



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

“DETERMINACIÓN DE LAS
CONDICIONES DE MOVILIDAD *in vitro*
PARA *Pasteurella multocida*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA CELULAR)

P R E S E N T A

ROSA MARÍA GARCÍA PÉREZ

CODIRECTORES DE TESIS:
DR. JOSÉ MANUEL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ
DR. ERASMO NEGRETE ABASCAL

MÉXICO D.F.

JUNIO, 2007



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.

**Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia
y Tecnología por el apoyo otorgado para la
realización de mis estudios de maestría.**

Becario de CONACYT No. De registro 57683

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Porque siempre ha formado parte esencial en mi corazón y me ha iluminado y guiado en los momentos más difíciles de mi vida.

Agradezco de forma especial al **Dr. Erasmo Negrete Abascal**, por la dirección de éste trabajo, por el apoyo y confianza depositada en mí para alcanzar ésta meta.

Al **Dr. J. Manuel Hernández H.**, por la dirección de esta tesis, por su apoyo incondicional, su disponibilidad en todo momento y su confianza.

Al **Dr. Sergio Vaca Pacheco**, por su apoyo, confianza, sugerencias, disposición y participación en la realización de éste trabajo.

A la **Dra. Mireya de la Garza Amaya**, por su apoyo, amistad, sugerencias durante el desarrollo de mi maestría.

Al **Dr. Juan Pedro Laclette San Román** por su apoyo, sugerencias, disposición y participación en la realización de ésta tesis.

Al **Dr. Mario A. Rodríguez**, por su apoyo en la realización de mi tesis.

Al **Dr. Carlos G. García Tovar**, por su amistad y apoyo durante la realización de mi trabajo de tesis.

Al **M. en C. Armando Pérez Rangel**, por su colaboración, participación, confianza y apoyo técnico.

A **Fortunato Mote Rodríguez, Armando Sánchez, Alejandrina Reyes Vivar, Alberto García Miguel, J. Esteban Molina Alvarado** por su amistad y apoyo técnico.

A **Alfredo Padilla Barberi** por su amistad, apoyo gráfico, disponibilidad y participación en la realización de este trabajo.

A la **Bióloga B. Adriana Castillo J., M. en C. Eduardo Carrillo T.**, por su amistad y apoyo en la realización de éste trabajo.

A **Ma. Esther Cid, Rocío Guerrero García, Blanca Olguin, Ma. Del Refugio Contreras, Rosa Ma. Cruces Angeles, Ma. Cristina Martínez Torres**, por su amistad y apoyo secretarial.

.A LA VIDA, por todas las maravillosas oportunidades que me da día a día para alcanzar cada una de mis metas.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a las personas que más quiero en mi vida.

Ana Carmen Pérez R.

Mi madre, que también ha sido mi amiga, por toda su dedicación y amor.

Gregorio García H.

Mi padre, que siempre me ha alentado en esforzarme para alcanzar mis metas y me ha enseñado el significado de luchar en contra las adversidades en su caso cuando le sacó ventaja al cáncer de piel.

Miguel A., Aarón A., Silvia G., Felipe de J.

A mis hermanos, gracias por todo su cariño y que no importa la distancia que nos separe siempre estamos juntos para apoyarnos.

Erasmó Negrete A.

Gracias, por todo su cariño, paciencia y apoyo que me ha impulsado a alcanzar mis metas y por toda una vida compartiendo logros.

Nicolás Negrete García

La pequeña luz en mi vida. Nunca olvides que te amo.

Anayeli Gómez G, Silvia Gómez G. y Agustín Gómez S.

Por todo el cariño que me han brindado.

A las **Familias Negrete Abascal y Pajarito Moreno** por todo el cariño que me han brindado.

† **Angelito Gómez G.**

Por enseñarme lo bella que es la vida.

† **Ivan Erick Mitre Esquivel**

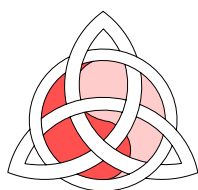
Por su amistad y apoyo técnico.

† **Florencia Cano Rocha y Apolonio García** por todo el cariño y apoyo.

A quienes que se me han adelantado de este mundo y que algún día los volveré a encontrar.

Cada persona brilla con luz propia entre todas las demás. No hay dos fuegos iguales. Hay fuegos grandes y fuegos chicos y fuegos de todos los colores. Hay gente de fuego sereno, que ni se entera del viento, gente de fuego loco que llena el aire de chispas. Algunos fuegos, fuegos bobos, no alumbran ni queman; pero otros arden la vida con tantas ganas que no se puede mirarlos sin parpadear y quien se acerca, se enciende.

Eduardo Galeano



INDICE

	ÍNDICE -----	i
	ÍNDICE DE FIGURAS -----	iv
	ÍNDICE DE TABLAS -----	v
	LISTA DE ABREVIATURAS -----	vi
1	RESUMEN -----	1
2	INTRODUCCION -----	2
2.1	CARACTERÍSTICAS GENERALES de <i>Pasteurella multocida</i> ---	2
2.1.1	EPIDEMIOLOGIA Y MECANISMOS DE TRANSMISIÓN de <i>P. multocida</i> -----	3
2.1.3	CLASIFICACIÓN de <i>P. multocida</i> -----	4
2.1.4	ENFERMEDADES CAUSADAS POR <i>P. multocida</i> -----	5
	▪ COLERA AVIAR -----	5
	▪ SEPTICEMIA HEMORRAGICA -----	6
	▪ RINITIS ATROFICA -----	7
	▪ PASTEURELOSIS EN CONEJOS -----	7
	▪ MANIFESTACIONES CLINICAS EN HUMANOS -----	8
2.1.5	FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>P. multocida</i> -----	8
	▪ CAPSULA -----	9
	▪ LIPOPOLISACARIDO (LPS)-----	9
	▪ TOXINA DERMONECROTICA-----	10
	▪ FIMBRIAS -----	10
	▪ PORINA H -----	11
	▪ SIALIDASAS -----	11
	▪ HEMOLISINA -----	12
	▪ PROTEASAS -----	12
2.2	FLAGELO -----	13
	Estructura flagelar -----	13
	a) Filamento flagelar -----	14
	Eje Central-----	14

	b) Gancho-----	15
	c) Cuerpo Basal -----	15
	Motor flagelar -----	16
	Aparato Exportador-----	16
	d) Proteínas auxiliares y de unión -----	17
	Ensamble -----	18
	Función-----	20
	Importancia en patogenicidad -----	23
	Tipos de flagelo -----	23
	Genética del flagelo-----	24
3	ANTECEDENTES DIRECTOS -----	24
4	JUSTIFICACIÓN -----	25
5	HIPÓTESIS -----	26
6	OBJETIVOS	
	▪ OBJETIVO GENERAL -----	26
	▪ OBJETIVOS PARTICULARES-----	26
7	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL -----	27
8	MATERIAL Y METODOS -----	27
8.1	Origen de las cepas utilizadas -----	27
8.2	Selección de cepas móviles -----	28
8.3	Ensayos de movilidad -----	28
8.4	Efecto del pH, diferentes compuestos químicos y temperatura en la motilidad de <i>P. multocida</i> -----	28
8.5	Purificación de la flagelina de <i>P. multocida</i> -----	29
8.5.1	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida -----	29
8.5.2	Electroinmunotransferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa (Western blott)-----	29
8.5.3	Secuencia de amino ácidos-----	30
8.6	Microscopía electrónica-----	30
8.7	Extracción de DNA cromosómico -----	31
8.8	Amplificación del gen <i>fliC</i> por la Reacción en Cadena de la Polimerasa -----	31
8.9	Clonación -----	32
8.10	Secuenciación-----	32

8.11	Análisis in silico -----	33
9	RESULTADOS -----	34
9.1	Ensayos de motilidad-----	34
9.2	Condiciones de motilidad-----	35
9.3	Obtención de flagelina-----	37
9.4	Microscopía Electrónica-----	38
9.5	Inmunorreconocimiento (Western Blott) -----	39
9.6	Extracción de DNA y amplificación de <i>fliC</i> de <i>P. multocida</i> por PCR-----	40
9.7	Secuencia de aminoácidos y nucleóticos de la flagelina y del gen <i>fliC</i> de <i>P. multocida</i> y análisis “in silico”-----	42
9.8	Secuencia nucleotídica-----	43
9.9	Secuencia del extremo amino terminal de la flagelina -----	44
10	DISCUSIÓN -----	45
11	CONCLUSIONES -----	56
12	PERSPECTIVAS -----	57
13	BIBLIOGRAFÍA -----	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1A	Estructura del flagelo	14
Fig. 1B	Composición proteica del flagelo	14
Fig. 2	Micrografía electrónica del flagelo	18
Fig. 3	Esquema de los TLRr	22
Fig. 4	Arreglos de flagelo en la superficie bacteriana	23
Fig. 5	Ensayos de motilidad.....	34
Fig. 6	Obtención de la flagelina	37
Fig. 7	Microscopía electrónica	38
Fig. 8	Inmunorreconocimiento	39
Fig. 9	Extracción de DNA	40
Fig. 10	Amplificación de <i>fliC</i> de <i>P. multocida</i> por PCR	41
Fig. 11	Productos de amplificación de los genes <i>cltC</i> de <i>P. multocida</i> aisladas de diferentes hospederos	42
Fig. 12	Secuencia de aminoácidos y nucleóticos de la flagelina y del gen <i>fliC</i> de <i>P. multocida</i> y análisis <i>in silico</i>	43
Fig. 13	Secuencia del extremo amino terminal de la flagelina	44

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1	Requerimientos bioquímicos de <i>P.multocida</i>	4
TABLA 2	Motilidad de las cepas de <i>P.multocida</i> en diferentes condiciones de crecimiento	36

RESUMEN

Pasteurella multocida es una bacteria patógena de importancia veterinaria descrita como no móvil y no flagelada. En el presente trabajo se muestran evidencias de que *P. multocida* expresa flagelo y es capaz de moverse “*in vitro*” Usando electroforesis (SDS-PAGE) bajo condiciones desnaturalizantes, se determinó que el filamento flagelar estaba constituido por subunidades de flagelina de aproximadamente 38-40 kDa. Por medio de microscopía electrónica se demostró la presencia de filamentos flagelares polares de aproximadamente 15 µm de longitud y 10-20 nm de grosor, los cuales pudieron observarse también por microscopía electrónica después de liberarlos de la superficie bacteriana y obtenerlos por centrifugación diferencial. La motilidad de *P. multocida* pudo determinarse en soya tripticaseína con baja concentración de agar y fue afectada por la temperatura de incubación y la adición de glucosa, fosfato y cloruro de sodio al medio de ensayo. Muestras de flagelina purificada presentaron reactividad cruzada por Western blot al incubarlas con antisueros contra diferentes flagelinas. Utilizando oligonucleótidos complementarios a los extremos 5' y 3' del gen *fliC* de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se obtuvo por PCR un fragmento de 990 pb, cuya secuencia codificaría una proteína de 40 kDa, en concordancia con el tamaño de la flagelina purificada determinado por electroforesis. La secuencia amino terminal de la proteína y la secuencia de DNA del gen *fliC* amplificado por PCR mostraron una identidad del 95% con flagelinas de diferentes bacterias, incluyendo a las de *A. pleuropneumoniae* y *Escherichia coli* O15H17. La motilidad es considerada como un factor de virulencia en diferentes bacterias patógenas y puede ser importante para la patogénesis de *P. multocida* en los diferentes animales que infecta.

2. INTRODUCCION

Pasteurella multocida es el agente etiológico de un grupo de enfermedades económicamente importantes y altamente contagiosas de animales, tanto silvestres como domésticos (Christensen y Bisgaard., 2000).

Pasteurella, junto con los géneros *Haemophilus* y *Actinobacillus*, conformaban la familia *Pasteurellaceae*, a la que recientemente se han adicionado entre otros a los géneros *Mannheimia*, *Gallibacterium*, *Lonepinella* y *Phocoenobacter* (Jacques y Leonie, 2002). En el Manual Bergey se considera a todos los miembros de esta familia como inmóviles e incapaces de expresar un sistema flagelar. Sin embargo, en ocasiones bacterias móviles no son capaces de presentar flagelo si las condiciones de su microambiente son tales que impidan su expresión, puesto que el ensamblaje de dicha estructura es muy costoso energéticamente (Manson y col., 1977; Dreyfus y col., 1993; Macnab y Parkinson 1991; Fernández y Berenguer 2000).

2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES de *P. multocida*

P. multocida es un cocobacilo pleomórfico Gram-negativo de 1-2 µm de longitud, cuyas células pueden observarse al microscopio óptico como formas cocoides, bacilos cortos o filamentosos, con tinción bipolar, que pueden aparecer sueltos o agrupados en parejas o cadenas cortas. *P. multocida* es un microorganismo anaerobio facultativo, hasta ahora descrito como no móvil, que crece bien en medios de agar sangre, agar chocolate y Mueller-Hinton, pero no en agar McConkey, eosina azul de metileno (EMB), ni en otros medios selectivos o diferenciales empleados para el aislamiento de enterobacterias. Después de una incubación de 24 h en agar sangre, las colonias de *P. multocida* son lisas, de 1–2 mm de diámetro, con un color gris azulado brillante, no hemolíticas y en ocasiones mucoides. El crecimiento en agar sangre y la característica tinción bipolar ayudan a diferenciar *P. multocida* del género *Haemophilus*, con el que puede confundirse en la observación microscópica inicial. Como la mayoría de las especies del género, *P. multocida* da positivas las reacciones de oxidasa y catalasa, y reduce los nitratos a nitritos (Mandell y col., 1995)

La ausencia de hemólisis en medios con sangre, la producción de indol, la descarboxilación de la ornitina y una reacción de ureasa negativa permiten

diferenciar a *P. multocida* de las otras especies del género. *P. multocida* incluye tres subespecies: *P. multocida ssp multocida*, *P. multocida ssp septica* y *P. multocida ssp gallicida*. La identificación de subespecies se basa en la producción de ácido a partir del sorbitol y del dulcitol, aunque esta distinción no se considera relevante en los aislamientos clínicos (Christensen y col., 2005).

2.1.1 EPIDEMIOLOGÍA Y MECANISMOS DE TRANSMISIÓN

P. multocida coloniza los conductos gastrointestinal y respiratorio de una gran variedad de mamíferos y aves, los cuales constituyen su principal reservorio (Holst y col., 1992). Los animales más frecuentemente colonizados son los gatos (50-90%) y los perros (50-65%). Las tasas de colonización en seres humanos son muy bajas; en estudios epidemiológicos se ha aislado *P. multocida* de la faringe y de las secreciones respiratorias del 2-3% de las personas que tienen contacto con animales. La colonización es más frecuente en las personas que presentan patología respiratoria crónica, sobre todo enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y bronquiectasias, en ancianos y en pacientes con algún tipo de inmunodepresión. Generalmente el hombre adquiere la infección por inoculación directa, por arañazos o mordeduras de animales, especialmente de gatos o perros. Con menor frecuencia se producen infecciones de heridas abiertas, no causadas por mordedura, sino por contacto con secreciones de animales. *P. multocida* es la causa más frecuente de infección de heridas producidas por mordedura de gato; sin embargo, en heridas por mordeduras de perros las principales causas de infección son *Staphylococcus aureus* y diferentes especies del género *Streptococcus*, siguiéndoles en frecuencia *P. multocida* (Goldstein y col., 1978).

Pasteurella es transmitida a otros animales a través de varios mecanismos:

- El contacto directo con animales enfermos.
- Aerosoles.
- La ingestión de agua y alimentos contaminados.
- Picadura de mosquitos.
- Fomites.
- Mordeduras.

El mecanismo de transmisión más importante es por medio de aerosoles. La transmisión por ectoparásitos, vía fomites y por las moscas puede ocurrir durante la etapa aguda del brote, particularmente en la forma septicémica que se presenta en mamíferos y aves; los pájaros silvestres, las ratas y los ratones también se ven involucrados en la propagación. La bacteria puede persistir en sitios donde ha habido brotes de la enfermedad, constituyendo un riesgo permanente, aunque éste se puede minimizar realizando una buena desinfección y fumigación, además de controlar la presencia de roedores (Lovea y col., 2000).

2.1.2 CLASIFICACIÓN

Taxa superior:

Bacteria; *Proteobacteria*; *Gammaproteobacteria*; *Pasteurellales*; *Pasteurellaceae*.

Como se describe en el Manual Bergey, el género *Pasteurella* puede ser dividido en siete especies: *P. multocida*, *P. haemolytica*, *P. neumotropica*, *P. anatipestifer*, *P. ureae*, *P. aerogenes* y *P. gallinarum* cuyas principales características bioquímicas diferenciales se muestran en la Tabla I.

Tabla I

<i>Características</i>	<i>multocida</i>	<i>pneumo- tropica</i>	<i>gallinarum</i>	<i>aerógenes</i>	<i>ureae</i>	<i>anatipestifer</i>
Hemólisis	-	-	-	-	-	-
MacConkey	-	-	-	+	-	-
Ureasa	-	+	-	+	+	-
Indol	+	+	-	+	+	-
Acido de manitol	+	-	-	-	+	-
Gas de glucosa	-	-	-	+	-	-
Hidrólisis de gelatina	-	-	-	-	-	+

P. multocida se clasifica en cinco serogrupos : A, B, D, E y F en base al antígeno capsular (Sawada y col., 1982; Rimler y Rhoades, 1987), mediante la técnica de hemaglutinación pasiva con eritrocitos recubiertos con un extracto crudo conteniendo antígenos específicos de la cápsula, incluyendo

lipopolisacárido (LPS) y polisacárido no antigénico. En base al antígeno somático se clasifica en 16 serotipos utilizando la técnica de difusión en gel.

Además de las especies mencionadas, el género incluye a las siguientes: *P. avium*; *P. bettyae*; *P. canis*; *P. dagmatis*; *P. langaaensis*; *P. anatis*; *P.skyensis*; *P. stomatis*; *P. testudinis*; *P. volantium*; *Pasteurella sp.A*, *Pasteurella sp.B* (Skerman y col., 1980; Madsen y col., 1985; Boyce, 1995).

Después de la reclasificación de género se agregaron seis nuevas especies, las que incluyen a *P. granulomatis* (Ribeiro y col., 1989), *P. caballi* (Schlater y col., 1989), *P. betti*, *P. lymphangitis*, *P. mairii* and *P. trehalosi* (Sneath y col., 1990). Recientemente *P. granulomatis* y *P. haemolytica* se han reclasificado en el género de *Mannheimia* (Angen y col., 1999).

2.1.3 ENFERMEDADES CAUSADAS POR *P. multocida*

Dependiendo de la zona afectada, estas enfermedades pueden agruparse en tres categorías:

- 1) De vías respiratorias superiores y áreas adyacentes.
- 2) Neumónica / septicémica.
- 3) Local / traumática.

Las enfermedades causadas por *P. multocida* afectan principalmente a la industria pecuaria y causan pérdidas económicas significativas en todo el mundo (Pijoan, 1999; Benkirane, 2002; FAO, 1994, 1995).

CÓLERA AVIAR

Esta enfermedad se describió originalmente en Australia en 1938, es altamente contagiosa, afecta aves domésticas y silvestres, principalmente a pavos, pollos y gallinas (Christensen y col., 2000; Blackall y col., 1995). La bacteria entra a los tejidos de las aves a través de las membranas mucosas de la faringe, de la conjuntiva o de heridas cutáneas. Los signos de la infección de cólera aviar aguda se presentan sólo unas pocas horas antes de la muerte. Durante este periodo la muerte de las aves infectadas parece ser el indicio de la enfermedad. Los signos más frecuentes son: fiebre, anorexia y plumaje

ondulado, descarga mucosa por el pico, diarrea, y frecuencia de la respiración aumentada. La cianosis ocurre inmediatamente antes de la muerte.

En la etapa crónica los signos están relacionados con infecciones localizadas en crestas, senos paranasales, articulaciones de piernas o alas, patas, y bolsas esternales, las cuales con frecuencia se hinchan. Se pueden observar lesiones de la conjuntiva y faríngeas, así como la tortícolis provocada como resultado de la infección de las meninges. Las aves que sobreviven quedan infectadas de forma crónica y se ha observado repetición de brotes.

SEPTICEMIA HEMORRÁGICA

La septicemia hemorrágica clásica se manifiesta por una septicemia aguda, casi siempre mortal, principalmente en bovinos. La septicemia hemorrágica es causada por dos serotipos de *P. multocida*, específicamente el B: 2 y el E: 2 (Rimler, 1990). La septicemia hemorrágica clásica, la cual se observa frecuentemente en el sureste de Asia, ocurre por lo general al inicio de la temporada de lluvias y monzones, después de varios meses de sequía, en que los animales han estado consumiendo muy poco alimento. La enfermedad es particularmente prevalente entre los búfalos. Entre las causas de estrés que pueden contribuir a los brotes se encuentra el cansancio, la exposición a temperaturas extremas, la mala nutrición, y el cambio de alimentos. La mayoría de los casos en el bovino y búfalo son agudos, sucediendo la muerte de 6 a 24 horas después de presentarse los primeros signos. En algunos brotes los animales pueden sobrevivir hasta 72 horas. Lo primero que se hace aparente es un letargo, renuencia a moverse y temperatura elevada. A continuación aparece salivación y descarga nasal, así como inflamación edematosa en la región faríngea que se disemina hacia la región cervical ventral y al pecho. Las membranas mucosas visibles se encuentran congestionadas y la dificultad respiratoria es seguida por colapso y muerte. La recuperación, particularmente en los búfalos, es rara. Su período de incubación es de 90 días (portadores activos y latentes) (Carter y De Alwais, 1989).

Cuando se presentan circunstancias propicias para el crecimiento y multiplicación de *P. multocida*, en el cuerpo del animal se desarrolla una septicemia en pocas horas; sin embargo, el agente etiológico puede ser hospedado por períodos variables en un pequeño porcentaje de animales sin

signos clínicos y la perpetuación de la enfermedad, de año a año o de estación a estación, generalmente se atribuye a este estado de portador. Los bovinos inoculados artificialmente con una dosis letal (aproximadamente 20 mil bacilos por vía intranasal), muestran signos clínicos en pocas horas y mueren entre 18 a 30 horas después. Los cambios tisulares más evidentes en animales infectados son: hemorragias ampliamente distribuidas, edema e hiperemia general. En la mayoría de los casos hay inflamación edematosa de la cabeza, cuello y región del pecho. Hay hemorragias petequiales subserosas por todo el cuerpo del animal y frecuentemente se encuentra líquido teñido de sangre en las cavidades torácica y abdominal (Carter y De Alwais, 1989).

RINITIS ATRÓFICA INFECCIOSA

Se caracteriza por inflamación hemorrágica purulenta de la mucosa nasal y etmoidal de los cerdos. La atrofia afecta los cornetes nasales y en casos graves ataca los maxilares con deformación de la cara. Pueden presentarse hemorragias y torceduras de la nariz de algunos cerdos. Se puede difundir al cerebro y causar encefalitis, con frecuencia posteriormente se presenta neumonía. Puede también observarse desaparición de tejidos en las vías aéreas superiores (cornetes) y necrosis de los tejidos blandos que puede invadir huesos de la nariz y cara (Rutter, 1985).

PASTEURELOSIS EN CONEJOS

En la rinitis/sinusitis causada por *P. multocida* las manifestaciones incluyen descargas naso-oculares, estornudos y congestión. Los estornudos son muy ruidosos por lo estrecho de los conductos que se bloquean si no reciben un tratamiento oportuno; esta enfermedad puede progresar a neumonía.

Con frecuencia *Pasteurella* no se puede eliminar completamente y los conejos quedan como portadores sanos, los cuales muestran constantemente los signos de la pasteurelosis y pueden propagar la bacteria. Clásicamente los síntomas incluyen incapacidad para levantarse o acicalarse y para inclinar la cabeza. Los conejos enfermos giran en círculos o se caen, en casos extremos un animal puede torcerse o girar violentamente. Muchos de estos animales

enfermos pueden mejorar con largos tratamientos con antibióticos (Kehrenberg y col., 2001).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS EN HUMANOS

La mayoría de las infecciones de piel y tejidos blandos de seres humanos se debe a heridas provocadas por mordeduras o arañazos infectados (Holst y col., 1992) o al contacto de la piel sana o dañada, con las mascotas (Jonhson y col., 1977; Kumar y col., 1990; Weber y col., 1984). La infección se caracteriza por el rápido desarrollo de una celulitis, con o sin formación de abscesos, y drenaje purulento o serosanguinolento por la herida. Por inoculación directa, o por extensión, pueden afectarse huesos y articulaciones originando osteomielitis y artritis séptica, aunque estas complicaciones son raras. Se han descrito infecciones óseas y articulares por diseminación hematogena, especialmente en pacientes con artritis reumatoide, prótesis articulares, y en pacientes en tratamiento con corticosteroides.

La manifestación clínica más frecuente de la infección respiratoria por *P. multocida* es la neumonía y más del 90% de los casos se presentan en pacientes con patología pulmonar subyacente. El comienzo de la sintomatología puede ser gradual o agudo y los síntomas más frecuentes son fiebre, disnea y dolor pleurítico.

Otras manifestaciones clínicas menos frecuentes causadas por *P. multocida* son las infecciones intra-abdominales, que incluyen la peritonitis bacteriana espontánea, peritonitis secundaria a la perforación de vísceras, abscesos intra-abdominales e infección de heridas quirúrgicas. Se han descrito con menor frecuencia casos de endocarditis, infecciones oculares, infecciones genitales y del tracto urinario y meningitis (Kumar y col., 1990).

2.1.4 FACTORES DE VIRULENCIA DE *P. multocida*

Entre los principales factores de virulencia de *P. multocida* se encuentran la cápsula, el lipopolisacárido (LPS), las fimbrias, algunas proteínas de membrana externa (OMP), la toxina dermonecrótica, el sideróforo multocidina, el receptor para transferrina y a algunas enzimas extracelulares (proteasas, lipasa, hialuronidasa, neuraminidasa). Muchas de las bacterias patógenas atacan a sus hospederos liberando factores de virulencia,

inyectando directamente moléculas tóxicas (principalmente proteínas) en su hospedero para invadirlo o matarlo (Zhang y col., 1998; Gorga y col., 2001; Aizawa, 2001).

Cápsula

Las cápsulas tienen un papel importante al determinar el acceso de ciertas moléculas a la membrana celular, mediando la adherencia a superficies e incrementando la tolerancia de la bacteria a la desecación (Boyce y col., 2000a y 2000b) además de conferirle protección contra la fagocitosis y contra la actividad bactericida del complemento del suero (Ophir y Gutnick, 1994; Vogel y col., 1997; Kahler y col., 1998; Smith y col., 1999).

La enfermedad causada depende generalmente del serogrupo capsular, ya que los serogrupos B y E, que producen una cápsula compuesta principalmente de arabinosa, manosa y galactosa, causan septicemia hemorrágica en ganado vacuno y búfalos; el serogrupo A, productor de una cápsula extracelular de ácido hialurónico, causa cólera de las aves y pasteurelisis neumónica porcina; y el serogrupo D, cuya cápsula contiene heparina, causa rinitis atrófica en cerdos. El serogrupo F también causa cólera en aves y produce una cápsula de condroitin-sulfato (Rimler and Rhoades, 1987).

La mayoría de los casos de cólera aviar, septicemia hemorrágica y rinitis atrófica es causada por cepas de los serogrupos A, B y D, respectivamente, sugiriendo que la cápsula está relacionada a la patogénesis de la enfermedad y la especificidad hacia el hospedero.

Lipopolisacárido (LPS)

El LPS (endotoxina) es uno de los componentes principales de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, siendo la porción A del lípido la parte más tóxica de la endotoxina (Pudrí y col., 2003).

Se ha sugerido que el LPS de *P. multocida* puede participar en la adherencia bacteriana a las células del tracto respiratorio porcino (Jacques y Paradis, 1998) y se ha demostrado que participa de modo importante en la septicemia hemorrágica de los búfalos (Harper y col., 2004; Horadagoda y col., 2001).

Los anticuerpos contra el LPS protegen parcialmente a ratones de la infección por *P. multocida* (Ramdani y Adler, 1991). Las cepas aisladas de brotes de cólera aviar muestran resistencia al efecto bactericida del suero, un fenotipo que se ha considerado como indicador de la virulencia de las cepas que infectan a pavos (Morishita y col. 1990).

Toxina dermonecrótica.

Algunas cepas de *P. multocida* producen una toxina dermonecrótica, conocida también como toxina osteolítica. Estas cepas toxigénicas son capaces de causar rinitis atrófica en cerdos, a diferencia de las no toxigénicas que no causan la enfermedad (Il'ina y Zasukhin, 1975). El gen que codifica esta toxina (*toxA*) ha sido clonado en *Escherichia coli* y la proteína recombinante se ha utilizado para producir rinitis atrófica en cerdos (Kamps y col., 1990; Lax y Chanter, 1990; Staddon y col., 1991). Esta toxina penetra a la célula por un mecanismo endocítico no bien definido, afecta la permeabilidad endotelial (Essler y col., 1998) y actúa estimulando varias cascadas intracelulares de señalización para promover la proliferación de los osteoclastos, provocando la resorción del hueso, en tanto que inhibe específicamente la diferenciación de los osteoblastos (Lax y col., 2004). La toxina purificada es suficiente para inducir experimentalmente la rinitis atrófica progresiva en cerdos (Foged y col. 1987).

Fimbrias.

Las fimbrias, también conocidas como pili, son apéndices similares a pelos formados por subunidades proteicas llamadas fimbrinas o pilinas, generalmente miden 1-2 μm de longitud y su diámetro es de 2-8 nm. Las fimbrias han sido asociadas con la adhesión a tejidos del hospedero sobre todo en bacterias patógenas (Finlay y Falkow, 1997), por ejemplo el pilus tipo I que se encuentra en las cepas uropatógenas de *E. coli* y *Salmonella*, el pilus tipo IV de *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella ssp.*; *Neisseria ssp.*, *Vibrio cholerae* y las cepas enteropatógenicas y enterotoxigénicas de *E. coli*. Se ha demostrado in vivo que el pilus contribuye a la virulencia (Bieber y col., 1998). Se ha evidenciado su papel en la adhesión in vitro usando órganos y cultivos celulares (Finlay y Falkow, 1997).

Se han aislado y caracterizado las fimbrias tipo IV de los serogrupos A, B y D de *P. multocida*. Esta fimbria se expresa en mayor cantidad en condiciones de microaerofilia (Ruffolo y col. 1997). Los genes del pilus tipo IV comparten homología con los del sistema de secreción tipo II, que ensambla este organelo complejo en la superficie bacteriana (Pugsley, 1993).

Porina H.

Las porinas son proteínas formadores de canales, han sido encontradas en bacterias Gram-negativas, mitocondrias y cloroplastos. Además de la función de poro, las porinas bacterianas sirven como receptores para bacteriófagos y bacteriocinas y en el caso de bacterias patógenas son el blanco del sistema inmunológico (Chevalier y col., 1993),

Algunas toxinas bacterianas funcionan insertándose en la membrana plasmática de la célula hospedera, lo que causa la formación de un poro o canal que conduce a la lisis celular. Esta familia de toxinas se ha encontrado en muchos patógenos Gram negativos y comparte un mecanismo de secreción conservado (tipo I) que es responsable de transportarlas fuera de la bacteria (Bosch y col., 2001).

La porina H, de 37 kDa, es la principal proteína de membrana externa (OMP) de *P. multocida* (Lugtenberg y col., 1986). Esta proteína ha sido purificada y caracterizada como una porina, porque está estructural y funcionalmente relacionada con la superfamilia de porinas formadoras de canales en bacterias Gram negativas; presenta un alto contenido de glicina, bajo contenido de prolina y carece de cisteína. Funciona como tamiz molecular permitiendo la difusión de pequeños solutos hidrofílicos a través de la membrana externa y también sirve como receptor para bacteriófagos y bacteriocinas (Chevalier y col., 1993, Bosch y col., 2001)

Sialidasas.

Las sialidasas son una superfamilia de exoglicosidasas que liberan N-acetil-neuraminato (ácido siálico) de las glicoproteínas, glicolípidos y polisacáridos. Estas enzimas son expresadas principalmente en eucariontes, en algunos virus y en bacterias y protozoarios patógenos.

Las especies de *Pasteurella* son patógenos oportunistas que se encuentran en las mucosas de organismos superiores, y producen sialidasas, las cuales se consideran un factor de virulencia en *P. multocida*, *M. haemolytica* y *P. volantium*. (Muller y Mannheim. 1995).

Las sialidasas de *P. multocida* NanB y NanH, tienen alta actividad en un amplio rango de pH, lo que sugiere que las dos enzimas son aptas para actuar en diversos ambientes del hospedero, incluyendo las secreciones mucosas y el suero. El poseer ambas sialidasas aumenta enormemente la capacidad metabólica de un organismo para colonizar diferentes especies de animales o crecer en diferentes tejidos, al proporcionarle una marcada versatilidad en su acceso para utilizar el ácido siálico como fuente de carbono (Mizana y col., 2000).

Hemolisina

Las hemolisinas son agentes que dañan la membrana celular y se han descrito como factores de virulencia debido a su habilidad para lisar eritrocitos y otras células del hospedero. Aunque *P. multocida* se ha descrito como un microorganismo no hemolítico, se ha demostrado que ésta es capaz de producir una hemolisina en condiciones anaeróbicas. Al clonar el gen *ahpA* de *P. multocida* en una cepa no hemolítica de *E. coli*, se observó una elevada actividad hemolítica sobre eritrocitos de pollo, conejo, bovino, ovino y equino; en menor grado sobre eritrocitos humanos (Diallo y Frost, 2000; Cox y col., 2000).

Proteasas

Las proteasas son enzimas degradativas que catalizan la hidrólisis total o parcial de proteínas, rompen enlaces peptídicos y degradan las proteínas a péptidos. Diferentes tipos de proteasas tienen diferentes especificidades para enlaces entre residuos de aminoácidos particulares.

P. multocida es capaz de secretar metaloproteasas y la caracterización de algunas de ellas se ha llevado a cabo destacando su posible papel durante la colonización de tejidos y desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, la colonización de las superficies mucosas y posterior invasión podría ser promovida por proteasas que degradan diferentes sustratos que se encuentran

en un huésped, incluyendo IgA e IgG (Pouedras y col., 1992; Klauser y col., 1993). En algunas bacterias las metaloproteasas son consideradas como factores de virulencia que participan en la patogénesis. En *P. multocida* se han descrito varias metaloproteasas que son secretadas al medio y se sugiere podrían participar en el daño producido por la bacteria a sus hospederos (Pouedras y col., 1992; Negrete-Abascal y col., 1999)

2.2 FLAGELO

Las bacterias tienen varios estilos de vida: individuales, simbióticas, comensales o parásitas y patógenas. Sólo las células que nadan por medio de flagelos buscan mejores medios para sobrevivir. El flagelo bacteriano es un organelo motor y un aparato de ensamble y de exportación de proteínas (Macnab, 2003).

ESTRUCTURA FLAGELAR

Los flagelos bacterianos están formados por tres partes (Fig. 1A):

- A. Un filamento largo y helicoidal.
- B. Una estructura corta curvada conocida como gancho.
- C. Un complejo cuerpo basal formado de un cilindro central y una serie de anillos alrededor y debajo del complejo.

El filamento y el gancho salen de la superficie celular mientras que el cuerpo basal se extiende en la membrana celular y contiene los anillos inferiores en la membrana interna.

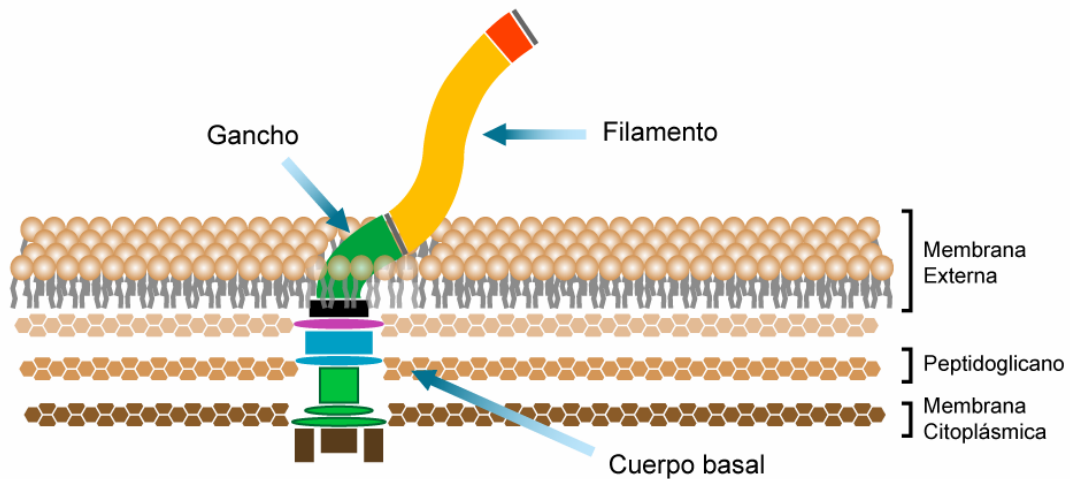


Fig. 1. A. Estructura del flagelo. Se muestran esquemáticamente los componentes principales del flagelo.

a) Filamento Flagelar. El filamento es el componente principal del flagelo, está formado por la polimerización de alrededor de 20,000 copias de una proteína llamada flagelina, cuyo peso molecular puede variar de 30 a 80 kDa dependiendo de la especie bacteriana. El ensamble final de la flagelina da como resultado una estructura tubular con un diámetro constante de 20 nm y una longitud variable de 5-10 μm . El papel específico del filamento flagelar es como propulsor, lo cual demanda una baja flexibilidad durante la rotación para impulsar a la célula (Fernández y Berenguer, 2000). La característica esencial de la estructura que emplea mecanismos de exportación vía flagelar es un cilindro central aproximadamente de 3 nm que se extiende por todo el filamento desde el espacio periplásmico del anillo MS hasta la punta del filamento (Macnab, 2003). En el filamento se encuentra el Eje Central.

Eje Central. La motilidad está bajo el control de las señales ambientales, por lo tanto el motor necesita más de un modo de operación para responder. El mecanismo más estudiado es el cambio en la dirección de rotación del motor entre el sentido en contra y a favor de las manecillas del reloj. Esto requiere un eje, el cual en *Salmonella* consiste de subunidades de tres proteínas FliG, FliM y FliN (Yamaguchi y col., 1986). Aún no se sabe su estequiometría precisa excepto para FliG, la cual puede formar una fusión funcional con las proteínas

FliF del anillo MS. La mejor estimación para FliM y FliN es de casi 37 y 100 respectivamente. Este eje central es una estructura larga. Morfológicamente, FliM y FliN forman una estructura citoplásmica similar a un anillo o taza llamado anillo C. FliG participa también en la generación de movimiento, FliM es el blanco para la salida de la cadena de transducción sensorial y el papel de FliN aún se desconoce (Macnab, 2003).

b) Gancho. El gancho flagelar es una estructura cilíndrica construida en forma similar al filamento, funciona como una unión universal. En bacterias tales como *Salmonella*, las cuales tienen múltiples flagelos emergiendo de diversas partes de la célula, los ganchos juegan un papel importante para ayudar a que esos flagelos funcionen eficientemente. El gancho es el resultado de la polimerización de aproximadamente 130 subunidades de la proteína FlgE y su longitud es regulada por la unión de las proteínas FlgK y FlgL a la punta del gancho durante el ensamble flagelar (Macnab, 1977; Bar Tana y col., 1977; Ikeda y col., 1987).

c) Cuerpo Basal. Es una estructura compleja, la cual abarca desde la envoltura celular y se extiende hasta el citoplasma. En las bacterias Gram-negativas, en su forma más simple consiste de un cilindro central y de tres anillos proteicos llamados L (por LPS), P (por péptidoglicano (PG) y de un anillo de membrana llamado MS (membrana/supramembrana). Los anillos P y L están embebidos en la membrana externa y en el péptidoglicano estando conectados por un cilindro, mientras que el anillo MS está insertado en la membrana interna. Estos anillos son el resultado de la polimerización de 26 subunidades de las proteínas FlgH, FlgI, y FliF para los anillos L, P y MS respectivamente. Por otro lado el cilindro central está formado por cuatro proteínas diferentes (FlgB, FlgC, FlgG y FlgF), siendo el componente principal la proteína FlgG, la cual está presente en aproximadamente 26 copias (Macnab, 2003).

Por microscopía electrónica se ha detectado la presencia de un anillo adicional conectado al anillo MS el cual sobresale de la membrana interna al citoplasma. El cuerpo basal junto con esta estructura llamada anillo C (de citoplasma) forma lo que se llama Cuerpo Basal Extendido. Inmunoensayos

con anticuerpos específicos revelaron que el anillo C tiene tres proteínas motoras FliG, FliM, y FliN. El cuerpo basal es una estructura pasiva; por ejemplo, recibe los impulsos del movimiento del motor y los transmite al gancho y de este al filamento (Osawa y col., 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 arregladas alrededor del cuerpo basal, está compuesto por dos proteínas Mot A y Mot B. El estator no está unido covalentemente al peptidoglicano y permanece fijo en la célula. Las proteínas Mot forman un anillo de 11 elementos alrededor del cuerpo basal funcionando no sólo como una unión al péptidoglicano sino que también forman un canal de protones que va del periplasma al citoplasma (Macnab, 2003; Vale, 2003).

El rotor consiste de múltiples copias de una proteína, llamada FliG, que no están unidas covalentemente al anillo MS y junto con las proteínas Mot son responsables de la generación del movimiento (Zhou y col., 1998; Lloyd y col., 1996; Braun y col., 1999).

Este motor utiliza el potencial de protones transmembranal, eléctrico ($\Delta\psi$) y químico (ΔpH). Blair y Berg, (1998) sugieren que cuando los protones atraviesan la membrana se unen específicamente a un aspartato en Mot B provocando un cambio conformacional en el estator que dirige al motor hacia un paso de rotación. Este es seguido por la desprotonación del residuo de aspartato que libera el protón hacia el citoplasma y la restauración del estator a su conformación original. Esta movilidad requiere cientos de protones por revolución (Blair y Berg, 1998; Kojiyama y Blair, 2001).

Aparato Exportador. La maquinaria de exportación está en la cara citoplásmica del anillo MS. El aparato exportador flagelar secreta las proteínas del filamento, gancho y flagelo, en la secuencia y cantidad adecuadas, las cuales difunden hacia el tubo central del flagelo para su ensamble en la parte distal de la estructura creciente (Macnab, 2003; Vale, 2003; Minamino y Macnab 1999).

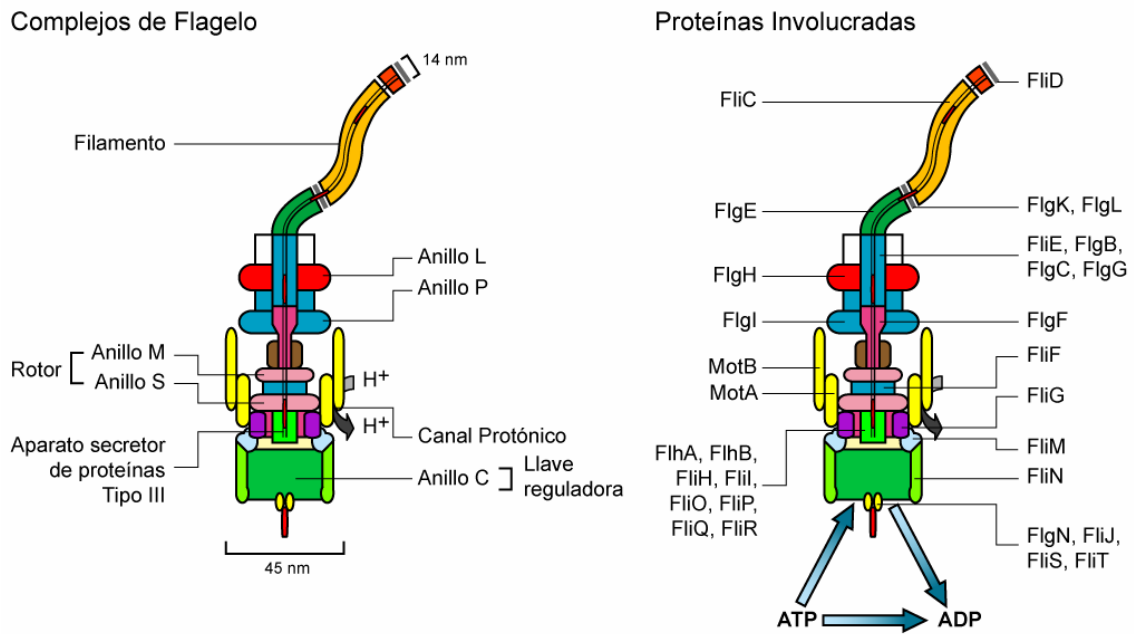


Fig. 1B. Composición proteica.

Proteínas auxiliares y de unión.

Proteínas capping. Estas proteínas se localizan en la punta del filamento en 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).

Proteínas de unión. Entre el gancho y el filamento existen dos zonas de proteínas que son llamadas proteínas de unión (Ikeda y col., 1987). Una posible función de estas proteínas es que son adaptadores estructurales ya que el gancho y el filamento tienen diferentes propiedades mecánicas, el primero como una unión universal y el segundo como un propulsor. Estudios cristalográficos recientes apoyan estos datos (Imada, referido en Macnab, 2003).

Ensamble del flagelo.

Los primeros eventos de ensamble del flagelo involucran los componentes de la membrana citoplásmica. En los procariotes las proteínas de la membrana citoplásmica son insertadas en la membrana por la vía Sec (Katayama y col., 1996).



Fig 2. Imagen por microscopía electrónica del flagelo. Esta imagen es un promedio de 100 imágenes individuales de una preparación congelada de flagelo (DeRosier, 1998).

La primera estructura flagelar que se detecta por microscopia electrónica (ME) durante la formación del flagelo, es el anillo MS del cuerpo basal, el cual se forma por el autoensamble de las subunidades de FliF. El ensamble del anillo MS en la membrana citoplásmica ocurre en ausencia de otros componentes flagelares. Sin embargo, se desconoce el mecanismo usado por la célula para seleccionar la localización y el número de anillos MS sintetizados o el momento de iniciar el ensamble flagelar. La siguiente estructura que se ensambla es el anillo C cuyos componentes son FliG, FliM y FliN. La finalización de estos anillos marca el tiempo para el ensamble de un cilindro más delgado, cuyos componentes son FlgB, FlgC, FlgF, FlgG, esto ocurre por el poro formado por el anillo MS (Katayama y col., 1996).

Posteriormente es incorporada la proteína FlgD en su punta actuando como andamio, el cual permite que la proteína del gancho FlgE inicie la polimerización. Sin embargo, el crecimiento del gancho es detenido rápidamente debido al obstáculo físico que presenta la membrana externa. Para atravesar la membrana externa deben ser adicionados los anillos P y L.

Un precursor de FlgI (proteína del anillo P) se ensambla y se une fuertemente en el centro del cilindro seguido por FlgH (proteína del anillo L) el cual se une en la punta. El ensamble de los anillos P y L requiere de FlgA y de la oxidación de dos cisteínas de FlgI por el sistema formador de unión disulfuro (Dsb) en el espacio periplásmico de la célula. La secreción de FlgI (anillo P) y FlgH (anillo L) en el periplasma y membrana externa es dependiente de la vía general de secreción (GSP). Ambas proteínas son sintetizadas con un péptido señal dependiente del sistema Sec (SP) que es procesado durante su secreción. Aunque el ensamble de los anillos P y L no está completamente entendido se ha demostrado el requerimiento de la proteína capping FlgD (Minamino y Macnab, 1999).

El número de las subunidades adicionadas subsecuentemente al gancho (por arriba de un tamaño de 55 ± 6 nm) aparentemente es controlado por FliK, una proteína cuya localización en la célula aún no se sabe. FlhB es responsable de la selección del tipo de proteína secretada a través del aparato de secreción flagelar (Macnab, 1996).

Una vez que el gancho es completado, el factor anti- σ FlgM es secretado de la célula, permitiendo la transcripción del operón clase III por medio de FliA (σ^{28}), las proteínas asociadas al gancho FlgK, FlgL y FliD se unen entre ellas. El papel inicial de FlgK es polimerizar en la punta del gancho FlgE (principal componente del gancho) reemplazando el andamio de FlgD. Esto permite inmediatamente la polimerización de una o más FlgF en la punta de FlgK. Finalmente se adiciona FliD en la punta actuando como una nueva proteína capping (Ikeda y col., 1987).

Después de la adición de FliD, las subunidades de flagelina inician su incorporación en la unión FlgL-FliD llevando a la extensión del filamento con longitud variable, que depende de la cantidad de flagelina sintetizada. Un problema importante para el crecimiento del filamento es la barrera energética que representa el movimiento de las subunidades de flagelina a lo largo de su longitud para alcanzar la punta del filamento (por arriba de $10 \mu\text{m}$). Se ha propuesto que FliI, una ATPasa requerida para síntesis flagelar, pueda proporcionar la energía requerida para el movimiento de la flagelina. Como muchas otras proteínas del aparato flagelar, FliI es homóloga a los componentes del sistema de secreción tipo III. Con excepción de los

componentes de los anillos P y L la secreción de las otras proteínas flagelares requiere de una maquinaria específica, el aparato de exportación el cual está relacionado filogenéticamente con el sistema de secreción tipo III encontrado en muchas bacterias patógenas. Cerca de 10 genes con homología a los genes pertenecientes al aparato de secreción tipo III han sido identificados en el cluster flagelar. Algunos de estos (codifican para las proteínas FlhA, FlhB, FliH, FliI, FliO, FliP, FliQ, y FliR) pueden ser componentes integrales de esta maquinaria ya que si se muta alguno de ellos, falla la secreción de los componentes flagelares (por ejemplo, FlgE la proteína del gancho y su proteína cap FlgD). Sin embargo algunos han sido localizados en el cuerpo basal (FliP, FliR y FlhA), más probablemente en el poro formado por el anillo MS, esto apoya su involucramiento como componentes del aparato de secreción flagelar (Katayama y col., 1996).

Este sistema actúa como una jeringa molecular dirigiendo la inyección de varias proteínas bacterianas en el citoplasma del hospedero eucariota activando la vía de señalización de la célula huésped y llevando a una variedad de respuestas celulares que favorecen la invasión del patógeno (Fernández y Berenguer, 2000).

Función

El flagelo bacteriano no sólo es un organelo de locomoción, sino que contiene un sofisticado aparato exportador muy parecido a la vía de secreción tipo III para factores de virulencia. Los flagelos bacterianos también juegan un papel muy importante en la adhesión, colonización, formación de biofilms e invasión que contribuyen a la patogénesis. El número y distribución de flagelos en bacterias es variable, sin embargo, la expresión flagelar es influenciada por las condiciones de crecimiento. En medio sólido muchas especies de bacterias expresan más flagelo que al ser crecidas en medio líquido (Kirov, 2003).

El flagelo está involucrado en los siguientes procesos:

- La quimiotaxis. Es el movimiento de una bacteria hacia un estímulo positivo o lejos de uno negativo. Es importante para la movilidad y la virulencia, dado que es a través de este mecanismo como se acercan o

se alejan de los componentes químicos que le pueden servir o dañar, respectivamente (Tortora y col., 2002)

- Participa en adhesión (*Salmonella*, *Pseudomonas*, *E. coli*). (Josenhans y Suerbaum 2002).
- Tiene similitud con el sistema de transporte de proteínas tipo III. Por medio de este aparato se translocan subunidades proteicas en una forma dependiente de ATP a través de la membrana citoplásmica y son liberadas al canal central para posteriormente ser ensambladas. El aparato de secreción tipo III del flagelo muestra homología con el aparato de secreción tipo III de las bacterias Gram-negativas, las cuales exportan toxinas y otros factores de virulencia que influyen la interacción de la bacteria con el hospedero en la patogénesis (Aizawa 2001).
- Formación de biofilms. Las células agregativas interactúan con ellas mismas o con células del huésped formando biofilms (Kirov, 2003).
- La flagelina, un ligando presuntivo para Receptores Toll-like 5 (TLR5).

Durante el curso normal de una infección, el agente infeccioso provoca que el hospedero desarrolle una respuesta inmune, que involucra estrategias de la respuesta innata, seguida de una respuesta inmune específica que favorece la eliminación del patógeno y estimula al hospedero a establecer un estado de inmunidad protectora (Goldstein, 2004).

Los TLRs son miembros de la superfamilia de receptores de Interleucina 1 (Fig. 3). La porción extracelular de estos receptores contiene un repetido rico en leucinas, el cual tiene un motivo xxLxLxx que está involucrado en el reconocimiento de moléculas conservadas expresadas sobre los agentes infecciosos pero no en el hospedero; los TLRs median la producción de citosinas necesarias para el desarrollo de la inmunidad (Hayashi y col., 2001).

La flagelina de bacterias Gram positivas y Gram negativas es reconocida por los receptores TLR5, y actúa como un potente activador de la expresión de genes involucrados en el proceso inflamatorio del epitelio intestinal. Aunque la flagelina promueve la inflamación solo si atraviesa el epitelio intestinal y entra en contacto con membranas basolaterales (Kaisho y Akira, 2000; Gewirtz, 2001; Hayashi y col., 2001).

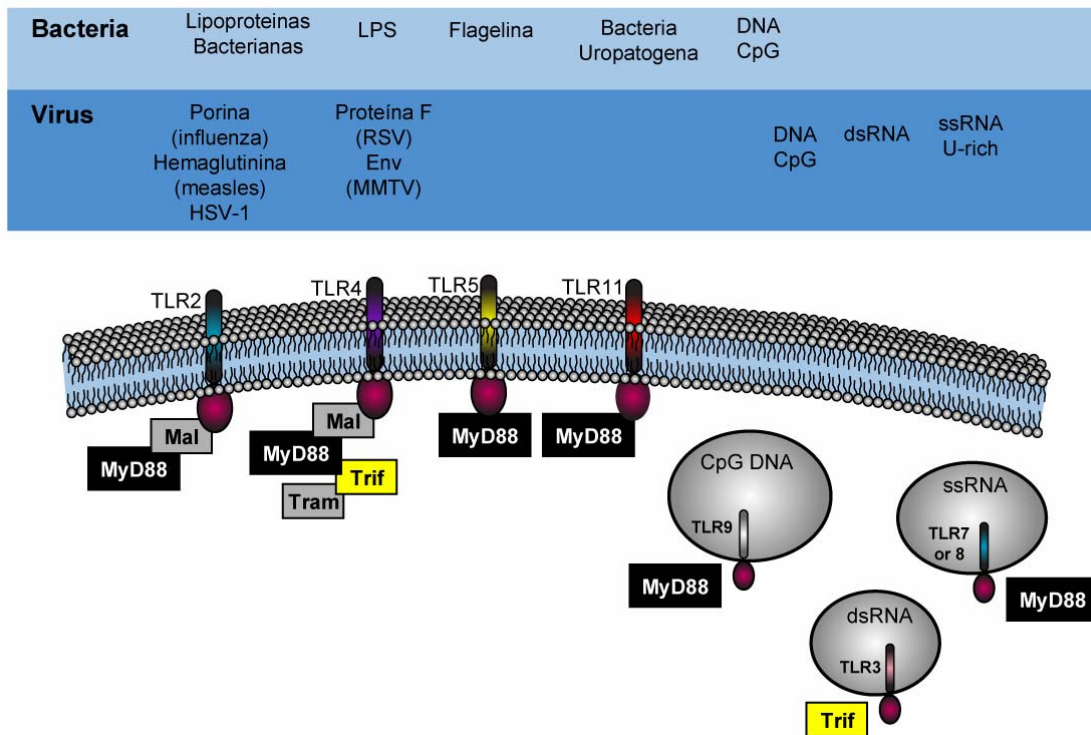


Fig.3. Esquema de los TLRs.

Importancia del flagelo en patogenicidad.

Se ha demostrado que existen varias especies bacterianas que requieren de la motilidad para que tengan éxito en su hospedero. La evidencia se apoya en que bacterias mutantes inmóviles o no flageladas son incapaces de colonizar y su capacidad para producir enfermedad se ve disminuida (Kerridge y col. 1960). El flagelo puede servir como un apéndice adhesivo en las fases iniciales de la colonización, así también se sabe que sirve como señal mecánica para indicarle a la bacteria que el programa de regulación por contacto del hospedero ha iniciado. Después de las fases de adherencia e infección la bacteria regula su motilidad a favor de una invasión celular específica o programa de transducción de señal (Josenhans y Suerbaum, 2002).

Tipos de flagelo

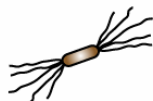
La distribución de los flagelos en las células bacterianas tiene cuatro posibles arreglos:

- Monótricos. Un solo flagelo polar.



Vibrio

- Amfítrico. Un manojo de flagelos en cada extremo de la célula.



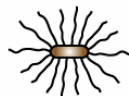
Spirillum

- Amlofótrico. Dos o más flagelos en un extremo de la célula.



Bartonella

- Perítrico. Flagelos distribuidos lateralmente o en todo el contorno de la célula.



E. coli

Fig. 4. Arreglos del flagelo en la superficie bacteriana.

Genética de flagelo

El flagelo tiene una base genética compleja. Estudios del flagelo de microorganismos como *E. coli* y *S. enterica*, han demostrado que existen más de 50 genes involucrados en la motilidad y quimiotaxis. Estos genes están arreglados en alrededor de 14 operones flagelares, los cuales se distribuyen en tres clusters principales que operan en una cascada regulatoria, generando una jerarquía en la expresión de genes. En *E. coli* el operón clase 1 codifica los activadores transcripcionales del operón clase 2. Los genes del operón 2 incluyen componentes estructurales del gancho y el activador transcripcional para el operón clase 3. El operón clase 3 incluye los genes estructurales del filamento flagelar y el sistema de transducción de señales para la quimiotaxis que dirige el movimiento de las células. Este mecanismo de regulación asegura

que los genes de la clase 3 no se transcriban antes de que las estructuras del gancho sean completadas (Harshey y Toguchhi, 1996; Kalir y col. 2001).

3. ANTECEDENTES DIRECTOS

El interés en el estudio del flagelo se ha incrementado en fechas recientes, considerándolo no sólo como un organelo de locomoción, ya que contiene además un aparato de transporte sofisticado que está estrechamente relacionado con el sistema de secreción tipo III para factores de virulencia. Además de que también tiene un papel adicional en adhesión, colonización, formación de biofilm, e invasión que contribuyen a la patogénesis bacteriana (Kirov, 2003).

El número y distribución de flagelos en las bacterias varía, desde único hasta arreglos con múltiples flagelos. La expresión flagelar está influenciada por las condiciones de crecimiento. En medio sólido, muchas bacterias expresan más de un tipo de flagelo, a diferencia de aquellas que lo hacen en medio líquido. Algunas especies, como *Proteus mirabilis*, incrementan su número de flagelos; mientras que otras, como *V. parahaemolyticus*, tienen un flagelo polar en medio líquido, pero en medio sólido presentan una mezcla de flagelo polar (Fla) y peritrico (Laf), éste último puede estar en gran número (Allison y Hughes, 1991; McCarter, 1999). La producción de flagelo es un proceso costoso para la bacteria en términos de recursos y energía (Kirov, 2003).

En la familia *Pasteurellacea* se incluye a un gran número de microorganismos patógenos para el ser humano entre los que se encuentran *H. influenzae*, *H. ducreyi*, *A. actinomycetemcomitans*, y patógenos para animales como *M. haemolytica*, *A. pleuropneumoniae* y *P. multocida*, entre otros. En el Manual Bergey se describe a todos los integrantes de esta familia como microorganismos inmóviles, pero en nuestro grupo de investigación hemos demostrado que *A. pleuropneumoniae*, responsable de la pleuroneumonía porcina, expresa flagelo, es móvil *in vitro*; posee un gen *fliC*, cuya secuencia de nucleótidos y la de aminoácidos de su flagelina son muy parecidas a las flagelinas de otras bacterias. La flagelina de *A. pleuropneumoniae* mostró reactividad cruzada con anticuerpos contra flagelinas de *E. coli* y *Salmonella*, entre otras bacterias (Negrete-Abascal y col., 2003).

4. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de las bacterias patógenas Gram negativas y algunas Gram positivas poseen en su membrana estructuras flagelares. El flagelo es mucho más que un órgano de locomoción y tiene múltiples funciones que contribuyen a la patogénesis (Kirov, 2003). Dada la importancia del flagelo como factor de virulencia y como órgano de locomoción de las bacterias, y dado que al menos otro de los miembros de la familia *Pasteurellaceae*: *A. pleuropneumoniae*, descrito como no móvil, tiene flagelo, es probable que *P. multocida* sea capaz de expresar flagelo *in vitro* bajo ciertas condiciones ambientales.

5. HIPOTESIS

P. multocida es capaz de expresar flagelo y de moverse *in vitro*.

6. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

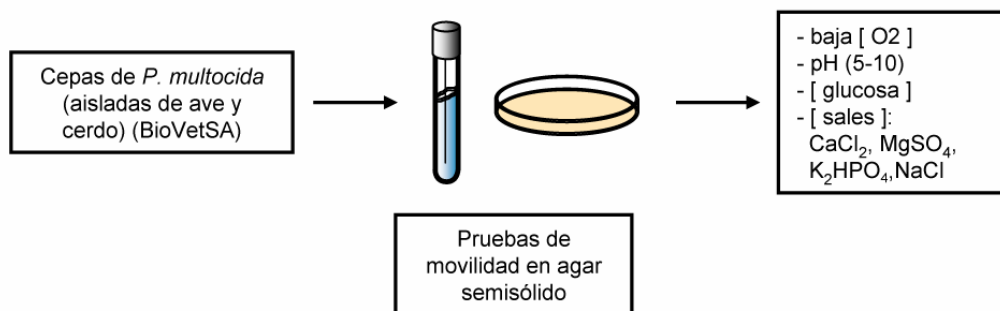
Demostrar la motilidad *in vitro* de *P. multocida*.

OBJETIVOS PARTICULARES

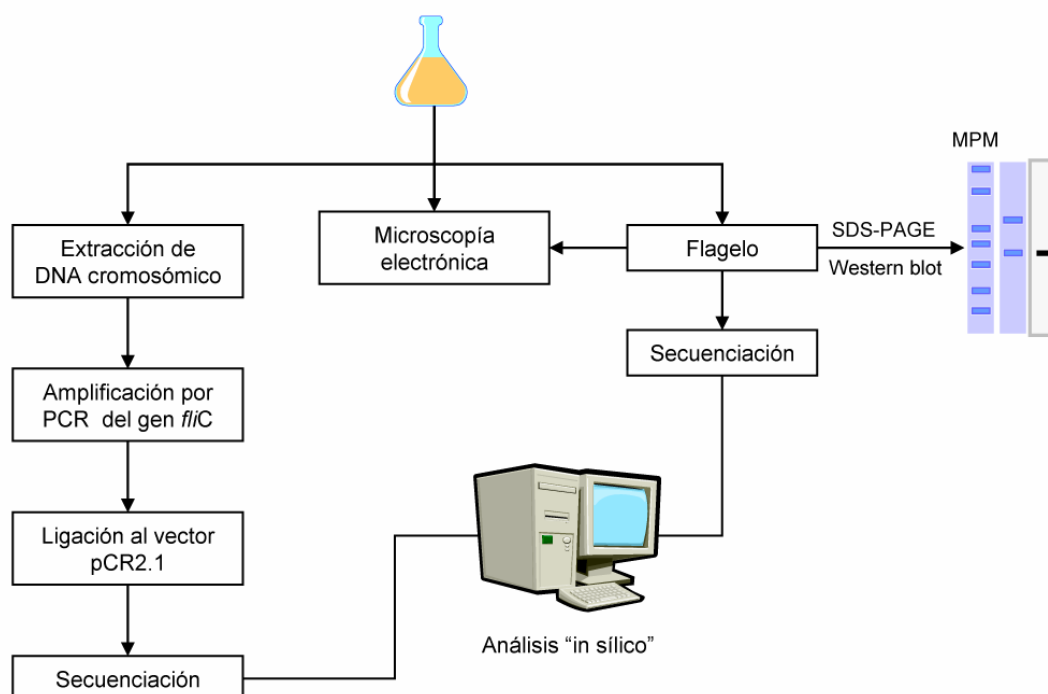
- Determinar las condiciones *in vitro* para la movilidad de *P. multocida*.
- Demostrar la presencia de flagelo en la superficie bacteriana por microscopía electrónica.
- Obtener la flagelina de *P. multocida*.
- Determinar la reactividad cruzada de la flagelina con diferentes sueros anti-flagelo.
- Amplificar por PCR y secuenciar el gen *fliC* de *P. multocida*.
- Deducir la secuencia de aminoácidos de la flagelina a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *fliC*.

7. Estrategia Experimental.

Estrategia experimental para la selección de cepas móviles.



Procesamiento de las cepas móviles.



8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 ORIGEN DE LAS CEPAS

Las cepas de *P. multocida* utilizadas en este trabajo fueron donadas por el laboratorio BIOVETSA de Tehuacán, Puebla. Estas cepas fueron aisladas de pollo (*P. multocida* serovar A, ATCC 11039) y de cerdos (serovar D) con rinitis atrófica. Las cepas de *E. coli* enteropatógena E2348/69 y O63: H (-) fueron usadas como controles positivo y negativo en las pruebas de motilidad y fueron gentilmente donadas por la Dra. Teresa Estrada, del Departamento de

Biomedicina Molecular del CINVESTAV-IPN y por el Dr. Armando Navarro del Laboratorio de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM; respectivamente.

8.2 SELECCIÓN DE CEPAS MÓTILES

Esta selección se realizó inoculando por punción la cepa de *P. multocida* en placas de agar semisólido (caldo soya tripticaseina (TSB) o infusión de cerebro corazón (BHI) adicionados con 0.4% de agar). Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda y en condiciones de microaerofilia (Negrete-Abascal y col., 2003). Una vez que se obtuvo un crecimiento radial, las colonias de la periferia fueron tomadas con un asa recta y reinoculadas en medio semisólido. Este proceso se repitió hasta obtener crecimientos radiales en tiempos de 3-4 días de incubación. Las bacterias obtenidas con estas resiembras fueron las que se usaron para determinar las condiciones óptimas de motilidad y para hacer observaciones en microscopía electrónica.

8.3 ENSAYOS DE MOVILIDAD

Para poder elegir el medio más adecuado para los ensayos de motilidad en tubo, las cepas seleccionadas se inocularon por punción en diferentes medios de cultivo TSB, BHI, Luria Bertani Glucosa y Fosfato (LBGP) y triptona (10 g/l) con cloruro de sodio (5 g/l), usando 0.2, 0.3, 0.35 y 0.4% de agar. 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 una motilidad positiva (Adler, 1966).

8.4. EFECTO DEL pH, DIFERENTES COMPUESTOS QUÍMICOS Y TEMPERATURA EN LA MOTILIDAD DE *P. multocida*

Habiendo determinado que el medio TSB o el caldo triptona con NaCl suplementados con 0.2% de agar e incubados en condiciones de microaerofilia eran las condiciones más apropiadas para observar la motilidad de *P. multocida*, se eligió el caldo triptona con NaCl para determinar el efecto de diferentes variables, las cuales incluyeron pHs de 5 a 10; la adición de diferentes sales: CaCl₂ (2.5, 5.0 y 7.0 mM); MgSO₄ (2.0 y 4.0 mM); K₂HPO₄ (1.4, 2.0 y 4.1 mM); NaCl (85, 170, 256, 341 mM); dextrosa (13, 27, 55 y 110

mM) y la incubación a 23 ± 3 °C (temperatura ambiente), 37, 39, o 40 °C. Los tubos se revisaron cada día en un periodo de 72 h (Kerridge, 1960; Adler y Templeton, 1967; Holt y Chaubal, 1997, Girón, 1995; Lai y col., 1997).

8.5 PURIFICACIÓN DE LA FLAGELINA DE *P. multocida*

Para obtener la flagelina de *P. multocida*, bacterias seleccionadas como móviles de la cepa aislada de pollo se crecieron en medio soya tripticaseina adicionado con 0.7% de agar y 5% de suero de ternera o 5% de sangre de carnero (Negrete-Abascal y col., 2003). Las células se cosecharon y se resuspendieron en Tris-HCl 20 mM (pH 8.0) conteniendo NaCl 25 mM. Las células fueron agitadas mecánicamente durante 5 minutos y se centrifugaron a $8,000 \times g$ durante 20 minutos, para separarlas del flagelo liberado. El flagelo fue obtenido por centrifugación diferencial de acuerdo a la metodología descrita por Girón (1995).

8.5.1 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Para determinar el peso molecular de la subunidad monomérica del flagelo de *P. multocida*, las proteínas obtenidas por centrifugación diferencial se analizaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 10% de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Las muestras de flagelo fueron hervidas previamente durante 5 minutos en buffer muestra a las cuales se les adicionó 2-mercaptoetanol a una concentración final del 5%. El corrimiento electroforético se realizó a 100 voltios hasta que el colorante de corrida llegó aproximadamente a 0.5 cm. del extremo inferior del gel. Los geles fueron teñidos durante 1 h en una solución que contenía azul de Coomassie R-250 al 0.25% (BioRad, EUA). Para contrastar las bandas de las proteínas, el gel se destiñó realizando varios cambios con una solución de metanol al 30% y ácido acético al 10%.

8.5.2 INMUNORECONOCIMIENTO (WESTERN BLOTTING)

Después de realizar el corrimiento electroforético las proteínas de los geles fueron transferidas a papel de nitrocelulosa durante 2h a 100 V de acuerdo a la técnica descrita por Towbin y col., (1979). Terminada la transferencia, el gel se tiñó con azul de Coomassie y la membrana con Rojo de

Ponceau para verificar la eficiencia de la transferencia. La membrana de nitrocelulosa se incubó en agitación durante toda la noche a 4°C con PBS-Tween-leche 6% (solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.4; NaCl 150 mM; Tween 20 al 0.05% (Sigma, EUA) y leche descremada al 6.0% (BioRad, EUA), para bloquear las uniones inespecíficas. Posteriormente las membranas se incubaron a 4°C con agitación durante toda la noche con el primer anticuerpo (anticuerpo policlonal de conejo anti-flagelo de *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. mirabilis* o *A. pleuropneumoniae*) (Negrete-Abascal y col., 2003) diluido 1:1000 en PBS-Tween-leche. Terminada la incubación el exceso de anticuerpo se eliminó lavando tres veces el papel con PBS-Tween durante 5 min a temperatura ambiente. Enseguida las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 4 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo (IgG de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa) diluido 1:2000 en PBS-Tween-leche, las membranas se lavaron 5 min cada vez a temperatura ambiente por dos veces con solución amortiguadora de fosfatos 20 mM pH 7.4, NaCl 150 mM y una vez con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.4 (PBS). El reconocimiento de las proteínas por los antisueros se evidenció utilizando 0.5 mg/ml de 4-cloro-1-naftol (Sigma, EUA) y peróxido de hidrógeno al 0.01%. La reacción se detuvo lavando exhaustivamente con agua bidestilada. Como control positivo del inmunoreconocimiento se empleó flagelina purificada de *E. coli*.

8.5.6 SECUENCIA DE AMINO ÁCIDOS

La secuencia amino ácida de la flagelina de *P. multocida* se determinó a partir de una muestra de proteína transferida a una membrana de polivinilidene difluoruro (PVDF, Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Las bandas se cortaron y se secuenciaron en un secuenciador de proteínas modelo LF3000 (Beckman, Fullerton, CA) interconectado con un analizador en línea modelo 1120 (Applied Biosystems).

8.6 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Bacterias seleccionadas como mótilis o el flagelo purificado de *P. multocida* se resuspendieron en agua destilada estéril y se colocaron en rejillas de cobre recubiertas con carbón y Formvar y se tiñeron negativamente con

ácido fosfotúngstico pH 7.4 al 1% (peso/volumen). Estas muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión JEM 2000 EX a 80 V.

8.7 EXTRACCIÓN DE DNA CROMOSÓMICO

La obtención del DNA cromosómico de *P. multocida* se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Chen y Kuo (1993). Se centrifugaron 1.5 ml de cultivo bacteriano durante 3 minutos a 12, 000 rpm. La pastilla se resuspendió y las células se lisaron usando 200 µl de buffer de lisis (Tris-acetato 40 mM pH 7.8, acetato de sodio 20 mM, EDTA 1 mM, SDS 1 %) con agitación vigorosa. Para remover la mayoría de las proteínas y restos celulares se adicionó 100 µl de NaCl 5M se mezcló muy bien y se centrifugó a 12, 000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se recolectó el sobrenadante y se le adicionó cloroformo, el tubo se agitó por inversión suave, se centrifugó a 12, 000 rpm durante 3 min a 4 °C, el sobrenadante se pasó a otro tubo y se le adicionó etanol al 100 %, se lavó dos veces con etanol al 70 %, se secó y se resuspendió en 50 µl de agua desionizada estéril. La pureza e integridad del DNA obtenido fue determinada por corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1% de acuerdo al método descrito por Sambrook y col., (1989). La electroforesis se realizó a 10 voltios/cm durante 1 h, y utilizando como marcador de tamaño al marcador de 1 kb (Invitrogen).

8.8 AMPLIFICACIÓN DEL GEN *fliC* POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

El DNA genómico de *P. multocida* se utilizó como templado para la amplificación del gen *fliC* por PCR, para esto se utilizaron los oligos reportados previamente por Negrete y col., (2003); y cuyas secuencias nucleotídicas son:

Oligonucleótido en sentido	5´ AATACAACAGCCTCTCGCT 3´
Oligonucleótido en antisentido	5´ AGAGACAGAACCTGCTGC 3´

La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 30 µl que contenía amortiguador de PCR 1X para la enzima Taq DNA polimerasa (Tris-HCl 20 mM pH 8.4; KCl 50 mM), MgCl₂ 4.3 mM (Gibco, BRL, EUA) dATP, dCTP, dGTP y dTTP 200 µM de cada uno (Boehringer-Mannhaeim), 1 U de la

enzima de DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Gibco, BRL, EUA), 30 ng de DNA y 100 ng de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer) bajo las siguientes condiciones: 10 min a 94°C para la desnaturalización del DNA, 25 ciclos de polimerización (1 min a 94 °C, 1 min a 56 °C (hibridación) y 2 min a 72 °C) y por último un ciclo de 10 minutos a 72°C para la extensión.

8.9 CLONACIÓN DEL GEN *fliC* DE *P. multocida*.

El producto de la amplificación se clonó en el vector pCR2.1 (Invitrogen), interrumpiendo el gen *lacZ* (α -complementación), pCR2.1 posee dos marcadores de selección; ampicilina y kanamicina. Se utilizó una cepa de *E. coli* TOP10 como hospedero general para la construcción pCR2.1-*fliC Pm*. La identificación de las colonias *lacZ*-, que fueran portadoras del producto amplificado se realizó en primera instancia en base al fenotipo resultante de la α -complementación, en presencia del sustrato cromogénico 5-Bromo-4-Cloro-3-Indol β -D-galactósido (X-gal) y de ampicilina (100 μ g ml⁻¹), fenotipo colonias blancas ampicilina resistentes.

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

8.10 SECUENCIACIÓN

Una vez identificadas las colonias portadoras del fragmento clonado se envió una muestra de DNA plasmídico (pCR2.1-*fliC Pm*) a secuenciar al laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FES-I. El fragmento clonado fue secuenciado automáticamente en un secuenciador de nucleótidos Abi Prism 3100 (Perkin-Elmer, AB Fullerton CA), usando los primers universales reversos T4 y M13 y siguiendo los protocolos *Taq* dye deoxy terminator and dye primer. Las secuencias de amino ácidos y de nucleótidos de la flagelina y del gen *fliC* de *P. multocida* fueron depositadas en The Gene Bank Database con el número de acceso AY445112.

8.11 ANÁLISIS IN SÍLICO

Una vez obtenidas las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos, se realizó el análisis de las mismas comparándolas con diferentes genes *fliC* y flagelinas previamente reportadas utilizando los programas n-Blast y AliBee Multiple Alignement,

9 RESULTADOS

A través de resiembras sucesivas en placas con medio semisólido, se lograron seleccionar colonias bacterianas móviles de *P. multocida* (Fig. 5A) las cuales presentaron un crecimiento radial mayor al de *E. coli* O63:H-, usada como control negativo, pero este crecimiento radial fue siempre menor al observado con *E. coli* enteropatógena E2348/69, usada como control positivo (no mostrada en la placa), pues como se observa en el ensayo en tubo (Fig. 5B), la cepa de *E. coli* empleada como control positivo presentó siempre una alta motilidad ocupando todo el espacio de que disponía en tiempos de incubación cortos.

ENSAYO DE MOTILIDAD.

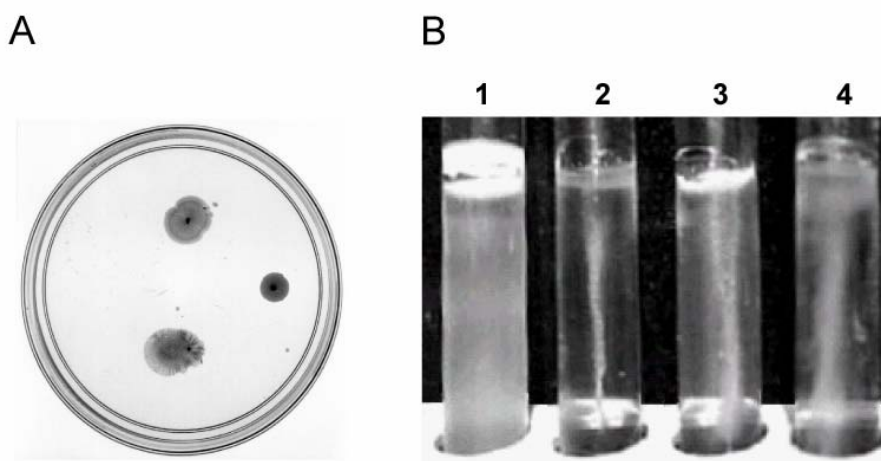


Figura 5. Ensayos de movilidad de *P. multocida* (Pm). **A.** En placa con medio semisólido (triptona con NaCl y agar 0.4%). **B.** En tubo a las mismas condiciones pero suplementado con glucosa [27 mM] y agar 0.2% (1) *E. coli* (EPEC); (2) *E. coli* H-; (3) *Pm* aislada de ave y (4) *Pm* aislada de cerdo.

CONDICIONES DE MOTILIDAD

De los diferentes medios empleados para detectar la motilidad de *si*, tanto en TSB como en triptona con NaCl se observaron resultados similares. Se eligió éste último para poder determinar las condiciones de motilidad debido a que se trataba de un medio menos complejo que el TSB.

En el ensayo para la motilidad en placa se usó una concentración de agar de 0.4%. En tubo la concentración de agar óptima fue de 0.2%; a una concentración de 0.3% la motilidad disminuyó, siendo aún menor a 0.35%. A 0.4% la motilidad prácticamente fue nula (Tabla 2). La condición atmosférica también influyó en la motilidad, siendo más evidente en condiciones de microaerofilia que en condiciones atmosféricas normales.

La adición de glucosa en concentraciones de 13 o 27 mM al medio de ensayo favoreció la motilidad, pero concentraciones superiores (55 o 110 mM) la inhibieron.

La presencia de NaCl y la de KH_2PO_4 fueron necesarias para la motilidad de *P. multocida*, siendo las concentraciones óptimas de 17 y 1.4 mM, respectivamente. Concentraciones superiores a 17 mM de NaCl no afectaron la motilidad de *P. multocida*, pero una concentración mayor o igual a 4 mM de KH_2PO_4 la disminuyó. El MgSO_4 no afectó la motilidad a concentraciones de 2 y 4 mM; sin embargo, la presencia de CaCl_2 en concentraciones iguales o superiores a 5 mM la afectaron negativamente.

El pH también afectó la motilidad, siendo 7 el pH óptimo. Valores por arriba o por debajo de 7 afectaron negativamente la motilidad. La motilidad de *P. multocida* pudo observarse sin cambio a 37, 39 o 40 °C, pero a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C) ésta fue casi nula (Tabla 2).

TABLA 2. Motilidad de las cepas de *P. multocida* en diferentes condiciones de crecimiento.

Condición del ensayo	PmC	PmP	Condición del ensayo	PmC	PmP
[Glucose mM]			[Agar %]		
13	+++	++	0.2	+++	+++
27	++	+++	0.3	++	++
55	+/-	+	0.35	+	+
110	+/-	+/-	0.4	-	-
[CaCl ₂ mM]			Temperatura (° C)		
2.5	+	++	22	+/-	+/-
5.0	+/-	+	37	++	++
7.0	+/-	+/-	39	++	++
			40	++	++
[MgSO ₄ mM]			pH		
2.0	+	++	5	-	-
4.0	+	++	6	+/-	+
			7	++	++
[NaCl mM]			8	+	++
Sin adición	-	-	9	+/-	+/-
8.5	+/-	+	10	-	-
17.0	+++	++			
25.6	++	++	Baja tension de oxigeno	++	+++
34.1	++	++			
[KH ₂ PO ₄ mM]					
Sin adición	+/-	+/-			
1.4	++	+++			
2.0	++	++			
4.1	+	++			

La motilidad de las cepas de *P. multocida* (PmP: aislado de pollo; PmC: aislado de cerdo) fue probada con 0.2% agar y 37°C en todos los experimentos, excepto en aquellos en los que se variaron las concentraciones de agar y la temperatura. Las cepas fueron probadas al menos 3 veces y los resultados fueron registrados después de 72 h de incubación. +++: muy mótil; ++: moderadamente mótil; +: mótil; +/-: escasamente mótil; -: no mótil.

OBTENCIÓN DE LA FLAGELINA

Las cepas seleccionadas como mótils, crecidas en soya tripticaseína con agar al 0.7% y adicionado con 5% de suero de ternera o sangre de borrego, se cosecharon y agitaron mecánicamente para liberar el flagelo de la superficie bacteriana. Estas estructuras bacterianas se purificaron por centrifugación diferencial y se corrieron electroforéticamente en condiciones desnaturizantes en un gel de poliacrilamida al 10% dando origen a una proteína de aproximadamente 38 kDa, entre otras (Fig. 6A). Como no se obtuvo una purificación total y la muestra presentaba diferentes bandas de proteínas, se realizó un inmunoreconocimiento usando un suero policlonal anti-flagelo de *E. coli* para confirmar que ésta(s) bandas correspondían a una flagelina (Fig. 6B)

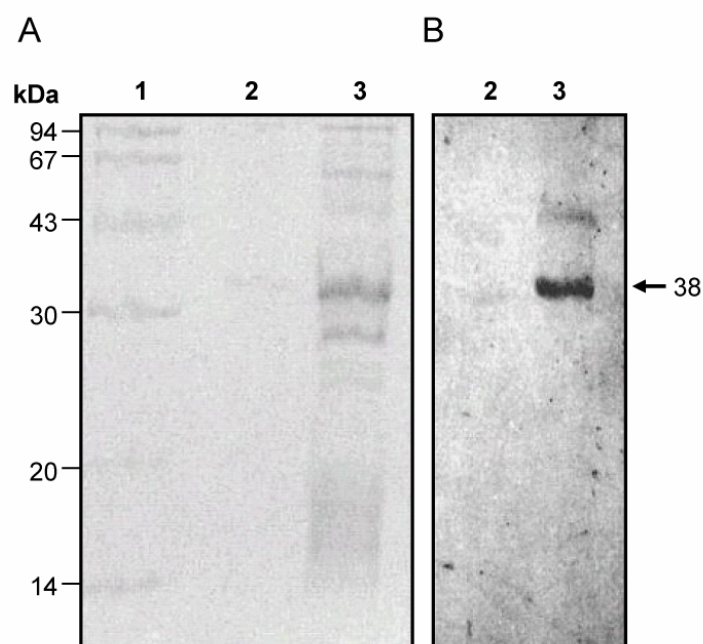


Figura 6. A. SDS-PAGE al 10% teñido con Azul de Coomassie donde se muestra la flagelina de *P. multocida*. Carril 1) Marcadores de peso molecular, Carril 2) primeras fracciones, Carril 3) fracción enriquecida **B.** Proteínas transferidas a papel de nitrocelulosa y tratadas con el anticuerpo anti-flagelina de *E. coli*. Carril 2) primeras fracciones, carril 3) fracción enriquecida

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Las colonias de *P. multocida* crecidas en soya tripticaseina con agar al 0.4% y adicionado con 5% de suero de ternera o sangre de borrego y seleccionadas como mótils mostraron filamentos flagelares en su superficie cuando se observaron con ayuda de un microscopio electrónico. Estas estructuras presentaron una distribución principalmente polar; lo cual no descarta una distribución diferente en condiciones de crecimiento distintas. Los flagelos presentaron una longitud promedio de 15 μm y un grosor de 10-20 nm (Fig. 7A). La presencia de flagelos en las muestras obtenidas por centrifugación diferencial fue también determinada por microscopía electrónica confirmando el reconocimiento inmune obtenido con el suero policlonal anti-flagelo de *E. coli* (Fig. 7B).

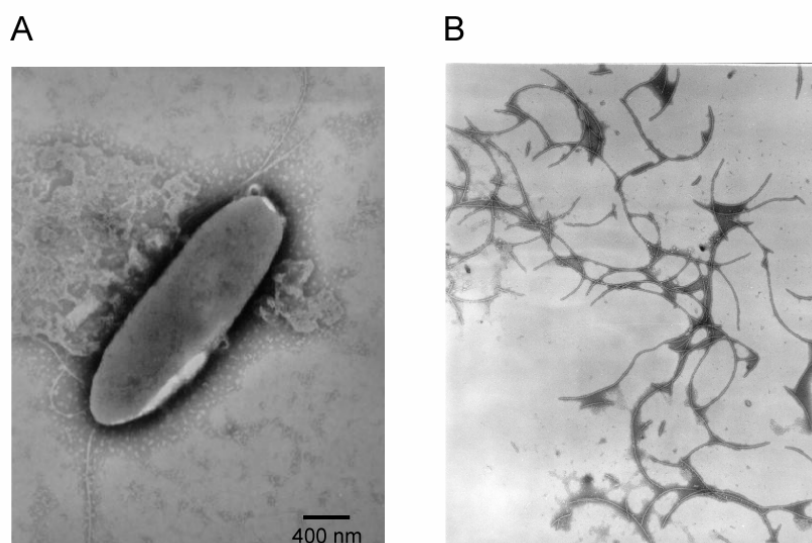


Figura 7. Micrografía electrónica de **A.** Células de *P. multocida*. **B.** Flagelo purificado de *P. multocida*.

RECONOCIMIENTO (WESTERN BLOT)

La flagelina de *P. multocida* fue reconocida por sueros policlonales dirigidos contra flagelinas de diferentes bacterias (Fig. 8). Esta reactividad fue muy similar a la observada con la flagelina de *E. coli* usada como control positivo. Este inmunoreconocimiento confirmó la presencia de epítomos comunes entre las diferentes flagelinas bacterianas ya descritas.

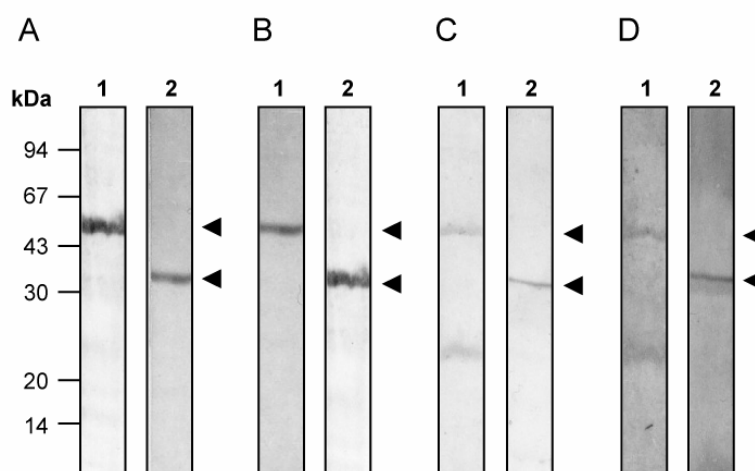


Figura 8. Western blot donde se muestra el reconocimiento de las flagelinas de *E. coli* (carriles con número 1) y de *P. multocida* (carriles con número 2) al usar diferentes sueros policlonales anti-flagelo.

- A. Anti-flagelo de *E. coli*.
- B. Anti-flagelo de *S. typhimurium*.
- C. Anti-flagelo de *P. mirabilis*.
- D. Anti-flagelo de *A. pleuropneumoniae*.

EXTRACCIÓN DE DNA Y AMPLIFICACIÓN DE *fliC* DE *P. multocida* POR PCR

La extracción del DNA de la cepa de *P. multocida* aislada de pollo se logró adecuadamente y después de un tratamiento con fenol cloroformo y RNAsa, el DNA se obtuvo en un estado de pureza adecuado para la PCR (Fig. 9).

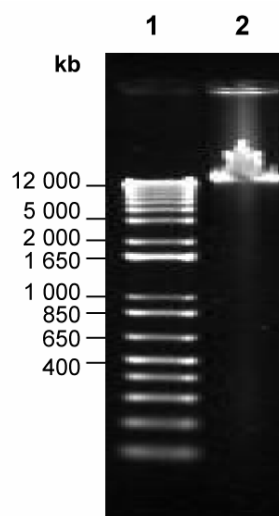


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1) Marcador 1 de Kilobase, Carril 2) DNA cromosómico de *P. multocida*.

Usando este DNA como templado se logró la amplificación de un producto de aproximadamente 1000 pb (Fig. 10) el cual se clonó en el vector pCR 2.1 y se envió a secuenciar. De la misma manera, se obtuvo también DNA genómico de la cepa de *P. multocida* aislada de cerdo (serotipo D) así como de dos aislados de campo (de cerdo y de conejo, también proporcionados por BioVetSA) de los cuales se logró amplificar un producto de tamaño similar al obtenido previamente con la cepa aislada de pollo (Fig. 11)

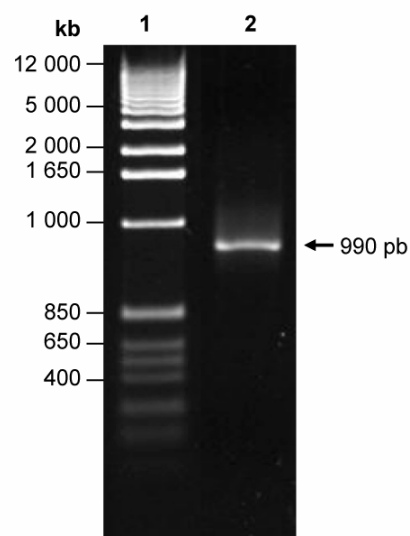


Figura 10. Producto de amplificación del gen *fliC* de *P. multocida* con los iniciadores diseñados para amplificar el *fliC* de *A. pleuropneumoniae*. Gel de agarosa al 1%, Carril 1) Marcador 1 Kb, Carril 2) Producto de PCR *fliC* de *P. multocida* aislada de pollo.

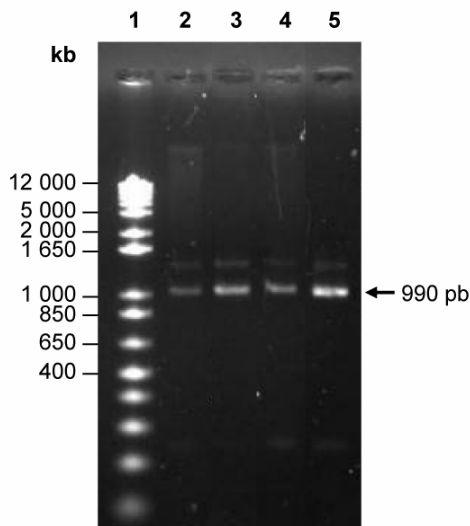


Fig. 11. Productos de amplificación de los genes *fliC* de *P. multocida* aisladas de diferentes hospederos. Carril 1) Marcador 1 Kb, Carril 2) *P. multocida* OV, Carril 3) *P. multocida* X73, Carril 4) *P. multocida* 1569 (otro aislado de cerdo), Carril 5) *P. multocida* 3307 (aislado de conejo)

SECUENCIA DE AMINO ÁCIDOS Y NUCLEÓTIDOS DE LA FLAGELINA Y DEL GEN *fliC* DE *P. multocida* Y ANÁLISIS IN SILICO.

Utilizando oligonucleótidos complementarios al gen *fliC* de *A. pleuropneumoniae* y DNA genómico de *P. multocida*, se obtuvo por PCR un fragmento de 990 pb, cuya secuencia fue homóloga a la de los genes *fliC* de otras bacterias, incluida *A. pleuropneumoniae*, también miembro de la familia *Pasteurellaceae* (Fig.12)

La secuencia de amino ácidos completa de la flagelina obtenida de *P. multocida* aislada de pollo mostró una proteína constituida por 335 a.a. La comparación de esta secuencia con las de otras flagelinas reportadas usando el programa BlastX (EXPECT=10; matrix BLOSUM62, word size=3) reportó un alto porcentaje de identidad con las flagelinas de *A. pleuropneumoniae*, *E. coli* O15H17, *V. cholerae*, y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15691), entre otras (Fig.12).

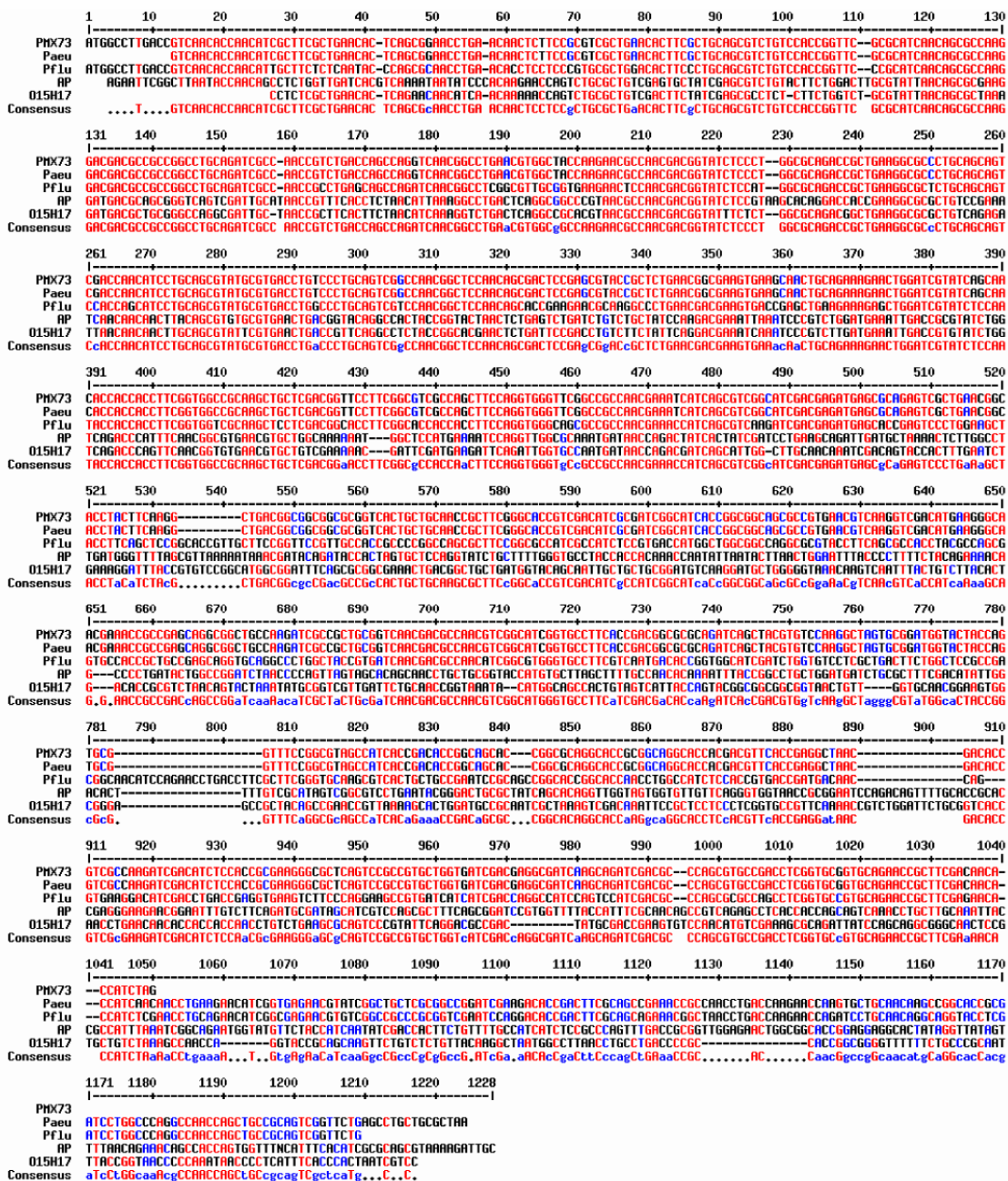


Fig.12. Alineamiento nucleotídico del gen *fliC* de *P. multocida* con las secuencias reportadas de los genes *fliC* de *Ps. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *A. pleuropneumoniae* y *E. coli* O15H17 realizado con el programa Multalin. Bases en rojo indican bases idénticas, en azul las bases idénticas entre dos secuencias, en negro bases diferentes y (-) ausentes.

SECUENCIA AMINO TERMINAL DEL PEPTIDO fliC.

	N-terminal (1)	(50)
<i>P. multocida</i>	MALTVNTN IASLNTQR NLNSSASLNTSLQ RLSTGSR INSAKDDAAGLQ I	
<i>E. coli</i>	MAQVINTNSLSLITQ NN INKNQSALSSSIE RLSSGLR INSAKDDAAGQ AI	
<i>P. aeruginosa</i>	MALTVNTN IASLNTQR NLNSSASLNTSLQ RLSTGSR INSAKDDAAGLQ I	
<i>P. putida</i>	MALTVNTN IASIT TQ N LTKASNAQTSMQ RLSSGLR INSAKDDAAGLQ I	
<i>S. typhimurium</i>	MAQVINTNSLSLLTQ NN LNKSQSALGTAIE RLSSGLR INSAKDDAAGQ AI	
<i>Y. enterocolit</i>	MA-VINTNSLSLLTQ NN LNKSQSSLSAIE RLSSGLR INSAKDDAAGQ AI	
<i>B. bronchisepti</i>	MAAVINTNYLSLVAQ NN LNKSQSALGSAIE RLSSGLR INSAKDDAAGQ AI	
<i>T. phagedenis</i>	M--II NH MSAMFAQ R TLGNTNLSVQKNME KLS SGLRINRAGDDASGLAV	
CONSENSO	M NTN SL TQ NLN	RLS G RINSA DDAAG I
	(51)	(100)
<i>P. multocida</i>	ANRLTSQV NGL NVATKNANDGISLAQTAE GA LQOSTN ILQ MRDLSLQSA-	
<i>E. coli</i>	ANRF T SNIKGLTQAARNANDGISVAQT EG ALSEIN NNLQ RVRELTVQAT--	
<i>P. aeruginosa</i>	ANRLTSQV NGL NVATKNANDGISLAQTAE GA LQOSTN ILQ MRDLSLQSA--	
<i>P. putida</i>	ANRLTSQ ING LQAVKNANDGISIAQTAE GA MQASTDILQ KM RTLALCSA--	
<i>S. typhimurium</i>	ANRF T ANIKGLTQASRNANDGISIAQT EG ALNEIN NNLQ RVRELAVQSA--	
<i>Y. Enterocolit</i>	ANRF T S ING LTVAAARNAELGISLSQTAE GA LGEIN NNLQ RVRDLTVQAQN-	
<i>B. bronchisepti</i>	ANRF T ANVKGLTQAARNANDGISIAQT EG ALNEIN NNLQ RIRELTVQAS--	
<i>T. phagedenis</i>	SEKMRSQIR GLN QASTNAQNGISFIQVAESYLQ ET TDV IQ RIRELSVQ S ANG	
CONSENSO	ANR T NGL NANDGIS AQT EGAL N QR R L Q	

Fig. 13. Alineamiento múltiple de la región N-terminal del péptido deducido del gen *fliC* clonado de *P. multocida*, con siete diferentes flagelinas bacterianas; *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *S. typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Bordetella bronchiseptica* y *Treponema phagedenis*. Aminoácidos en rojo indica el más alto índice de identidad, en azul indica residuos funcionalmente idénticos y en negro un menor índice de identidad. Realizado con el programa AliBee Multiple Alignment

10 DISCUSIÓN

Existen evidencias de que muchos de los determinantes de virulencia de bacterias patógenas son regulados por el medio ambiente y se expresan sólo bajo ciertas condiciones. Los microorganismos patógenos deben tener mecanismos específicos que faciliten la colonización, eviten el sistema inmune del hospedero y les permitan adquirir los nutrientes necesarios. Ellos deben también producir factores que causen daño al hospedero (directa o indirectamente). Debido a que el ambiente encontrado en un hospedero será completamente diferente del ambiente externo, los patógenos deben ser capaces de regular la expresión de los genes necesarios al moverse del ambiente al hospedero o de un nicho a otro (Shehata y Marr, 1971; Griffiths, 1991; Óbice y col., 2004).

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, algunos de los patógenos se mueven a través de diferentes medios ambientes (de la superficie de la mucosa al torrente sanguíneo o de la localización extracelular al interior de las células). Esto tiene consecuencias importantes no solo para el entendimiento de la patogenicidad bacteriana y de las enfermedades causadas, sino también para el diseño de medidas usadas para prevenir o tratar infecciones. La patogenicidad generalmente depende de una o varias propiedades de la bacteria y la respuesta a las señales del medio ambiente involucran alteraciones coordinadas en la expresión de grupos de genes y operones que codifican varios factores (Miller y col., 1989).

En términos generales, los genes pueden ser regulados positiva (activados) o negativamente (reprimidos), y su regulación puede ocurrir nivel de transcripción, traducción o posttraduccionalmente. La regulación de un gen o grupo de ellos a nivel transcripcional y en particular a nivel del inicio de la transcripción es el método más efectivo para controlar su expresión. El conocimiento de la regulación genética bacteriana ha sido fuertemente influido por el concepto del operón, en el cual una proteína regulatoria controla la expresión de dos o más genes que son transcritos como un mensaje policistrónico. El operón representa un mecanismo para la expresión

coordinada de un grupo de genes de acuerdo a como una bacteria experimenta diferentes cambios ambientales. El agrupamiento de varios operones o genes individuales bajo el control de una proteína reguladora común produce un regulón, en el cual todas las unidades transcripcionales son reguladas en respuesta a una señal común (Dorman y Smith, 2001).

El regulón de la quimiotaxis flagelar en *E. coli* contiene más de 50 genes que están organizados en una jerarquía tal que la expresión de genes en la punta de la jerarquía es requerida para la expresión de los genes más bajos en esa jerarquía. Se requiere una gran cantidad de energía para la síntesis de flagelo. La cantidad de flagelina sola es el 8% del total de la proteína celular cuando los operones flagelares son expresados óptimamente. A pesar del alto costo energético que representa para un microorganismo expresar flagelos, las ventajas que le confiere expresarlos le redituarán en ventajas de sobrevivencia y de su patogenicidad con respecto a aquellos que no los expresen (Macnab y Parkinson, 1991).

La expresión de genes de virulencia está 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 o en un ambiente definido, en coordinación con cambios en las condiciones ambientales (Mekalanos, 1992).

Diferentes factores de virulencia han sido descritos y caracterizados en *P. multocida* (Boyce y col., 2000b; Essler y col., 1998; Mizana y col., 2000; Snipes y col., 1988); sin embargo a la fecha no han sido descritas evidencias acerca de la movilidad in vitro y la presencia de flagelo en esta bacteria. (Kilian y Biberstein, 1984). En este trabajo se reportan las condiciones y características bioquímicas que permiten evidenciar la motilidad y la presencia de flagelo bacteriano en *P. multocida*.

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 Ragione y col., 2000; Van Hasten y col., 2000). Para *P. multocida* 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 para poder colonizar eficazmente depende de factores relacionados al microambiente en el que se encuentren dentro de su hospedero o de ciertas condiciones *in vitro*, por ejemplo, los cambios de temperatura influyen en la expresión del pilus tipo 1 en *E. coli* (Wolf y Arking, 2002) y el contacto con células induce la expresión de pili tipo IV de diferentes bacterias Gram negativas, tales como *A. pleuropneumoniae* (Winther-Larsen y Koomey, 2002; Boekema y col., 2004). Varios autores han demostrado que cuando cepas de *P. multocida* aisladas de aves se crecen *in vivo*, expresan nuevos antígenos de superficie los cuales no son expresados en condiciones *in vitro* (Snipes y col., 1988; Choi y col. 1991), lo que sugiere fuertemente que la expresión de proteínas tales como la flagelina podría estar relacionada a ciertas condiciones del medio ambiente dentro de su hospedero o que no están comúnmente presentes *in vitro*.

Para poder evidenciar la motilidad *in vitro*, la presencia de flagelo sobre la superficie de *P. multocida* y para obtener la flagelina a partir de células que la expresaban, fue muy importante la selección previa de cepas mótilas. Sin esta selección, no hubiese sido posible ver la motilidad de esta bacteria. Este proceso fue similar al utilizado para seleccionar cepas mótilas de *A. pleuropneumoniae*, otro miembro de la familia *Pasteurellaceae* y agente responsable de la pleuroneumonía porcina, del cual también se demostró recientemente la motilidad *in vitro* (Negrete-Abascal y col., 2003). Para ambas bacterias, la motilidad se vio favorecida en medios BHI o TSB con una concentración de agar del 0.2-0.3%. Estos resultados también fueron similares a los reportados por Girón (1995) al estudiar la motilidad de diferentes cepas de *Shigella* reportando una concentración óptima de agar de 0.175%.

P. multocida presentó motilidad óptimamente a una concentración de agar de 0.2% independientemente de cual cepa se estuviese probando. La motilidad disminuyó cuando la concentración de agar se elevó al 0.3 o 0.35%. La variación en la concentración de agar conlleva cambios importantes en disponibilidad de oxígeno, nutrientes, osmolaridad y viscosidad, entre otras, las cuales pueden tener gran influencia en la expresión del flagelo.

Dos tipos diferentes de motilidad son mediados por el flagelo bacteriano. La motilidad natatoria (swimming) en medio líquido y el movimiento ondulatorio (swarming) en superficies sólidas o en medios viscosos condiciones viscosas.

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 está asociada con la diferenciación celular al fenotipo ondulatorio (swarmer), y depende de la incrementada expresión flagelar inducida en superficies sólidas y por alta viscosidad, este tipo de motilidad se ha demostrado tanto en bacterias Gram-negativas como en Gram-positivas (Kirov, 2003).

El swarming ha sido caracterizado en *Proteus sp.* y en *V. parahaemolyticus*. En *Proteus sp* la hiperflagelación resulta de la incrementada expresión del mismo tipo flagelar usado para el movimiento natatorio, mientras que en *V. parahaemolyticus* ocurre debido a la inducción del flagelo lateral. El swarming de *Proteus* tiene una fuerte apariencia de ojo de toro. La colonia inicial de 2-4 μm presenta bacterias con 6-10 flagelos peritricos y se diferencia en células hiperflageladas de 20-80 μm las cuales migran en forma al mismo tiempo, paran y revierten a células vegetativas antes de una segunda fase de diferenciación de swarming. Esto da como resultado el patrón de anillo concéntrico (McCarter, 1999; Harshey 1994, Belas, 1996).

La presencia de flagelo polar sobre la superficie de *P. multocida* fue determinada por microscopía electrónica, observándose filamentos de aproximadamente 15 μm de longitud y diámetro de 10-20 nm; dimensiones muy similares a las descritas para el flagelo polar expresado por *A. pleuropneumoniae* (Negrete-Abascal y col., 2003) en condiciones similares. Sin embargo, al comparar ambas proteínas por su corrimiento electroforético, se encontró que mientras que la flagelina expresada por *P. multocida* correspondía a una proteína de aproximadamente 40 kDa, la reportada para *A. pleuropneumoniae* era de 65 kDa. Esta diferencia en tamaño no resulta extraña, pues se ha reportado que el peso molecular de las flagelinas expresadas por diferentes microorganismos puede variar desde 30 hasta más de 80 kDa o pueden existir variaciones en el tamaño de la flagelina entre cepas del mismo tipo, como ha sido descrito para *P. aeruginosa* (Brimer 1998). En ambos casos, *P. multocida* y *A. pleuropneumoniae*, no se ha descartado la posibilidad de expresión de flagelos con otra distribución al cambiar las condiciones de crecimiento.

La formación de flagelo bacteriano es sensible a las condiciones del medio ambiente. En *E. coli* la síntesis flagelar es inhibida por represión catabólica causada por el crecimiento en presencia de D-glucosa como fuente de carbono, y por temperaturas elevadas (Adler y Templeton, 1967). Li y col. en 1993 describieron diferentes condiciones de crecimiento que llevan a la pérdida de motilidad, éstas condiciones incluyen el crecimiento de la bacteria en altas concentraciones de carbohidratos, sales inorgánicas y alcoholes, altas temperaturas, o bajo la presencia de inhibidores de DNA girasa.

La temperatura es una de las principales señales regulatorias para un gran número de patógenos, particularmente aquellos que pueden ser expuestos a temperaturas ambiente más bajas que el intervalo encontrado en sus hospederos, un ejemplo lo tenemos en la habilidad que tiene *Shigella* para causar disentería dependiente de la capacidad para invadir y multiplicarse en células epiteliales de colon; ésta propiedad es dependiente de la temperatura. Se ha demostrado que *Shigella* crecida a 30 °C es incapaz de penetrar células de mamíferos en cultivo y es avirulenta, en modelos de laboratorio, solamente aquellas que crecen a 37 °C exhiben el fenotipo asociado con virulencia. La virulencia en esta bacteria está mediada por varios genes localizados en plásmidos y en su cromosoma, algunos de estos se encuentran en un regulón controlado por la temperatura. La mayoría de las enterobacterias presentan motilidad a 35°C; la motilidad de *Y. enterocolitica* y *Listeria monocytogenes* se observa entre 22 a 25 °C, mientras que *S. pullorum* presenta una alta motilidad cuando es incubada a 42 °C (Holt y Chaubal, 1997; Kerridge ,1960; Koneman y col., 1983).

En el caso de *P. multocida* se observó que era capaz de expresar flagelo a temperaturas de 37, 39 o 40 °C, pero a temperatura ambiente (aproximadamente 22-23 °C) la motilidad prácticamente se vio inhibida. Las temperaturas a las cuales *P. multocida* expresó flagelo corresponden con las temperaturas corporales de algunos de sus hospederos como pueden ser el humano (37°C); el pollo y el cerdo (aproximadamente 39-40°C). Esta motilidad también se vio favorecida cuando los medios de prueba se incubaron en condiciones de microaerofilia y presencia de CO₂ (Tabla 2).

En algunos casos la expresión de factores de virulencia es controlada no sólo por la temperatura, sino que ésta actúa junto con otra señal regulatoria, por ejemplo la toxina de *S. dysenteriae* es regulada por temperatura y hierro (Weinstein y col., 1988) y varios factores de virulencia en *Yersinia* son controladas por temperatura y calcio (Maurelli, 1989). En el caso de *P. multocida*, se desconoce si la combinación de temperatura y algún ión metálico u otra condición ambiental favorece la expresión de flagelo, pues se evaluaron condiciones individuales. La expresión de flagelo y motilidad podrían también estar reguladas por factores genéticos aún sin identificar y factores ambientales (Girón, 1995; Zhao y col., 1995).

La motilidad de *P. multocida* se vio afectada por el pH del medio, siendo óptima a pH neutro; cuando el pH del medio se alejaba de la neutralidad, la motilidad disminuía. De manera similar, ésta se vio afectada por la presencia de dextrosa, fosfato y cloruro de sodio, siendo las concentraciones óptimas de 27 mM, 1.4mM y 170 mM respectivamente (Tabla 2). En *E. coli*, se ha descrito previamente que la presencia de glucosa en concentraciones iguales o superiores a 27.8 mM inhibían la síntesis de flagelo (Adler y Templeton, 1967, Eisenstein y col. 1982), en *P. multocida* se observó que la adición de glucosa favorecía la motilidad, teniendo como concentración óptima 27 mM, concentraciones superiores a ésta, la disminuían; efecto muy parecido al reportado en *E. coli*. Se ha sugerido que este efecto se debe a que un incremento en la concentración de glucosa disminuye la concentración intracelular de CRP/cAMP, lo que provoca un efecto inhibitorio en la expresión del operón flhD. Yakota y Gots, 1970 reportaron que el cAMP es un requerimiento indispensable para la formación del flagelo en *E. coli*, y *S. typhimurium*, y por lo tanto para su motilidad. Sin embargo, este no parece ser un fenómeno común, pues bacterias tales como *Enterobacter aerogenes*, *Providencia rettgeri* y *P. mirabilis* presentan una mayor motilidad en medios con altas concentraciones de glucosa (Lai y col., 1997).

La importancia del polifosfato inorgánico en la patogénesis y motilidad bacteriana ha sido descrita para diferentes microorganismo patógenos y esto se ha corroborado ampliamente con cepas de *P. aeruginosa* mutantes en la poli fosfato cinasa (Rashid y col., 2000 a y b); en *P. multocida*, la adición de fosfato al medio de prueba, favoreció la motilidad, observándose una motilidad

óptima a una concentración de 1.4 mM, indicando que al igual que para otras bacterias la presencia de fosfato favorecía la inducción de motilidad.

Resultados parecidos a los obtenidos en este trabajo han sido reportados por Avelino Flores y col., (2004) quienes trabajaron con una construcción genética de *E. coli* enteropatógena H6 que contenía el promotor de *fliC* fusionado al gen reportero de la β -galactosidasa. Ellos encontraron que la presencia de iones divalentes, cloruro de sodio y una atmósfera con CO₂ inducían la transcripción de la β -galactosidasa.

La liberación mecánica del flagelo y/o flagelina a partir de colonias previamente seleccionadas como mótilas, permitió observar una proteína de aproximadamente 38-40 kDa en geles de poliacrilamida al 10%. Debido a que se observaron, además de esta banda, otras de mayor tamaño (aprox. 28, 65 y 90 kDa), aunque de menor intensidad (Fig. 6A), se decidió corroborar por inmunoreconocimiento si estas bandas correspondían a una flagelina. El inmunoblotting de estas muestras, al usar un antisuero contra la flagelina de *Salmonella*, nos permitió observar reconocimiento intenso de la banda de aproximadamente 38-40 kDa y un menor reconocimiento de la banda de aproximadamente 65 kDa sugiriendo este resultado que *P. multocida* podría expresar más de una flagelina como ha sido reportado para bacterias tales como *P. mirabilis* (Fig 6B); (Belas y Flaherty, 1994). Este resultado necesita confirmarse con posteriores experimentos. Debido a que la banda más frecuentemente obtenida en los procesos de extracción y la que también se obtenía en mayor cantidad era la de 38-40 kDa, se decidió trabajar con esta proteína. Esta flagelina también mostró reactividad cruzada al usar sueros anti-flagelina de *E. coli*, *A. pleuropneumoniae*, *S. typhimurium*, y *P. mirabilis* (Fig. 8) corroborando reportes previos que indican que las flagelinas de diferentes microorganismos presentan epitopos comunes al tener regiones compartidas en los extremos de la molécula (Macnab, y Parkinson 1991). Esta reactividad fue muy similar a la observada con la flagelina de *E. coli* usada como control positivo.

Cuando se secuenció la proteína de 38-40 kDa, el extremo amino terminal mostró homología con las secuencias de flagelinas de *A. pleuropneumoniae*, *E. coli* O15H17, *V. cholerae*, y *P. aeruginosa* (ATCC 15691), corroborando el resultado obtenido por inmunoblotting (Fig. 13). La

secuencia de amino ácidos total mostró homología con las secuencias de flagelina de las mismas bacterias y en menor proporción con las de otros microorganismos.

A partir del DNA genómico de *P. multocida*, se amplificó un fragmento de aproximadamente 1000 pb utilizando los oligos empleados para la amplificación del gen *fliC* de *A. pleuropneumoniae* reportado previamente (Negrete Abascal y col., 2003). La secuencia de nucleótidos del fragmento correspondió a 990 pb y mostró homología con las secuencias reportadas para genes *fliC* de diferentes microorganismos, incluyendo el de *A. pleuropneumoniae*. (Fig. 12)

La secuencia de amino ácidos completa de la flagelina obtenida de *P. multocida* aislada de pollo mostró una proteína constituida por 335 amino ácidos. La comparación de esta secuencia con otras secuencias de amino ácidos para otras flagelinas reportadas usando el programa BlastX (EXPECT=10; matrix BLOSUM62, word size=3) reportó un alto porcentaje de identidad con las flagelinas de *A. pleuropneumoniae*, *E. coli* O15H17, *V. cholerae*, y *P. aeruginosa* (ATCC 15691), entre otras.

A pesar de contar con la secuencia completa del probable gen *fliC* de *P. multocida* y a que segmentos de DNA de tamaño similar fueron amplificados a partir de otros aislados de campo de *P. multocida* usando los mismos primers y condiciones que para amplificar el probable gen *fliC*, no se encontró homología alguna en la secuencia del genoma completo reportada para *P. multocida* PM70. Sin embargo, varios genes relacionados con motilidad y secreción de proteínas están reportados en éste genoma y son comunes para las cepas PM70 y X-73. Estas cepas están aún bajo estudio a nivel de composición de secuencias y regulación de sus genes (Boyce y col., 2002).

La motilidad es considerada como una propiedad muy antigua de las bacterias. Está estrechamente vinculada con la quimiotaxis, la habilidad para orientarse a lo largo de ciertos gradientes químicos. La combinación de motilidad y quimiotaxis habilita a la bacteria para detectar y obtener nutrientes y para poder colonizar. El mecanismo de motilidad mejor conocido en la bacteria es el debido a la presencia de flagelo. Las bacterias móviles gastan parte considerable de su energía metabólica para sintetizar las proteínas que

formarán parte estructural de éste aparato y es proporcionar la energía para su rotación (Josenhans y Suerbaum, 2002).

Existen varias especies bacterianas que requieren de la motilidad para tener éxito en la colonización de sus hospederos humanos o animales. En la mayoría de los casos la evidencia se deriva de los estudios con cepas mutantes no móviles o no flageladas en modelos animales adecuados o cultivos celulares. Un argumento a favor de la importancia de la motilidad durante la infección es la recuperación de cepas móviles después de la infección con cepas de bacterias no móviles o la mezcla de bacterias motiles/no motiles (Eaton y col., 1992). Observaciones directas en biopsias de mucosa de animales o pacientes claramente muestran la presencia bacterias móviles, por ejemplo con *Campylobacter* (Lee y col.1986). Se ha demostrado que en algunas bacterias patógenas la motilidad juega un papel importante, principalmente en las fases iniciales de la infección y no es necesaria posteriormente (Josenhans y Suerbaum, 2002). Entre estas bacterias tenemos a *Salmonella*, *E. coli*, *Bordetella bronquiseptica*, *B. pertusis*. El flagelo puede servir como un apéndice adhesivo en las fases iniciales de la colonización y como un organelo móvil, de esta forma sirve como una señal mecánica para indicarle a la bacteria que el contacto con el hospedero ha iniciado. El flagelo y no la motilidad juegan un papel importante en el modelo de infección oral de en pollos de un día de nacidos por *Salmonella* (Allen-Vercoe y col., 1999). Se ha reportado que las mutantes deficientes en motilidad, quimiotaxis o flagelina son menos virulentas que la cepa silvestre (Robertson y col., 2000), lo cual puede indicar que el contacto con las células del hospedero es más fácil para bacterias móviles. En cambio *L. pneumophila* necesita la motilidad para establecer y mantener una infección en un hospedero (Swanson y Hammer, 2000).

Otras bacterias patógenas necesitan la motilidad durante la infección de un hospedero y no pueden persistir sin ella, tampoco cuando son deficientes en quimiotaxis. Entre ellas tenemos, por ejemplo, a *Borrelia burgdorferi*, *Treponema*, *Helicobacter*, *Campylobacter*, *P. aeruginosa*, y *Proteus* (Josenhans y Suerbaum, 2002).

El sistema flagelar está estrechamente vinculado, estructural y funcionalmente al sistema de traslocación y exporte de proteínas, el cual fue

primeramente descubierto en *Salmonella* (Kubori y col., 2000). Ambos sistemas son homólogos al sistema de secreción tipo III (TTSS) (Macnab, 1999). El flagelo y el TTSS asociados a virulencia no son mutuamente excluyentes y coexisten en muchos patógenos (Josenhans y Suerbaum, 2002).

En la patogénesis de infecciones del tracto respiratorio debidas a *P. aeruginosa*, se ha demostrado que el flagelo y/o la motilidad flagelar son necesarios en tres estados de la infección: 1) la adquisición de organismos móviles, 2) inmunoestimulación y 3) adaptación. La motilidad flagelar y la motilidad basada en el pili tipo IV se ha reportado que son necesarias para el desarrollo de una infección por parte de *P. aeruginosa*, así como para la formación de biofilms (Feldman y col., 1998; O'Toole y Kolter, 1998).

En la primera etapa de la infección, cepas ambientales de *P. aeruginosa* son inhaladas o inadvertidamente liberadas en el tracto respiratorio superior. En esta etapa, la expresión del flagelo es crítica para que los microorganismos presenten quimiotaxis hacia los sustratos adecuados, tales como la mucina. En un huésped normal la presencia de defensinas y péptidos antimicrobianos así como el funcionamiento de mecanismos de limpieza, eliminarán a los microorganismos antes de que se monte una respuesta inmune.

En la segunda etapa, en pacientes con fibrosis cística y probablemente neumonía, existe una infección de vías respiratorias caracterizada por inflamación en respuesta al microorganismo. Y como consecuencia de la disminución de la actividad de defensinas, el microorganismo no es eficientemente eliminado. La producción de diferentes factores de virulencia (proteasas, elastasa, neuraminidasas etc.) le permitirá alcanzar la barrera de glicocálix y posteriormente la superficie apical del epitelio. El flagelo actúa como un "sensor" que reconoce estructuras GM1 accesibles en la superficie de células epiteliales, permitiendo un contacto íntimo e iniciar la cascada de señales que resultan en la expresión de IL-8. Ya que IL-8 es una potente citosina, los organismos flagelados pueden ser eliminados en esta etapa por la respuesta inflamatoria.

En la etapa de adaptación existen bastantes bacterias en las vías aéreas de tal manera que se puede realizar una selección de mutantes que

específicamente se adaptan al nicho ecológico. Para evitar ser eliminadas por las células fagocíticas del hospedero, mutantes aflageladas proliferan permaneciendo por más tiempo en el hospedero que las cepas silvestres flageladas. Puede ocurrir también que aparezcan mutantes mucoides que sobreexpresen alginato, un factor de virulencia adicional.

Se ha reportado que la flagelina es una proteína muy inmunogénica (Akerley y col., 1995) y en algunas infecciones bacterianas se ha demostrado que bacterias flageladas son más fácilmente eliminadas que aquellas no flageladas

Las flagelinas de patógenos Gram-negativos además de ser muy inmunogénicas, tienen propiedades inmunomoduladoras. Se ha demostrado que las flagelinas de *S. typhimurium* y *E. coli* dirigen la expresión de la citosina proinflamatoria IL-8 en cultivos celulares de epitelio intestinal, mutantes flagelares no son capaces de causar esta fuerte respuesta inmune (Dibb-Fuller y col., 1999; Gewirtz y col., 2001). La inyección de flagelina purificada en ratones y ratas lleva a la liberación de citosinas inflamatorias y provoca síntomas similares al shock endotóxico independientes de las reacciones por LPS y el receptor Toll-like 4 (TLR-4). Posteriormente se demostró que esos efectos eran mediados por TLR-5 (Hayashi y col. 2001). Es por ello que la flagelina es considerada como una de las principales señales de daño que actúan en la inducción de la inmunidad innata contra patógenos Gram-negativos en el hospedero (Josenhans y Suerbaum, 2002).

Considerando todas las funciones en las cuales está involucrado el flagelo, se puede concluir que éste podría ser muy importante para la patogenicidad de *P. multocida*, junto con los demás factores de virulencia que posee esta bacteria. La participación del flagelo en diferentes procesos patogénicos llevados a cabo por *P. multocida* tales como la adhesión, la invasión celular, formación de biofilms, etc. dentro de su hospedero son eventos que esperan ser estudiados.

11 CONCLUSIONES

- Se demostró la motilidad *in vitro* de *P. multocida*. En base a los resultados obtenidos se puede concluir que *P. multocida*, contrariamente como se ha descrito en la literatura, es capaz de presentar movilidad *in vitro* y probablemente de igual forma lo haga *in vivo*, bajo condiciones microambientales de su hospedero que estimulen dicho movimiento.
- La motilidad caracterizada para *P. multocida* en este trabajo es afectada por el pH del medio, la temperatura del ambiente, y presenta un requerimiento de dextrosa, fosfato y cloruro de sodio a las concentraciones de 27 mM, 1.4mM y 170 mM respectivamente.
- *P. multocida* expresa flagelos polares (aproximadamente 15 μm de longitud y diámetro de 10-20 nm) constituidos por una proteína monomérica de 38 kDa.
- Se logró amplificar un fragmento de 990 pb (*fliC*) a partir del genoma de diferentes aislados de *P. multocida*.
- La flagelina de *P. multocida* muestra una alta identidad (95%) a las secuencias de flagelinas reportadas para otros microorganismos incluida la de *A. pleuropneumoniae*.
- Este es el primer trabajo donde se demuestra la movilidad y la presencia de un gen *fliC* en *P. multocida*. Estos resultados amplían en gran medida el conocimiento sobre este patógeno y abren nuevos marcos de investigación en *P. multocida*, que pueden conducir hacia un mejor entendimiento de los mecanismos de interacción con su hospedero.

12 PERSPECTIVAS

- Clonar el fragmento amplificado para lograr la sobreexpresión y purificación de la flagelina
- Determinar la participación en patogénesis del flagelo de *P. multocida* a través de ensayos de adhesión, colonización e invasión a células.
- Obtener anticuerpos policlonales contra la flagelina de *P. multocida* los cuales serán útiles para apoyar los ensayos anteriores.
- Determinar si esta flagelina pudiese ser utilizada como herramienta de diagnóstico.
- Determinar su posible utilidad como un componente vacunal.
- Demostrar su participación en virulencia con el uso de mutantes.

13 BIBLIOGRAFIA

Adler, J. (1966). Chemotaxis in bacteria, *Science*. 153: 708-716.

Adler, J. and Templeton, B. (1967). The effect of environmental conditions on the motility of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 46: 175-184.

Aizawa, S.I. (2001). Bacterial flagella and type III secretion system. *FEMS Microbiol. Lett.* 202: 157-164.

Akerley, B. J., Cotter, P.A. and Miller J. F. (1995). Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *Bordetella*-host interaction. *Cell* 80:611-620.

Allen-Vercoe, E., Sayers, A.R. and Woodward, M.J. (1999). Virulence of *Salmonella enterica* serotype enteritidis aflagellate and afimbriate mutants in a day-old chick model. *Epidemiol. Infect.* 122: 395-402.

Allison, C. and Hughes, C. (1991). Bacterial swarming: an example of prokaryotic differentiation and multicellular behavior. *Sci. Prog. (Edinb).* 75: 403-422.

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 granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 67-86.

Avelino Flores, F., Shin, S., Koper, J.B., Castañeda Roldán, E. and Girón J.A. (2004). Factores ambientales que influyen en la expresión del flagelo de *Escherichia coli* enteropatógena. 34 Congreso Nacional de Microbiología. Cancún Q.R. Mexico. pp 11.

Bar Tana, J., Howlett, B.J. and Koshland JR. D.E. (1977). Flagellar formation in *Escherichia coli*. electron transport mutants. *J. Bacteriol.* 130: 787-792

Belas, R. and Flaherty, D. (1994). Sequence and genetic analysis of multiple flagellin-encoding genes from *Proteus mirabilis*. *Gene.* 128: 33-41.

Belas, R. (1996). Sense, response and adaptation to surfaces: swarmer cell differentiation and behaviour. In: *Bacterial Adhesion: Molecular and ecological diversity* pp. 281-331. Wiley-Liss, New York.

Benkirane, A. and De Alwis, M.C.L. (2002). Haemorrhagic septicaemia, its significance, prevention and control in Asia. *Vet. Med-Czech.* 47: 234-240.

Bieber D., Ramer S.W., Wu C.Y., Murray W.J., Tobe T., Fernandez R., and Schoolnik G.K. (1998). Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*. 280: 2114-2118.

Blair, D.F. and Berg, H.C.(1988). Restoration of torque in defective flagellar motors. *Science*. 242: 1678-1681.

Boekema, B.K., Van Putten, J.P., Stockhofe-Zurwieden, N. and Smith, H.E. (2004). Host cell contact-induced transcription of the type IV fimbriae gene cluster of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 72: 691-700.

Bosch, M., Tarragó, R., Garrido, M., Campoy, S., Fernández, A., Pérez, A., Badiola, I. and Barbé, J. (2001). Expression of the *Pasteurella multocida* ompH gene is negatively regulated by the Fur protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 203: 35-40.

Boyce, J. M. (1995). *Pasteurella species*. En: Mandell, G.; Bennett, J.E. and Dolin, R. Principles and practice of infectious diseases. 4th Ed. 2. Churchill Livingstone. U.S.A. pp. 2068-2070.

Boyce J.D., Chung J.Y. and Adler B. (2000a). *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. *J. Biotechnol.* 83:153-60.

Boyce J.D. and Adler B. (2000b). The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2).*Infect. Immun.* 68:3463-3468.

Boyce, J. D., Wilkie, I., Harper, M., Paustian, M. L., Kapur, V. and Adler, B. (2002). Genomic scale analysis of *Pasteurella multocida* gene expression during growth within the natural chicken host. *Infect. Immun.* 70: 6871-6879.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

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.

Brimer, C.A. and Montie T.C. (1998) Cloning and comparison of fliC genes and identification of glycosylation in the flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* a-type strains. *J. Bacteriol.* 180: 3209-3217.

Carter, G.R., and De Alwis M.C.L. (1989). Haemorrhagic Septicaemia. In *Pasteurella and Pasteurellosis*, C. Adlam, and J.M. Rutter, eds., London:Academic Press, pp. 131-160.

Confer, A.W. (1993). Immunogens of *Pasteurella*. *Vet. Microbiol.* 37: 353-368.

Cox, A.J., Hunt, M.L., Ruffolo, C.G. and Adler, B. (2000). Cloning and characterization of the *Pasteurella multocida* ahpA gene responsible for a haemolytic phenotype in *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* 72: 135-152.

Chanter, N. (1990). Molecular aspects of the virulence of *Pasteurella multocida*. *Can. J. Vet. Res.* 54: S45-S47.

Chen, W. P., and Kuo, T. T. (1993). A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 21: 2260.

Chevalier, G., Duclouhier, H., Thomas, D., Schechter, E., and Wróblewski, H. (1993). Purification and characterization of protein H, the major porin of *Pasteurella multocida*. *J. Bacteriol.* 175: 266-276.

Choi, K.K., Maheswaran, S.K., Felice, L.J. and Molitor, T.W. (1991). Relationship between the iron regulated outer membrane proteins and the outer membrane proteins of in vivo grown *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* 28: 75-92.

Christensen, J. P. and Bisgaard, M. (2000). Fowl cholera. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 19: 626-637.

Christensen H., Bisgaard M., Angen O., Frederiksen W. and Olsen J.E. (2005). Characterization of sucrose-negative *Pasteurella multocida* variants, including isolates from large-cat bite wounds. *J. Clin. Microbiol.* 43: 259-70.

DeRosier D.J. (1998). The turn of the screw: the bacterial flagellar motor. *Cell.* 93: 17-20.

Diallo I.S. and Frost A.J. (2000). Characteristics of a haemolytic extract from avian *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* 72: 37-45.

Dibb-Fuller, M.P., Allen-Vercoe, E., Thorns, C.J., and Woodward M.J. (1999). Fimbriae- and flagella-mediated association with and invasion of cultured epithelial cell by *Salmonella enteritidis*. *Microbiology.* 145:1023-1031.

Dorman, C.J. and Smith, S.G.J. (2001). Regulation of virulence gene expression in bacterial pathogens. In: Groisman, E.A. (ed.) *Principles of bacterial pathogenesis*. Academic Press. Pp.75-132.

Dreyfus, G.; Williams A.W.; Kawagishi, I.; and Macnab, R.M. (1993). Genetic and Biochemical Analysis of *Salmonella typhimurium* Flil, a flagellar protein related to the catalytic subunit of F₀F₁ ATPase and to virulence proteins of mammalian and plant. *J. Bacteriol.* 175: 3131-3138.

Eaton, K.A.; Morgan, D.R. and Krakowa, S. (1992). Motility as a factor in the colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 37: 123-127.

- Eisenstein, B. I. and Dodd, D. C. (1982). Pseudocatabolite repression of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 151: 1560–1567.
- Essler M, Hermann K, Amano M, Kaibuchi K, Heesemann J, Weber PC, and Aepfelbacher M. (1998). *Pasteurella multocida* toxin increases endothelial permeability via Rho kinase and myosin light chain phosphatase. J. Immunol. 161: 5640-5646.
- FAO (1994): Statistical profile of livestock development in the Asia Pacific Region. RAPA Publication No. 1994/26.
- FAO (1995). Production year book 1995, FAO, Statistics Division. Pathogens. J. Bacteriol. 175: 3131-3138.
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H. and Prince, A. (1998). Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. Infect. Immun. 66: 43-51.
- Fernández, L.A. and Berenguer, J. (2000). Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 24: 21-44.
- Finlay, B.B., and Falkow, S. (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61:136-69
- Foged, T., Pedersen, K.B. and Elling. (1987). Characterization and biological effects of the *Pasteurella multocida* toxin. FEMS Microbiol. Lett. 43:45-51.
- Gewirtz, A.T. Navas, T.A., Lyons, S., Godowski P.J. and Madara J.L. (2001). Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. J. Immunol. 167: 1882-1885.
- Girón, J.A. (1995). Expression of flagella and motility by *Shigella*. Mol. Microbiol. 18: 63-75
- Goldstein, D.R. (2004). Toll-like receptors and other links between innate and acquired alloimmunity. Curr Opin Immunol. 16:538-44.
- Gorga, F., Galdiero, M., Buommino, E., and Galdiero, E. (2001). Porin and lipopolysaccharide induce apoptosis in human spermatozoa. Clin. Diag. Lab. Immunol. 8: 206-208.
- Griffiths, E (1991). Environment regulation of bacterial virulence-implications of vaccine design and production. TIBTech. 9: 309-315.
- Harper M., Cox A.D., St Michael F., Wilkie I.W., Boyce J.D. and Adler B. (2004). A heptosyltransferase mutant of *Pasteurella multocida* produces a truncated lipopolysaccharide structure and is attenuated in virulence. Infect. Immun. 72: 3436-43.

- Harshey, R.M. (1994). Bees aren't the only ones: swarming in Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 13: 389-394.
- Harshey, R.M. and Toguchhi, A. (1996). Spinning tails: homologies among bacterial flagellar systems. *Trends Microbiol.* 4: 226-231.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Undergill, D.M. and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagelin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 410: 1099-1103
- Holt, P. S. and Chaubal, L.H. (1997). Detection of motility and putative synthesis of flagellar proteins in *Salmonella pullorum* cultures. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1016–1020.
- Holst, E., Rollof, J., Larson, L., and Nielsen, J,P, (1992). Characterization and distribution of *Pasteurella* species recovered from infected humans. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2984-2987.
- Horadagoda, N.U., Hodgson, J.C., Moon, G.M. and Eckersall, P.D. (2001). Role of endotoxins in the pathogenesis of haemorrhagic septicaemia in buffalo. *Microb. Pathol.* 30: 171-178.
- Ikeda, T., Asakura, S. and Kamiya, R. (1987). Total reconstitution of *Salmonella* flagellar filaments from hook and purified flagellin and hook-associated proteins *in vitro*. *J. Mol. Biol.* 209: 109-114.
- Jacques, M.; and Paradis, S. (1998). Adhesin-receptor interactions in *Pasteurellaceae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 45-59.
- Jacques, M. and Leonie G.M. (2002). Virulence factors of *Pasteurellaceae*, formidable animal pathogens. *ASM News.* 68: 174-179.
- Jonhson, R. H., and Rumans, L. W. (1977). Unusual infections caused by *Pasteurella multocida*. *JAMA.* 237:146-147.
- Josenhans C., and Suerbaum S. (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 291: 605-614.
- Kahler, C.M., Martin, L.E., Shih, G.C., Rahman, M.M., Carlson, R.W. and Stephens, D.S. (1998). The (α 2→8) linked polysialic acid capsule and lipooligosaccharide structure both contribute of ability of serogroup B *Neisseria meningitidis* to resist the bactericidal activity of human serum. *Infect. Immun.* 65: 5939-5947.
- Kaisho, T. and Akira, S. (2000). Critical roles of Toll-like-receptors in host defense. *Crit. Rev. Immunol.* 20: 393-405.

Kalir, S., McClure, J., Pabbaraju, K., Southward, C., Ronen, M., Leibler, S., Surette, M.G., and Alon, U. (2001). Ordering genes in a flagella pathway by analysis of expression kinetics from living bacteria. *Science*. 292: 2080-2083.

Kamps A.M., Kamp E.M. and Smits M.A. (1990). Cloning and expression of the dermonecrotic toxin gene of *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 67:187-190.

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

Kehrenberg, C., Dschulze-Tazil, G., Chaslus-Dancla, E. and Schvarz, S. (2001), Antimicrobial resistance in *P. multocida* and *Mannhaemia*: epidemiology and genetic basis. *Vet. Res.* 32: 323-339

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

Kilian, M. and Biberstein, E.L. (1984). Genus II. Haemophilus, In N.R. Krieg, J.G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md., pp. 558–569.

Kirov, S.M. (2003). Bacteria that express lateral flagella enable dissection of the multifunctional roles of flagella in pathogenesis. *FEMS. Microbiol. Lett.* 224: 151-159.

Klauser T, Pohlner J, and Meyer TF. (1993). The secretion pathway of IgA protease-type proteins in gram-negative bacteria. *Bioassays.* 15:799-805.

Kojiyama, S. and Blair, D.F. (2001). Conformational change in the stator of the bacterial flagellar motor. *Biochemistry.* 40: 13041-13050.

Koneman, E.W., Allen, S.D., Dowell, Jr., V.R. and Sommers, H.M. (1983). *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, J.P. Lippincott, Philadelphia, Pa, pp. 85-86.

Kubori, T.; Sukhan, A.; Aisawa, S.I. and Galan J.E. (2000). Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 97: 10225-10230.

Kumar, A., Devlin, H.R. and Vellend, H. (1990). *Pasteurella multocida* meningitis in an adult: case report and review. *Rev. Infect. Dis.* 12: 440-448.

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. Res. Comm.* 231: 692-695.
- La Ragione, 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.
- Lax, A.J. and Chanter, N. (1990). Cloning of the toxin gene from *Pasteurella multocida* and its role in atrophic rhinitis. *J. Gen. Microbiol.* 136: 81-87.
- Lax A.J., Pullinger G.D., Baldwin M.R., Harmey D., Grigoriadis A.E. and Lakey J.H. (2004). The *Pasteurella multocida* toxin interacts with signalling pathways to perturb cell growth and differentiation. *Int. J. Med. Microbiol.* 293: 505-512.
- Lee, A., O'Rourke, J.L., Barrington, P.J. and Trust, T.J. (1986). Mucus colonization as a determinant of pathogenicity in intestinal infection by *Campylobacter jejuni*: a mouse cecal model. *Infect. Immun.* 51:536-546.
- Li, C., Louise, C. J., Shi, W., and Adler, J. (1993). Adverse conditions which cause lack of flagella in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 2229-2235.
- Il'ina, Z.M and Zasukhin I. (1975). Role of *Pasteurella* toxins in the pathogenesis of infectious atrophic rhinitis. *Vet. Inst. Omsk.* 25: 76-86.
- Lovea, D. N., Malik, R. and Norris, J.M. (2000). Bacteriological warfare amongst cats: what have we learned about cat bite infections? *Vet. Microbiol.* 74: 179-193.
- Lloyd, S.A., Tang, H., Wang, X., Billings, S. and Blair, D.F. (1996). Torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*: evidence of a direct role for FliG but not FliM or FliN. *J. Bacteriol.* 178:223-231.
- Lugtenbreg, B., Van Boxtel, R., Evenberg, D., Dejong, M., Storm, P. and Frik, J. (1986). Biochemical and Immunological characterization of cell surface proteins of *Pasteurella multocida* strains causing atrophic rhinitis in swine. *Infect Immun.* 52:175-82.
- Macnab R.M. (1977a). Bacterial flagella rotating in bundles: a study in helical geometry. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74: 221-225.
- Macnab R.M. and Ornston, M.K. (1977b). Normal-to-curly flagellar transitions and their role in bacterial tumbling. Stabilization of an alternative quaternary structure by mechanical force. *J. Mol. Biol.* 112:1-30
- Macnab R.M. and Parkinson, J.S. (1991). Genetic analysis of the bacterial flagellum. *Trends Genet.* 7:196-200.

- Macnab, R.M. (1996). Flagella and motility. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology 1. (Neidhardt, F.C., Ed.), pp123-125. ASM Press, Washington, D.C.
- Macnab, R.M. (1999). The bacterial flagellum: reversible rotary propellor and type III export apparatus. *J. Bacteriol.* 181: 7149-7153.
- Macnab R.M. (2003). How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 77-100.
- Madsen, E. B., Bisgaard, M., Mutters, R., and Pedersen, K. B. (1985). Characterization of *Pasteurella* species isolated from lungs of calves with pneumonia. *Can. J. Comp. Med.* 49: 63–67.
- Mandell, G.L.; Bennett, J.E. and Raphael, D. (1995). Principles and Practice of Infectious Diseases. 2 . 4 th Ed. U.S.A. Churchill Livingstone.
- Manson, M. D.; Tedesco, P.; Berg, H.C.; Harold, F.M.; and VanDerDrift, C. (1977). A protonmotive drives bacterial flagellar. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 9060-9064.
- Maurelli, T. (1989). Temperature regulation of virulence genes in pathogenic bacteria: a general strategy for human pathogens?. *Microb. Pathog.* 7:1-10.
- May, B. J.; Zhang, Q.; Li, L.L.; Paustian, M.L.; Whittam, T.S.; and Kapur. V. (2001). Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 3460-3465.
- McCarter, L. (1999). The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1: 51-57.
- 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.
- Mizana, S., Henk, A., Stallings, A., Maier, M. and Lee, M.D. (2000). Cloning and characterization of sialidases with 2-6' and 2-3' sialyl lactose specificity from *Pasteurella multocida*. *J. Bacteriol.* 182: 6874-6883
- Morishita, T.Y., Snipes, K.P. and Carpenter, T.E. (1990). Serum resistance as an indicator of virulence of *Pasteurella* for turkeys. *Avian Dis.* 34: 888-892.

- Muller, H.E. and Mannheim, W. (1995). Occurrence of sialidase and N-acetylneuraminidase lyase in *Pasteurella* species. Zentralbl Bakteriologie. 283:105-114.
- Negrete-Abascal, E., Tenorio, V.R. and de la Garza, M. (1999). Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolates. Curr. Microbiol. 38: 64-67.
- Negrete-Abascal, E., Reyes, M. E., García, R.M., Vaca, S., Girón, J. A., García, O., Zenteno E, and de la Garza, M. (2003). Flagella and motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. J. Bacteriol. 185: 664-668.
- Óbice, J.D., Cullen, P.A. and Adler, B. (2004). Genomic-scale analysis of bacterial gene and protein expression in the host. Emerg. Infect. Dis. 10: 1357-1362.
- Ophir, T. and Gutnick, D.L. (1994). A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. Appl. Environ. Microbiol. 60: 740-745.
- Osawa, K, Ueno, T. and Aizawa, S.I. (1994). Overproduction of flagellar switch proteins and their interactions with MS ring complex in vitro. J. Bacteriol. 176: 3683-3691.
- O'Toole, G.A. and Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol. Microbiol. 30: 295-304.
- Pijoan C. (1999). Pneumonic pasteurellosis, In Diseases of swine, 8th ed. Ed Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. Iowa State University Press, pp. 511-520.
- Pouedras, P., Andre, P.M., Donnio, P.Y. and Avril, J.L. (1992). Cleavage of immunoglobulin A1, A2, and G by proteases from clinical isolates of *Pasteurella multocida*. J. Med. Microbiol. 37:128-132.
- Pugsley, A.P. (1993). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. Microbiol. Rev. 57: 50-108.
- Ramdani and Adler. B.S. (1991). Oposonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide (LPS) antigens of *Pasteurella multocida* and the role of lipopolysaccharides in immunity. Vet. Microbiol. 26: 335-347.
- Rashid MH, Rao NN and Kornberg A. (2000a). Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. J. Bacteriol. 182: 225-227.
- Rashid M.H and Kornberg A. (2000b). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 4885-4890.
- Rimler R.B. and Rhoades K.R. (1987). Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*. J. Clin. Microbiol. 25: 615-618.

- Rimler, R.B. (1990). Comparison of *Pasteurella multocida* lipopolysaccharides by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis to determine relationship between group B and E hemorrhagic septicemia strains and serologically related group A strains. *J. Clin. Microbiol.* 28: 654-659.
- Robertson, J. M.; Grant, G.; Allen-Vercoe, E. ; Woodward, M.J.; Pusztai, A. and Flint, H.J. (2000). Adhesion of *Salmonella enterica* var Enteritidis strains lacking fimbriae and flagella to rat ileal explants cultured at the air interface or submerged in tissue culture medium. *J. Med. Microbiol.* 49: 691-696.
- Ruffolo, C.G., Tennent, J.M., Michalski, W.P. and Adler, B. (1997). Identification, purification and characterization of type 4 fimbriae of *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.* 65: 339-343.
- Ribeiro, G. A.; Carter, G. R.; Frederiksen, W.; and Riet-Correa, F. (1989). *Pasteurella haemolytica*-like bacterium from a progressive granuloma of cattle in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1401-1402.
- Rutter J.M. (1985): Atrophic rhinitis in swine. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 29:239-279.
- Sawada T, Rimler RB, and Rhoades KR. (1982). Indirect hemagglutination test that uses glutaraldehyde-fixed sheep erythrocytes sensitized with extract antigens for detection of *Pasteurella* antibody. *J. Clin. Microbiol.* 15:752-756.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Shehata, T.A. and Marr A.G. (1971). Effect of nutrient concentration on the growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 107:210-216.
- Schlater LK, Brenner DJ, Steigerwalt AG, Moss CW, Lambert MA and Packer RA. (1989). *Pasteurella caballi*, a new species from equine clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 27: 2169-2174.
- Skerman, V.B.D.; McGowan, V. and Sneath, P.H.A (1980). Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30: 225-420.
- Smith, H.E.; Damman, M.; Van Der Velde, J.; Wagenaar, F.; Wisselink, H.J.; Stockhofe-Zurwieden, N. and Smits, M.A. (1999). Identification and characterization of the cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect. Immun.* 67: 1750-1756
- Sneath PH and Stevens M. (1990). *Actinobacillus rossii* sp. nov., *Actinobacillus seminis* sp. nov., nom. rev., *Pasteurella bettii* sp. nov., *Pasteurella lymphangitidis* sp. nov., *Pasteurella mairi* sp. nov., and *Pasteurella trehalosi* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40:148-153.

Snipes, K.P., Hansen, L.M. and Hirsh, D.C. (1988). Plasma-and iron-regulated expression of high molecular weight outer membrane proteins by *Pasteurella multocida*. Am. J. Vet. Res. 49: 1336-1338.

Staddon J.M., Barker C.J., Murphy A.C., Chanter N., Lax A.J., Mitchell R.H., Rozengurt E. (1991). *Pasteurella multocida* toxin, a potent mitogen, increases inositol 1,4,5-trisphosphate and mobilizes Ca²⁺ in Swiss 3T3 cells. J Biol Chem. 266:4840-7.

Swanson, M. S.; and Hammer, B. K. (2000). *Legionella pneumophila* pathogenesis: A fateful journey from amoebas to macrophages. Annu. Rev. Microbiol. 54: 567-613.

Towbin H, Staehelin T. and Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4350-4354.

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

Tortora, G.J., Funke, R.R., Case C. L. Microbiology. 7^a ed. Benjamin Cummings. 2002, pp 83-85.

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

Vogel, U.; Weinberger, A.; Frank, R.; Muller, A.; Kohl, J.; Atkinson, J.P. and Frosch, M. (1997). Complement factor C3 deposition and serum resistance in isogenic capsule and lipooligosaccharide sialic acid mutants of serogroup B *Neisseria meningitidis*. Infect. Immun. 65: 4022-4029.

Weber, D.J.; Wolfson, J.S.; Swartz, M.N.; and Hooper, D.C. (1984). *Pasteurella multocida* infections. Report of 34 cases and review of the literature. Medicine. 63:133-154.

Weinstein, D.L.; Holmes, R.K. and O'Brien, A.D. (1988). Effects of iron and temperature on Shiga-like toxin I production by *Escherichia coli*. Infect. Immun. 56: 106-111.

Winther-Larsen, H.C. and Koomey, M. (2002). Transcriptional, chemosensory and cell-contact-dependent regulation of type IV pilus expression, Curr. Opin. Microbiol. 5: 173-178.

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

Yakota, T. and Gots, J.S. (1970), Requirement of adenosine 3', 5'-cyclic phosphate for flagella formation in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 103: 513-516.

Yamaguchi, S., Fujita, H., Ishihara, A., Aizawa, S-I. and Macnab, R.M.(1986). Subdivision of flagellar genes of *Salmonella typhimurium* into regions responsible for assembly, rotation and switching. J. Bacteriol. 166: 187-193.

Zhang, Y.; Chung JY, and Adler B. (1998). The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A: 1. FEMS Microbiol Lett. 166:289-96.

Zhao, G.; Pijoan, C.; Choi, K.; Maeswaran, S. K.; and Trigo, E. (1995). Expression of iron-regulated outer membrane proteins by porcine strains of *Pasteurella multocida*. Can. J. Vet. Res. 59: 46-50.

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 of *Escherichia coli*: a critical role for Asp 32 of MotB. J. Bacteriol. 180: 2729-2735.

