente bajo condiciones adversas en el hospedero. Es por ello que la bacteria debe poseer los determinantes necesarios para la patogenicidad. Una vez dentro del hospedero, los patógenos tienden a moverse en diferentes medios ambientes como podría ser de la superficie de la mucosa al torrente sanguíneo o del exterior al interior celular; esto es importante por que no solo ayuda al entendimiento de la patogenicidad sino que por el conocimiento de estas habilidades nos ayudad a plantear medidas de prevención y tratamientos contra estos patógenos (Miller *et al.*, 1989).

La expresión de genes de virulencia esta estrictamente regulada y responde a estímulos ambientales tales como la temperatura, el pH y la disponibilidad de nutrientes, entre otros. Tal regulación permite la expresión oportuna de proteínas requeridas para el crecimiento y sobrevivencia de un microorganismo dentro de su hospedero, en coordinación con los cambios en las condiciones ambientales (Mekalanos, 1992).

En este trabajo se reportan las condiciones y características bioquímicas que permiten evidenciar la movilidad y la presencia de flagelo bacteriano en *G. anatis*, que como se ha demostrado previamente en diferentes microorganismos que los

primeros eventos de una infección, tales como la adhesión y la invasión, dependen al menos parcialmente de la expresión de fimbrias y flagelos (La Regione *et al.*, 2000; Van Hasten *et al.*, 2000).

Para *G. anatis* la expresión de flagelo *in vivo* es probable que le sea muy importante para lograr el acceso a los tejidos que esta bacteria coloniza. En algunas bacterias patógenas la expresión de organelos de superficie es vital para poder colonizar eficazmente por ejemplo, los cambios de temperatura influyen en la expresión del pilus tipo 1 en *E. coli*. (Wolf & Arking, 2002).

La única forma de lograr ver movilidad de *G. anatis in vitro* y la presencia de flagelo sobre su superficie, así como la obtención de la flagelina a partir de las células que la expresaban, fue la selección previa de cepas móviles, este proceso se hizo de manera similar a como lo realizaron en *A. pleuropneumoniae* (Negrete-Abascal *et al.*, 2003) encontrando que en ambas bacterias el medio BHI con una concentración de agar del 0.2-0.3 % favorece la movilidad, estos resultados también fueron similares a los reportados por Girón (1995) al estudiar la movilidad de diferentes cepas de *Shigella* reportando una concentración óptima de agar de 0.174%. Al variar la concentración de agar, la concentración de oxígeno en el medio, la disposición de nutrientes, así como la difusión de la temperatura y viscosidad, entre otras variables, también se verán afectadas (Kirov, 2003).

La movilidad mediada por flagelos se ha descrito de dos maneras: La movilidad natatoria en medio líquido (Swimming) y el movimiento ondulatorio en superficies sólidas o en medios viscosos (Swarming). La primera contribuye a la colonización bacteriana de la superficie celular del hospedero y juega un papel muy importante en la formación de biofilm, la segunda esta asociada con la diferenciación celular al fenotipo ondulatorio (swarmer) y depende de la incrementada expresión flagelar inducida en superficies sólidas y por alta viscosidad (Kirov, 2003).

La presencia de un flagelo polar sobre la superficie de *G. anatis* se determinó por microscopía electrónica de transmisión, observándose un flagelo polar que después de calcular sus dimensiones usando la escala de la microfotografía,

media aproximadamente 16 μm de longitud y diámetro de 10-20 nm; el cual es similar al reportado para *A. pleuropneumoniae* (Negrete-Abascal *et al.*, 2003) y *Pasteurella multocida* (García, 2007), ambas evaluadas en condiciones similares.

La expresión de flagelo esta altamente mediada por las condiciones del medio ambiente, por ejemplo en el caso de *E. coli* la movilidad se ve inhibida por la presencias de D-glucosa como fuente de carbono y por temperaturas elevadas (Adle *et al.*, 1967). Incluso se ha reportado que ciertas condiciones inhiben la movilidad como las altas concentraciones de carbohidratos, sales inorgánicas, alcoholes y altas temperaturas (Li *et al.*, 1993).

La temperatura juega un papel importante en la regulación de la expresión del flagelo, debido a que existe una variación entre el ambiente externo y el del hospedero, esto induce al patógeno a activar sus mecanismos de invasión y colonización; la mayoría de las enterobacterias presentan movilidad a 35°C, en otros casos como *Y. enterocolitica* y *Listeria monocytogenes* presentan movilidad entre 22 a 25°C y en algunos casos como *S. puliorum* a 42°C (Holt *et al.* 1997; Kerridge, 1960; Koneman *et al.*, 1983).

G. anatis presento movilidad a una temperatura de 37°C, en temperaturas superiores se ve disminuida pero no inhibida como fue el caso de la temperatura ambiente (22°C), aunque 37°C no corresponde con la temperatura corporal del pollo, organismo hospedero, que esta en un promedio de 41°C, es probable que *in vitro* tenga un efecto positivo sobre la movilidad, por que aunque en la temperatura de 40°C, se ve disminuida la movilidad, esto no quiere decir que no le favorezca pero *in vivo* las condiciones de humedad, son constantes y aunque *in vitro* se controla esta variable con el paso del tiempo de incubación la humedad del medio semisólido disminuía considerablemente haciendo del medio mas denso, dificultando la movilidad. (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 (Yakota *et al.*, 1970) y en el caso de *G. anatis* la

presencia de dextrosa en el medio favoreció su movilidad cuando estaba en una concentración de 13 mM, que fue la concentración mínima medida en este trabajo su aumento de concentración en el medio inhibía de forma creciente la movilidad a partir de la concentración 55 mM ya no había movilidad (tabla 5); esto sugiere que posiblemente el incremento de dextrosa en el medio afecte el metabolismo de la bacteria. En enterobacterias se ha visto que el aumento de dextrosa, decrece la concentración intracelular de cAMP, este decaimiento conduce a un efecto inhibitorio en la expresión del gen regulador *flhD*, regulador maestro en la síntesis flagelar (Hsin-Chih L. *et al.*, 1997).

En cuanto al requerimiento de sales se logro determinar que el NaCl y el K₂HPO₄ son compuestos que favorecen la movilidad de *G. anatis* sin embargo por los resultados obtenidos probando MgSO₄ es poco probable que sea determinante para favorecer la movilidad.

En el caso de NaCl se observo que al aumentar la concentración en el medio aumentaba la movilidad de *G. anatis*, siendo la concentración de 34.1 mM la concentración que mas estimulo la movilidad *in vitro*. Un caso similar fue la presencia de calcio en el medio, se observo que el CaCl₂ a una concentración creciente favorecía la movilidad de *G. anatis* siendo 7mM la concentración que en este estudio fue la máxima la que mas favorecían la movilidad de *G. anatis*. Es importante considerar el papel que tienen los iones en la regulación de la movilidad, pues como anteriormente se menciono, los motores flagelares son impulsados por los gradientes del potencial electroquímico de la membrana (Namba et al., 1997)

En cuanto a los ensayos de pH se determino como óptimo un pH de 7, unidades por arriba o por debajo de éste disminuían el movimiento (Tabla 4), se sugiere que esto tiene relación con los sitios u órganos que colonizan (Bojensen *et al.* 2004)

La probable flagelina de *G. anatis* coincide con el tamaño de las flagelinas reportadas para otros microorganismos. En este caso se observó una banda de aproximadamente 60 kDa para la cepa F149^T en comparación con el flagelo de *A.*

pleuropneumoniae que fue reportado de 65 KDa y para *P. multocida* de 40 KDa, se sabe que los pesos moleculares de estas proteínas varían de entre 30 hasta 80 KDa, entre diferentes microorganismos, incluso puede variar entre diferentes cepas del mismo microorganismo, (Brimer, 1998). A pesar de que en las microfotografías, la cepa 12656-12, muestra un flagelo polar, no se logró purificar una posible flagelina o al menos no fue reconocida por ningún anticuerpo, mas aun muestra poca o nula movilidad bajo las condiciones trabajadas, es probable que debido a que la expresión flagelar este altamente regulada por las condiciones ambientales y que en su formación participen mas de 50 genes, no se hayan completado los mecanismos moleculares que le den funcionalidad al flagelo, también que es probable que esta cepa, necesite mas concentración de oxígeno en el medio, siendo el crecimiento en tubo una limitante en comparación con el crecimiento en placa (Adler *et al.*, 1967; Girón, 1995; Holst *et al.*, 1997).

Como una forma de comprobar si la proteína obtenida era flagelina se procedió a corroborar por inmunoreconocimiento si la banda electroeluida de 60 KDa era reconocida por anticuerpos dirigidos contra flagelos de diferentes microorganismos. Esta flagelina mostro reactividad cruzada al usar suero anti-flagelina de *E. coli*, dando reconocimiento con este anticuerpo (figura 5); también se encontró reacción cruzada con los sueros anti-flagelo de *A. pleuroneumoniae*, *S. typhimurium* y *P. miriabilis*, (figura 6). Esto corrobora que las proteínas flagelares de diferentes microorganismos presentan epítomos conservados al tener regiones compartidas en el extremo N-terminal de la molécula, esta reactividad se corroboró al usar como control positivo flagelo de *E. coli* (Figura 7) (Macnab, Parkinson, 1991).

Los resultados del análisis MALDI-TOF y su posterior análisis *in silico* indican que efectivamente la proteína descrita es homologa a una tipo flagelar de *Clostridium chauvoei*, sin embargo no mostro un score aceptable con las secuencias de flagelo reportadas para *A. pleuroneumoniae* ó *Escherichia coli*.

8.-CONCLUSIONES.

A) Se demostró la movilidad *in vitro* de *G. anatis*. En base a los resultados se concluye que las cepas F149^T y ESV-69 de *G. anatis* contrariamente como se ha descrito en la literatura, son capaces de presentar movilidad *in vitro* y con esto se puede intuir que también lo haga *in vivo*, bajo condiciones microambientales de su hospedero que estimulen dicho movimiento.

B) La movilidad caracterizada para *G. anatis* en este trabajo es afectada por el pH del medio, la temperatura del ambiente, y presenta un requerimiento de dextrosa (13 mM), cloruro de sodio (30.1 mM) y cloruro de calcio (7 mM).

C) *G. anatis* expresa flagelos polares (aproximadamente 16 micras de longitud y diámetro de 10 a 20 nm) constituidos por una proteína monomérica de 60 KDa, la flagelina de *G. anatis* muestra una alta identidad con las secuencias de flagelinas reportadas para *Clostridium chauvoei*.

E) Este es el primer trabajo donde se demuestra la movilidad *in vitro* *G. anatis* y se reporta la identidad de la proteína flagelar con otras proteínas flagelares de otros microorganismos.

F) Estos resultados amplían el conocimiento de la capacidad patogénica de este microorganismo, ayudando al mejor entendimiento de los mecanismos de interacción con su hospedero.

REFERENCIAS.

- Adler, J. (1996). Chemotaxis in bacteria, *Science*. 153: 708-716.
- Adler, J. and Templeton, B. (1967). The effect of environment conditions on the motility of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 46: 175-184.
- Angen O., Mutters R., Caugant D. A., Olsen J. E. and Bisgaard M. (1999). Taxonomic relationships of the (*Pasteurella*) haemolytica complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia Haemolytica* gen. nov., comb. Nov., *Mannheimia glucosidal* sp. Nov., *Mannheimia ruminalis* sp. Nov. and *Mannheimia varigena* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 67-86.
- Atsumi T, McCarter L, Imae Y. (1992). Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion-motive forces. *Nature* 355: 182–184.
- Atsumi T, Maekawa Y, Yamada T, Kawagishi I, Imae Y, Homma M (1996). Effect of viscosity on swimming by the lateral and polar flagella of *Vibrio alginolyticus*. *J. Bacteriol.* 178 (16): pp. 5024–5026.
- Aldridge, P. & Hughes, K. T. (2002). Regulation of flagellar assembly. *Curr Opin Microbiol* 5, 160–165.
- Berg, H. C. (2003). The rotary motor of bacterial flagella. *Annu. Rev. Biochem.* 72:19–54.
- Bisgaard M., Christensen H., Bojesen A.M. and Christensen J.P.(2005). Avian infections caused by species of Pasteurellaceae, an update. 14th. World veterinary poultry congress. Istanbul, Turkey. Pag. 110-117.
- Blair, D. F. (2003). Flagellar movement driven by proton translocation. *FEBS Lett.* 545:86–95.
- Bojensen A. M., O. L. Nielsen J. P. Christensen and M. Bisgaard. (2004). In vivo studies of *Gallibacterium anatis* infection in chickens. *Avian Pathol.* 33: 145-152.
- Bourret, R. B., Charon, N. W., Stock, A. M. & West, A. H. (2002). Bright lights, abundant operons – fluorescence and genomic technologies advance studies of bacterial locomotion and signal transduction: review of the BLAST meeting, Cuernavaca, Mexico, 14–19 January 2001. *J Bacteriol* 184, 1–17.

Braun T. F., Poulson S, Gully J. B., Empey J., Van Way S. (1999). Function of proline residues of MotA in torque generation by the flagellar motor of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 181:3542-3551.

Broek A.V., Lambrecht M. and Vanderleyden J. (1998). Bacterial Chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonizacion by *Azospirillum brasilense*. Microbiology. 144: 2599-2606.

Castellanos L., Vazquez M., Carrido A., Compagarrido R. (2006). Protección conferida por una vacuna comercial contra *Gallibacterium anatis* en aves de postura comercial. Boletín técnico, año 5, num 11. Boehringer Ingelheim Vetmedica, S.A. de C. V.

Christensen H., Bisgaard M., Bojesen A. M., mutters R. and olsen J. E. (2003) Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, "*Actinobacillus salpingitidis*" or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. Nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. Int. J. Sys Evol. Microbiol. 53: 275-287.

García Pérez Rosa María. (2007). Determinación de las condiciones de movilidad *in vitro* para *Pasteurella multocida*. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Celular), Facultad de Ciencias UNAM.

García Gómez Elizabeth. (2004). Identificación y caracterización de proteínas secretadas por *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* aislada de pollo. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM.

Girón, J. A. (1995). Expression of flagella and motility by *Shigella*. Mol. Microbiol. 18:63-75.

Gotz R. Limmer N., Ober K. and Schmitt R. (1982). Motility a Chemotaxis in two strains of *Rhizobium* with complex flagella. J. Gen. Microbiol. 128: 789-798.

Hans G. and Zaborosch Ch. (1997). Microbiología General. Ed. Omega. 2ª ed. Barcelona España. Pag. 66-68.

Harshey, R. M. & Matsuyama, T. (1994). Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 8631–8635.

Holt, P. S. and Chaubal, L. H. (1997). Detection of motility and putative synthesis of flagellar proteins in *Salmonella pillorum* cultures. J. Clin. Microbiol. 35: 1016-1020.

Hsin-Chin L., Shu J. C., Ang S., Lai M. J., Fruta B., Lin S., Lu K. and Ho S. (1997). Effect of glucose concentration on swimming motility in enterobacteria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 231: 692-695.

Jacques M. and Mikael L. G. (2002). Virulence Factors of Pasteurellaceae, formidable animal pathogens. *A. S. M. News.* 68: 174-179.

Katayama, E., T. Shiraishi, K. Oosawa, N. Baba, and S. Aizawa. (1996). Geometry of the flagellar motor in the cytoplasmic membrane of *Salmonella typhimurium* as determined by stereo-photogrammetry of quick-freeze deepetchreplica images. *J. Mol. Biol.* 255:458–475.

Kawagishi, I., Imagawa, M., Imae, Y., McCarter, L. & Homma, M. (1996). The sodium-driven polar flagellar motor of marine *Vibrio* as the mechanosensor that regulates lateral flagellar expression. *Mol Microbiol* 20, 693–699.

Kerridge, D. (1960). The effect of inhibitors on the formation of flagella by *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* 23: 519-538.

Kim YK, McCarter LL (2000). Analysis of the Polar Flagellar Gene System of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 182 (13): pp. 3693–3704

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* 227: 680-685.

Lai, H. C., Shu, J. C., Ang, S., Lai, M. J., Fruta, B., Lin, S., Lu, K. T., and Ho, S. W. (1997). Effect of glucose concentration on swimming motility in *Enterobacteria* *Biochem. Biophys. Comm.* 231:692-695.

La Regione, R.M., Sayers, A.R. and Woodward, M.J. (2000). The role of fimbriae and flagella in the colonization, invasion and persistence of *Escherichia coli* O78:K80 in the day-old chick model. *Epidemiol. Infect.* 124: 351-363.

McCarter LL (2004). Dual Flagellar Systems Enable Motility under Different Circumstances. *J. Mol. Microbiol and Biotech.* 7: pp. 18–29.

Macnab, R. M. (1999). The bacterial flagellum: reversible rotary 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.

Manson M. D., Armitage J. P., Hoch J. A. and Macnab R. M. (1998). Bacterial Locomotion and Signal Transduction. *J. of Bacteriol.* 180:1009-1022.

- Mena R. E., C. Vázquez C., S. Vaca P., O García G., V. M. Pérez M., A. Pérez M., J. Ibarra C., M. de la Garza, E. Zenteno, E. Negrete A. (2004). Antigenic secreted proteins from *Haemophilus paragallinarum*. A 110-kDa putative RTX protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 232: 83-87.
- Mekalanos, J.J.(1992). Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* 174: 1-7.
- Miller, J. F., Mekalanos, J.J. and Falkow, S. (1989). Coordinated regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science.*243:916-922.
- Minamino, T. and Macnab, R.M. (1999). Components of Salmonella Flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J. Bacteriol.*181:1388-1394.
- Montes-García JF, López-Ochoa J, Vaca S, Vázquez C, Zenteno E, Pérez-Márquez VM and Negrete-Abascal E. (2011). *Gallibacterium anatis* produces an amyloid-like protein (en revision Avian pathology)
- Namba, K. (1997) Structure and Function of Macromolecular Assembly. Proceeding of the 22nd International Symposium, Division of Biophysics, The Taniguchi Foundation. (ed.)
- Namba K., Vonderviszt E. (1997). Molecular architecture of bacterial flagellum. *Quar. Rev. Biophys.* 30: 1-65.
- Negrete-Abascal, E., Reyes, M.E., García, R.M., Vaca, S., Girón, J. A., García, O., Zenteno E, and de la Garza, M. (2003). Flagella and motility in *Actinobacillus pleuroneumonie*. *J. Bacteriol.* 186:664-668.
- Osawa, K, Ueno, T. and Aizawa, S.I. (1994). Overproduction of flagellar switch protein and their interactions with MS ring complex in vitro. *J. Bacteriol.* 176:3683-3691.
- Pallen Mark J. and Matzke Nicholas J. (2006) From The Origin of Species to the origin of bacterial flagella. *Nature rev. Microbiol.* 4: 784-790.
- Reidhaar-Olson, J. F., & Sauer, R. T. (1990). Functionally Acceptable Substitutions in Two-Helical Regions of Repressor, Proteins: Structure, Function, and Genetics 7, 306-316.
- Soutourina, O. A., Semenova, E. A., Parfenova, V. V., Danchin, A. & Bertin, P. (2001). Control of bacterial motility by environmental factors in polarly flagellated

and peritrichous bacteria isolated from Lake Baikal. *Appl Environ Microbiol* 67, 3852-3859.

Unión Nacional de Avicultores, (2010).(<http://www.una.org.mx/>) consultado en marzo de 2010

Vale, R.D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*. 112:467-480.

Van Hasten, F.J. A. M., Hendriks, H.G.C.J.M., Koninkx, J.F.J.G., Van der Zeijst, B.A.M. and Gastra, W. (2000). Inactivation of the flagellin gene of *Salmonella enteric serotype enteritidis* strongly reduces invasion in to differentiated Caco-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett* 185: 175-179.

Vaca S., E. Monroy , L. Rojas, Sanchez P., Soriano-Vargas E., Bojesen Mike A. and Negrete-Abascal E. (2011) Adherence of *Gallibacterium anatis* to inert surfaces. *J. A. V. A.* 10(13): 1688-1693.

Vázquez M., Bojensen A., Mora R., and González C. (2005).Effect of *Gallibacterium anatis* challenge in the egg production in comercial and SPF birds under controlled conditions. 14th.World veterinary poultry congress. Istanbul, Turkey. Pag. 199.6.-

Wolf, D.M. and Arking, A. P. (2002). Fifteen minutes of fim: control type 1 pili expression in *E. coli*. *OMICS* 6: 91-114.

Yokota T. and Gots J. (1970). Requiriment of adenosine 3'-5'- cyclic phosphate for flagella formation in *Escherichia coli* and *Sallmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 103: 513-516.

Zhou, J., Sharp, L. L., Tang, H.L., Lloyd, S. A.,Billing, S. and Blair D.F. (1998). Function of protonable residues in the flagellar motor de *Escherichia coli*: a critical role for Asp 32 of MotB. *J. Bacteriol.* 180: 2729-2735.

