



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**“Identificación y purificación de una Hemaglutinina de
Gallibacterium anatis”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PRESENTA:

RAÚL JAVIER GÓMEZ GARCÍA

ASESOR: DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

2014



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.

Proyecto se realizó en el Laboratorio de Genética de la UMF

De la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM

Apoyado por

PAPIIT IN 222313

PAPCA FESI.

ÍNDICE

RESUMEN 1

INTRODUCCIÓN..... 2

PATOGÉNESIS.

CUADRO CLÍNICO.

DISTRIBUCIÓN.

TRANSMISIÓN.

CLASIFICACIÓN.

PROPIEDADES BIOQUÍMICAS.

TRATAMIENTO.

CARACTERÍSTICAS.

ANTECEDENTES..... 9

JUSTIFICACIÓN..... 11

OBJETIVOS..... 12

GENERAL.

PARTICULARES.

MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
CEPA BACTERIANA.	
CRECIMIENTO DE LA BACTERIA.	
OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS.	
PURIFICACIÓN DE HEMAGLUTININA.	
ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS (SDS-PAGE).	
INMUNO RECONOCIMIENTO (WESTERN BLOTTING).	
OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA HEMAGLUTININA.	
FIJACIÓN DE ERITROCITOS CON GLUTARALDEHÍDO.	
ENSAYO DE HEMAGLUTINACIÓN.	
RESULTADOS.....	18
DISCUSIÓN.....	26
CONCLUSIONES.....	28
REFERENCIAS.....	29
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	33

RESUMEN

Gallibacterium anatis es un cocobacilo Gram (-) miembro de la familia *Pasteurellaceae*. Es una bacteria que coloniza el tracto respiratorio superior y el aparato reproductor de las aves. Es la responsable de originar una notable reducción en la producción de huevo, tanto de gallinas de postura comercial como de reproductoras, debido a que causa lesiones como peritonitis, afecciones del tracto reproductor y nefromegalia. *G. anatis* se divide en dos biotipos: el biovar β -hemolítico y el biovar no hemolítico. Las bacterias del género *Gallibacterium* tienen la capacidad de aglutinar los eritrocitos de las aves y de los mamíferos; sin embargo, aún no se han identificado las hemaglutininas o receptores de la superficie de los eritrocitos que participan en la hemaglutinación. En este trabajo se demostró la actividad aglutinante de una hemaglutinina secretada por *Gallibacterium anatis*. Esta hemaglutinina se purificó a través de cromatografía de intercambio iónico, obteniéndose dos proteínas de aproximadamente 60 y 65 KDa. La probable identidad como hemaglutinina fue determinada usando un suero α -hemaglutinina de *Avibacterium paragallinarum*, el cual reconoció principalmente a la proteína de 65 KDa. Con la proteína purificada se realizaron ensayos de aglutinación con eritrocitos de pollo confirmando su actividad hemaglutinante. Para poder determinar la presencia de una proteína similar en los miembros de la familia *Pasteurellaceae*, se utilizaron sueros de animales infectados con *Gallibacterium anatis* y *Mannheimia haemolytica*. El reconocimiento inmune cruzado al usar otros sueros nos indica la presencia de proteínas similares producidas por diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae*, las cuales pueden constituir un inmunógeno común a diversos miembros de la familia.

Proyecto apoyado por PAPIIT IN222313 y PAPCA FESI, UNAM

Introducción.

Gallibacterium anatis

Gallibacterium anatis ha sido recientemente reclasificado en la familia *Pasteurellaceae* (Christensen, 2003); es un cocobacilo Gram (-) no móvil, encapsulado, β hemolítico o no, que forma colonias semitransparentes grisáceas y circulares con un tamaño de 1 a 2 milímetros de diámetro.

Gallibacterium spp. presenta las características típicas de un patógeno oportunista debido a que depende de factores de predisposición en su hospedero, como infecciones por virus, otras bacterias, parásitos, estrés o desbalances hormonales para producirle una enfermedad (Bojesen *et. al.*, 2003A).

Gallibacterium tiene un amplio espectro de hospederos, se ha aislado tanto de aves domésticas como de aves silvestres incluyendo pollos, pavos, gansos, patos, palomas, faisanes y perdices. A pesar de su naturaleza cosmopolita estudios previos indican que los pollos son su hospedero predominante. (Bojesen *et. al.*, 2004).

G. anatis se divide en dos biotipos: el biovar β -hemolítico y el biovar no hemolítico. La capacidad para lisar los eritrocitos es un fenotipo prominente de ciertos patógenos y la hemolisina producida es un factor de virulencia (Bager *et. al.*, 2013).

Patogénesis

A *Gallibacterium anatis* se le considera uno de los responsables de originar una notable reducción en la producción de huevo, ya que afecta especialmente el aparato reproductor tanto de gallinas de postura comercial (Neubauer, *et. al.*, 2009), como de reproductoras; ocasionándoles lesiones importantes en estos

órganos tales como atrofia de ovario con hemorragias y regresión del mismo, ruptura y deformación de folículos ováricos, oviducto no funcional con hemorragias, además de otras lesiones como peritonitis y nefromegalia (González-Pedrajo y Dreyfus *et. al.*, 2003).

La bacteria ha sido asociada a lesiones patológicas incluyendo salpingitis, peritonitis, septicemia, pericarditis, hepatitis, enteritis y lesiones en el tracto respiratorio, pero también ha sido considerada como oportunista puede ser parte de la flora normal del tracto superior respiratorio y del tracto inferior reproductivo (Zepeda *et. al.*, 2010).

Cuadro clínico

La enfermedad en las gallinas de postura se manifiesta entre las 22 y 35 semanas, mientras que en reproductoras es alrededor de las 40 semanas. En esta etapa se presenta descarga nasal, fiebre, crestas caídas y cianóticas, anorexia, diarrea verdosa-parda, en algunas ocasiones se han observado orejuelas ennegrecidas y hematomas en la región periorbital (<http://www.gallibacterium-anatis.com.mx>).

Distribución en el mundo.

En el mundo se ha identificado a *G. anatis* en gallinas reproductoras y en ponedoras en 16 países, en casi todos los continentes. Se ha reportado como flora indígena así como también en casos que presentan patología (Fig. 1).

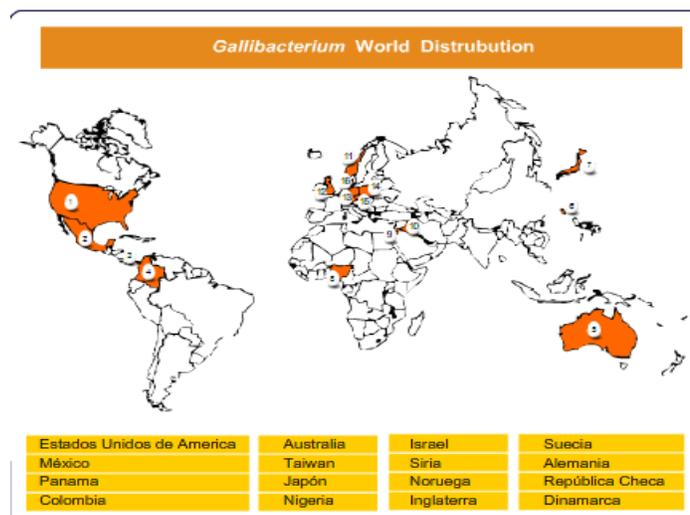


Figura 1. Distribución Mundial de *Gallibacterium anatis* (hasta 2006). Se enlistan los 16 países donde ha sido reportado. <http://www.gallibacterium-anatis.com.mx>

Distribución en México.

En México se ha detectado la presencia de 15 diferentes biovars (figura 2) de los 24 identificados, a su vez se incluyeron 3 nuevos biovars a la clasificación original, a los que se designó como biovars 25, 26 y 27, únicamente reportados en México. De los biovars identificados, los 3 más predominantes son: el biovar 13 presente en el 23% de los casos; el biovar 4 presente en un 20% de los casos y el biovar 11 presente en el 17% (Fig. 2).

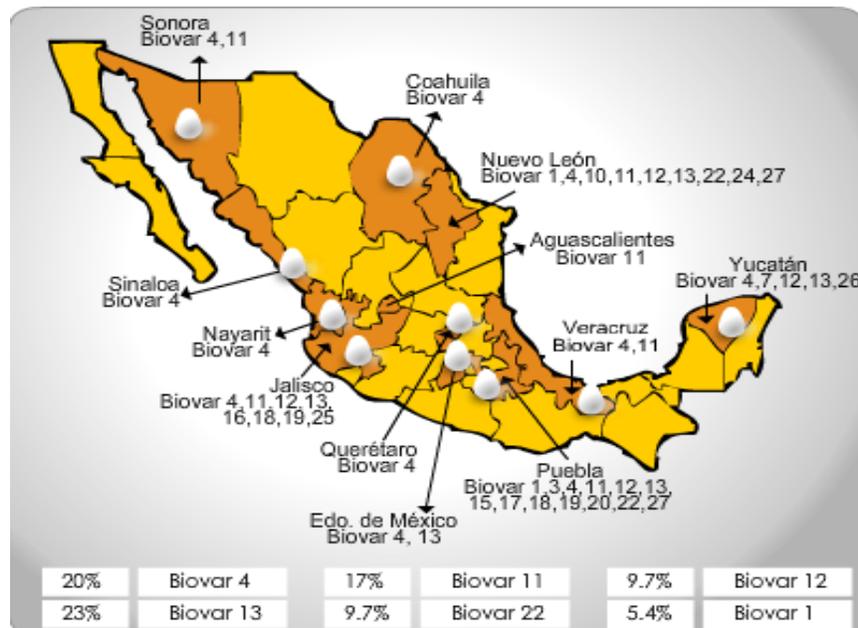


Figura 2. Distribución de *Gallibacterium anatis* en México. Se ha identificado en 11 estados. En los estados de Puebla y Monterrey es donde se han identificado el mayor número de biovares. <http://www.gallibacterium-anatis.com.mx>

En el año 2003 se logró la identificación de *G. anatis* *bv hemolítica* en 138 aislamientos a partir de explotaciones avícolas de los estados de Sonora, Sinaloa, Nuevo León, Jalisco, Querétaro, Veracruz, Estado de México, Puebla y Yucatán, y se estableció que el 80% de los aislamientos pertenecía al biogrupo 4, el 9% al biogrupo 1, el 7% al biogrupo 2, el 3% al biogrupo U y el 1% al biogrupo 7 (Casaubon *et. al.*, 2004).

Transmisión

Se ha demostrado que la prevalencia de *Gallibacterium* está relacionada con bajos niveles de bioseguridad en los sistemas de producción y que la transmisión de la bacteria se da de manera horizontal, descartando la posibilidad de que esto pueda ocurrir verticalmente, puesto que no se ha aislado la bacteria en los pollitos de gallinas infectadas (Bojesen *et. al.*, 2003B).

Clasificación

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

De acuerdo a los estudios de biología molecular realizados por Christensen y colaboradores, las bacterias identificadas anteriormente como *Pasteurella haemolítica like*, *Actinobacillus salpingitidis* y *Pasteurella anatis* pertenecen a un género diferente, por lo que fueron reclasificadas en el género *Gallibacterium* (Christensen *et. al.*, 2003).

Propiedades bioquímicas

Este microorganismo es catalasa (-), oxidasa (-) y fosfatasa (+). Reductor de Nitrato. La reacción en medio de Hugh-Leifson produce fermentación (+) D-glucosa. La prueba de aminopeptidasa para porfirina y alanina es positiva. Presenta formación de ácido sin gas de: glicerol, (-) D-ribosa, (+) D-Xilosa, (-) D-manitol, (-) D-fructosa, (+) D-galactosa, (+) D-glucosa, (+) D-manosa, sucrosa y rafinosa. Las pruebas de: o-nitrofenil- α -D-glucopiranosida (ONPG) p-nitrofenil, α -D-glucopiranosida (PNPG) son positivas. Es negativo el crecimiento simbiótico, las reacciones en citrato de Simmons, ácido-mucato, base malonato, H₂S/triple azúcar Fe (TSI) y crecimiento en presencia de KCN, Voges-Proskauer a 37°C y producción de ureasa (Christensen *et. al.*, 2003; Bisgaard *et. al.*, 2009).

Presenta resultados negativos con las pruebas de arginina deshidrolasa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, fenilalanina deaminasa, indol, gelatinasa y Tween 20 y 80. No forma pigmentos. No hay producción de ácido con m-erytritol, adonitol, (+) D-arabitol, xilitol, (-) L-xilosa, dulcitol, (+) D-fucosa, (+) L-rhanmnosa,

(-) L-sorbosa, celobiosa, (+) D-melobiosa, (+) D-melezitosa, (+) D-glicogen, inulina, aesculina, amidalin, arbutin, gentobiosa, salicin, (+) D-turanosa o β -N-CH₃-glucosamida. (Christensen et. al., 2003; Bisgaard et. al., 2009).

Las reacciones de p-nitrofenil β -D-glucopiranosida (NPG), o-nitrofenil α -L-fucopiranosida (ONPF), α -galactosidasa, ácido p-nitrofenil β -glucopiranosidurónico (PGUA), α -mnosidasa y o-nitrofenil β -D-xilanopiranosida (ONPX) también dan resultados negativos. Se observan variaciones en la reacción de rojo de metilo a 37°C, crece en agar MacConkey y presenta producción de ácido de (+) L-arabinosa, (-) D-arabinosa, m-inositol, (-) D-sorbitol, (-) L-fucosa, lactosa, maltosa, trehalosa y dextrina. La especie tipo es *Gallibacterium anatis*. (Christensen et. al., 2003).

Tratamiento

Recientemente, se determinó que algunos aislamientos de *Gallibacterium* son multi-resistentes a antibióticos. A partir de una colección de aislamientos de campo y cepas de referencia de *Gallibacterium* de México y Dinamarca, identificaron que el 63% de los aislamientos fueron resistentes a 3 o más antibacterianos, mientras que solamente dos aislamientos fueron sensibles a todos los antibióticos. Cabe señalar que la mayoría de las cepas mostró resistencia a la tetraciclina y al sulfametoxazol (92% y 97% de los aislamientos de campo y 67% y 42% de las cepas de referencia) (Bojesen et. al., 2011)

Características de la bacteria

Las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en distintos aspectos del ciclo de vida bacteriano (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003). En el caso particular de *G. anatis*, ha sido descrita la secreción de proteasas que degradan *IgG* de pollo, las cuales podrían tener una participación en la patogénesis (García-Gómez *et. al.*, 2005). Además, ha sido descrita la expresión de un probable receptor de siderófos en la superficie bacteriana, cuando la bacteria se incuba en un medio restringido de hierro (Rea, 2011). Y aunque este microorganismo es considerado como no motil, en condiciones de laboratorio se ha demostrado que presenta motilidad en medios semisólidos y por observaciones al microscopio electrónico de transmisión, se ha observado que posee flagelos (Montes García, 2012) y también expresa fimbrias en su superficie en la (Fig. 3) muestran las fimbrias de *G. anatis*. (Jaques M. Mikael LG. 2002).

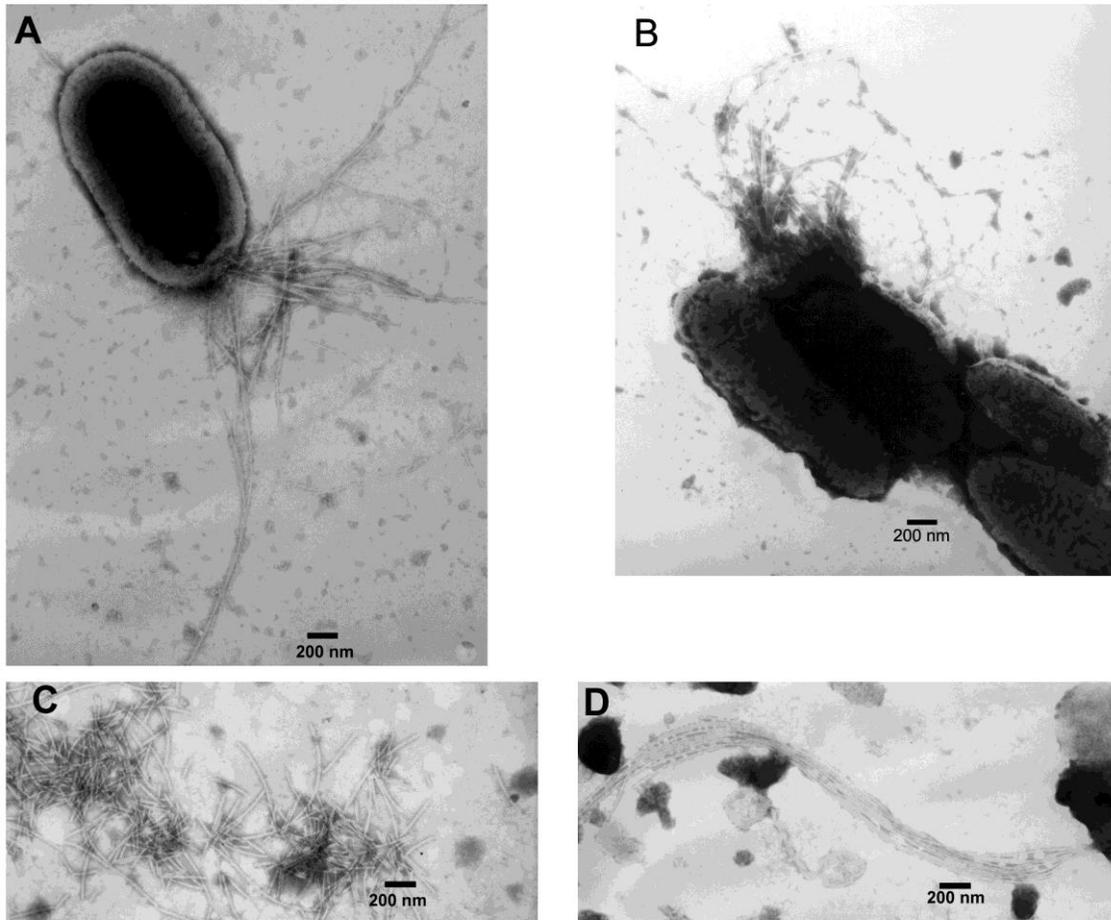


Figura 3. Fotografías de microscopía electrónica de *Gallibacterium anatis* F149^T presentando fimbrias sobre la superficie de la bacteria (A) y (B) y fimbrias concentradas por precipitación con PEG después de agitar a la bacteria (C) y (D). (Salgado Lucio, *et. al.*, 2012).

Antecedentes

Zepeda *et. al.*, (2009), determinaron la actividad hemoaglutinante de siete cepas de referencia de *Gallibacterium*, nueve mexicanas y tres aislamientos daneses, usando eritrocitos frescos de diferentes especies que incluyeron aves (pollo de engorda, gallos, gallinas de postura, pavo, paloma, codorniz, pato, halcón de

Harris y gorrión), bovino, oveja, caballo, perro, conejo, cerdo y humano (grupos A, B, AB y O; Rh+). Los resultados obtenidos indican que algunas cepas de *Gallibacterium* son capaces de aglutinar eritrocitos de ave, o de mamíferos como cerdos y bovinos. Sin embargo, los mecanismos y estructuras que median esta hemoaglutinación no se conocen.

Kristensen *et. al.*, (2011), demostraron la producción de una citotoxina por *G. anatis* 12646-12 activa contra diferentes variedades de células de pollo, incluida la línea celular de macrófagos (HD11). A esta toxina se le denominó GtxA y estos autores mostraron que es similar a toxinas RTX presentes en otros miembros de la familia *Pasteurallaceae*.

Vaca *et. al.*, (2011), evaluaron la propiedad de *G. anatis* para adherirse a superficies inertes como posible mecanismo para la formación de una biopelícula, así como la participación de proteínas en el proceso de formación de la biopelícula. La adhesión representa un paso crítico en la patogénesis, asegura la colonización de las células del hospedero por sus moléculas adhesinas.

Kristensen *et. al.*, (2011), investigaron la variación en la actividad hemolítica entre las diferentes especies de *Gallibacterium* y sus cepas. Encontraron que el gen *gtxA* está presente en los biovares hemolíticos y no hemolíticos. En las variantes no hemolíticas el gen *gtxA* está interrumpido por la inserción de otra secuencia. También se observó la existencia de un nuevo sistema de secreción necesario para la exportación de la toxina. Comprobando así que las diferencias en las

propiedades hemolíticas de las cepas pueden explicarse por los cambios genotípicos y su expresión diferencial.

Salgado-Lucio *et. al.*, (2012), demostraron que *G. anatis* F149^T expresa fimbrias que contribuyen a su adhesión a células epiteliales orofaríngeas de pollo y sugirieron que esta adhesión puede ser importante para la colonización del tracto respiratorio superior. Estructuras similares han sido descritas en la superficie de *G. anatis* 12656-12 variedad hemolítica; al analizar el genoma de esta cepa se encontraron 3 probables genes que codifican para fimbrias del tipo F17-like. La bacteria mutante en el gen *fffA*, el cual codifica para una de estas fimbrias, está atenuada en su virulencia para infectar aves sanas (Bager *et. al.*, 2013).

Justificación

La capacidad de colonizar tejidos e interactuar con diferentes células, le permite a un microorganismo establecer una comunicación con su hospedero, lo que le confiere así mismo una ventaja al adherirse y evitar ser eliminado por los mecanismos de defensa del hospedero. Es por ello que el conocimiento de los componentes involucrados en estos procesos es importante, ya que podrían permitir controlar el inicio o la interacción con células y/o tejidos, pudiendo con esto aliviar o evitar uno de los mecanismos tempranos de interacción hospedero-parásito.

Objetivos

General

- Aislar y purificar una probable hemaglutinina secretada por *Gallibacterium anatis* bv no hemolítica.

Particulares

- Obtener el patrón de proteínas secretadas de *G. anatis*.
- Evaluar diferentes métodos de precipitación y purificación de la probable hemaglutinina (HA).
- Obtener la probable HA de *G. anatis*.
- Inmunizar conejos con la probable HA.
- Determinar su reactividad cruzada con antisueros anti-HA de *Avibacterium paragallinarum*.

Material y Métodos

Cepa Bacteriana.

Se trabajó con la cepa de *G. anatis* F149^T. Esta bacteria forma parte del cepario del laboratorio de Genética de la Unidad de Morfología y Función de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM.

Crecimiento de la Bacteria.

La bacteria se precultivó en tubos con 5ml de BHI (infusión de cerebro y corazón) y se incubó durante 24 h a 37°C en agitación (175 r.p.m.). Para determinar la pureza de los cultivos, se inocularon placas de agar BHI y se incubaron a 37°C durante 24 h. Este precultivo se utilizó para inocular matraces (1:100) con 100 ml de BHI los cuales se incubaron a 37°C o 40°C durante 24 h.

Obtención de Proteínas.

Los cultivos fueron centrifugados durante 30 min (11 000 r.p.m.) y el sobrenadante libre de células se precipitó con sulfato de amonio (390g/L) durante 24 h en frío; posteriormente el precipitado se centrifugó durante 30 min (11 500 r.p.m. a 4°C). La pastilla obtenida se resuspendió con un volumen mínimo de buffer fosfato de sodio 50 mM NaCl 1 M pH 8. Posteriormente se centrifugó durante 30 min (11 500 r.p.m. a 4°C) se recuperó el sobrenadante y las muestras se concentraron.

Purificación de la hemaglutinina.

Para la purificación de la probable hemaglutinina, se utilizaron columnas de intercambio iónico (DEAE celulosa y CM celulosa) para preparar la resina para la columna, estas se activaron tratándolas con NaOH 1 M, enseguida se lavaron con abundante agua y posteriormente se trataron con HCl 0.5 M. Para eliminar el exceso de ácido se lavó varias veces con abundante agua. Posteriormente la resina fue tratada nuevamente con NaOH 1 M, y el exceso de éste se eliminó con agua destilada, finalmente la resina fue equilibrada con buffer de fosfato de sodio 50 mM / Urea 2 M pH 6.

Una vez concentradas las proteínas, se ajustaron a un pH de 6 (fosfato de sodio 50 mM / Urea 2 M) y se aplicaron a una columna de intercambio iónico. Las proteínas retenidas en la columna se diluyeron con el mismo buffer conteniendo diferentes concentraciones de NaCl (0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1 M). Las fracciones obtenidas se concentraron precipitando con metanol en frío. Las proteínas precipitadas se colectaron por centrifugación durante 5 min (14 000 r.p.m.). La pastilla se resuspendió en el mismo buffer. Por último para visualizar la posible HA se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida (Özcengiz *et. al.*, 2004. Voegel *et. al.*, 2010).

Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).

Para visualizar las proteínas (HAs) secretadas purificadas se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 10% de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970) posteriormente los geles se tiñeron con una solución

de Azul de Comassie R-250 al 0.25% en metanol, ácido acético y se destiñeron en una solución de ácido acético al 10%.

Inmunoreconocimiento (Western Blotting)

Para poder identificar las probables hemaglutininas secretadas por *G. anatis*, después de realizar la SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 2 h a 100 V. Después la membrana se bloqueó toda la noche en una solución de caseína al 5% en PBS-Tween 20. Enseguida la membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween a intervalos de 10 min, esto con el fin de retirar el excedente de caseína. Posteriormente la membrana se incubó durante 2h con el anticuerpo primario: α -Hemaglutinina A-1 de *Avibacterium paragallinarum*, suero de aves infectadas con *G. anatis*, suero de conejo infectado con *Histophilus somni*, suero de conejo inmunizado con probables hemaglutininas (60 y 65 KDa) de *G. anatis* y suero de conejos infectados con *Mannheimia hemolytica*, diluidos 1:1000 en PBS-Tween. Terminada la incubación se retiró el primer anticuerpo y la membrana se lavó tres veces con PBS-Tween. Después se incubó con el anticuerpo secundario: IgG de cabra α - conejo ó IgG de conejo α -pollo, marcados con peróxidasa, diluidos 1:1000 con PBS-Tween. Posteriormente se lavó 3 veces más con PBS-Tween y la reacción antígeno-anticuerpo se reveló con una solución de ácido fosfórico (50 mM pH 7.4), que contenía Diaminobencidina (10 mg) y CoCl_2 y NiCl_2 y 30 μ l de peróxido de hidrógeno, la reacción se detuvo con agua destilada. (Negrete *et. al.*, 1999).

Obtención de anticuerpos contra la hemaglutinina.

Se utilizaron conejos adultos, proporcionados por el Bioterio de la FES Iztacala, los cuales fueron mantenidos durante el periodo de obtención de anticuerpo bajo las condiciones señaladas en la NOM- 062- ZOO – 1999.

Los conejos se inocularon por vía subcutánea cada dos semanas con cuatro dosis en total. Para cada inmunización, los conejos se inyectaron con la proteína de 60 KDa secretada por *G. anatis* F149^T obtenida como se describió previamente. La proteína se mezcló con adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich) para la primera inmunización. Posteriormente se dieron 3 refuerzos con la misma cantidad de proteína, pero mezclada con una suspensión de Gelar; Aluminio, Magnesio y Dimeticona (Laboratorios Arlex) en lugar de adyuvante completo de Freund. Al término de este procedimiento los conejos se sangraron por punción cardíaca, el suero obtenido se recuperó y se conservó congelado hasta su uso. Con este suero se realizó un inmunoreconocimiento contra la hemaglutinina de 60 KDa de *G. anatis* F149^T y se probó su reactividad cruzada contra hemaglutininas de otras bacterias. Como control negativo se usó el suero pre-inmune del conejo y como control positivo suero contra hemaglutininas de *A. paragallinarum*. (Negrete *et. al.*, 1998).

Fijación de eritrocitos con glutaraldehído.

Los eritrocitos se prepararon según la técnica descrita por (Soriano *et. al.*, 2002) que consiste en la recolección de sangre completa de un ave en solución Alsever,

tres lavados con 0.15 M de NaCl. Posteriormente los eritrocitos se fijaron en una solución que contenía Na_3PO_4 (pH 8.2) (1 volumen) y 0.15 M de NaCl (9 volúmenes) en agua destilada (5 volúmenes) más 1% de glutaraldehído. Los eritrocitos fueron incubados en esta solución por 30 minutos a 4°C y lavados 3 veces con 0.15 M NaCl y posteriormente 5 veces con agua destilada. Al final se ajustaron los eritrocitos a una concentración de 1% en PBS con 0.01% de timerosal.

Ensayo de hemaglutinación

La capacidad hemaglutinante de la proteína purificada de *G. anatis* fue determinada como se describió previamente. Para ello se realizó una incubación de la proteína purificada con eritrocitos de pollo fijados con glutaraldehído al 1%, usando como diluyente PBS que contenía 0.01% de timerosal, con el método de micro-titulación. Se consideró como positivo a la aglutinación completa de los eritrocitos después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. Como controles positivo y negativo, se emplearon células completas (*G. anatis* 12656-12) y una suspensión de eritrocitos sin ninguna adición respectivamente. Los ensayos se realizaron por triplicado en dos ocasiones diferentes (Soriano *et. al.*, 2002; Zepeda *et. al.*, 2008).

Resultados

La cepa de *G. anatis* F149^T se cultivó en BHI líquido y en agar por 24 horas y se mantuvo por resiembra en placas de agar BHI adicionadas con 5% de sangre de conejo, cada semana. (Fig. 4).

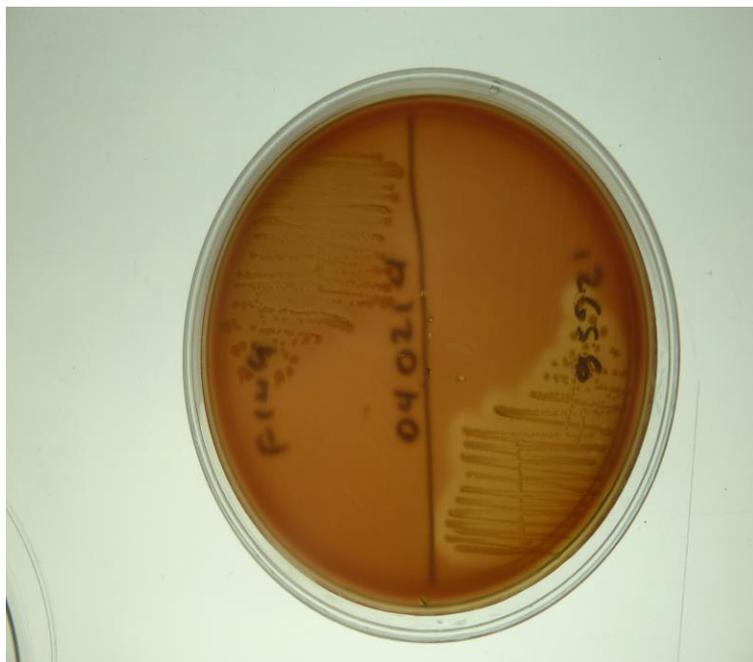


Figura 4. *Gallibacterium anatis* variedad no hemolítica (izquierda) F149^T en agar sangre y 12656-12 variedad hemolítica (derecha).

Para obtener la probable hemaglutinina de *G. anatis* se probaron diferentes metodologías que incluyeron la concentración de proteínas secretadas por precipitación con sulfato de amonio o metanol, proteínas de membrana externa y proteínas extraídas por tratamiento con fenol o por tratamiento alcalino (Fig.5). El crecimiento a 40°C produjo una mayor cantidad de la proteína de interés en los sobrenadantes de cultivo, por lo que todos los cultivos se incubaron a 40°C.

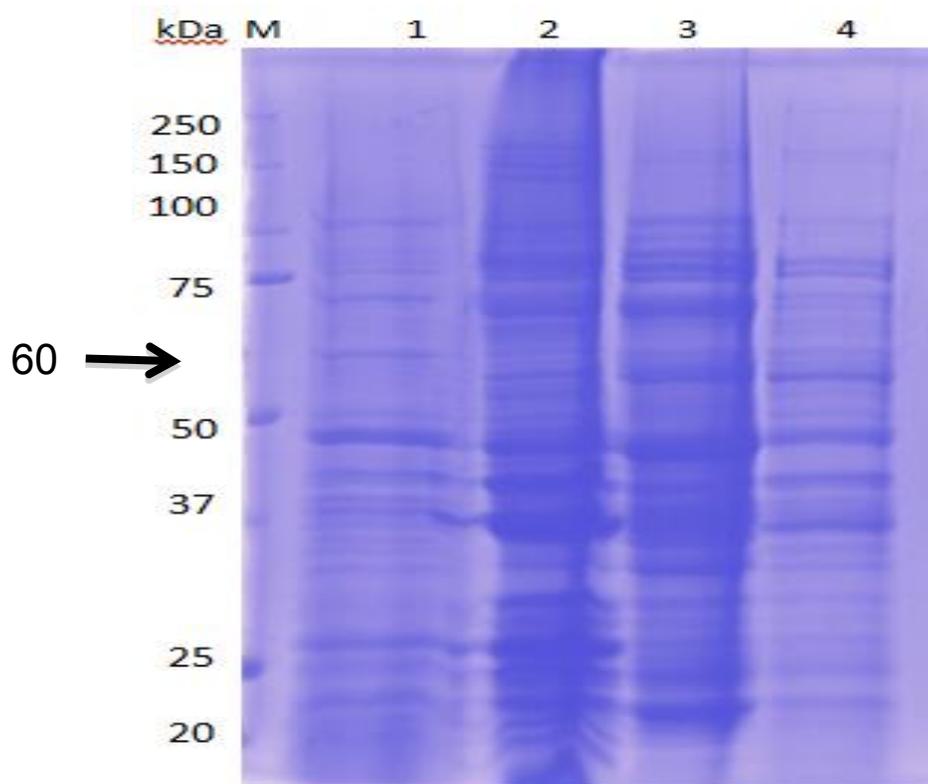


Figura 5. Gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie donde se muestra el patrón de proteínas de *G. anatis* F149^T obtenidas por diferentes metodologías: 1) Proteínas secretadas precipitadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70%; 2) Proteínas de membrana externa; 3) Proteínas secretadas tratadas con fenol y 4) Proteínas de membrana externa extraídas a pH alcalino.

Las proteínas secretadas por *Gallibacterium anatis* fueron concentradas por diferentes métodos de precipitación: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70% y etanol. Los patrones de proteínas obtenidos con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mostraron un peso que iba desde los 15 hasta los 250 KDa, la muestra precipitada con etanol mostro un rango de 25 a 250 KDa. Cuando las proteínas fueron precipitadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70% se obtuvo una buena cantidad de estas. Es por esto que el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fue el precipitante elegido para este estudio (Fig. 6).

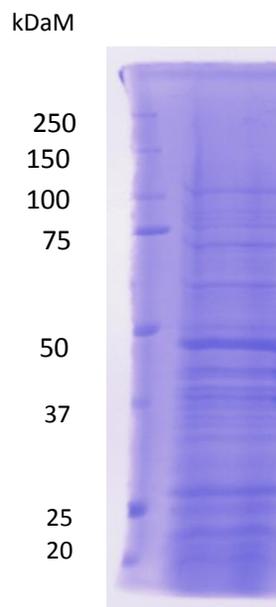


Figura 6. SDS-PAGE al 10% en el que se muestra el patrón de proteínas secretadas al crecer *Gallibacterium anatis* por 24 h a 37°C 1: Patrón de Proteínas precipitadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70%, M: Marcador de peso molecular.

El sobrenadante de cultivo libre de células se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 70% para concentrar las proteínas secretadas. Entre las proteínas secretadas que fueron expresadas a las 24 horas de crecimiento se encontraron dos proteínas de alrededor de 60 y 65 KDa, las cuales fueron purificadas utilizando la cromatografía

de intercambio iónico, después de eluir la muestra con diferentes concentraciones de NaCl, las proteínas se observaron purificadas como se aprecia en las fig. 7 y 8.

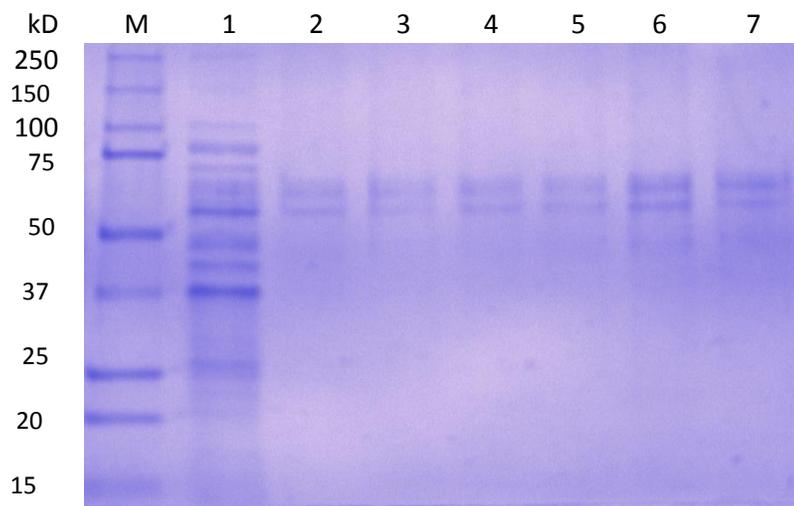


Figura 7. SDS-PAGE al 10% en la que se muestra la posible hemaglutinina secretada por *G. anatis*, purificada por cromatografía de intercambio aniónico (DEAE celulosa). M: Marcador de peso molecular; 1: muestra recuperada después de lavar la columna con buffer de fosfato de sodio/urea 2 M pH 6.0, 2: mismo buffer adicionado con 0.05 M de NaCl; 3: 0.1 M; 4: 0.2 M; 5: 0.3 M; 6: 0.5 M; 7: 1 M NaCl.

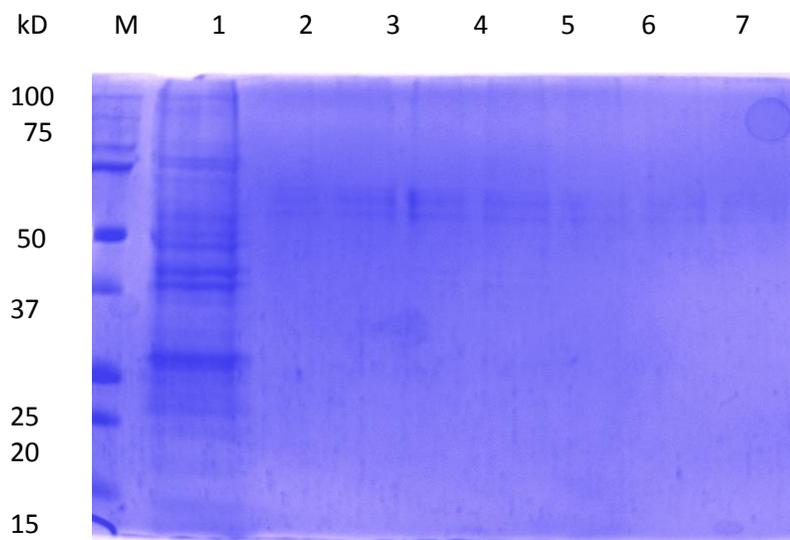


Figura 8. SDS-PAGE al 10% en la que se muestra la posible hemaglutinina secretada por *G. anatis*, purificada por cromatografía de intercambio catiónico (DEAE celulosa). M: Marcador de peso molecular; 1: muestra recuperada después de lavar la columna con buffer de fosfato de sodio / urea 2 M pH 6.0, 2: mismo buffer adicionado con 0.05 M de NaCl; 3: 0.1 M; 4: 0.2 M; 5: 0.3 M; 6: 0.5 M; 7: 1 M.

A partir de muestras aplicadas a columnas de intercambio iónico y la visualización de las mismas en geles SDS-PAGE al 10% se obtuvieron dos proteínas de aproximadamente 60 y 65 KDa, las cuales como se muestra en las fig. 7 y 8 se concentraron y se purificaron. Estas muestras fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa para realizar ensayos de inmunoreconocimiento (western blot) empleando los sueros descritos anteriormente, todos los cuales mostraron un inmunoreconocimiento de las proteínas purificadas (Fig. 9). Habiendo obtenido reconocimiento de estas dos bandas (probables hemaglutininas de *G. anatis*). Con estas dos proteínas purificadas se inocularon los conejos. Los sueros de conejo inmunes reconocieron también a las proteínas. Mientras que el suero pre-inmune no mostró reconocimiento (Datos no mostrados).

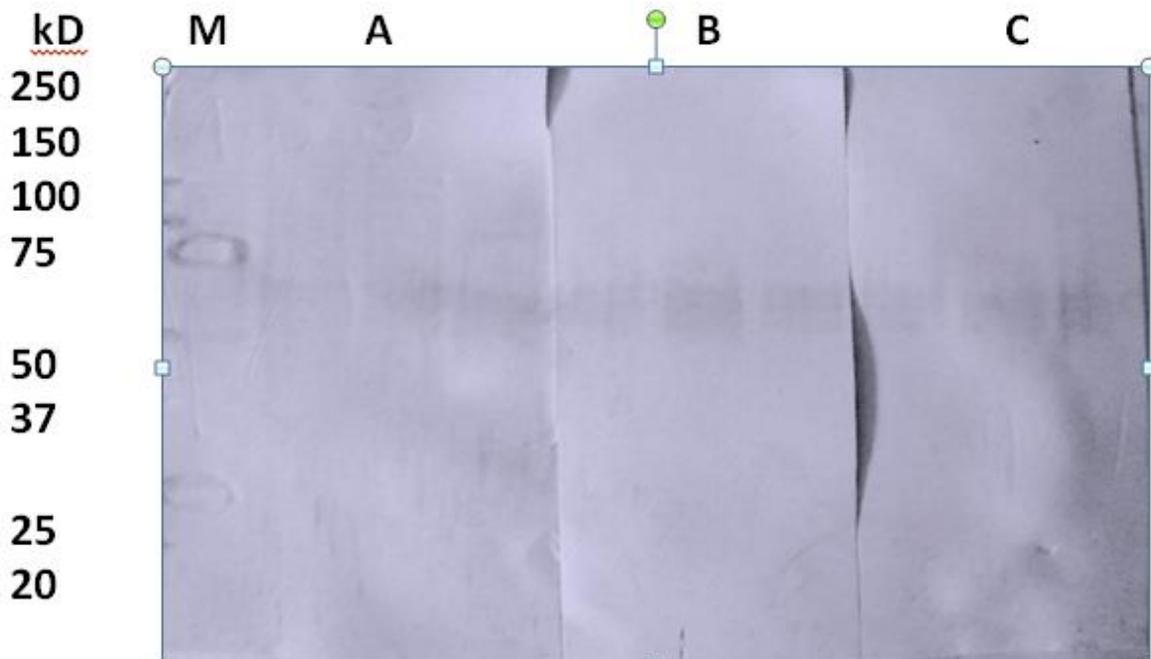


Figura 9. Inmunoreconocimiento de dos muestras (probables HA) diferentes purificadas por cromatografía de intercambio iónico al usar sueros A) anti-HA de *Avibacterium paragallinarum*; B) suero de aves infectadas con *G. anatis* y C) suero de aves infectadas con *A. paragallinarum*.

Como esta proteína se expresaba tanto a 37°C como a 40°C, se obtuvieron muestras de *G. anatis* F149^T a ambas temperaturas. Habiendo observado que esta proteína también era reconocida por sueros de otros microorganismos miembros de la familia *Pasteurellaceae*, se obtuvo una muestra, procesada de la misma manera pero de la bacteria *M. haemolítica* incubada a 37°C o 40°C, se realizó un inmunoreconocimiento utilizando sueros de aves infectadas con *G. anatis* y sueros de conejos, infectados con *M. haemolítica* y en ambas muestras, de ambos microorganismos se reconoció tenuemente dos proteínas del mismo peso molecular con ambos antisueros (Fig. 10) aunque predominantemente, fue reconocida la proteína de aproximadamente 65 KDa.

1 2 3 4 5 6 7 8



Figura 10. Inmunoreconocimiento de una proteína de aproximadamente 65 KDa en muestras provenientes de *G. anatis* F149^T (carriles 1 y 2; 5 y 6) y de *M. haemolytica* (carriles 3 y 4, 7 y 8) de muestras obtenidas a 37°C (carriles 1, 3, 5 y 7) o 40°C (carriles 2, 4, 6 y 8) en presencia de sueros de aves infectadas con *G. anatis* (carriles 1-4) o *M. haemolytica* (carriles 5-8).

Habiendo confirmado que las proteínas purificadas eran reconocidas por sueros anti-HA de *A. paragallinarum* y que eran reconocidas por sueros de aves enfermas infectadas con *G. anatis* o *A. paragallinarum* o de conejo infectados con *M. haemolytica*, se procedió a realizar un ensayo de hemaglutinación, usando como control positivo a células de *G. anatis* 12656-12. Los resultados obtenidos (Fig. 11) muestran que de la misma manera que la bacteria completa, la proteína purificada aglutina eritrocitos de pollo, confirmando con esto su función como hemaglutinina.

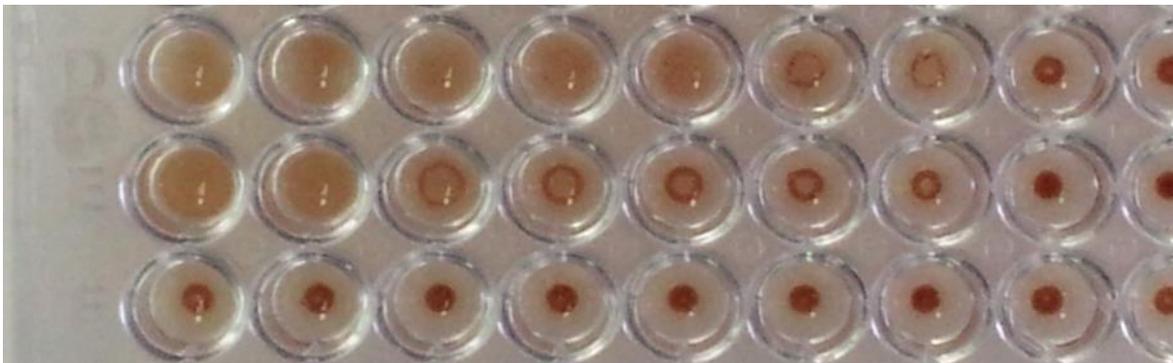


Figura 11. Ensayo de aglutinación empleando eritrocitos de pollo: Línea 1: Probable hemaglutinina de *G. anatis* F149^T purificada por columna de intercambio iónico. Línea 2: muestras de *G. anatis* 12656-12. Línea 3: eritrocitos de pollo.

Discusión.

Durante su crecimiento las bacterias pueden liberar una variedad de enzimas extracelulares o productos, algunos de los cuales son de vital importancia en la patogénesis. En algunos estudios se ha confirmado que existe una relación entre la fase de crecimiento bacteriano y la secreción de algunas proteínas (Maudsley y Kadis, 1986).

El entendimiento de la patogénesis de una bacteria, requiere la caracterización de sus diversos factores de virulencia. Para estudiar el papel que juegan los exoproductos de una bacteria en su virulencia es necesario purificarlos y caracterizarlos.

La purificación de la probable hemaglutinina de *G. anatis* F149^T se llevó a cabo evaluando previamente diversas metodologías para su obtención, con las cuales se trataba de obtener muestras que la contuvieran en mayor concentración, con menos proteínas adicionales, que el procedimiento fuese reproducible o más sencillo. De los métodos probados: precipitación con sulfato de amonio con metanol o con fenol, se eligió al primero, debido a que los productos obtenidos mostraron mayor reproducibilidad en número, concentración y debido también a que el sulfato de amonio es fácil de eliminar.

Después de la purificación de las proteínas en una columna de intercambio iónico, en el gel resultante de la SDS – PAGE observamos dos proteínas: una de 60 KDa y la otra de 65 KDa, que corresponden a la posible hemaglutinina filamentosa de manera similar a como fue reportado para la hemaglutinina de *Bordetella pertussis* purificada por (Özcengiz *et. al.*, 2004) mediante cromatografía en columna de intercambio iónico con un buffer con urea. Las proteínas extracelulares como las hemaglutininas filamentosas son proteínas altamente hidrófobas y son solubles sólo en medios de fuerza iónica elevada o en presencia de urea 2 M.

Las hemaglutininas han sido descritas como factores de virulencia de diferentes patógenos microbianos, por ejemplo de *Avibacterium paragallinarum* o *Pasteurella multocida* al infectar aves de corral (Rhoades *et. al.*, 1984; Blackall y Soriano, 2008).

Al realizarse los ensayos de reactividad cruzada (Western Blot) se obtuvo un inmunoreconocimiento de las proteínas de 60 y 65 KDa en presencia de los sueros empleados (dirigidos contra *A. paragallinarum* o *M. haemolytica*). Este resultado sugiere que las proteínas de *G. anatis* F149^T que se purificaron en este trabajo poseen la capacidad para producir una respuesta inmune en el hospedero y que ellas o alguna otra similar, son también expresadas por diversos miembros de la familia *Pasteurellaceae*. Este resultado sugiere también que estas dos proteínas podrían utilizarse como un inmunógeno para tratar de proteger a las aves contra la infección por varios patógenos de la familia *Pasteurellaceae*, toda vez que aparentemente se trata de un antígeno compartido por varios de ellos (*G. anatis*, *A. paragallinarum* y *M. haemolytica*).

Aunque *G. anatis* ha sido reportado como parte de la flora normal de diversas aves, diferentes reportes indican que *Gallibacterium* puede ser patógeno, ya que ha sido aislado de una gama de lesiones patológicas en aves de corral (Hacking y Pettit, 1974; Rhoades y Rimler, 1984; Shaw *et. al.*, 1990; Bojesen *et. al.*, 2004). El aporte principal de este trabajo es la demostración de que *G. anatis* produce hemaglutininas que comparten epítomos con proteínas de otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* que inducen una respuesta inmune, por lo que podrían utilizarse para preparar una vacuna polivalente para proteger a las gallinas contra la infección por estos patógenos.

Conclusiones

Gallibacterium anatis induce la expresión de una posible HA.

Se logró la purificación de dos proteínas (probables hemaglutininas) de aproximadamente 60 y 65 KDa.

Las proteínas purificadas como HAs fueron reconocidas por los sueros anti-HA de *A. paragallinarum* y de conejo inmunizados con estas proteínas secretadas por *Gallibacterium anatis*.

Estas proteínas purificadas aglutinan eritrocitos de pollo.

El reconocimiento inmune cruzado al usar otros sueros nos indica la presencia de epítomos conservados en proteínas producidas por diferentes miembros de la familia *Pasteurellaceae*.

Estas proteínas podrían utilizarse para preparar una vacuna polivalente para proteger a las gallinas contra la infección por varios miembros de la familia *Pasteurellaceae*.

REFERENCIAS

- Bager R. J., Barbara Nesta B., Pors S. E., Soriani M., Serino L., Boyce J. D., Adler B. and Bojesen A. M. 2013. The Fimbrial Protein FlfA from *Gallibacterium anatis*. Is a Virulence Factor and Vaccine Candidate. *Infect. Immun.* 81: 1964-1973.
- Blackall P. and Soriano E. 2008. Infectious *Coryza* and Related Bacterial Infections. In Diseases of poultry. In Saif MY (Ed) Diseases of poultry. 12 ed. Wiley-Blackwell. pp 789-803
- Bojesen A. M., Nielsen S. S. and Bisgard M. 2003A. Prevalence and transmission of haemolytic *Gallibacterium* species in chicken production systems with different biosecurity levels. *Avian Pathogen.* 32: 503-510.
- Bojesen A. M., Chritensen H., Nielsen O. L., Olsen J. E. And Bisgard M. 2003B. Detection of *Gallibacterium* spp. In chickens by fluorescent 16S rRNA in situ hybridization, *J. Clin. Microbiol.* 41: 5167-5172.
- Bojesen, A. M., Nielsen, O. L. Christensen, J. P. and Bisgaard, M. 2004. In vivo studies of *Gallibacterium anatis* infection in chickens. *Avian Pathogen* 33:145-152.
- Bojesen, A.M., M. E. Vázquez, R. J. Bager, D. Ifrah, C. González, F. M. A arestrup. 2011. Antimicrobial susceptibility and tetracycline resistant determinant genotyping of *Gallibacterium anatis*. *Vet. Microbiol.* 148: 105-110.
- Casaubon M. T., González C., Vázquez M. H., Urquiza O., Ruíz G., Quintana J. A. y Fehervari T. 2004. Lesiones debidas a *Gallibacterium anatis* en gallinas de postura desafiadas experimentalmente. Memorias de la XXIX Convención Anual ANECA, Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero. México.

- Christensen H., Bisgard M., Bojesen A. M., Mutters R. and Olsen J. E. 2003. Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, "*Actinobailillus salpingitidis*" or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. Nov. and description of additional genome species within *Gallibacterium* gen. nov. Int. J. Sys Evol. Microbiol. 53: 275-287.
- García-Gómez, E. Vaca, S., Pérez-Méndez, A., Ibarra-Caballero, J., Pérez-Márquez, V., Tenorio V. R. and Negrete Abascal, E. *Gallibacterium anatis* secreted metalloproteases degrade chicken IgG. 2005 Avian Pathol. 34: 426-429.
- Gonzalez-Pedrajo B. y Dreyfus G. 2003. Sistemas de secreción de Proteínas en las bacterias Gram negativas: Biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. En: Flores Herrera O., Riveros Rosas H., Sosa Peinado A. y Vázquez Contreras E. (eds.). Mensaje Bioquímico, Vol. XXVII. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. UNAM, México. 45-46.
- Hacking, W.C. and Pettit, J. R. 1974. *Pasteurella haemolityca* in pullets and laying hens. Avian Dis. 18: 483-486.
- Jaques M. and Mikael L. G. 2002. Virulence factors of *Pasteurellaceae*, formidable animal pathogens A. S. M. news. 68: 174-179.
- Kristensen B. M. Frees D. and Bojesen A. M. 2010. GtxA from *Gallibacterium anatis*, a Cytolytic RTX-toxin with a novel domain organization. Vet. Res. 41:25.
- Kristensen B. M. Frees D. and Bojesen A. M. 2011. Expression and secretion of the RTX-toxin GtxA among members of the genus *Gallibacterium*. Vet. Microbiol. 153:116-123.
- Montes García J. F. 2012. Determinación de condiciones de motilidad *in vitro* de *Gallibacterium anatis*. Tesis de Licenciatura, FES-Iztacala, UNAM
- Negrete-Abascal E., Tenorio V. R., Guerrero A. L., García R. M., Reyes M. E. y De la Garza M. 1998. Purification and characterization of a protease from

- Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an antigen common to all the serotypes. Can. J. Vet. Res. 62: 183-190.
- Negrete-Abascal E., Tenorio V. R. and De la Garza M. 1999. Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolates. Curr. Microbiol. 38: 64-67.
- Neubauer C, De Souza-Pilz M, Bojesen AM, Bisgaard M, Hess M. Tissue distribution of haemolytic *Gallibacterium anatis* isolates in laying birds with reproductive disorders. Avian Pathol. 2009 Feb; 38(1):1-7. doi: 10.1080/03079450802577848.
- Ramírez-Apolinar S. Fernando M. Guerra Infante, Maria de J. de Haro-Cruz C. Salgado Miranda. Kristensen, AM. Bojesen. E. Negrete Abascal E. Soriano Vargas. Journal of Animal and Veterinary Advances, 2012, Doi: 10.3923/java 2012. 556-560.
- Özcengiz E., KılınçK., Büyüktanır Ö. and Günalp A. 2004. Rapid purification of pertussis toxin (PT) and filamentous hemagglutinin (FHA) by cation-exchange chromatography. Vaccine, 22:1570-1575.
- Rea Hernández Juan Ismael., 2011. Respuesta a estrés por hierro en *Gallibacterium anatis*. Tesis de Licenciatura, FES-Iztacala, UNAM
- Rhoades , K. R. and Rimler, R. B. 1984. *Avian Pasteurellosis*. In M. S. Hofstad, H. J. Barnes, B. W. Calnek, W. M. Reid and H. W. Yoder Jr. (Eds.), Diseases of poultry, 8thedn (141-164). Ames: Iowa State University Press.
- Salgado Lucio M. L., Vaca S., Vázquez C., Zenteno E., Pérez-Márquez V. M., Rea I. and Negrete Abascal E.2012. Adhesion of *Gallibacterium anatis* to chicken oral-pharyngeal epithelial cells and identification of putative fimbriae. Advances Microbiol. 2: 505-510.
- Shaw, D.P., Cook, D. B. Maheswaran, S. K., Lindeman, C. J. and Halvorson, D. A. 1990. *Pasteurella haemolytica* as a co-pathogen in pullet and laying hens. Avian Dis. 34: 1005-1008.
- Soriano, V. E., M. G. Longinos, P. G. Navarrete, and R. P. Fernández. 2002. Identification and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from Mexico. Avian Dis. 46:686–690.

- Vaca P. S., Sanchez E. C., Monroy P. E. and Rojas L. 2011. Adherence of *Gallibacterium anatis* to inert surface J Anim Vet ADV 10: 1688-1693.
- Voegel M. T., Warren J. G., Matsumoto A., Igo M. M., Kirkpatrick B. C. 2010. Localization and characterization of *Xylella fastidiosa* haemagglutinin adhesins. Microbiology. 156: 2172-2179.
- Zepeda A., Ramírez S., Vega V., Morales V., Talavera M., Salgado M. C., Simon M. J. Bojesen A. M. and Soriano V. E. 2009. Hemagglutinin activity of *Gallibacterium* strains. Avian Dis. 53: 115-118.
- Zepeda VA, Calderón-Apodaca NL, Paasch ML, Martín PG, Paredes DA, Ramírez-Apolinar S, Soriano-Vargas E. Histopathologic findings in chickens experimentally infected with *Gallibacterium anatis* by nasal instillation. Avian Dis. 2010 Dec;54(4):1306-9.

Referencia de internet

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

GLOSARIO DE TERMINOS

Biovar: Es una variante de una cepa que difiere fisiológicamente de otras cepas de una especie en particular.

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

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

Hepatitis: Inflamación generalizada del hígado debido a una infección o intoxicación.

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

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

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

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

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

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

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