Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
Laboratorios de Bioquímica y Genética Microbiana

TITULO:

ESTUDIO GENÉTICO E INMUNOGÉNICO COMPARATIVO DE FIMBRIAS F17 EN *Gallibacterium anatis y Avibacterium paragallinarum*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS (Microbiología) CON OPCIÓN EN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA.

Presenta:

I.B.T José Pablo Velázquez Valtierra

Director de Tesis:

D.C. Candelario Vázquez Cruz

Coasesor:

Dra. Norma Elena Rojas Ruiz

Puebla de Zaragoza junio 2017

El proyecto de investigación “Estudio genético e inmunogénico comparativo de fimbrias F17 en *Gallibacterium anatis* y *Avibacterium paragallinarum*” se realizó en el laboratorio de Microbiología Molecular y Celular del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, bajo la dirección del Dr. Candelario Vázquez Cruz y la Dra. Norma Elena Rojas Ruiz.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Candelario Vázquez Cruz por recibirme en su laboratorio, por su apoyo, enseñanzas, guía, consejos e infinita paciencia. Gracias Doctor por dejarnos "ser" en el laboratorio, por dejarnos experimentar y tocar este mundo de ciencia. Por enseñarme cómo afrontar este trabajo y por todas las enseñanzas durante este tiempo.

A la Doctora Norma Elena Rojas Ruíz por su apoyo, enseñanzas y consejos a lo largo de la maestría. Gracias por ayudarme y motivarme a seguir adelante durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Erasmo Negrete Abascal, por el apoyo dado a lo largo de la realización de este trabajo.

A los integrantes de mi comité revisor:

Dra. Patricia Sánchez Alonso
Dra. Norma Elena Rojas Ruíz
Dr. Erasmo Negrete Abascal
Dr. Luis Javier Martínez Morales

Gracias por dedicarle a mi trabajo, lo más extraño y valioso que tenemos "el tiempo". Les agradezco cada una de sus valiosas correcciones.

A la M.C María Elena Cobos Justo por su apoyo en la parte que a la subclonación de los genes corresponde en este trabajo.

Al Biólogo Tomas Villamar del Bioterio de la FES-Iztacala, UNAM por llevar a cabo las inmunizaciones en conejos con las proteínas recombinantes obtenidas en este trabajo. De verdad gracias.

A mis excelentes profesores de la maestría por compartir un poco de su vasto conocimiento conmigo.

A mis compañeros de generación y laboratorio.

Al CONACyT por la beca de maestría

"Solo hay dos errores que se comenten en el camino: No empezar y no llegar hasta el final"

-Buda

DEDICATORIA

Al Padre, que por sobre todo siempre está presente guiándonos en la enseñanza.

A mis padres Francisca Valtierra Lara y José Pablo Velázquez Jiménez, que me han enseñado a lo largo de mi vida y en esta etapa no fue la excepción. A mis hermanos Benhazir Abigail mi "hermanita" y mi hermano Miguel Ángel, que durante esta etapa aprendí de ustedes y los vi crecer como personas y como profesionales. Y por qué siempre estuvieron apoyándome y dando fuerza para continuar.
A Suky y a Tuti, por mostrarme que no hay de qué preocuparse, solo se trata de confiar y disfrutar.

A Alma, por estar siempre conmigo, por continuar aprendiendo juntos y disfrutar todas las aventuras, por seguir queriéndonos.

A la M.C Elena Cobos, que fue la primera persona en darme buenas referencias de "jefe" y por apoyarme en la parte que a la subclonación de los genes corresponde en el trabajo. Muchas gracias "E".

A la M.C Jaqueline, que una vez que entre al laboratorio fue la primera persona en enseñarme a trabajar con *G. anatis* y cuestiones generales de lo que es el trabajo. Recuerdo como nos divertíamos purificando y dializando las proteínas hasta tarde jeje

Al M.C Alberto Chantes y al M.C Alfredo por sus consejos dados durante el trabajo siempre fueron muy oportunos.

A la Dra. Norma Elena Rojas Ruíz, por apoyarme desde su llegada al laboratorio y por compartir siempre las calorías extras.
Realmente les debo mucho a las personas que me apoyaron y ayudaron en el laboratorio.

A la banda: Laura, Mayra, Mónica y el Mu. Por qué hubo algo que nos juntó desde el principio y siempre era divertido estar en clase con ustedes. No podía olvidar al dinosaurio azul del Mu, como nos divertíamos con él.

Al M.C Francisco Cruz por aquellos momentos y platicas en el laboratorio, por todos los consejos dados, aunque algunos ya no los puedo recordar.

A los CONACyTs, le debo mucho a mi reclutador el MU, porque pase muy buenos momentos jugando con ustedes: Joel, Paco, Lobo, Chucho, Cesar, el Dr. Jesús, Tlachi, Migue, Chato (ni modo hijin, no eres el único de Guanajuato por acá), Rene, Joffre, Lalo malo, Rana, Dr. Antonino, Dr. Miguel, Robert, y a todos los CONACyTs que se unieron y seguirán con el equipo.

Todo lo que viví, aprendí, los desafíos que tuve, pude afrontarlos gracias a las personas, amigos que conocí en esta etapa, siempre di lo mejor de mí y así será. Fue una etapa de aprendizaje y despertar de conciencia. Agradezco todo lo que pasó

"Puedo aceptar al fracaso, todo el mundo falla en algo. Pero no puedo aceptar no intentarlo"

-Michael Jordan

La tierra no es ya el centro del universo sino tan sólo un planeta más de una de las infinitas galaxias existentes. El hombre no es el producto de un acto de creación superior, sino el resultado de un largo proceso evolutivo que aún continúa y, por último, el ser humano ignora, desconoce, la mayoría de sus propias motivaciones. “ninguna prueba contundente de esto”

El origen del hombre es totalmente desconocido, no soy un mono perfeccionado, tengo algo espiritual, somos seres espirituales viviendo una experiencia humana y hay que quitarnos de encima todas las creencias y encontrar nuestro verdadero ser.

Todo nuestro sistema biológico, el cerebro y la tierra misma, trabajan en las mismas frecuencias

-Nikola Tesla

Como buscadores de la verdad debemos sospechar y cuestionar nuestras propias ideas mientras conducimos nuestra investigación, para evitar perjuicios y pensamientos descuidados.

-Ibn al-Haytham

Nur para todos

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS VII
ÍNDICE DE TABLAS IX
LISTA DE ABREVIATURAS 1
RESUMEN 2
INTRODUCCION 3
Impacto de las enfermedades ocasionadas por *Gallibacterium anatis* y *Avibacterium paragallinarum* en el sector avícola 3
Características taxonómicas de *G. anatis* y *A. paragallinarum* 6
Características del cultivo de *G. anatis* y *A. paragallinarum* 9
Factores de virulencia de *G. anatis* y *A. paragallinarum* 9
Fimbrias de tipo F17 11
Estrategias de protección inmunológica contra *G. anatis* y *A. paragallinarum* 14
JUSTIFICACIÓN 15
OBJETIVOS 16
Objetivo general 16
Objetivos Particulares 16
ESQUEMA DE TRABAJO 17
MATERIALES Y MÉTODOS 18
Microorganismos y plásmidos empleados en esta investigación. 18
Estrategia de amplificación y clonación de genes que codifican para proteínas de fimbrias F17 de *G. anatis* y *A. paragallinarum.* 19
Análisis de expresión de proteínas recombinantes. 24
Inmunodetección de proteínas recombinantes 25
RESULTADOS 26
Microorganismos y Plásmidos empleados. 26
Amplificación y clonación de genes que codifican para proteínas de fimbrias F17 en *G. anatis* y *A. paragallinarum.* 28
Secuencias de construcciones en el vector pBluescriptII KS (-) 35
Mapas de construcciones en el vector pBluescriptII KS (-) 41
Análisis de expresión de proteínas recombinantes estructural y adhesina de fimbrias F17 de *G. anatis* en *E. coli* 45
Mapas de construcciones en pQE-30 45

Inducción de proteínas recombinantes 47
Purificación de proteínas recombinantes 50
Diálisis de proteínas recombinantes purificadas en condiciones desnaturalizantes. 51
Detección de las proteínas recombinantes por Western blot 52
DISCUSIÓN 54
CONCLUSIONES 58
ANEXOS 59
REFERENCIAS 70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Signos y lesiones de la infección por *G. anatis* 4
Figura 2. Ave que presenta signos clínicos de Coriza Infecciosa (CI) 5
Figura 3. Biovares de *G. anatis* 7
Figura 4. Biovares de *A. paragallinarum* 8
Figura 5. Representación de los elementos proteicos de una fimbria F17. 12
Figura 6. Arreglo genético del operón que codifica para fimbrias F17 12
Figura 7. Dibujo esquemático del ensamble de fimbrias F17 por la vía de chaperona/usher. 13
Figura 8. Esquema de Trabajo 17
Figura 9. Esquema que muestra el arreglo genético de los operones fimbriales en la cepa de *G. anatis* UMN179. 20
Figura 10. Mapa de vector pBluescriptII KS- donde fueron clonados los fragmentos de genes que codifican para proteínas de fimbrias F17. 21
Figura 11. Mapa de vector pQE-30 donde fueron subclonadas los fragmentos de genes que codifican para proteína estructural y adhesina. 21
Figura 12. Esquema que muestra el arreglo genético de los operones fimbriales en *A. paragallinarum* cepa CL 22
Figura 13. DNA genómico de *G. anatis* y *A. paragallinarum*. 27
Figura 14. DNA plasmídico de pBluescriptII KS (–). 27
Figura 16. Amplificación de los genes que codifican para proteínas de fimbrias en la cepa de *G. anatis* ESV34. 29

Figura 15. Amplificación de los genes que codifican para proteínas de fimbrias en la cepa de *G. anatis* F149^{T}. 29
Figura 17. Amplificación de los genes que codifican para proteínas de fimbrias F17 en las cepas 5 y 6 de *A. paragallinarum*. 30
Figura 18. DNA plasmídico de las construcciones obtenidas en pBluescriptII KS (-) 33
Figura 19. Alineamiento de secuencias de DNA de genes que codifican para proteína estructural del operón flf3. 35
Figura 20. Alineamiento de secuencias de DNA de genes que codifican para proteínas estructurales del operón flf1. 36
Figura 21. Alineamiento de secuencias de DNA de genes que codifican para proteína adhesina del operón flf3. 37
Figura 22. Alineamiento de secuencias de DNA de genes que codifican para proteína adhesina del operón flf3. 38
Figura 23. Alineamiento de secuencias de DNA de genes que codifican para proteína adhesina del operón flf. 39
Figura 24. Alineamiento de secuencias de DNA de genes que codifican para proteína adhesina del operón flf. 40
Figura 25. Mapa de la construcción Megan en pBluescriptII KS (-). 41
Figura 26. Mapa de la construcción Zuky en pBluescriptII KS (-). 42
Figura 27. Mapa de la construcción Samanta en pBluescriptII KS (-).. 42
Figura 28. Mapa de la construcción Tuti en pBluescriptII KS (-). 43
Figura 29. Mapa de la construcción Angeline en pBluescriptII KS (-).. 43
Figura 30. Mapa de la construcción Nathalie en pBluescriptII KS (-).. 44
Figura 31. Mapa de la construcción Megan en el plásmido pQE-30. 46
Figura 32. Mapa de la construcción Samanta2 en el plásmido pQE-30. 46
Figura 33. Cinética de inducción de la expresión del gen que codifica para proteína estructural del operón flf3 en el fondo genético de cepa de *E. coli* M15. 48
Figura 34. Cinética de inducción de la expresión del gen que codifica para proteína adhesina recombinante del operon flf3 en el fondo genético de la cepa de *E. coli* M15. 49
Figura 35. Purificación de proteína estructural de 18.2 kDa en condiciones desnaturalizantes....50
Figura 36. Purificación de proteína adhesina de 27.5 kDa en condiciones desnaturalizantes 50
Figura 37. Electroforesis de proteínas recombinantes purificadas y dializadas contra PBS 51
Figura 38. Western blot de proteínas sobreexpresadas, purificadas por cromatografia de afinidad y dializadas contra PBS. 52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de *G. anatis* utilizadas en este trabajo 18
Tabla 2. Cepas de *A. paragallinarum* utilizadas en este trabajo. 18
Tabla 3. Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo..... 19
Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo. 19
Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados para la detección de los genes que codifican para proteínas de fimbrias F17 en el genoma de las cepas de *G. anatis*..... 23
Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados para la detección de los genes que codifican para proteínas de fimbrias F17 en el genoma de las cepas de *A. paragallinarum*..... 24
Tabla 7. Resumen de amplificados de los operones fimbriales esperados en *G. anatis*. 31
Tabla 8. Resumen de amplificados de los operones fimbriales esperados en *A. paragallinarum*. 32
Tabla 9. Construcciones obtenidas en pBluescriptII KS (-) 34
Tabla 10. Construcciones para la expresión de las proteínas estructural y adhesina de *G. anatis*. 45

LISTA DE ABREVIATURAS

a.a	Aminoácidos
Amp	Ampicilina.
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato.
BHI	Infusión de cerebro y corazón
°C	Grados centígrados.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
D.O.	Densidad óptica.
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético.
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranósido.
Kpb	kilo pares de bases.
kDa	kiloDalton
KCl	Cloruro de potasio
Km	Kanamicina
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani.
mg	Miligramos.
µg	Microgramos.
ml	Mililitros.
µl	Microlitros.
NaCl	Cloruro de sodio.
NBT	Nitroazul de tetrazolium
ng	Nanogramos.
pb	Par de bases.
PBS	Regulador salino con fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
TBE	Regulador de Tris-boratos-EDTA.
TBS	Regulador salino con Tris
TEMED	Tetrametiletilendiamina
V	Voltios
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido

RESUMEN

Gallibacterium anatis y *Avibacterium paragallinarum* son bacterias patógenas de aves que causan enfermedades agudas en el tracto reproductor y respiratorio, y son responsables de la disminución en la producción de huevo y carne de aves. Por ser bacterias de reciente estudio sus mecanismos de patogenicidad no han sido completamente elucidados (Persson y Bojesen, 2015). Algunos de estos factores de virulencia identificados en estas bacterias son: toxinas del tipo RTX, cápsula de polisacáridos, metaloproteasas que degradan inmunoglobulina IgG aviar, hemaglutininas contra eritrocitos de aves y fimbrias para adherirse a superficies inertes. El presente estudio se centró en el estudio genético y molecular de los genes que codifican fimbrias tipo F17 por su importancia estructural para la adhesión y por su potencial respuesta inmunológica. A partir de la información del genoma de la cepa UMN179 de *Gallibacterium anatis*, que contiene 3 operones fimbriales, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar fragmentos de esos genes y usarlos como fuente de expresión de péptidos para purificarlos y posteriormente generar anticuerpos en conejo. Los amplificados de PCR se clonaron en el plásmido vector pBluescriptII KS (-) y se subclonaron para su expresión en el vector pQE-30 usando como hospedero heterólogo a *E. coli*. Se obtuvieron 4 construcciones que corresponden a secuencias de *G. anatis:* 1) Megan con un inserto de 493 pb de la cepa ESV 34 codifica para una proteína estructural de 164 a.a; 2) Samanta con un inserto de 745 pb de la cepa $F149^T$ codifica para una proteína adhesina de 248 a.a; 3) Tuti con un inserto de 745 pb que codifica para una proteína adhesina de 248 a.a de la cepa ESV34 y 4) Zuky con un inserto de 399 pb que codifica para una proteína estructural de 133 a.a. perteneciente al operón Flf1de la cepa ESV34. En el caso se secuencias de *A. paragallinarum* se obtuvieron 2 construcciones, ambas con un inserto de 1137 pb correspondientes al gen que codifica para la proteína adhesina de 379 a.a de las cepas 6 y 5 del operón Flf. Las secuencias Zuky y Samanta se subclonaron en el vector de expresión, para obtener los péptidos respectivos: uno estructural de 18.2 kDa de la cepa ESV34 (Megan) y una adhesina de 27.5 kDa la cepa $F149^T$. (Samanta). Las proteínas se purificaron por afinidad en columnas con níquel y elución por gradiente de imidazol. Las proteínas purificadas se usaron para inmunizar conejos y preparar anticuerpos que se evaluaron en experimentos tipo western blot, observando poca actividad específica de reconocimiento antígeno anticuerpo en esta etapa preliminar.

INTRODUCCION

Impacto de las enfermedades ocasionadas por *Gallibacterium anatis* y *Avibacterium paragallinarum* en el sector avícola

La AVEC ASBL (Association of Poultry Processors and Poultry Trade in the European Union countries) estima que la producción mundial de carne aumentará un 1.6% y que las aves de corral se convertirán en el mayor sector cárnico en 2020 (AVEC ASBL Annual Report , 2014). En el sector avícola, las enfermedades infecciosas del sistema respiratorio, representan uno de los mayores problemas de sanidad animal con niveles de morbilidad y mortalidad entre 10 y 50 % (Leon , 2009), las cuales son producidas por virus y bacterias. Entre los agentes virales destacan Paramoxovirus, Coronavirus, Herpesvirus, Metapneumovirus y entre las bacterianas son notorias las infecciones por *Avibacterium paragallinarum, Ornithobacterium rhinotracheale, Pasteurella multocida, Gallibacterium anatis* (Machota y Yanes, 2002), *Campylobacter spp*., *Salmonella sp* (no tifoidea), *Escherichia coli* O157: H7 y *Listeria monocytogenes* (Eberle y Kiess, 2012). Adicionalmente se sabe que las poblaciones bacterianas en las aves y en sus subproductos varían, dependiendo del manejo antes y después de su matanza, lo que es conocido como prácticas de higiene en la manipulación de las aves. En los productos comercializados de carne de ave la lista de los patógenos reportados es más grande incluyendo; *Campylobacter spp*., *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Pasteurella multocida*, *Riemerella anatipestifer*, *Salmonella spp*., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio spp*. y *Yersinia enterocolitica*. (Keklik, y Puri, 2010).

En la mayoría de los casos, *G. anatis* y *A. paragallinarum* fueron aisladas de aves comerciales enfermas; sin embargo, también se ha reportado su presencia en aves domésticas y silvestres tales como pavos, gansos, patos, faisanes, perdices, garzas, etc. (Christensen, *et al* 2003; Bojesen, *et al* 2003). La presencia de estas bacterias ha sido reportada en países de Europa, África, Asia y América.

En aves como el pollo de granja, *G. anatis* es parte de la microflora normal del tracto respiratorio superior y del tracto genital en animales sanos (Bojesen, *et al*., 2004) y su asociación con una gama de patologías es difícil de hacerse después de la autopsia en ausencia de lesiones, por lo cual no se puede relacionar como patógeno responsable de la enfermedad. (Bojesen, *et al.*, 2004; Bisgaard, *et al*, 2005). En otros casos la infección con *G. anatis* si correlaciona con cuadros patogénicos y la

recuperación de cultivos puros de los tejidos afectados. Por tanto, se propone que *G. anatis* posee linajes o cepas virulentas y avirulentas.

Las cepas virulentas de *G. anatis* producen gallibacteriosis, una infección sistémica que afecta principalmente al tracto reproductivo generando lesiones (Neubauer, *et al*., 2009) que afectan severamente a las gallinas ponedoras, haciendo decaer la producción de huevo (Neubauer, *et al*., 2009).

Los animales con gallibacteriosis presentan los siguientes síntomas: cara hinchada, secreción nasal, fiebre, depresión, postración, anorexia, dificultad respiratoria, crestas y barbillas cianóticas, diarrea café-verdosa, deshidratación, disminución en la postura (gallinas). En la necropsia se observa congestión en senos infraorbitarios con puntos hemorrágicos hasta la tráquea, hepatomegalia esplenomegalia, aerosaculitis, peritonitis y en otros casos, hemorragia en miocardio, inflamación renal, folículos deformes (gallinas), salpingitis, atrofia ovárica, ruptura folicular (Fig. 1).

Figura 1. Signos y lesiones de la infección por *Gallibacterium anatis*

Tomado de Mendoza, *et al*., 2015. Bioservice SRL, p.3

La bacteria *A. paragallinarum* infecta el tracto respiratorio superior de las aves produciendo la enfermedad conocida como coriza infecciosa (CI), ésta es una enfermedad respiratoria aguda. El síndrome clínico de la CI incluye: inflamación edematosa de la cara, alrededor de los ojos y la barbilla; descarga nasal, senos paranasales inflamados (Figura 2); disminución de consumo de agua y alimento, diarrea verde por sobreinfección (Blackall, 1999).

Figura 2. Ave que presenta signos clínicos de Coriza Infecciosa (CI)

Tomado de la base de datos de PoultryMed Home (http://www.poultrymed.com/Poultrymed/Templates/showpage.asp)

La Coriza Infecciosa (CI) se puede clasificar en dos tipos:

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

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

El resultado epidemiológico depende en gran medida de la cepa (Bojesen, *et al*., 2008). Aunque se han observado factores ambientales y del huésped que favorecen la infección de *G. anatis* y *A. paragallinarum*. Algunos de los factores que influyen en el huésped son los cambios hormonales (Gerlach, 1977), la edad (Bisgaard, 1977), el estrés (Rzewuska, *et al*., 2007), el estado inmunológico comprometido (Bojesen, *et al*., 2004) y de factores ambientales como la variación estacional de la temperatura.

Ambas enfermedades están relacionadas con pérdidas económicas en el sector avícola, con un gran impacto a nivel mundial, debido a que hay una mortalidad elevada en pollos de engorde y una disminución en la producción de huevo, perdidas que llegan a ser hasta del 60% (Christensen, *et al*., 2003).

Características taxonómicas de *G. anatis y A. paragallinarum*

Las bacterias de las especies *G. anatis y A. paragallinarum* son Gram negativas, pertenecen al phylum, Proteobacteria; Clase, Gammaproteobacteria; Familia, *Pasteurellaceae*; Géneros, *Gallibacterium* y *Avibacterium* respectivamente.

G. anatis es una bacteria descrita como no móvil, en forma de bacilo o pleomórficas, se encuentran aisladas o en pares, las colonias en agar sangre son lisas, grises, opacas, circulares elevadas de 1-2mm de diámetro después de 48 horas de incubación a 37ºC; no forman endoesporas; su crecimiento es mesofílico y anaerobio facultativo (Christensen, *et al* 2003). Fue clasificada en la familia *Pasteurellaceae* por Pohl (Bisgaard, *et al*., 2009; Christensen, *et al*., 2003). *Gallibacterium anatis* tiene dos biovares (Fig. 3), uno es el hemolítico y otro no hemolítico o anatis (Christensen, *et al*., 2003).

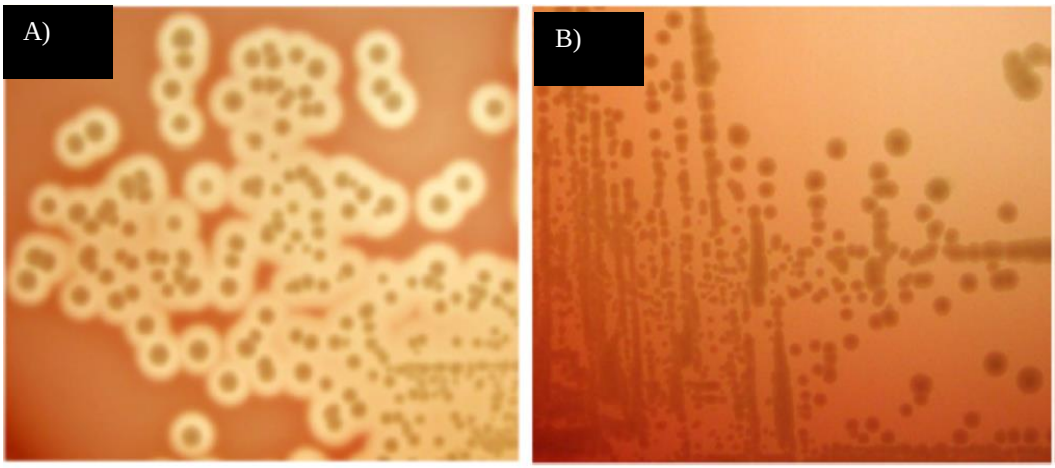


Figura 3. Biovares de *Gallibacterium anatis*

A) Biovar hemolítico B) Biovar no hemolítico, anatis

Tomado de Persson G, Bojesen M, Veterinary Research. 2015. 46:57 p2

Las cepas de *G. anatis* son positivas a las pruebas de catalasa, oxidasa, fosfatasa, B-galactosidasa y paranitrofenil-B-galactosido, reducen los nitratos. Forman ácido sin producción de gas a partir de glicerol, (-) D-ribosa, (+) D-xilosa, (-) D-manitol, (-) D-fructosa, (+) D-galactosa, (+) D-glucosa, manosa, sacarosa y rafinosa. Son negativas para las pruebas de crecimiento simbiótico, citrato de Simmons malonato, H_2S/Hierro triple azúcar, crecimiento en presencia de KCN, Voges-Proskauer a 37 °C y ureasa, no producen pigmentos, se han observado variaciones en la reacción de rojo de metilo a 37 ºC, crecimiento en Agar MacConkey y en la producción de ácido a partir de (+) L-arabinosa, (-) D-arabinosa, m-inositol, (-) D-sorbitol, (-) L- fucosa, lactosa, maltosa, trehalosa y dextrinosa (Christensen, *et al*., 2003).

A. paragallinarum es una bacteria no esporulada, presenta morfología cocobacilar con tendencia a la formación de cadenas cortas y algunos filamentos. En cultivos en caldo, es frecuente observar formas degradadas que aparecen como si fueran manchas de colorantes (Terzolo, 2000).
Son bacterias de 1 a 3 µm de largo y de 0.4 a 0.8 µm de ancho, pueden aparecer individualmente, en pares, o como cadenas cortas, con una tendencia a la formación de filamentos (Blackall, 1999). Las colonias en gelosa sangre tienen forma de gotas diminutas de 0.3 mm a 1 mm de diámetro, *A. paragallinarum* ha sido clasificada en tres serogrupos: A, B y C con nueve serovariedades de acuerdo al esquema de Page, distribuidas de la siguiente manera: A-1, A-2, A-3, A-4; B-1; C-1, C-

2, C-3 y C-4 (Kume, *et al*.,83). Algunas serovariedades tienen una distribución amplia en el mundo, mientras que otras estan limitadas a ciertas áreas geográficas.

En muchas especies bacterianas la síntesis de dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD, por sus siglas en inglés, nicotinamide adenine dinucleotide; factor V) ocurre inicialmente a partir del ácido quinolínico o por la vía del ácido nicotínico (Foster y Moat, 1980)**.** Algunos miembros de la familia *Pasteurellaceae*, no tienen estas vías de biosíntesis de NAD y deben obtenerlo directamente del medio o a partir de precursores, como es el caso de *A. paragallinarum.* Sin embargo, desde 1989 se identificaron aislamientos de *A. paragallinarum* que crecen en ausencia de NAD (Horner, *et al*., 2007); con base en el requerimiento de este factor de crecimiento (V), actualmente se reconocen dos biovariedades: 1) dependiente de NAD y 2) la independiente de NAD. (Fig. 4). A la fecha, se han identificado aislamientos de la biovariedad independiente de NAD en Sudáfrica (Horner, *et al*., 2007) y México (García , *et al*, 2004)

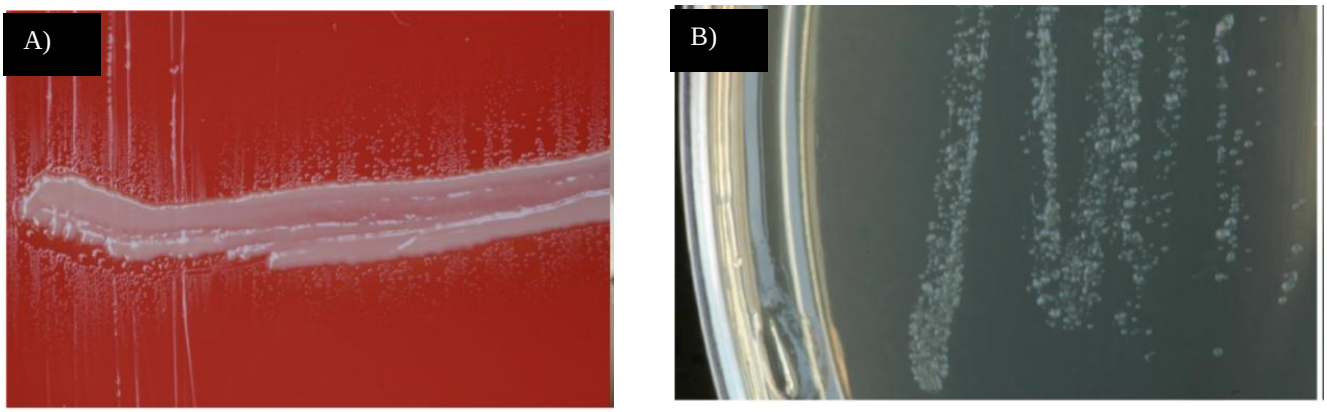


Figura 4. Biovares de *Avibacterium paragallinarum.*

A). Cultivo de *Avibacterium paragallinarum* en base de agar con 10% de sangre de ovino con colonia nodriza de *Staphylococcus epidermidis*. Colonias dependientes de NAD

B). Cultivo en placa sin sangre, ni colonia nodriza o NAD, Colonias independientes de NAD.

Tomado de Soriano, *et al*., Vet. Méx. 2013 57:62 p60

Características del cultivo de *G. anatis y A. paragallinarum*

G. anatis se cultiva en agar gelosa sangre con atmósfera de CO_2, donde pueden distinguirse los biovares hemolíticos de los no hemolíticos. Las colonias en este agar son lisas, grises, opacas, circulares, elevadas de 1-2 mm de diámetro. En medio líquido se cultiva en BHI (Brain Heart Infusion). La temperatura de incubación es de 37 °C por tener un comportamiento mesofílico.
Para el cultivo de *A. paragallinarum*, se emplea gelosa sangre colocando una estría nodriza de *Staphylococcus epidermidis* como productor de NAD (Blackall, 1999)**.** Las colonias tienen forma de gotas diminutas de 0.3 mm a 1 mm de diámetro muy cercanas a la colonia nodriza, crecimiento llamado "fenómeno de satelitismo". En medio líquido se utiliza BHI, suplementado con NAD, suero de pollo (1 %) o suero de caballo (5 %), porque es requerido para el crecimiento de algunas cepas. (Blackall, 1999). *A. paragallinarum* crece comúnmente en una atmósfera de 5 % de CO_2; sin embargo, éste no es un requisito esencial. Las temperaturas mínima y máxima de crecimiento son 25 y 40 °C, respectivamente, aunque la óptima es 37 °C (Blackall, 1999).

Factores de virulencia de *G. anatis y A. paragallinarum*

Se considera que un microorganismo patógeno posee la capacidad de producir daño o enfermedad en un organismo hospedero susceptible, en algún nivel, siendo la muerte el mayor de estos (medida de patogenicidad). El concepto "virulencia" es una medida cuantitativa de la patogenicidad, la cual se puede medir por el número de células del microorganismo patógeno, que es necesario para causar una enfermedad (Kristensen, *et al*., 2011). Los mecanismos de patogenicidad están mediados por factores de virulencia, los cuales les permiten a los microorganismos invadir el ambiente del hospedero, expresar estructuras externas o receptores superficiales especializados para su adhesión, (Meylan, *et al*., 2006), permanecer en estos sitios a través de procesos de colonización, evadir al sistema inmune (Diacovich y Gorvel, 2010) y finalmente causar daño tisular, con el fin de tener acceso a nuevos nichos y fuentes de nutrientes, necesarios para continuar su crecimiento y reproducción.

Factores de virulencia de *A. paragallinarum:* **i) Hemaglutininas**. Los antígenos hemaglutinantes, o hemaglutininas, son estructuras relacionadas principalmente con la antigenicidad, patogenicidad e inmunogenicidad de *A. paragallinarum*, ya que dan la capacidad de adherirse a las células que tapizan al tracto respiratorio (Terzolo, 2000), esto se debe a que los eritrocitos y las células del epitelio respiratorio en las aves reconocen antígenos comunes. La mayoría de las cepas de *A. paragallinarum* aisladas de aves tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos de pollo debido a las hemaglutininas, este antígeno no siempre es detectado con facilidad, ya que algunas cepas lo tienen oculto por antígenos capsulares superficiales que impiden su detección (Terzolo, 2000). **(ii) Cápsula.** Es una capa envolvente externa, "rígida, organizada como matriz polimérica impermeable", ubicada sobre la pared celular, su función es como adherente a las células hospederas, y protectora de las bacterias porque evita la desecación y la fagocitosis; las cepas de *A. paragallinarum* que carecen de esta estructura son avirulentas. (Sawata y Kume, 1983) **(iii) Lipopolisacáridos**. El lipopolisacárido (LPS) o endotoxina es el mayor componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, desempeñan una función importante en la activación del sistema inmune al constituir el antígeno superficial más importante en estas bacterias. El LPS está compuesto por una región lipídica y una glicosídica con funciones separadas y/o sinérgicas lo que hace de esta molécula uno de los factores de virulencia más complejos de comprender (Hurtado y Iregui, 2010), entre otras funciones participa en la adhesión de las bacterias a las células epiteliales. Este componente ha sido poco estudiado en *A. paragallinarum*, pero se sabe que le permite colonizar y producir la enfermedad (Iritani, *et al*., 1980). **(iv) Proteínas de membrana externa** (OMPs), algunas tienen capacidad inmunogénica (Iritani , *et al*., 1980), y algunas otras son transportadores específicos de iones importantes, como el hierro (Larios, 2007). **(vi) Proteasas**. *A. paragallinarum* produce varios antígenos secretados como las proteasas, enzimas degradantes que hacen la hidrólisis parcial o total de las proteínas; rompen los enlaces peptídicos liberando péptidos y aminoácidos para su desarrollo, o iones de reservas complejas como el hierro. Por su amplia actividad enzimática destruyen componentes tisulares para facilitar la invasión de órganos y/o tejidos, y contribuyen a que las bacterias evadan la respuesta inmune (Rivero, *et al* 2005). **(vii) Vesículas de membrana**. Las micro-vesículas de membrana externa (OMV) que libera al medio (Rocha, *et al* 2006), pueden contener diversos factores de virulencia como la probable toxina RTX y proteínas inmunogénicas.

Factores de virulencia de *G. anatis:* **(i) Vesículas de membrana externa** (OMV), estas estructuras se han observado en condiciones *in vitro* y pueden contener proteínas, toxinas o DNA (Persson y Bojesen, 2015). **(ii) Cápsula**, algunas cepas tienen una estructura compuesta de polisacáridos

extracelulares que tiene propiedades de virulencia como *Pasteurella multocida* (Boyce y Adler, 2000). La cápsula es una estructura que se ha reportado en patógenos para la evasión de la respuesta inmune (Willis y Whitfield, 2013). **(iii) Metaloproteasas**, que degradan la inmunoglobulina de aves, **(iv) Hemaglutininas**, algunas cepas de *G. anatis* son capaces de aglutinar eritrocitos aviares mediante la expresión de una probable hemaglutinina de 65 kDa (Montes, *et al* 2016). **(v) Toxinas RTX**, estas se producen por muchos miembros de la familia *Pasteurellaceae* y son responsables de sus propiedades hemolíticas o leucotóxicas (Frey y Kuhnert, 2002). *Gallibacterium* biovar hemolítica produce una hemolisina conocida como GtxA (toxina-RTX), la cual induce un fuerte efecto leucotóxico en los macrófagos aviares y es uno de los factores de virulencia más importantes de *G. anatis* (Kristensen, *et al*., 2009; Kristensen, *et al*., 2011). **(vi) Adhesinas fimbriales**, *G. anatis* se adhiere a células del epitelio en pollo (Salgado, *et al*., 2012) y se ha reportado la producción de varias adhesinas fimbriales (Johnson, *et al.*, 2013). A nivel genético en *G. anatis* se han identificado varios grupos de genes (5 operones) que participan en la biogénesis de fimbrias, las cuales están filogenéticamente relacionadas con las de familia F17; en diferentes aislados se han hallado de 1-3 operones de este tipo (Kudirkiene, *et al*., 2014).

Fimbrias de tipo F17

La familia de las fimbrias F17, anteriormente conocida como FY o Att25 (Lintermans, *et al.*, 1988; Lintermans, *et al*., 1988), comprende muchas variantes tales como las fimbrias F17, G, K99 y 20K, que son producidas por varios patotipos de *E. coli*, incluyendo ExPEC humana, *E. coli* enterotoxigénica animal (ETEC) y cepas de *E. coli* patógenas de aves (APEC) (Samadder, *et al.*, 2009; Stordeur, *et al* 2002). Para todas estas cepas se propone que las fimbrias están mediando la adhesión bacteriana a los receptores de glicoproteína en la mucosa (Le Bouguénec y Bbertin, 1999). Los estudios realizados con las fimbrias F17 han demostrado que estas tienen adhesinas específicas que se unen a ciertos receptores celulares, que están en la superficie y que contienen N-acetil-D-glucosamina (Glc-NAc) (Klausen, *et al.*, 2003; Le Baouguénec y Bbertin, 1999), siendo las subunidades estructurales de las fimbrias un soporte para mantener expuestas a las adhesinas en el exterior de la bacteria a. En la Figura 5 se esquematizan los elementos proteicos que integran a las fimbrias F17.

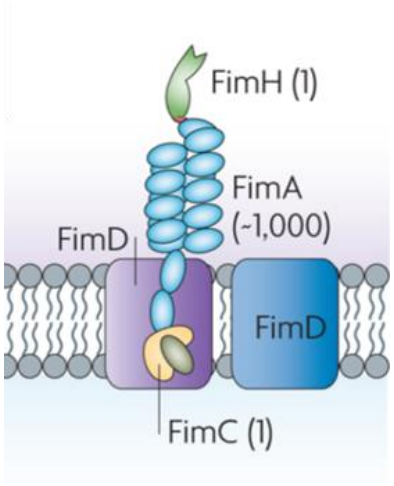


Figura 5. Representación de los elementos proteicos de una fimbria F17.

Tomado de Soriano, *et al.*, Vet. Méx. 2013 57:62 p60

La formación de las fimbrias F17 requiere de la expresión de un clúster de cuatro genes (Lintermans, *et al.*, 1991). (Figura 6) que comprende un gen que codifica una proteína chaperona, una proteína Usher, una proteína de adhesión y varias proteínas de la subunidad estructural designada como *flf*D, *flf*C, *flf*G y *flf*A, respectivamente.

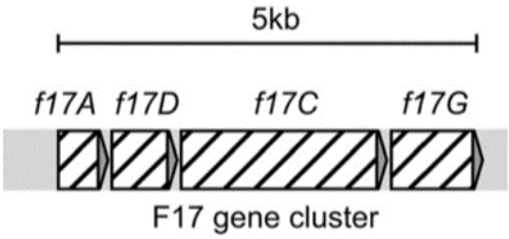


Figura 6. Arreglo genético del operón que codifica para fimbrias F17.

Tomado de Morgan, *et al*., Veterinary Research 2014, 45:76 p.8

El ensamblaje de las fimbrias F17 (Figura 7) ocurre por la vía de Chaperona/Usher (Wurpel, *et al*., 2013), donde dos proteínas, la proteína chaperona y la proteína Usher, facilitan el plegamiento, el ensamblaje y la secreción de la proteína de la subunidad estructural, que forman el tallo de las fimbrias

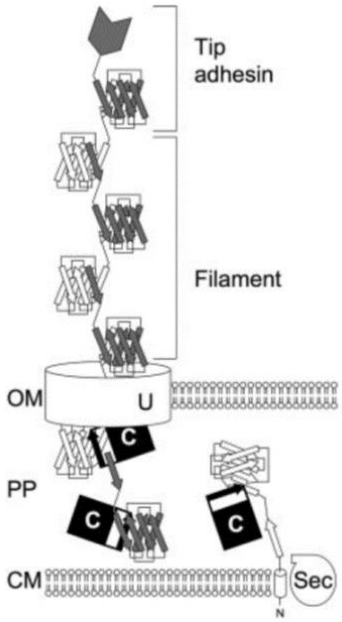


Figura 7. Dibujo esquemático del ensamble de fimbrias F17 por la vía de chaperona/usher.

Tomado de Sean-Paul N, *et al*., Microbiology and Molecular Biology Reviews 2007, 551–575 p. 2

Recientemente se han identificado varios operones necesarios para la biosíntesis de fimbrias en *Gallibacterium anatis* UMN179, y en estos el gen reportado con más frecuencia es el que codifica para una subunidad fimbrial de 20.5 kDa designada FlfA (GenBank No de acceso JX855927). Esta proteína tiene similitud de secuencia con el precursor de la proteína fimbrial F17 identificada en la cepa 536 de *Escherichia coli* patogénica extraintestinal (ExPEC) (Dobrindt, *et al.*, 2002).

Estrategias de protección inmunológica contra *G. anatis* y *A. paragallinarum*

En la práctica, la utilización de bacterinas contra Coriza Infecciosa no siempre induce protección, ya que suelen presentarse brotes de la enfermedad tras su aplicación y han mostrado frecuentemente que sólo confieren protección contra un serovar específico presente en la vacuna (Blackall y Soriano 2008). Sin embargo, es conocido que las aves que se han recuperado de una infección natural, adquieren inmunidad no solo contra la serovariedad que ocasionó la infección, sino también contra algunas de las otras nueve serovariedades de Page (Blackall, *et al*.,1990). En otras palabras, la infección natural puede producir protección cruzada entre las distintas serovariedades (Laboratorios Sanfer, 2005). También se tiene el conocimiento de que las cepas aisladas de campo de *G. anatis* se caracterizan por una alta diversidad antigénica, así como presentar resistencia a antibióticos (Bojesen, *et al*., 2011), lo que dificulta la elección del tratamiento. Sin embargo, gracias al avance de los estudios genómicos en *G. anatis*, se han identificado antígenos conservados en cepas de *G. anatis*, que incluyen una serie de inmunógenos potencialmente útiles para controlar las infecciones de *G. anatis* (Bager, *et al* 2014). En trabajos recientes de evaluación inmunológica y desafío en aves, se han evaluado antígenos que incluyen proteínas recombinantes o porciones de estas, así como la fracción N-terminal de la proteína GtxA, la toxina citolítica RTX, la proteína estructural FlfA subunidad de fimbria F17 (Pors, *et al.*, 2013), en donde se observó que estos antígenos indujeron un aumento de anticuerpos específicos contra la proteína administradas, así como una respuesta inmune protectora parcial. Estos resultados son muy prometedores para la generación de nuevas vacunas para el control de la gallibacteriosis.

JUSTIFICACIÓN

Los microorganismos *Gallibacterium. anatis* y *Avibacterium paragallinarum* son patógenos responsables de ocasionar pérdidas económicas significativas en el sector industrial avícola. Estas bacterias, poseen factores de virulencia, resistencia a antibióticos y alta diversidad antigénica. Por esta última característica, las vacunas existentes no brindan una protección extensa contra las enfermedades generadas por estos microorganismos, y hace de suma importancia conocer la combinación de los factores de virulencia, la composición genética por cepa y la dinámica de la población de estas bacterias, para el desarrollo y puesta en marcha de nuevas estrategias que prevengan eficazmente las infecciones causadas por *G. anatis* y *A. paragallinarum*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar a nivel genético la composición y organización de las secuencias que codifican para la expresión de las proteínas de fimbrias F17 en cepas de *Gallibacterium anatis* y *Avibacterium paragallinarum* e iniciar la evaluación de la respuesta inmunológica cruzada producida por estas fimbrias

Objetivos Particulares

1) Realizar la búsqueda y comparación bioinformática de las secuencias genéticas que codifican para proteínas de fimbrias F17 en *Avibacterium paragallinarum y Gallibacterium anatis.*
2) Determinar mediante PCR la presencia de los genes que codifican para proteínas de fimbrias F17en cepas aisladas de campo.
3) Clonar genes que formen parte del operón que codifica para proteínas de fimbrias F17 de *Avibacterium paragallinarum y Gallibacterium anatis* en *E. coli*
4) Expresar algunas proteínas de fimbrias F17 de *Avibacterium paragallinarum y Gallibacterium anatis* en *E. coli*
5) Realizar inmunizaciones en ratones con las proteínas recombinantes para obtener anticuerpos policlonales.
6) Detectar las proteínas recombinantes tipo F17 por Western blot

ESQUEMA DE TRABAJO

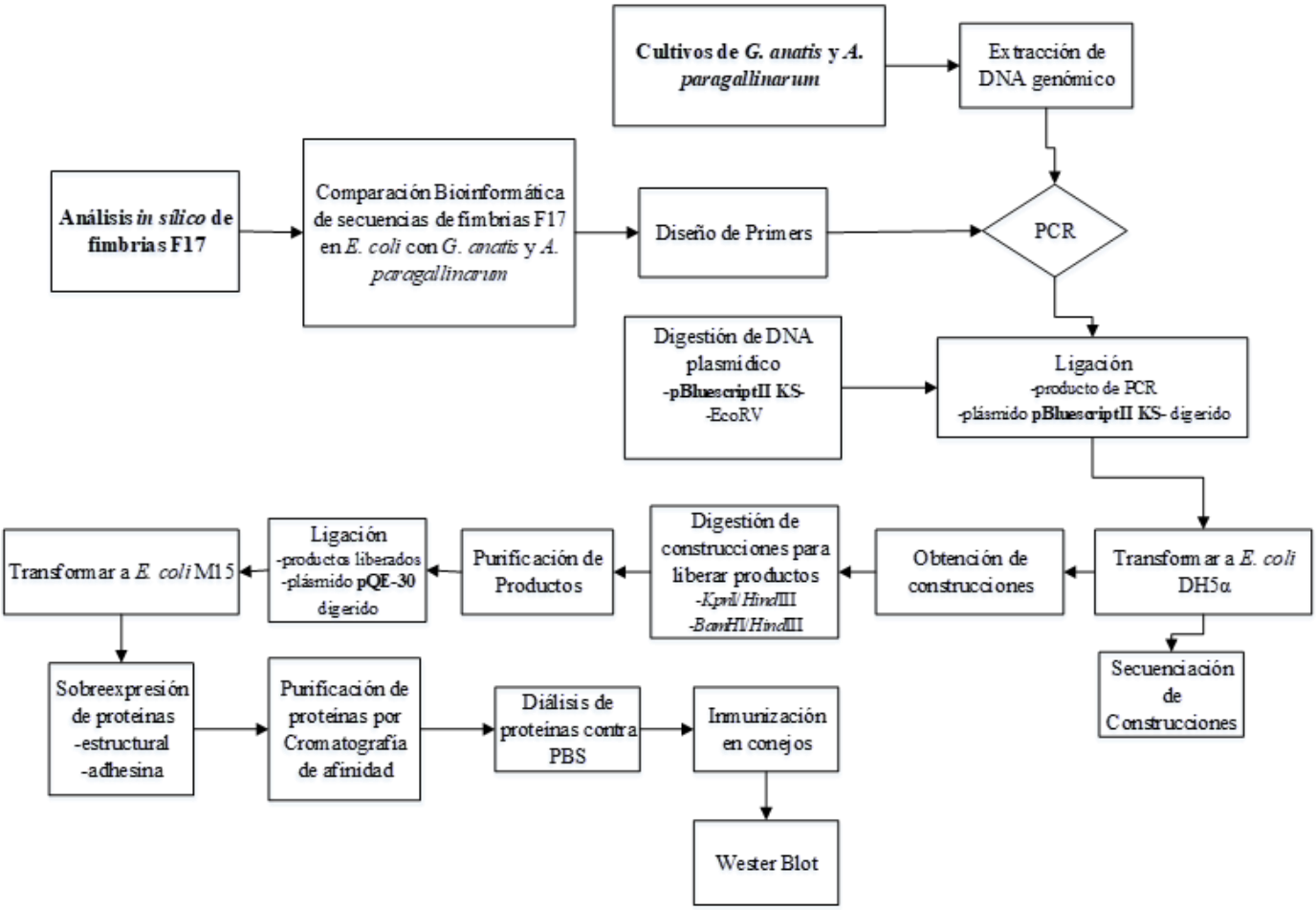


Figura 8. Esquema de Trabajo

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos y plásmidos empleados en esta investigación.

Las cepas de *Gallibacterium anatis* y *Avibacterium paragallinarum* utilizadas en este trabajo se indican en las Tablas 1 y 2. Se utilizaron 2 cepas de *E. coli* (Tabla 3) y los plásmidos utilizados para clonación y expresión de proteínas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 1. Cepas de *Gallibacterium anatis* utilizadas en este trabajo

Cepas *Gallibacterium anatis*	**Origen**	**Biovar**
ESV34	Aislado de campo	Hemolítica
F149^{T}	Cepa d referencia	anatis
12656-12	Cepa de referencia	Hemolítica
ESV1	Aislado de campo	Hemolítica
ESV2	Aislado de campo	Hemolítica
ESV3	Aislado de campo	Hemolítica
Gene2 ESV6	Aislado de campo	anatis
ESV 200	Aislado de campo	Hemolítica
ESV 199	Aislado de campo	Hemolítica

Tabla 2. Cepas de *Avibacterium paragallinarum* utilizadas en este trabajo.

Cepas *Avibacterium paragallinarum*	**Origen**	**Biovar**
CL	Aislado de campo	NAD dependiente
CT	Aislado de campo	NAD dependiente
5	Aislado de campo	NAD dependiente
6	Aislado de campo	NAD dependiente

Tabla 3. Cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo.

Cepa	**Origen**	**Características**
Escherichia coli DH5*α*	Invitrogen	F– endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK–mK+), λ–
Escherichia coli M15	Qiagen	F^-, Φ80ΔlacM15, lac^-, $recA^+$, Km^r

Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	**Origen**	**Características**
pBluescriptII KS (-)	Stratagene	ColE1, $LacZ^+$, Amp^r, 2958 pb.
pQE-30	Qiagen	N-terminal tag, 6xHis tag, Amp^r, 3461 pb

Estrategia de amplificación y clonación de genes que codifican para proteínas de fimbrias F17 de *G. anatis* y *A. paragallinarum*.

A partir del genoma de *Gallibacterium anatis* UMN179 (acceso No. CP002667) en el cual se han reportado la presencia de 3 operones fimbriales del tipo F17 que corresponden a los operones *flf* [(866581-873601 nt) y (809-812Tag)], *flf*1[(802183-810155 nt) y (750-753Tag)] y *flf*3 [(294622-301915nt) y (295-292Tag)]. Cada operón ubicado en la región del genoma de *G. anatis* UMN179 señalada anteriormente, cuenta con cuatro genes necesarios para la biosíntesis de fimbrias F17; una proteína estructural, proteína chaperona, Usher y adhesina (Figura 9.)

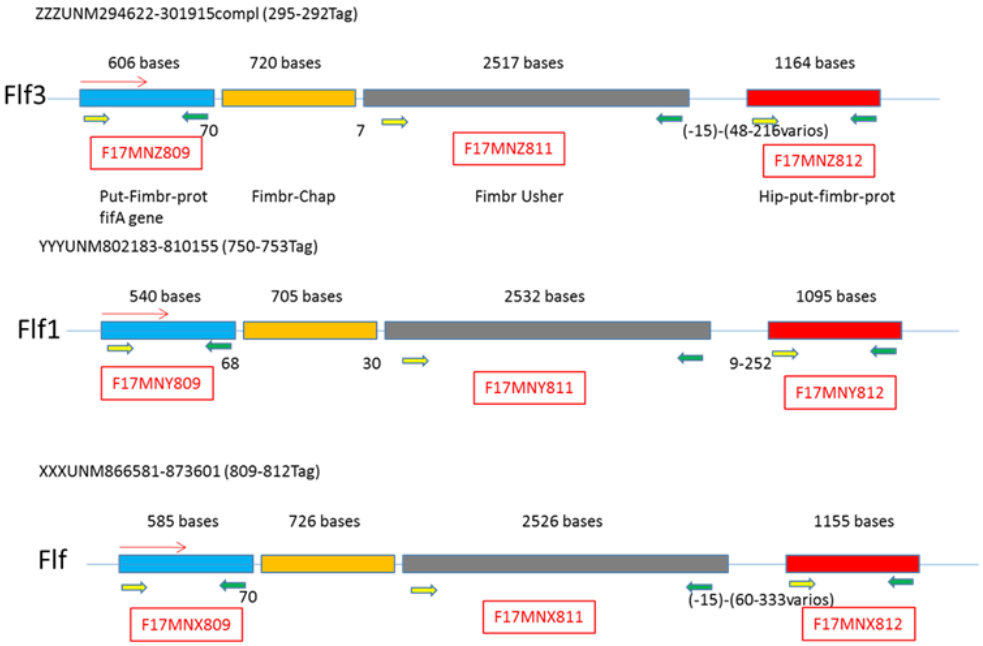


Figura 9. Esquema que muestra el arreglo genético de los operones fimbriales en la cepa de *G. anatis* UMN 179.

Los recuadros rojos indican la nomenclatura de los pares de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los fragmentos de genes.

Azul=gen que codifica para la proteína estructural FimA, Amarillo=gen que codifica para la proteína chaperona FimC, Gris= gen que codifica para la proteína Usher FimD, Rojo= gen que codifica para la proteína adhesina FimH.

Utilizando la aplicación PrimerSelect del programa Lasergene® DNASTAR, Inc., Madison WI, USA, se diseñaron 9 pares de oligonucleótidos para amplificar fragmentos de los tres operones que corresponden a las secuencias de los genes de la proteína estructural, de la proteína Usher y proteína adhesina (figura 9). En el diseño de los iniciadores se introdujeron secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción *Kpn*I, *Hind*III, *BamH*I y se añadieron algunas bases más en el extremo para facilitar la labor de las enzimas (Tabla 5).

Los genes que codifican para proteínas de fimbrias F17 fueron amplificados por PCR con enzima polimerasa de alta fidelidad *Pfx* (Invitrogene®), usando DNA genómico de los aislados de campo de *G. anatis* y *A. paragallinarum* como DNA molde, con los oligonucleótidos que se muestran en la tabla 5 y 6. Los productos de amplificación fueron clonados en la cepa de *E. coli* DH5α (Tabla 3) químicamente competente y empleando el vector de clonación pBluescriptII KS (-) (Figura 10) (Tabla 4) en el sitio *EcoR*V. Se seleccionaron las clonas recombinantes, las cuales fueron verificadas mediante PCR y secuenciación.

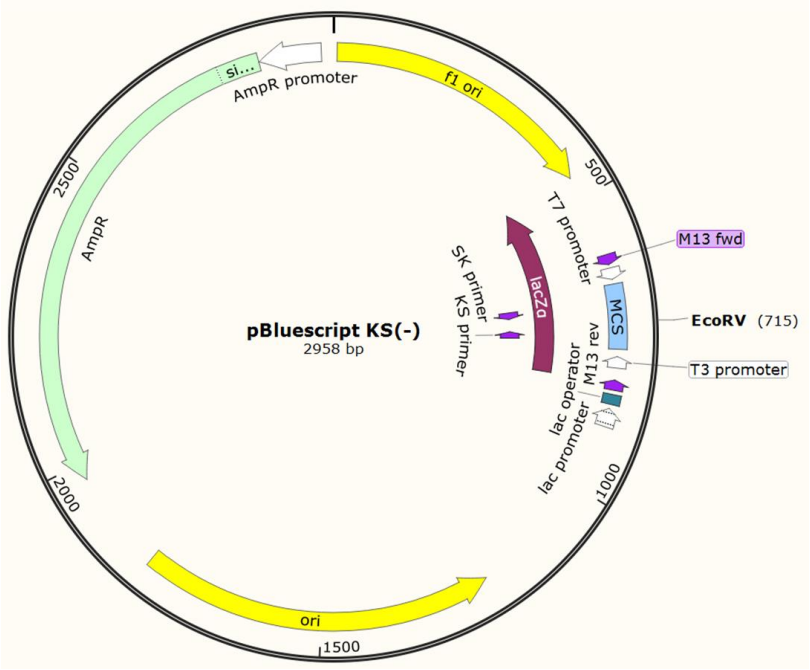


Figura 10. Mapa de vector pBluescriptII KS- (Agilent Technologies, California, EU). Donde se observa el MCS y el sitio *Eco*RV donde fueron clonados los fragmentos de genes que codifican para proteínas de fimbrias F17.

Los fragmentos de los genes que codifican para proteína estructural y adhesina de las cepas de *G. anatis* fueron subclonados en el vector de expresión pQE-30 en los sitios *Kpn*I/*Hind*III y *BamH*I/*Hind*III (Figura 11).

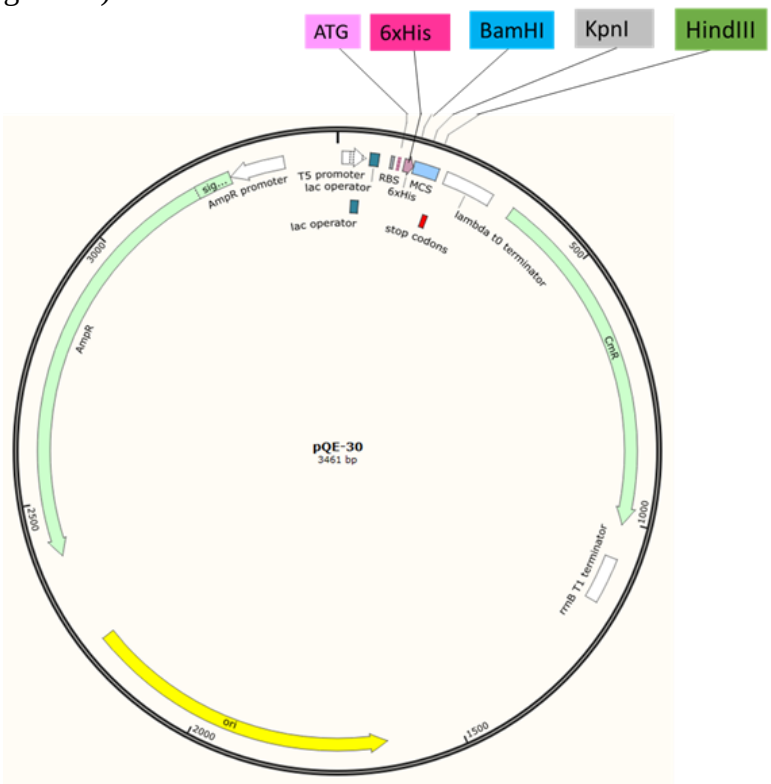


Figura 11. Mapa de vector pQE-30 (addgene, Suite, Sidney). Donde se observa el MCS y los sitios de restricción donde fueron subclonadas los fragmentos de genes que codifican para proteína estructural y adhesina.

En el caso de *A. paragallinarum*, el esquema de los operones fimbriales fue construido usando secuencias reportadas por Horta y col. (2015). A partir de la secuencia genómica de *A. paragallinarum* cepa CL, las secuencias fueron alineadas con respecto a las secuencias de los genes descritos en la cepa de *G. anatis* UMN179. Las secuencias de *A. paragallinarum* mostraron similitud a las secuencias descritas en *G. anatis* UMN179, en base a esta información se construyó el siguiente esquema (Figura 12), donde se observa la organización de los operones fimbriales en la cepa CL de *A. paragallinarum.*

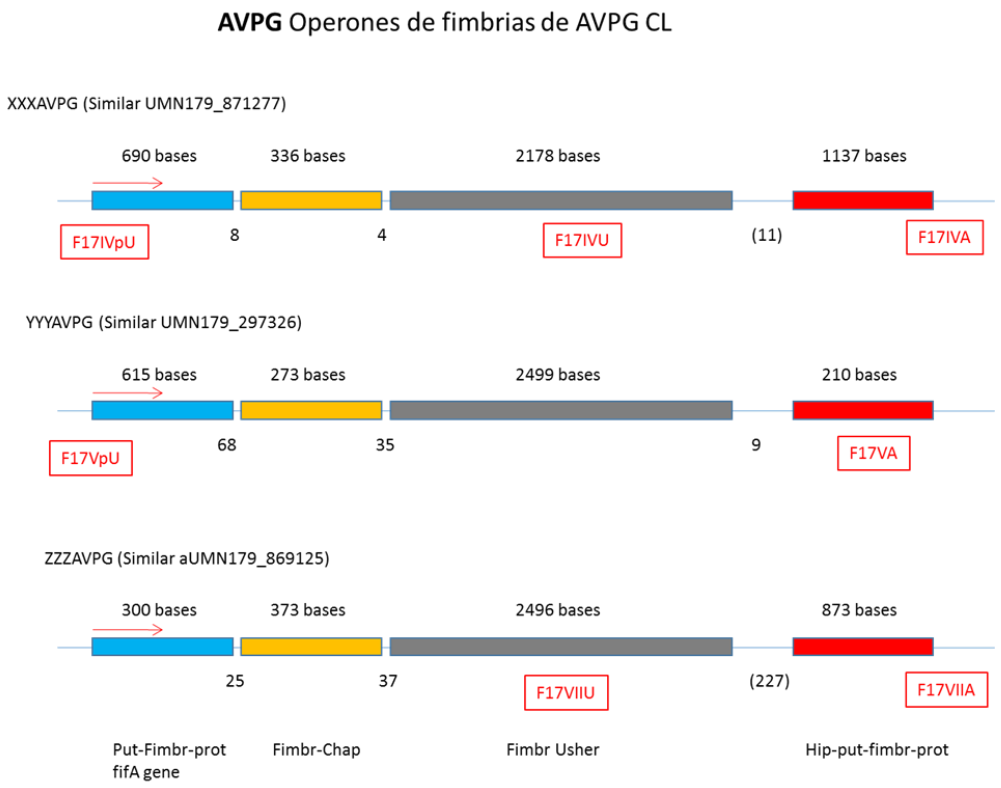


Figura 12. Esquema que muestra el arreglo genético de los operones fimbriales en *A. paragallinarum* cepa CL.

Los recuadros rojos indican la nomenclatura de los pares de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes.

Azul=gen que codifica para la proteína estructural FimA, Amarillo=gen que codifica para la proteína chaperona FimC, Gris= gen que codifica para la proteína Usher FimD, Rojo= gen que codifica para la proteína adhesina FimH.

Para el caso de las amplificaciones por PCR en el genoma de *A. paragallinarum*, en el laboratorio de Microbiología Molecular y Celular CIMC-ICUAP, ya se contaba con los oligonucleótidos diseñados previamente (Tabla 6).

Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados para la detección de los genes que codifican para proteínas de fimbrias F17 en el genoma de las cepas de *Gallibacterium anatis.*

GEN	Operón Fimbrial	OLIGONUCLEOTIDO	SECUENCIA
Proteína Estructural	*flf3*	F17MNZF809 F17MNZR809	TAC ATT GGT ACC GCC CAA CAC GGC ACT ATT TAC ATT AAG CTT CTT TAA CAG CAC CAG CAG T
Usher	*flf3*	F17MNZF811 F17MNZR811	TAC ATT GGT ACC TTT TTA TAC GGC AGT GAA GC TAC ATT AAG CTT CCG TCT TCT TGT TCT GGT AA
Adhesina	*flf3*	F17MNZF812 F17MNZR812	TAC ATT GGT ACC TTT GAA GGG ATA GAT GTT GGA GGA C TAC ATT AAG CTT GTA GCG TGC CTG TAT TTG ATG GAG
Proteína Estructural	*flf1*	F17MNYF809 F17MNYR809	TAC ATT GGA TCC GCT GCA GAT AAT TCA AAA GA TAC ATT AAG CTT AAG TTT GTT ATT GGA GGT AGT GA
Usher	*flf1*	F17MNYF811 F17MNYR811	TAC ATT GGA TCC AGC GTA GAA GCC GTT GAA TAC ATT AAG CTT GTA CCT AAT GGC GGC ACA C
Adhesina	*flf1*	F17MNYF812 F17MNYR812	TAC ATT GGA TCC CAA TAT CAA GCT ACA CCT AAT CC TAC ATT AAG CTT TTT AAT TCG AGA GGG TGG TC
Proteína Estructural	*flf*	F17MNXF809 F17MNXR809	TAC ATT GGA TCC GCC GAC CAA ACA AAC TCA G TAC ATT GTC GAC TGC GAT GGT ATA ATT CACTGTAGA
Usher	*flf*	F17MNXF811 F17MNXR811	TAC ATT GGA TCC TAT GTA GAG TTT GAC GCT GAT TT TAC ATT GTC GAC TGG TGG CAA CTC TTT TTC ATC
Adhesina	*Flf*	F17MNXF812 F17MNXR812	TAC ATT GGA TCC ACG GTT CCC CTT AGT GGT GT TAC ATT GTC GAC CTA TAA ATT AAA GGC TTG TCA TCC

Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados para la detección de los genes que codifican para proteínas de fimbrias F17 en el genoma de las cepas de *Avibacterium paragallinarum*.

GEN	Operón Fimbrial	OLIGONUCLEOTIDO	SECUENCIA
Proteína Estructural	*flf3*	F17VIIpUf F17VIIpUr	TTG AGT GGT AGG GTT CCT TT TCA ATG ATA ATA AAT ATT AT
Usher	*flf3*	F17VIIUf F17VIIUr	ATG ATT AAA CCG CAC TTA CA TCA ATA AAA TTG GCA TTG AA
Adhesina	*flf3*	F17VIIAf F17VIIAr	ATG CTT AAA AAA TTT CTT TT CTT AAT TTA AGG TGA GAT TG
Proteína Estructural	*flf1*	F17VpUf F17VpUr	CTA CAT TTT TAT CCG ACT TT TTA CTG TAG TGG GCT CGT CC
Usher	*flf1*		
Adhesina	*flf1*	F17VAf F17VAr	ATG AAA AAG CAA ATA ATA TT CTA TAA ATA ATT TTT TTT CT
Proteína Estructural	*flf*	F17IVpUf F17IVpUr	TTG AAA TTT TTT TCA CCA TC TCA GTT TTT TAA ATC TAA CA
Usher	*flf*	F17IVUf F17IVUr	TTGACGGATAAGCCTAAAGC TTA ATA AAA CTG GCA TTG TA
Adhesina	*flf*	F17IVAf F17IVAr	ATG AAA GGG AAA ATA ATT CA TCA ATC ATA ATA AAT ATT GT

Análisis de expresión de proteínas recombinantes.

Para sobreexpresar las proteínas estructural y adhesina se hizo la subclonación de los genes correspondientes en el vector pQE-30, empleando a *E. coli* M15 como cepa receptora. En un gel de poliacrilamida se analizó el perfil de proteínas tras la inducción con IPTG a cultivos con un crecimiento celular de una D. O_{600nm} de 0.6 de absorbancia. Se realizó una cinética de inducción para cada cultivo y se determinó el tiempo óptimo de inducción, los extractos que contenían proteína inducida fueron usados para purificación por afinidad en una columna de resina de sefarosa cargada con níquel (Ni^{2+}).

Las proteínas recombinantes fueron purificadas por gradiente de imidazol y en condiciones desnaturalizantes, utilizando buffer de unión (fosfato de sodio 100 mM, Tris 10 mM, imidazol 10 mM pH 8); buffer de lavado (fosfato de sodio 100 mM, Tris 10 mM, imidazol 50 mM ajustado a pH 6.3) y buffer de elución desnaturalizante (fosfato de sodio 100 mM, Tris 10 mM, imidazol 250 mM ajustado a pH 4.5), los tres buffers contenían urea 8 M como agente desnaturalizante.

Las proteínas recombinantes purificadas por gradiente de imidazol y en condiciones desnaturalizantes fueron dializadas contra PBS pH 7.4. Los sacos de diálisis empleados fueron de membrana tubular de celulosa regenerada que tienen un tamaño de poro de 28 µm y un tamaño de corte de peso molecular (MWCO) de 6000 a 8000 kDa, la proteína se concentró directamente en los sacos de diálisis por medio de deshidratación con sacarosa comercial, para finalizar las muestras se colectaron en fracciones de 0.5 ml y se almacenaron a -20 °C para su análisis en SDS-PAGE.

Inmunodetección de proteínas recombinantes

Las proteínas fueron transferidas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa, dónde quedaron inmovilizadas para revelarlas con ayuda de anticuerpos. La detección de las proteínas recombinantes estructural y adhesina fue realizada de manera indirecta, haciendo uso de un anticuerpo primario obtenido por la inmunización subcutánea de conejos con estas proteínas. Los conejos fueron proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, las condiciones de cuidado y uso de los animales fueron de acuerdo a lo establecido en la NOM-062- 00-1999. Los conejos fueron inoculados cuatro veces con la siguiente temporalidad, después de la primera inmunización hubo tres refuerzos, cada dos semanas. El reconocimiento de los anticuerpos policlonales se realizó utilizando un anticuerpo Anti-IgG de conejo (anticuerpo secundario) acoplado a fosfatasa alcalina (A4312. SIGMA-ALDRICH, Misuri, EU). El ensayo de western blot fue llevado a cabo de acuerdo a lo establecido por Sambrook, *et al*.,1989.

RESULTADOS

Estudio bioinformático de genes que codifican para fimbrias en *Avibacterium paragallinarum y Gallibacterium anatis*

Para *G. anatis y A. paragallinarum* se sugiere que el genoma contiene tres operones que codifican proteínas putativas de fimbrias F17, aunque sólo se hizo la búsqueda de los operones que están anotados en la base de datos del genoma de la cepa UMN179 de *G. anatis* haciendo el seguimiento de la proteína Usher. Las secuencias de los genes que codifican para fimbrias F17, muestran diferentes porcentajes de identidad observando un 32.602% de identidad para los tres genes que codifican para proteínas estructurales, 48.913% de identidad para los tres genes que codifican para proteínas chaperonas, 50.972% de identidad para los tres genes que codifican para proteínas usher y 17.949% de identidad para los tres genes que codifica para proteínas adhesinas. Siendo los genes que codifican para proteína usher los más conservados no solo en *G. anatis* UMN179, sino también en otros microorganismos

Considerando regiones únicas para cada gen se diseñaron juegos de primers para amplificar porciones de los genes que codifican para proteínas de fimbrias F17 y continuar con la investigación, siendo importante verificar la existencia experimental de los genes en el genoma de *A. paragallinarum* y *G. anatis*, las secuencias elegidas por medios computacionales están contenidas en las tablas 5 y 6.

Microorganismos y Plásmidos empleados.

Se utilizaron varias cepas de *G. anatis* (tabla 1) y *A. paragallinarum* (tabla 2), de estas se extrajo DNA genómico de 10 cepas de *G. anatis* y 4 cepas de *A. paragallinarum*, como cepas de referencia se usaron la cepa 12656-12 de *G. anatis* y para *A. paragallinarum* la cepa CL (Figura 13).

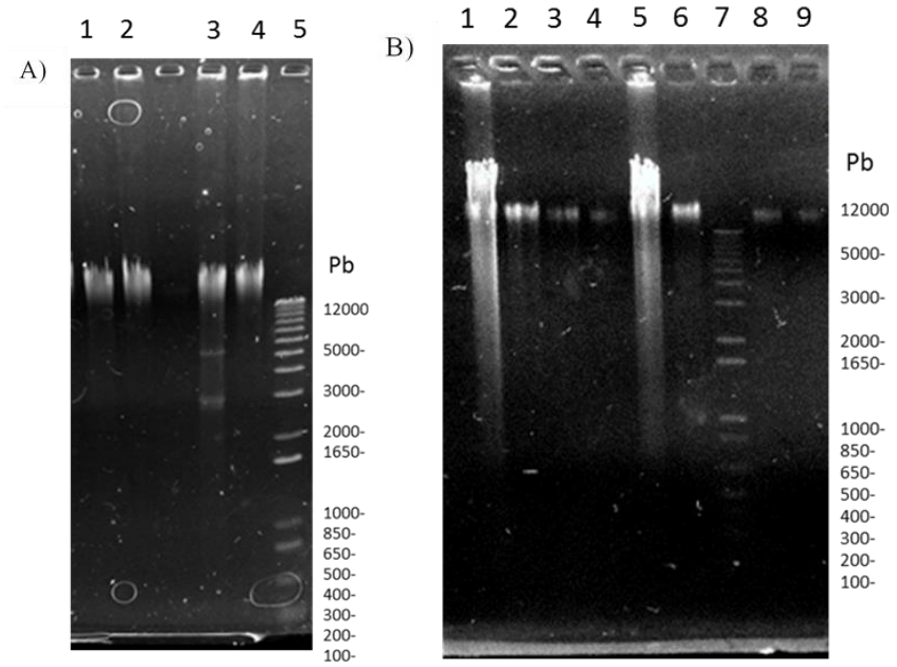


Figura 13. DNA genómico de *G. anatis* y *A. paragallinarum* observado en geles de agarosa al 0.8%.

A). DNA genómico de *G. anatis*. Carriles 1: cepa ESV 34; 2: cepa F149^{T}; 3: cepa ESV199; 4: cepa ESV200, 5 M.P.M.
B) DNA genómico de *A. paragallinarum*. Carriles 1,2,3 y 4: cepa CL, DNA genómico concentrado, dilución 1:10, dilución 1:20 y dilución 1:30. Respectivamente. 5,6,8 y 9: cepa 6, DNA genómico concentrado, dilución 1:10, dilución 1:20 y dilución 1:30. Respectivamente; 7: M.P.M

Se obtuvo el DNA plasmídico del vector de clonación pBluescriptII KS (-) de 2958 pb, en la figura 14 (carril 2). El plásmido vector digerido con *Eco*RV en el carril 3, se observan las isoformas del plásmido debido a una digestión parcial. El vector linearizado posteriormente fue ligado a los productos amplificados por PCR de los genes que codifican para fimbrias F17.

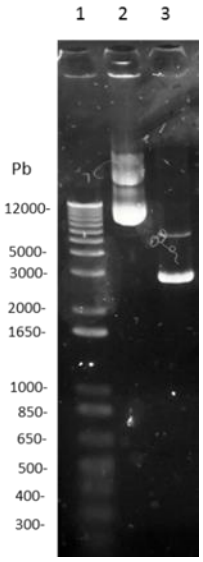


Figura 14. DNA plasmídico de pBluescriptII KS (–) sin digerir y digerido con enzima de restricción *Eco*RV. Gel de agarosa al 0.8%. Carril 1: M.P.M; 2: Plásmido pBluescriptII KS (-) sin digerir; 3: Plásmido pBluescriptII KS (-) digerido con enzima de restricción *Eco*RV.

Amplificación y clonación de genes que codifican para proteínas de fimbrias F17 en *G. anatis* y *A. paragallinarum*.

Se realizaron amplificaciones utilizando los oligonucleótidos enlistados en la tabla 5 y 6 en 10 cepas de *G. anatis* y 4 cepas de *A. paragallinarum*. Para el caso de la amplificación por PCR utilizando DNA genómico de las cepas de *G. anatis;* los oligonucleótidos amplifican solo una porción de los genes (Tabla 7), para el caso de *A. paragallinarum* los oligonucleótidos empleados en la PCR amplificaron todo el gen blanco de los oligonucleótidos (Tabla 8).

Con el DNA genómico de *G. anatis y A. paragallinarum* fue posible la detección de algunos de los genes que codifican para las proteínas estructural, usher y adhesina de las fimbrias F17 (Figuras 15-17). En la figura 15 y 16 se muestran los productos de PCR que fueron amplificados usando DNA genómico de las cepas ESV34 y F149^{T} de *G. anatis* respectivamente. En ambos casos se observa la amplificación de los productos esperados de acuerdo a la tabla 7, con la amplificación de un solo producto específico, aunque en algunas cepas no se obtuvieron productos de PCR con los oligonucleótidos usados.

En la cepa F149^{T} se observan tres bandas de amplificación (figura 15), donde el producto de 745 pb representa el producto seleccionado para clonación, este amplificado corresponde al fragmento del gen que codifica para proteína adhesina del operón *flf*3. Los amplificados en los carriles 3 y 11 no se seleccionaron para clonación. Por otro lado, en los amplificados usando DNA genómico de la cepa ESV34 se observan siete bandas de amplificación (figura 16), donde los productos en los carriles 2, 3 y 6 se seleccionaron para la clonación y son: amplificado de los fragmentos de los genes que codifican para proteína estructural de 493 pb operón *flf*3; carril 3: amplificado de gen que codifica para proteína adhesina de 745 pb del operón *flf*3 y carril: 6 amplificado que codifica para proteína estructural de 399 pb del operón *flf*1. Estos productos son porciones de genes que se pueden clonar en fase y que codifican para parte de las proteínas de la fimbria F17 y son potenciales inmunógenos.

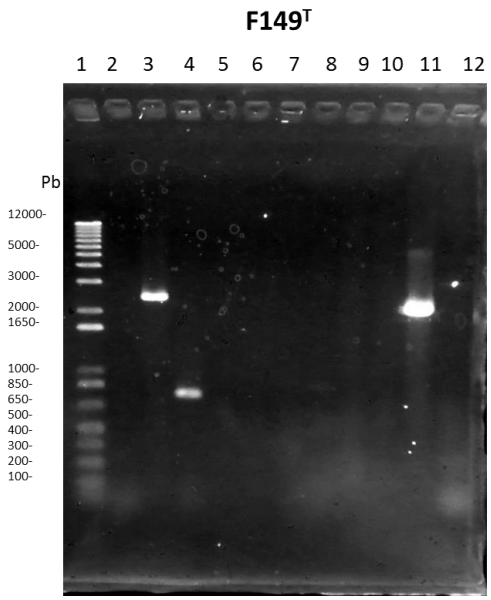


Figura 16. Amplificación de los genes que codifican para proteínas de fimbrias en la cepa de *G. anatis* F149^{T}.

Gel de agarosa al 0.8 %. Carril 1: M.P.M; 3: Amplificado de genes que codifican para proteínas Usher 2499 pb operón *flf3*; 4: Amplificado de gen que codifica para proteína adhesina 745 pb operón *flf3*; 11: Amplificado de gen que codifica para proteína Usher 2133 pb operón *flf*.

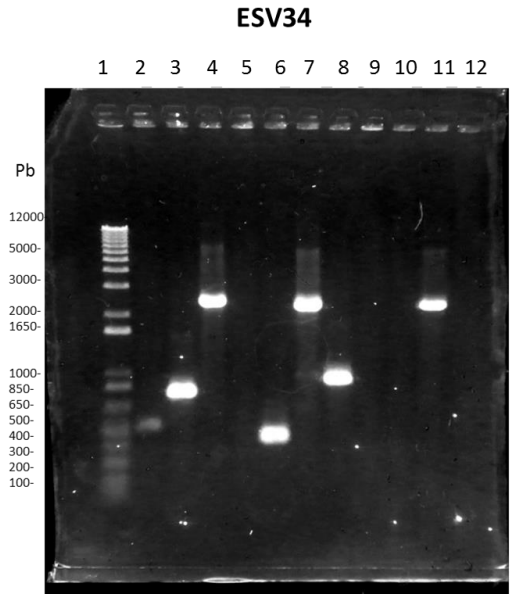


Figura 15. Amplificación de los genes que codifican para proteínas de fimbrias en la cepa de *G. anatis* ESV34.

Gel de agarosa al 0.8 %. Carril 1: M.P.M; 2: Amplificado de genes que codifica para proteínas estructural 493 pb operón *flf3*; 3: Amplificado de gen que codifica para proteína adhesina 745 pb operón *flf3*; 4: Amplificado gen que codifica para proteína Usher 2499 pb operón *flf*3; 6: Amplificado de gen que codifica para proteína estructural 399 pb operón *flf*1; 7: Amplificado de gen que codifica para proteína Usher 2334 pb operón *flf*1; 8: Amplificado de gen que codifica para proteína adhesina 951 pb operón *flf*1; 11: Amplificado de gen que codifica para proteína Usher 2133 pb operón *flf*,

Cuando se usó DNA genómico de cepas de *A. paragallinarum* para la amplificación por PCR, se obtuvieron varias bandas en un mismo tubo de reacción, dentro de estos amplificados se encontraba el amplificado esperado de acuerdo a la tabla 8. En el caso de las amplificaciones alrededor de 1kb en el carril 1 usando DNA genómico de las cepas 5 y 6 de *A. paragallinarum* (Figura 17) estos amplificados corresponden a los genes que codifican ara proteínas adhesinas del operón *flf*. Sin embargo, algunos juegos de oligonucleótidos no generaron productos de amplificación a partir de DNA de las cepas *A. paragallinarum* (Tabla 8).

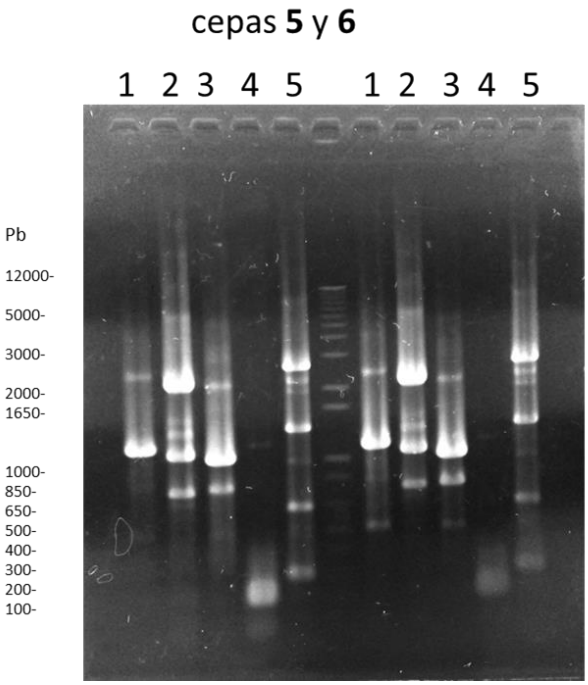


Figura 17. Amplificación de los genes que codifican para proteínas de fimbrias F17 en las cepas 5 y 6 de *A. paragallinarum*.

Gel de agarosa al 0.8 %. Carril 1: amplificado del gen que codifica para proteína adhesina 1137 pb del operón *flf;* 2: amplificado de gen que codifica para proteína usher 2178 pb del operón *flf*; 3: amplificado de gen que codifica para proteína estructural 690 pb del operón *flf*; 4: amplificado de gen que codifica para proteína adhesina 210 pb del operón *flf1*: 5: amplificado de gen que codifica para proteína usher 2496 pb del operón *flf3*. Carril sin número: M.P.M.

Las Tablas 7 y 8, muestran el resumen de amplificación que se obtuvieron en este trabajo, para los genes fimbriales en *G. anatis* y *A. paragallinarum* respectivamente.

Tabla 7. Resumen de amplificados de los operones fimbriales esperados en *G. anatis*. Las proteínas codificadas, el tamaño de estos genes en pares de bases, el par de oligonucleótidos específicos y el resultado de amplificación en las cepas analizadas.

	ESV 199	ESV 200	Gene2 ESV F149 ESV1	ESV 3	ESV 2	ESV?	12656	F149	ESV 34		Oligo	Tamaño del gen (pb)	Amplificado (pb)	% del gen amplificado	Proteina	Operón Fimbrial
							x		X	1	F17MNZF809	606	493	81.4	estructural	*flf3*
											F17MNZR809					
							x	x	x	2	F17MNZF811	2517	2499	99.3	Usher	
											F17MNZR811					
							x	x	x	3	F17MNZF812	1137	745	64	adhesina	
											F17MNZR812					
		x					x		x	1	F17MNYF809	540	399	73.9	estructural	*flf1*
											F17MNYR809					
							x		x	2	F17MNYF811	2532	2334	92.2	Usher	
											F17MNYR811					
		x					x		x	3	F17MNYF812	1095	921	86.8	dhesina	
											F17MNYR812					
	x									1	F17MNXF809	585	510	87.2	estructural	*flf*
											F17MNXR809					
							x	x	x	2	F17MNXF811	2526	2133	84.4	Usher	
											F17MNXR811					
										3	F17MNZF812	1155	72.2	72.2	adhesina	
											F17MNZR812					

Azul=proteína estructural; Gris=proteína Usher; Rojo=proteína adhesina.
El color y la x representan una amplificación positiva

Tabla 8. Resumen de amplificados de los operones fimbriales esperados en *A. paragallinarum*. Las proteínas codificadas, el tamaño de estos genes en pares de bases, el par de oligonucleótidos específicos y el resultado de amplificación en las diferentes cepas analizadas.

CL	C	6	5	Oligo	Tamaño del Gen (pb)	Amplificado esperado (pb)	% del gen amplificado (pb)	Proteína	Operón Fimbrial
X	X	X	X	F17VIIUf	2496	2496	100	Usher	*flf*1
				F17VIIUr					
X	X	X	X	F17VIIAf	873	873	100	adhesina	
				F17VIIAr					
X	X			F17VpUf	615	615	100	estructural	
				F17VpUr					
									*flf*3
X	X	X	X	F17VAf	210	210	100	adhesina	
				F17VAr					
X	X	X	X	F17IVpUf	690	690	100	estructural	
				F17IVpUr					
X	X	X	X	F17IVUf	2178	2178	100	Usher	*flf*
				F17IVUr					
X	X	X	X	F17IVAf	1137	1137	100	adhesina	
				F17IVAr					

Azul=proteína estructural; Gris=proteína Usher; Rojo=proteína adhesina.
El color y la x representan una amplificación positiva

Los productos de PCR elegidos como candidatos fueron reamplificados con enzima DNA polimerasa *Pfx* (Invitrogene®), se ligaron al vector pBluescriptII KS (-) (Stratagene) previamente digerido con enzima de restricción *EcoR*V (Fermentas® Thermo Fisher SCIENTIFIC Massachusetts, EU) para transformar células competentes de *E. coli* DH5α. Los insertos clonados se linealizaron utilizando *EcoR*I (Figura 18). Las construcciones se secuenciaron y se hicieron los análisis de alineamiento con secuencias de GenBank, utilizando el programa BLAST. Se corroboró que los fragmentos ligados al vector correspondieran a los genes esperados, así se obtuvieron 6 construcciones en el vector de clonación pBluescriptII KS (-), dos con secuencias de genes que codifican para proteínas estructurales y cuatro para adhesinas (tabla 9).

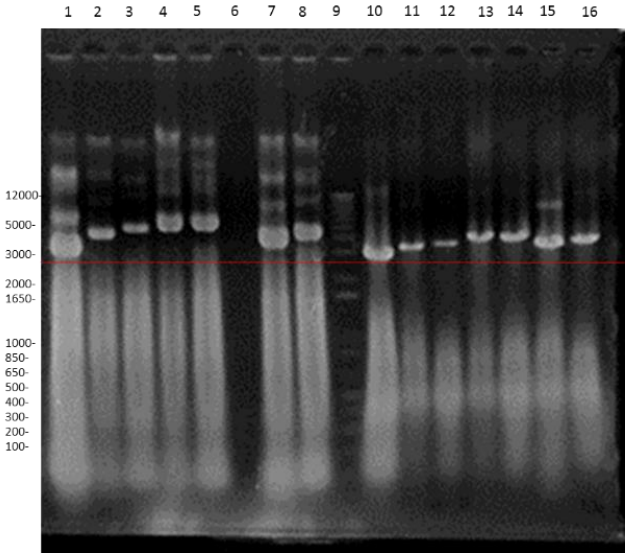


Figura 18. DNA plasmídico de las construcciones obtenidas en pBluescriptII KS (-) sin digerir y digeridas que contienen los genes que codifican para proteínas de fimbrias F17.
Gel de agarosa al 0.8 % Carriles del 1 al 8 muestran DNA plasmídico sin digerir; del 10 al 16 digerido con enzima de restricción *EcoR*V. Carril 1**:** DNA de Plásmido pBluescriptII KS (-); **2:** Construcción Megan; **3:** Construcción Samanta; 4: Construcción Nathalie; 5: Construcción Angeline; 6: vacío; 7: Construcción Zuky; 8: Construcción Tuti.
Carril 9) M.P.M; 10: DNA de Plásmido pBluescriptII KS (-); 11: Construcción Megan (3463 pb); 12: Construcción Samanta (3715pb); 13: Construcción Nathalie (4100 pb); 14: Construcción Angeline (4100 pb); 15: Construcción Zuky (3369 pb); 16: Construcción Tuti (3715 pb).

Tabla 9. Construcciones obtenidas en pBluescriptII KS (-) con secuencias de genes que codifican para proteínas estructurales y adhesinas en cepas de *G. anatis y A. paragallinarum*

Nombre de la construcción	Fragmento del Gen	Tamaño del fragmento del gen en pb	Tamaño de la construcción en pBluescriptII KS (-) en pb	Cepa	Operón	Sitios de restricción	Identidad respecto al gen de referencia
Megan	proteína estructural	493 pb	3463 pb	*G. anatis* ESV34	*flf3*	*Kpn*I/*Hind*III	97%
Zuky	proteína estructural	399 pb	3369 pb	*G. anatis* ESV34	*flf1*	*BamH*I/*Hind*III	100%
Samanta	proteína adhesina	745 pb	3715 pb	*G. anatis* ESVF149^{T}	*flf3*	*Kpn*I/*Hind*III	99%
Tuti	proteína adhesina	745 pb	3715 pb	*G. anatis* ESV34	*flf3*	*Kpn*I/*Hind*III	99%
Nathalie	proteína adhesina	1137 pb	4100 pb	*A. paragallinarum* cepa6	*flf*	-	98%
Angeline	proteína adhesina	1137 pb	4100 pb	*A. paragallinarum* cepa5	*flf*	-	98%

Secuencias de construcciones en el vector pBluescriptII KS (-)

Las secuencias de los fragmentos de DNA clonados en el vector pBluescriptII KS (-) fueron analizados por alineamiento y comparación con los genes depositados de GenBank, observando que existe identidad con las secuencias de los genes que forman parte de los operones del tipo F17.

Análisis de las secuencias de las construcciones con los insertos clonados que codifican para proteínas estructurales.

En la Figura 19 se muestra el alineamiento de la secuencia de nucleotídica clonada en la construcción Megan, cuyo tamaño fue de 493 pb, y que proviene del fragmento del gen que codifica para la proteína estructural del operón *flf3* de *G. anatis* cepa ESV34, alineado contra el gen de referencia de la cepa UMN179 y que mostró 97 % de identidad.

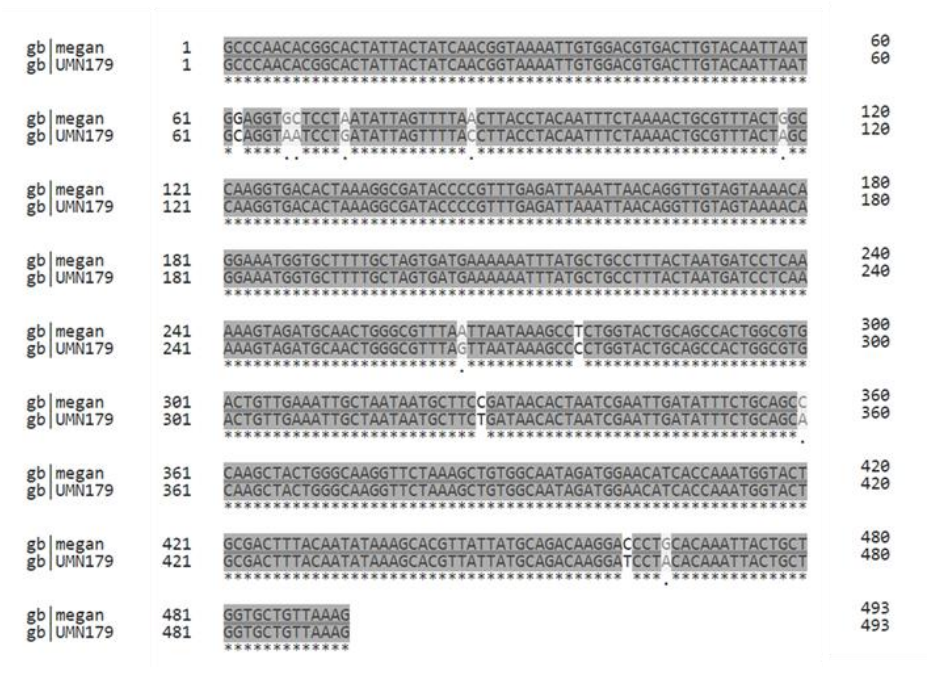


Figura 19. Alineamiento de secuencias de DNA de genes que codifican para proteína estructural del operón *flf3*.

Alineamiento entre secuencia de gen que codifica para proteína estructural del operón *flf3* de *G. anatis* UMN179 y secuencia clonada de *G. anatis* ESV34 (construcción Megan). Las posiciones idénticas están resaltadas en gris.

En la Figura 20 se muestra el alineamiento de la secuencia nucleotídica clonada en la construcción Suky, el inserto clonado fue de 399 pb, y que proviene del fragmento del gen que codifica para la proteína estructural del operón *flf1* de *G. anatis* cepa ESV34, alineado contra el gen de referencia de la cepa UMN179, secuencia que tiene 100 % de identidad en este análisis.

```
gb|suky        1   GCTGCAGATAATTCAAAAGACGGAACAGTTAATTTTAATGGGAAATTGGTAGATAATACC   60
gb|UMN179      1   GCTGCAGATAATTCAAAAGACGGAACAGTTAATTTTAATGGGAAATTGGTAGATAATACC   60
                   ************************************************************

gb|suky       61   TGTACTGTTAATACAAATAGTCAAAATCTGACTGTACAATTACCTACCTTACCTGTTCGC  120
gb|UMN179     61   TGTACTGTTAATACAAATAGTCAAAATCTGACTGTACAATTACCTACCTTACCTGTTCGC  120
                   ************************************************************

gb|suky      121   CTATTAGCAAATGCCAATGACACTGCTGGTTTAACATTATTCCAACTTCAACTTGATAAT  180
gb|UMN179    121   CTATTAGCAAATGCCAATGACACTGCTGGTTTAACATTATTCCAACTTCAACTTGATAAT  180
                   ************************************************************

gb|suky      181   TGTAACAATCAAAAAGCAAGAGCCTATTTTGTTCCTACCCCAGACAAAGTTGATTTAGCT  240
gb|UMN179    181   TGTAACAATCAAAAAGCAAGAGCCTATTTTGTTCCTACCCCAGACAAAGTTGATTTAGCT  240
                   ************************************************************

gb|suky      241   TCTGGTCGTCTAAAAAATACTGAAGCAACAGGTACAGCTGCAAAAAATGCACAAGTACAA  300
gb|UMN179    241   TCTGGTCGTCTAAAAAATACTGAAGCAACAGGTACAGCTGCAAAAAATGCACAAGTACAA  300
                   ************************************************************

gb|suky      301   TTACTTGATAGCGATGCAGCTACTGTTATCAATGCAACAGGGACAGGCGGACATCAAGGA  360
gb|UMN179    301   TTACTTGATAGCGATGCAGCTACTGTTATCAATGCAACAGGGACAGGCGGACATCAAGGA  360
                   ************************************************************

gb|suky      361   AGTAATCTACAAACCATCACTACCTCCAATAACAAACTT                       399
gb|UMN179    361   AGTAATCTACAAACCATCACTACCTCCAATAACAAACTT                       399
                   ***************************************
```

Figura 20. Alineamiento de secuencias de DNA de genes que codifican para proteínas estructurales del operón *flf1*.

Alineamiento entre secuencia de gen que codifica para proteína estructural del operón *flf1* de *G. anatis* UMN179 y secuencia clonada de *G. anatis* ESV34 (construcción Samanta). Las posiciones idénticas están resaltadas en gris.

Análisis de las secuencias de las construcciones con los insertos clonados que codifican para proteínas adhesinas.

En la Figura 21 se muestra el alineamiento de la secuencia nucleotídica clonada en la construcción Samanta, el inserto clonado es de 745 pb, y proviene del fragmento del gen que codifica para la proteína adhesina del operón *flf3* de *G. anatis* cepa F149^{T}, el alineamiento con el gen de referencia de la cepa UMN179 dio 99 % de identidad.

```
gb|samanta     1   TTTGAAGGGATAGATGTTGGAGGACCAAGTGGAGTACCAACACAAGAAAAATATATTAGC   60
gb|UMN179      1   TTTGAAGGGATAGATGTTGGAGGACCAAGTGGAGTACCAACACAAGAAAAATATATTAGC   60
                   ************************************************************

gb|samanta    61   GCTAATTATAATCGTGTTGGTTATAATGAGGTGGTTTATCGTTGGAATATAGGTGAAATA  120
gb|UMN179     61   GCTAATTATAATCGTGTTGGTTATAATGAGGTGGTTTATCGTTGGAATATAGGTGAAATA  120
                   ************************************************************

gb|samanta   121   ATGGCGGGAGACTACTGTAAGAGACGCTCCGGTGTAACGAATCCAACGGATCGATTTTGG  180
gb|UMN179    121   ATGGCGGGAGACTACTGTAAGAGACGCTCCGGTGTAACGAATTCAACGAATCGATTTTGG  180
                   ************************************** ***** ***********

gb|samanta   181   CTAGAAATTAAATATTTTGATACACAAGATAAAAATAGTCAGTATTTTGAAAGAAGATTA  240
gb|UMN179    181   CTAGAAATTAAATATTTTGATACACAAGATAAAAATAGTCAGTATTTTGAAAGAAGATTA  240
                   ************************************************************

gb|samanta   241   CTGGAAGTAAATAATCATCTAGTAACCATTGACGGTACAGGTCCATATCAATTTGCCATT  300
gb|UMN179    241   CTGGAAGTAAATAATCATCTAGTAACCATTGATGGTACAGGTCCATATCAATTTGCCATT  300
                   ******************************** **************************

gb|samanta   301   GTTGACAGAGGAGAATCACTGATTTTTGATTTAAGACTAAAGCTAAAAGATACTTTTCTC  360
gb|UMN179    301   GTTGACAGAGGAGGATCACTGATTTTTGATTTAAGACTAAAGCTAAAAGATACTTTTCTC  360
                   ************.*********************************************

gb|samanta   361   TATAATTCAACGCCAGCAGATATTTCTATTCCGGCAAACGCGCCTTTGGCAATCATTACG  420
gb|UMN179    361   TATAATTCAACGCCAGCAGATATTTCTATTCCGGCAAACACGCCTTTGGCAATCATTACG  420
                   ************************************.*******************

gb|samanta   421   ATGTTATGTGTGGATAAAACGACATCAGGTAATACCGTAGCGGATTATCAAGCTAATGAT  480
gb|UMN179    421   ATGTTATGTGTGGATAAAACGACATCAGGTAATACCGTAGCGGATTATCAAGCTAATGAT  480
                   ************************************************************

gb|samanta   481   AATAGGGCTTATAAATATAACTCATTCTCTATGATAAAAGTTACCTCCGCGAATGAGGCA  540
gb|UMN179    481   AATAGGGCTTATAAATATAACTCATTCTCTATGATAAAAGTTACCTCCGCGAATGAGGCA  540
                   ************************************************************

gb|samanta   541   ACCTTTAGTTTTGCTCGAATTTGTACACTGGAAGATAATAACCAAACGGTTAAACTAAAA  600
gb|UMN179    541   ACCTTTAGTTTTGCTCGAACTTGTACACTGGAAGATAATAACCAAACGGTTAAACTAAAA  600
                   ******************  ***************************************

gb|samanta   601   GATGTGACTGTAAAAGAACTTAATGAGAATGACGAAGTGCTAGGTAAAACTTTTGATATT  660
gb|UMN179    601   GATGTGACTGTAAAAGAACTTAATGAGAATGACGAAGTGCTAGGTAAAACTTTTGATATT  660
                   ************************************************************

gb|samanta   661   GGGCTTAATTGCCCCGGAGGAAGTGTAAAAAATGCTTATATTCTTTTTACTGATGCCAAT  720
gb|UMN179    661   GGGCTTAATTGCCCCGGAGGAAGTGTAAAAAATGCTTATATTCTCTTTACTGATGCTCTT  720
                   ****************************************** *********** .:*

gb|samanta   721   TCTCCATCAAATACAGGCACGCTAC                                    745
gb|UMN179    721   TCTCCATCAAATACAGGCACGCTAC                                    745
                   ************************
```

Figura 21. Alineamiento de secuencias de DNA de genes que codifican para proteína adhesina del operón *flf3*.

Alineamiento entre secuencia de gen que codifica para la proteína adhesina del operón *flf3* de *G. anatis* UMN179 y secuencia clonada de *G. anatis* F149^{T} (construcción Samanta). Las posiciones idénticas están resaltadas en gris.

En la Figura 22 se muestra el alineamiento de la secuencia nucleotídica clonada en la construcción Tuti, el inserto clonado fue de 745 pb, y provino del gen que codifica para la proteína adhesina del operón *flf3* de *G. anatis* cepa ESV34, el alineamiento con el gen de referencia de la cepa UMN179 dio 99 % de identidad.

```
gb|tuti      1   TTTGAAGGGATAGATGTTGGAGGACCAAGTGGAGTACCAACACAAGAAAAATATATTAGC   60
gb|UMN179    1   TTTGAAGGGATAGATGTTGGAGGACCAAGTGGAGTACCAACACAAGAAAAATATATTAGC   60
                 ************************************************************

gb|tuti     61   GCTAATTATAATCGTGTTGGTTATAATGAGGTGGTTTATCGTTGGAATATAGGTGAAATA  120
gb|UMN179   61   GCTAATTATAATCGTGTTGGTTATAATGAGGTGGTTTATCGTTGGAATATAGGTGAAATA  120
                 ************************************************************

gb|tuti    121   ATGGCGGGAGACTACTGTAAGAGACGCTCCGGTGTAACGAATCCAACGGATCGATTTTGG  180
gb|UMN179  121   ATGGCGGGAGACTACTGTAAGAGACGCTCCGGTGTAACGAATTCAACGAATCGATTTTGG  180
                 ************************************** *****.***********

gb|tuti    181   CTAGAAATTAAATATTTTGATACACAAGATAAAAATAGTCAGTATTTTGAAAGAAGATTA  240
gb|UMN179  181   CTAGAAATTAAATATTTTGATACACAAGATAAAAATAGTCAGTATTTTGAAAGAAGATTA  240
                 ************************************************************

gb|tuti    241   CTGGAAGTAAATAATCATCTAGTAACCATTGACGGTACAGGTCCATATCAATTTGCCATT  300
gb|UMN179  241   CTGGAAGTAAATAATCATCTAGTAACCATTGATGGTACAGGTCCATATCAATTTGCCATT  300
                 ******************************** *************************

gb|tuti    301   GTTGACAGAGGAGAATCACTGATTTTTGATTTAAGACTAAAGCTAAAAGATACTTTTCTC  360
gb|UMN179  301   GTTGACAGAGGAGGATCACTGATTTTTGATTTAAGACTAAAGCTAAAAGATACTTTTCTC  360
                 ************.*******************************************

gb|tuti    361   TATAATTCAACGCCAGCAGATATTTCTATTCCGGCAAACACGCCTTTGGCAATCATTACG  420
gb|UMN179  361   TATAATTCAACGCCAGCAGATATTTCTATTCCGGCAAACACGCCTTTGGCAATCATTACG  420
                 ************************************************************

gb|tuti    421   ATGTTATGTGTGGATAAAACGACATCAGGTAATACCGTAGCGGATTATCAAGCTAATGAT  480
gb|UMN179  421   ATGTTATGTGTGGATAAAACGACATCAGGTAATACCGTAGCGGATTATCAAGCTAATGAT  480
                 ************************************************************

gb|tuti    481   AATAGGGCTTATAAATATAACTCATTCTCTATGATAAAAGTTACCTCCGCGAATGAGGCA  540
gb|UMN179  481   AATAGGGCTTATAAATATAACTCATTCTCTATGATAAAAGTTACCTCCGCGAATGAGGCA  540
                 ************************************************************

gb|tuti    541   ACCTTTAGTTTTGCTCGAACTTGTACACTGGAAGATAATAACCAAACGGTTAAACTAAAA  600
gb|UMN179  541   ACCTTTAGTTTTGCTCGAACTTGTACACTGGAAGATAATAACCAAACGGTTAAACTAAAA  600
                 ************************************************************

gb|tuti    601   GATGTGACTGTAAAAGAACTTAATGAGAATGACGAAGTGCTAGGTAAAACTTTTGATATT  660
gb|UMN179  601   GATGTGACTGTAAAAGAACTTAATGAGAATGACGAAGTGCTAGGTAAAACTTTTGATATT  660
                 ************************************************************

gb|tuti    661   GGGCTTAATTGCCCCGGAGGAAGTGTAAAAAATGCTTATATTCTTTTTACTGATGCCAAT  720
gb|UMN179  661   GGGCTTAATTGCCCCGGAGGAAGTGTAAAAAATGCTTATATTCTCTTTACTGATGCTCTT  720
                 ****************************************** ********** .:*

gb|tuti    721   TCTCCATCAAATACAGGCACGCTAC                                    745
gb|UMN179  721   TCTCCATCAAATACAGGCACGCTAC                                    745
                 ************************
```

Figura 22. Alineamiento de secuencias de DNA de genes que codifican para proteína adhesina del operón *flf3*.

Alineamiento entre secuencia de gen que codifica para la proteína adhesina del operón *flf3* de *G. anatis* UMN179 y secuencia clonada de *G. anatis* ESV34 (construcción Samanta). Las posiciones idénticas están resaltadas en gris.

En la Figura 23 se muestra el alineamiento de la secuencia nucleotídica clonada en la construcción Angeline, el inserto clonado fue de 1137 pb, y provino del gen que codifica para la proteína adhesina del operón *flf* de *A. paragallinarum* cepa 6, el alineamiento con el gen de referencia de la cepa Avpg 2015 dio 98 % de identidad.

```
gb|Avpg2015      1  ATGAAAGGGAAAATAATTCATTGGTTTATATCGATGATGGCTTTGGTGATTTTGTTTAAA    60
gb|angeline      1  ATGAAAGGGAAAATAATTCATTGGTTTATATCGATGATGGCTTTGGTGATTTTGTTTAAA    60
                    ************************************************************

gb|Avpg2015     61  CCATCATTTTCTTTTGCCTATATATTTGAAGGGAAAGATGTTGGAGGATCGACAGTACCA   120
gb|angeline     61  CCATCATTTTCTTTTGCCTATATATTTGAAGGGAAAGATGTTGGAGGATCGACAGTACCA   120
                    ************************************************************

gb|Avpg2015    121  CCAAAGCAAGAACGTTATTTTAACGTTAATTATCATCGTGTTGGTTATAATGAGGTGGTT   180
gb|angeline    121  CCAAAGCAAGAACGTTATTTTAACGTTAATTATCATCGTGTTGGTTATAATGAGGTGGTT   180
                    ************************************************************

gb|Avpg2015    181  TATCGTTGGAATATAGGTGAAATAATGGCGGGAAACTACTGTAGGCAACGTGCTGGTGTA   240
gb|angeline    181  TATCGTTGGAATATAGGTGAAATAATGGCGGGAAACTACTGTAGGCAACGTGCTGGTGTA   240
                    ************************************************************

gb|Avpg2015    241  ATGAATCCAGTGGATAAATATTGGTTAGAAATTAAATATTTTGATACACAAGAAAAAAGT   300
gb|angeline    241  ATGAATCCAGTGGATAAATATTGGTTAGAAATTAAATATTTTGATACACAAGAAAAAAGT   300
                    ************************************************************

gb|Avpg2015    301  AGTCAGTATTTTGAAAGAAGGTTACTGGAAGTAAATAATCGTCTAGTAACAATTAATGAT   360
gb|angeline    301  AGTCAGTATTTTGAAAGAAGGTTACTGGAAGTAAATAATCGTCTAGTAACAATTAATGAT   360
                    ************************************************************

gb|Avpg2015    361  GCAAGCTCATATCAATTTGCTATTGTTGAGCGTGGACAATCATTGACATTTGATTTAAGA   420
gb|angeline    361  GCAAGCTCATATCAATTTGCTATTGTTGAGCGTGGACAATCATTGACATTTGATTTAAGA   420
                    ************************************************************

gb|Avpg2015    421  CTAAAGCTAAAAGATACTTTTCTCTATAATACAACGCCAGCGGATATTTCTATTCCGGCA   480
gb|angeline    421  CTAAAGCTAAAAGATACTTTTCTCTATAATACAACGCCAGCGGATAGTTCTATTCCGGCA   480
                    ********************************************* *************

gb|Avpg2015    481  AACACGCCTTTGGCAATCATTACGATGTTATGTGTGGATAAAACGACATCAGGTAATACC   540
gb|angeline    481  AACACGCCTTTGGCAATCATTACGA----------------------------------   505
                    *************************

gb|Avpg2015    541  GTAGAGGATTATCAAAAAACTGATAATAGGGAGTATAAATATAATTCATTCTCTATAATA   600
gb|angeline    506  ---GAGGATTATCAAAAAACTGATAATAGGGAGTATAAATATAATTCATTCTCTATAATA   562
                       ***********************************************************

gb|Avpg2015    601  AAAATTACCTCCGCGGATTCTGCAACCTTTAGTTTTGCCCGAACTTGCACACTGGAAAAT   660
gb|angeline    563  AAAATTACCTCCGCGGATTCTGCAACCTTTAGTTTTGCCCGAACTTGCACACTGGAAAAT   622
                    ************************************************************

gb|Avpg2015    661  AATAACCAAACGATTAAACTAAAGGATGTGACTGTAAAAGAACTTAATGAGAATGACGAA   720
gb|angeline    623  AATAACCAAACGATTAAACTAAAGGATGTGACTGTAAAAGAACTTAATGAGAATGACGAA   682
                    ************************************************************

gb|Avpg2015    721  GTGCTAGGTAATACTTTTGATATTGGGCTTAATTGCCCCGGAGGAAGTGTAAAAAATGCT   780
gb|angeline    683  GTGCTAGGTAATACTTTTGATATTGGGCTTAATTGCCCCGGAGGAAGTGTAAAAAATGCT   742
                    ************************************************************

gb|Avpg2015    781  TATATTCTCTTTACTGATGCACTTTCTCCATCAAATACAGGCACGCTACCGCGTGTTGGG   840
gb|angeline    743  TATATTCTCTTTACTGATGCACTTTCTCCATCAAATACAGGCACGCTACCGCGTGTTGGG   802
                    ************************************************************

gb|Avpg2015    841  GCGATTGGACGATTACATTCATCTGAAACTATGGCTACACAGACTGTATTAAGCGTAAAA   900
gb|angeline    803  GCGATTGGACGATTACATTCATCTGAAACTATGGCTACACAGACTGTATTAAGCGTAAAA   862
                    ************************************************************

gb|Avpg2015    901  GATTCAGTGACTAAACAGTATTTAACTTATAGACAGCCTTTAATAGCAAACGGTGATTTT   960
gb|angeline    863  GATTCAGTGACTAAACAGTATTTAACTTATAGACAGCCTTTAATAGCAAACGGTGATTTT   922
                    ************************************************************

gb|Avpg2015    961  TTTAATAAGCCAACAGGAAATCAAGCGGCAGGTTTTTACTCATTTAATCAGGAGACATTA  1020
gb|angeline    923  TTTAATAAGCCAACAGGAAATCAAGCGGCAGGTTTTTACTCATTTAATCAGGAGACATTA   982
                    ************************************************************

gb|Avpg2015   1021  ACTATTAACCGAAAGCCTAAGCATCGTTATGAGGTTTATTATCGTAAGTTACCAAATAGC  1080
gb|angeline    983  ACTATTAACCGAAAGCCTAAGCATCGTTATGAGGTTTATTATCGTAAGTTACCAAATAGC  1042
                    ************************************************************

gb|Avpg2015   1081  ACGCCGAAAGCTGGAACAATATCAGCCAAGATGACTTACAATATTTATTATGATTGA     1137
gb|angeline   1043  ACGCCGAAAGCTGGAACAATATCAGCCAAGATGACTTACAATATTTATTATGATT--     1097
                    ***************************************************
```

Figura 23. Alineamiento de secuencias de DNA de genes que codifican para proteína adhesina del operón *flf*.

Alineamiento entre secuencia de gen que codifica para la proteína adhesina del operón *flf* de *A. paragallinarum* 2015 y secuencia clonada de *A. paragallinarum* 6 (construcción Angeline). Las posiciones idénticas están resaltadas en gris.

En la Figura 24 se muestra el alineamiento de la secuencia nucleotídica clonada en la construcción Nathalie, el inserto clonado fue de 1137 pb, que correspondía al gen que codifica para la proteína adhesina del operón *flf* de *A. paragallinarum* cepa 5, el alineamiento con el gen de referencia de la cepa Avpg 2015 mostró 98 % de identidad.

```
gb|nathalie        1  GATTAAAGGAAAATAAATCCAATGGTTAATATCCGATAGATGGCCTTTGGTGATTTTTG    60
gb|Avpg2015        1  -ATGAAAGGCAAA-ATAATTCATTGGTTTATATCG--ATGATGG-CTTTGGTGATTTT-G    54
                       ** *****.*** ::*** **:*****:*****   ::***** ************ *

gb|nathalie       61  TTTAAACAATTCATTTTCTTTTGCCCTAAATATTGGAAAGGGAAAGATGTTGGAGGATCG   120
gb|Avpg2015       55  TTTAAAC-CATCATTTTCTTTTGCCTATATATTT--GAAGGGAAAGATGTTGGAGGATCG   111
                      ******* .:************** ::*:::**  .**********************

gb|nathalie      121  ACAGTACCACCAAAGCAAGAACGTTATTTAAACGTTAATTATCATCGTGTTGGTTATAAT   180
gb|Avpg2015      112  ACAGTACCACCAAAGCAAGAACGTTATTTAACGTTAATTATCATCGTGTTGGTTATAAT   171
                      ****************************:*****************************

gb|nathalie      181  GAGGTGGTTAATCGTTGGAATATAGGTGAAATAATGGCGGGAAACTACTGTAGGCAACGT   240
gb|Avpg2015      172  GAGGTGGTTTATCGTTGGAATATAGGTGAAATAATGGCGGGAAACTACTGTAGGCAACGT   231
                      *********:******************************************************

gb|nathalie      241  GCTGGTGTAATGAATCCAGTGGATAAATATTGGTTAGAAATTAAATATTTTGATACACAA   300
gb|Avpg2015      232  GCTGGTGTAATGAATCCAGTGGATAAATATTGGTTAGAAATTAAATATTTTGATACACAA   291
                      ************************************************************

gb|nathalie      301  GAAAAAAGTAGTCAGTATTTTGAAAGAAGGTTACTGGAAGTAAATAATCGTCTAGTAACA   360
gb|Avpg2015      292  GAAAAAAGTAGTCAGTATTTTGAAAGAAGGTTACTGGAAGTAAATAATCGTCTAGTAACA   351
                      ************************************************************

gb|nathalie      361  ATTAATGATGCAAGCTCATATCAATTTGCTATTGTTGAGCGTGGACAATCATTGACATTT   420
gb|Avpg2015      352  ATTAATGATGCAAGCTCATATCAATTTGCTATTGTTGAGCGTGGACAATCATTGACATTT   411
                      ************************************************************

gb|nathalie      421  GATTTAAGACTAAAGCTAAAAGATACTTTTCTCTATAATACAACGCCAGCGGATATTTCT   480
gb|Avpg2015      412  GATTTAAGACTAAAGCTAAAAGATACTTTTCTCTATAATACAACGCCAGCGGATATTTCT   471
                      ************************************************************

gb|nathalie      481  ATTCCGGCAAACACGCCTTTGGCAATCATTACGATGTTATGTGTGGATAAAACGACATCA   540
gb|Avpg2015      472  ATTCCGGCAAACACGCCTTTGGCAATCATTACGATGTTATGTGTGGATAAAACGACATCA   531
                      ************************************************************

gb|nathalie      541  GGTAATACCGTAGAGGATTATCAAAAAACTGATAATAGGGAGTATAAATATAATTCATTC   600
gb|Avpg2015      532  GGTAATACCGTAGAGGATTATCAAAAAACTGATAATAGGGAGTATAAATATAATTCATTC   591
                      ************************************************************

gb|nathalie      601  TCTATAATAAAAATTACCTCCGCGGATTCTGCAACCTTTAGTTTTGCCCGAACTTGCACA   660
gb|Avpg2015      592  TCTATAATAAAAATTACCTCCGCGGATTCTGCAACCTTTAGTTTTGCCCGAACTTGCACA   651
                      ************************************************************

gb|nathalie      661  CTGGAAAATAATAACCAAACGATTAAACTAAAGGATGTGACTGTAAAAGAACTTAATGAG   720
gb|Avpg2015      652  CTGGAAAATAATAACCAAACGATTAAACTAAAGGATGTGACTGTAAAAGAACTTAATGAG   711
                      ************************************************************

gb|nathalie      721  AATGACGAAGTGCTAGGTAATACTTTTGATATTGGGCTTAATTGCCCCGGAGGAAGTGTA   780
gb|Avpg2015      712  AATGACGAAGTGCTAGGTAATACTTTTGATATTGGGCTTAATTGCCCCGGAGGAAGTGTA   771
                      ************************************************************

gb|nathalie      781  AAAAATGCTTATATTCTCTTTACTGATGCACTTTCTCCATCAAATACAGGCACGCTACCG   840
gb|Avpg2015      772  AAAAATGCTTATATTCTCTTTACTGATGCACTTTCTCCATCAAATACAGGCACGCTACCG   831
                      ************************************************************

gb|nathalie      841  CGTGTTGGGGCGATTGGACGATTACATTCATCTGAAACTATGGCTACACAGACTGTATTA   900
gb|Avpg2015      832  CGTGTTGGGGCGATTGGACGATTACATTCATCTGAAACTATGGCTACACAGACTGTATTA   891
                      ************************************************************

gb|nathalie      901  AGCGTAAAAGATTCAGTGACTAAACAGTATTTAACTTATAGACAGCCTTTAATAGCAAAC   960
gb|Avpg2015      892  AGCGTAAAAGATTCAGTGACTAAACAGTATTTAACTTATAGACAGCCTTTAATAGCAAAC   951
                      ************************************************************

gb|nathalie      961  GGTGATTTTTTTAATAAGCCAACAGGAAATCAAGCGGCAGGTTTTTACTCATTTAATCAG  1020
gb|Avpg2015      952  GGTGATTTTTTTAATAAGCCAACAGGAAATCAAGCGGCAGGTTTTTACTCATTTAATCAG  1011
                      ************************************************************

gb|nathalie     1021  GAGACATTAACTATTAACCGAAAGCCTAAGCATCGTTATGAGGTTTATTATCGTAAGTTA  1080
gb|Avpg2015     1012  GAGACATTAACTATTAACCGAAAGCCTAAGCATCGTTATGAGGTTTATTATCGTAAGTTA  1071
                      ************************************************************

gb|nathalie     1081  CCAAATAGCACGCCGAAAGCTGGAACAATATCCGCCAAGATGACTTACAATATTTATTAT  1140
gb|Avpg2015     1072  CCAAATAGCACGCCGAAAGCTGGAACAATATCAGCCAAGATGACTTACAATATTTATTAT  1131
                      ********************************.***************************

gb|nathalie     1141  GATTGA                                                        1146
gb|Avpg2015     1132  GATTGA                                                        1137
                      ******
```

Figura 24. Alineamiento de secuencias de DNA de genes que codifican para proteína adhesina del operón *flf*.

Alineamiento entre secuencia de gen que codifica para la proteína adhesina del operón *flf* de *A. paragallinarum* 2015 y secuencia clonada de *A. paragallinarum* 5 (construcción Nathalie). Las posiciones idénticas están resaltadas en gris.

Mapas de Construcciones en el vector pBluescriptII KS (-)

Los mapas de las construcciones fueron realizados en el programa SnapGene[R] Viewer GSL Biotech LLC, Chicago, EU, utilizando la secuencia del plásmido de clonación pBluescriptII KS (-), así como las secuencias obtenidas de los resultados de secuenciación de dichas construcciones (Figura 25 -30).

Mapa de la construcción con el inserto clonado correspondiente a la proteína estructural

En la Figura 25 se muestra el mapa de la construcción Megan, el inserto clonado fue de 493 pb, y corresponde al gen que codifica para la proteína estructural del operón *flf3* de *G. anatis* cepa ESV34.

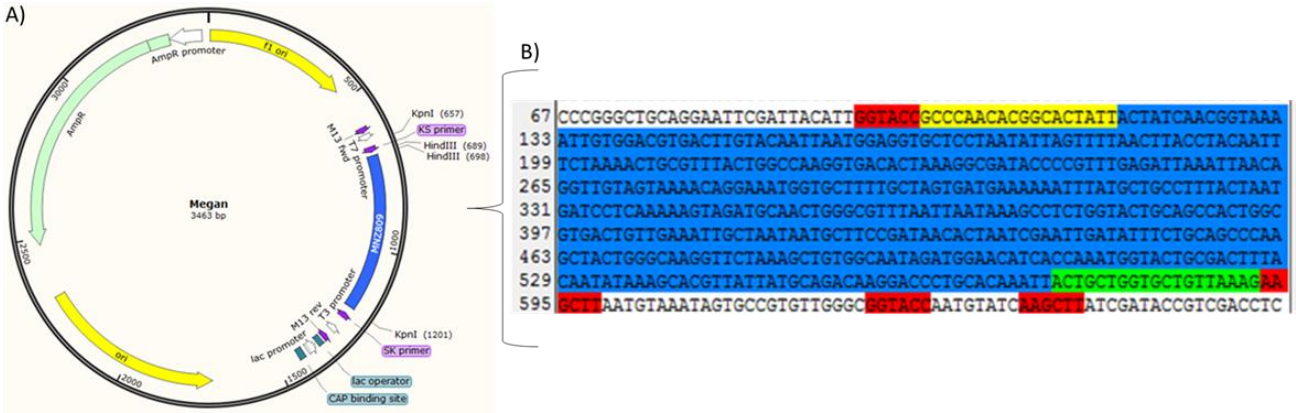


Figura 25. A) Mapa de la construcción Megan en pBluescriptII KS (-). B) Secuencia de 493 pb que proviene del gen que codifica para la proteína estructural del operón *flf3* de la cepa ESV 34 de *G. anatis.*

En la Figura 26 se muestra el mapa de la construcción Zuky, el inserto clonado fue de 399 pb, y corresponde al gen que codifica para la proteína estructural del operón *flf1* de *G. anatis* cepa ESV34.

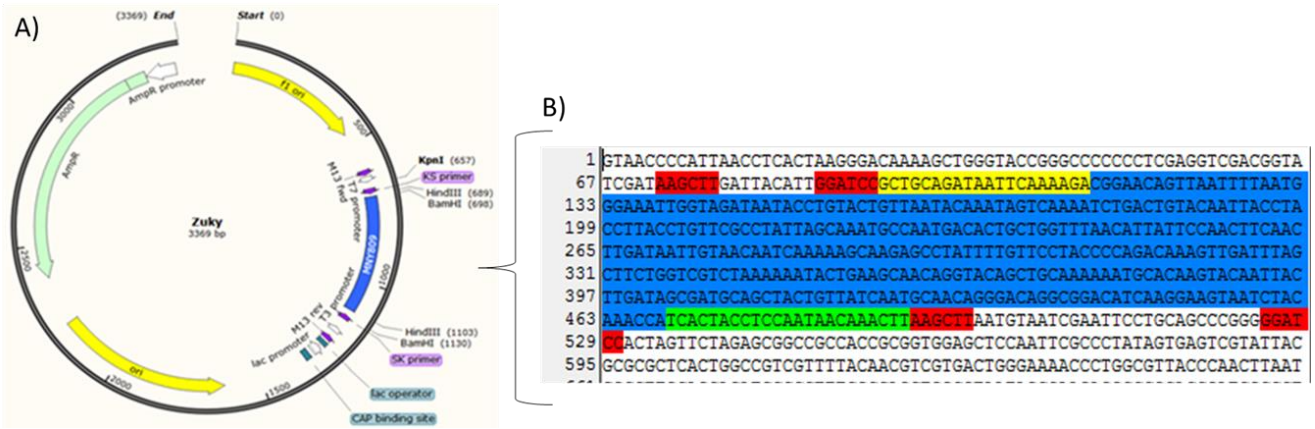


Figura 26. A) Mapa de la construcción Zuky en pBluescriptII KS (-). B) Secuencia de 399 pb que proviene del gen que codifica para la proteína estructural del operón *flf1* de la cepa ESV 34 de *G. anatis.*

Mapa de la construcción con el inserto clonado correspondiente a la proteína adhesina

En la Figura 27 se muestra el mapa de la construcción Samanta, el inserto clonado fue de 745 pb, y corresponde al gen que codifica para la proteína adhesina del operón *flf3* de *G. anatis* cepa F149^{T}.

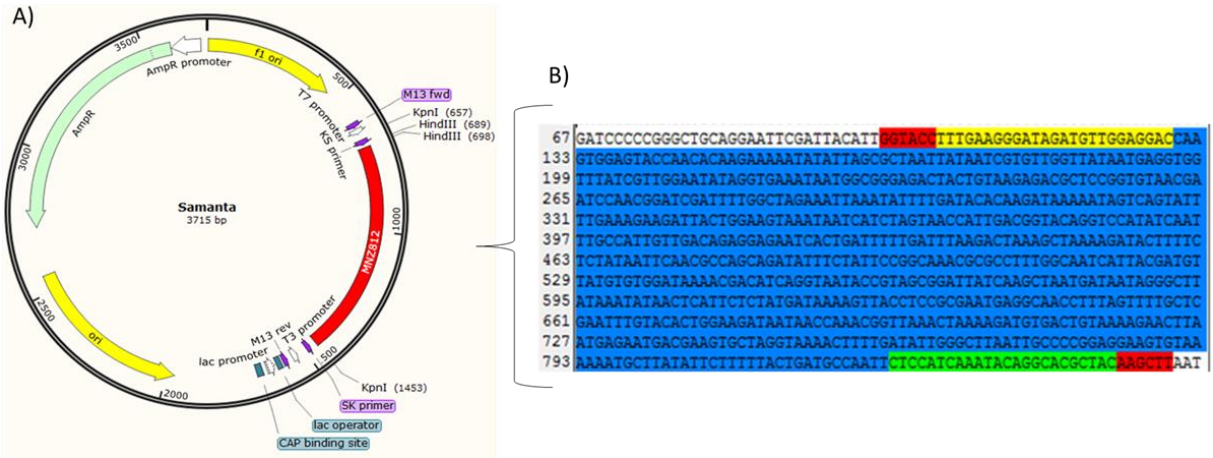


Figura 27. Mapa de la construcción Samanta en pBluescriptII KS (-). B) Secuencia de 745 pb proveniente del gen que codifica para la proteína adhesina del operón *flf3* de la cepa F149^{T} de *G. anatis.*

En la Figura 28 se muestra el mapa de la construcción Tuti, el inserto clonado fue de 745 pb, y corresponde al gen que codifica para la proteína adhesina del operón *flf3* de *G. anatis* cepa ESV34.

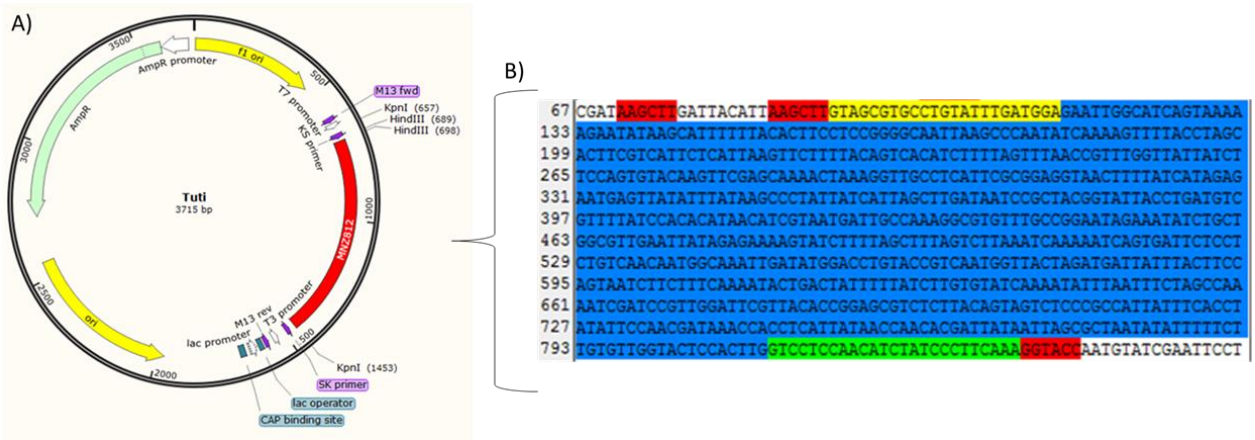


Figura 28. Mapa de la construcción Tuti en pBluescriptII KS (-). B) Secuencia de 745 pb clonada a partir del gen que codifica para la proteína adhesina del operón flf3 de la cepa ESV34 de *G. anatis.*

En la Figura 29 se muestra el mapa de la construcción Angeline, el inserto clonado fue de 1137 pb, y corresponde al gen que codifica para la proteína estructural del operón *flf* de *A. paragallinarum* cepa 6.

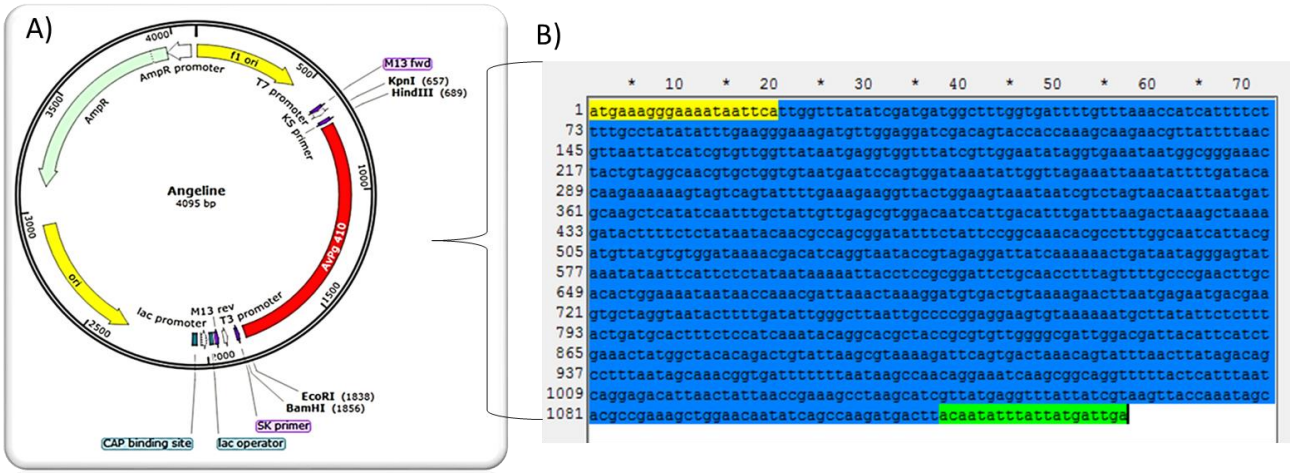


Figura 29. Mapa de la construcción Angeline en pBluescriptII KS (-). B) Secuencia de 1137 pb que proviene del gen que codifica para la proteína adhesina del operón *flf* de la cepa 6 de *A. paragallinarum*.

En la Figura 30 se muestra el mapa de la construcción Nathalie, el inserto clonado fue de 1137 pb, y corresponde al gen que codifica para la proteína estructural del operón *flf* de *A. paragallinarum* cepa 5.

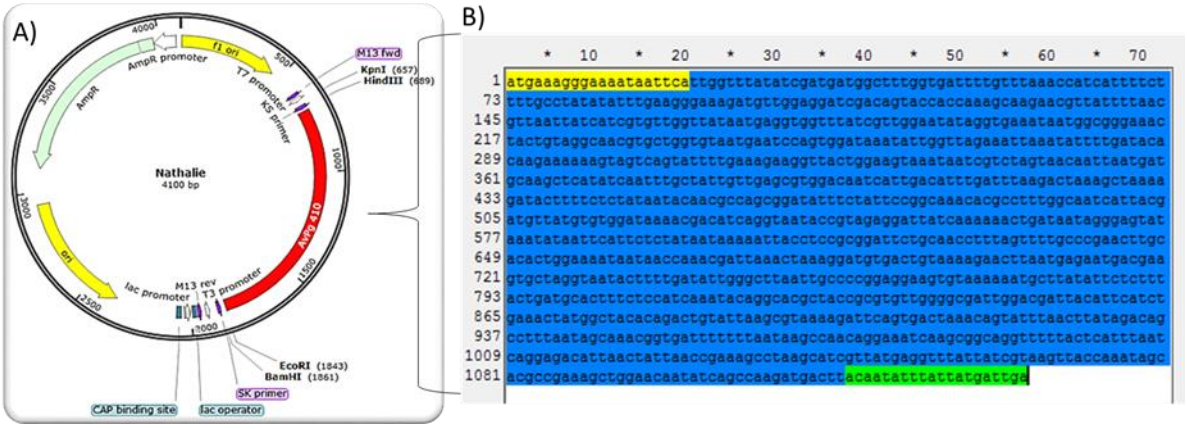


Figura 30. Mapa de la construcción Nathalie en pBluescriptII KS (-). B) Secuencia de 1137pb se obtuvo del gen que codifica para la proteína adhesina del operón *flf* de la cepa 5 de *A. paragallinarum*.

Análisis de expresión de proteínas recombinantes estructural y adhesina de fimbrias F17 de *G. anatis* en *E. coli*

Se obtuvieron 2 construcciones en el vector de expresión pQE30, una (Megan2) que codificaba parte de la proteína estructural y otra (Samanta2) que codifica parte de la adhesina, ambas originarias de *G. anatis* (tabla 10).

Tabla 10. Construcciones para la expresión de las proteínas Estructural y Adhesina de *G. anatis*.

Nombre de la construcción	Fragmento del Gen	Tamaño del gen en pb	Tamaño de la Construcción en pb	Cepa	Operón	Tamaño esperado en kDa de la proteína inducida
Megan2	proteína estructural	493 pb	3936 pb	*G. anatis* ESV34	*flf3*	18.2 kDa
Samanta2	proteína adhesina	745 pb	4188 pb	*G. anatis* F149^{T}	*flf3*	27.6 kDa

Mapas de construcciones en pQE-30

Los mapas de las construcciones fueron realizados en el programa SnapGene^{R} Viewer GSL Biotech LLC, Chicago, EU. utilizando las secuencias del plásmido de expresión pQE-30 y las obtenidas de los resultados de secuenciación de dichas construcciones.

En la Figura 31 se muestra el mapa de la construcción Megan2, el inserto subclonado fue de 493pb, proviene del gen que codifica para la proteína estructural del operón flf3 de *G. anatis* cepa ESV34, el análisis bioinformático de la secuencia clonada da certeza del tipo de transformante para este gen, también se muestran los elementos como el codón de inicio ATG, secuencia de histidinas 6XHis, oligonucleótidos, gen de interés y el codón de paro.

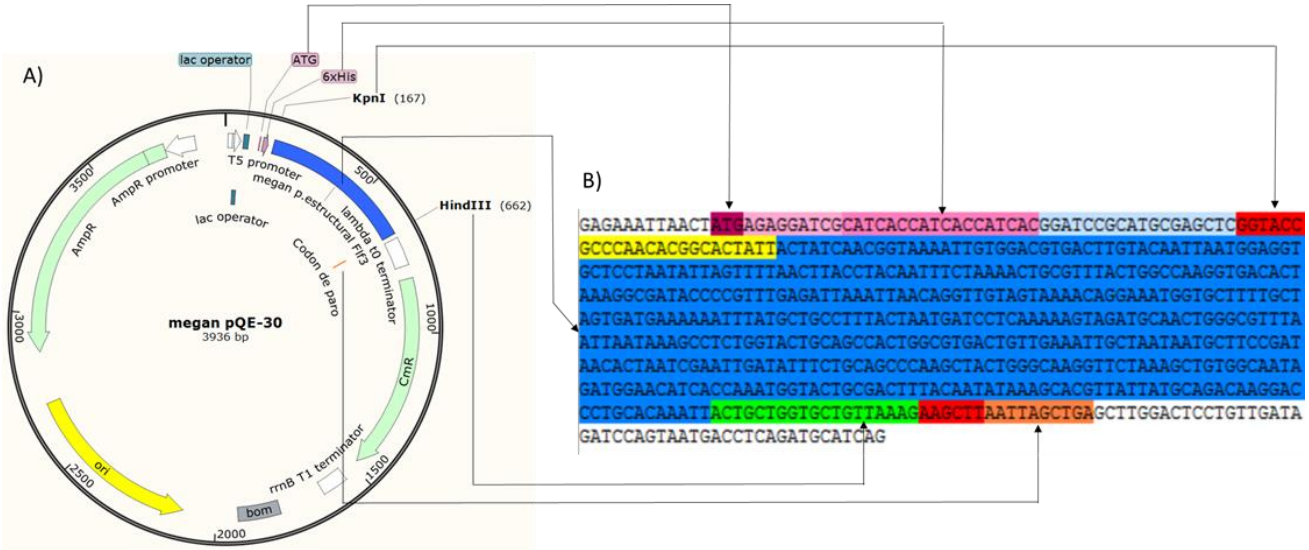


Figura 31. A) Mapa de la construcción Megan en el plásmido pQE-30.

B) Secuencia de 493 pb que contiene parte del gen que codifica para la proteína estructural del operón *flf3* de la cepa ESV34 de *G. anatis*, así como elementos: ATG codón de inicio, oligonucleótidos, secuencia del gen y codón de paro.

La construcción Samanta2 (Figura 32) en el vector de expresión pQE-30 contiene al inserto clonado de 745 pb, proveniente del gen que codifica para la proteína adhesina del operón *flf3* de *G. anatis* cepa F149^{T}.

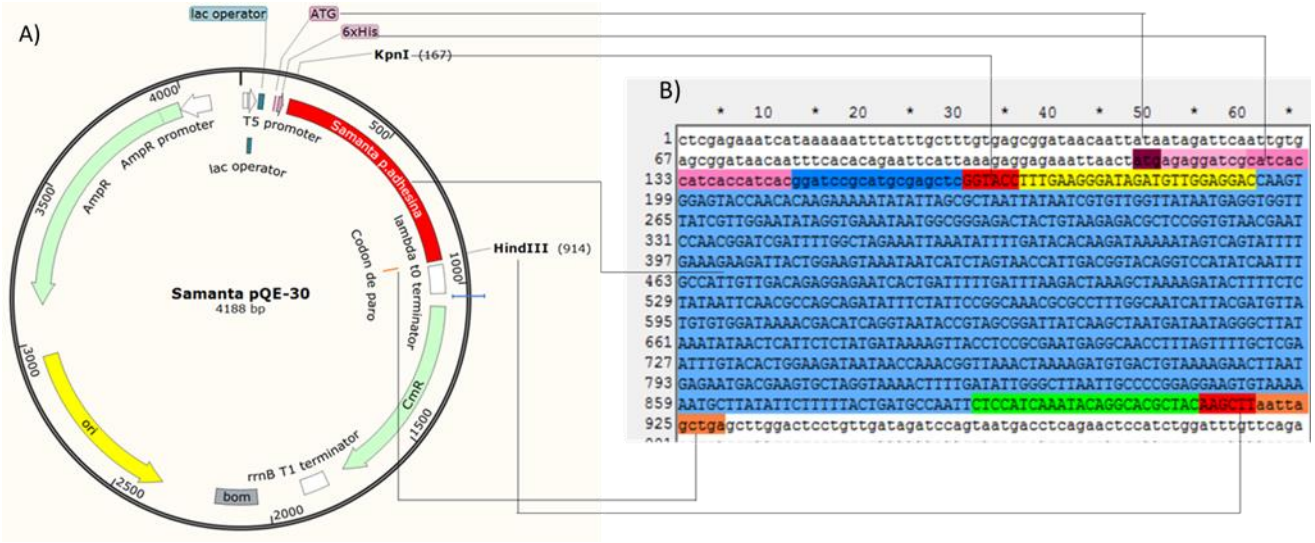


Figura 32. A) Mapa de la construcción Samanta2 en el plásmido pQE-30.

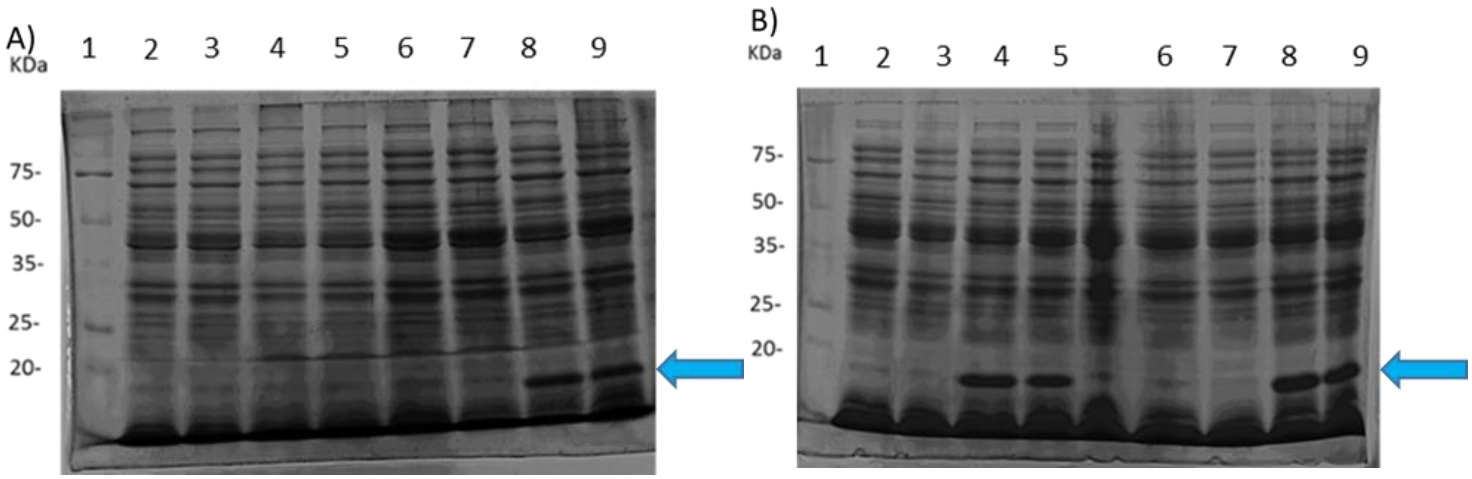
B) Secuencia de 745 pb contiene parte del gen que codifica para la proteína estructural del operón *flf3* de la cepa F149^{T} de *G. anatis*, así como elementos: ATG codón de inicio, oligonucleótidos, secuencia del gen y codón de paro.

Inducción de la expresión de genes que codifican para proteína estructural y adhesina.

Cinética de inducción de la expresión del gen que codifica para proteína estructural de 18.2 kDa

Las clonas recombinantes de *E. coli* M15 transformadas con las construcciones de Megan2 y Samanta2, fueron inducidas con IPTG para sobreexpresar las proteínas recombinantes, el tamaño de las proteínas esperadas fue de 18.2 kDa y 27.5 kDa para la proteína estructural y proteína adhesina respectivamente.

A partir de las células transformadas con las construcciones Megan2 (gen que codifica para la proteína estructural) y Samanta2 (gen que codifica para la proteína adhesina), se prepararon cultivos y a partir de una D.O $_{600}$ =0.6 se evaluaron mediante inducciones con IPTG (1 mM), las inducciones se monitorearon durante 5 horas continuas y a las 24 horas. Se realizó la colecta de células, la ruptura celular y una separación electroforética de proteínas en geles SDS-PAGE al 10 % comparando cultivos inducidos con IPTG o no inducidos (Figura 25 y 26). Se tomaron muestras cada hora durante 5 horas continuas, la toma de muestra final fue a las 24 horas. Se puede observar que la sobreexpresión de la proteína estructural de 18.2 kDa se inicia desde la primera hora (Figura 25 A, carril 8 y 9), y conforme aumenta el tiempo la intensidad de la banda va incrementando. En el tiempo cero antes de comenzar la inducción con IPTG (1mM), se puede apreciar una banda que tienen el tamaño de la proteína esperada inducida Figura 26 A, carril 2 a 7. Esta banda se mantiene a lo largo del tiempo de inducción, por lo que se encuentra una proteína semejante en el fondo genético de la cepa de *E coli* M15, o quizás exista escape de la represión de su expresión. Finalmente podemos observar que la inducción de la proteína estructural a las 24 horas es clara en el fondo genético de la cepa de *E coli* M15.



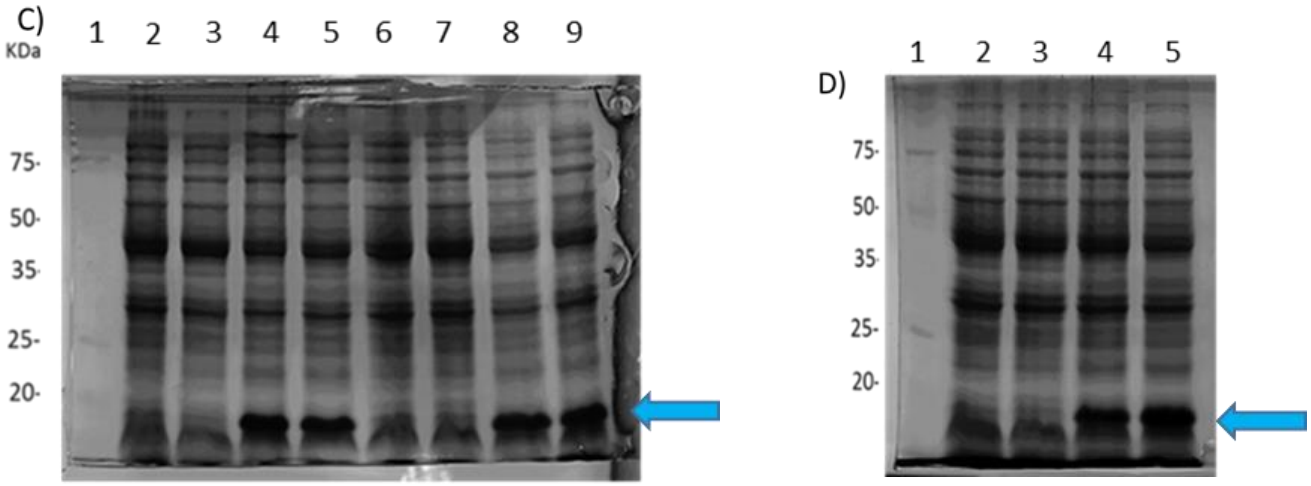


Figura 33. Cinética de inducción de la expresión del gen que codifica para proteína estructural del operón *flf3* en el fondo genético de cepa de *E. coli* M15.

La flecha azul indica la zona de la inducción de la proteína esperada de 18.2 kDa

Perfil de proteínas obtenidas por SDS-PAGE al 10 %.
A) carril 1: M.P.M; 2: *E. coli* M15 sin plásmido;3: *E. coli* M15 con pQE-30; 4: clona 33; 5: clona 25, a 0 h de inducción; 6: *E. coli* M15 sin plásmido; 7: *E. coli* M15 con pQE-30; 8: clona33; 9: clona 25, a 1 hora de inducción.
B) carril 1: M.P.M; 2: *E. coli* M15 sin plásmido;3: *E. coli* M15 con pQE-30; 4: clona 33; 5: clona 25, a 2 h de inducción; 6: *E. coli* M15 sin plásmido; 7: *E. coli* M15 con pQE-30; 8: clona33; 9: clona 25, a 3 hora de inducción.
C) carril 1: M.P.M; 2: *E. coli* M15 sin plásmido;3: *E. coli* M15 con pQE-30; 4: clona 33; 5: clona 25, a 4 h de inducción; 6: *E. coli* M15 sin plásmido; 7: *E. coli* M15 con pQE-30; 8: clona33; 9: clona 25, a 5 hora de inducción.
D) carril 1: M.P.M; 2: *E. coli* M15 sin plásmido;3: *E. coli* M15 con pQE-30; 4: clona 33; 5: clona 25, a 24 h de inducción;

Cinética de inducción de la expresión del gen que codifica para proteína adhesina de 27.6 kDa

La inducción de la proteína adhesina de 27.6 kDa inició claramente desde la primera hora de contacto de bacterias con IPTG (Figura 26 A, carril 8 y 9) y conforme avanzó el tiempo en las siguientes 5 horas, la intensidad de la banda se incrementó gradualmente. También se observó una banda arriba de la banda de proteína recombinante inducida después de la inducción, sin embargo, es evidente el aumento de intensidad en la banda de la proteína recombinante, por lo que puede diferenciarse de la banda de la proteína nativa presente en el fondo genético de la cepa de *E. coli* M15. El seguimiento de la inducción hasta las 24 hrs mostró que la proteína se expresa establemente, aunque, se distingue mejor en tiempos cortos.

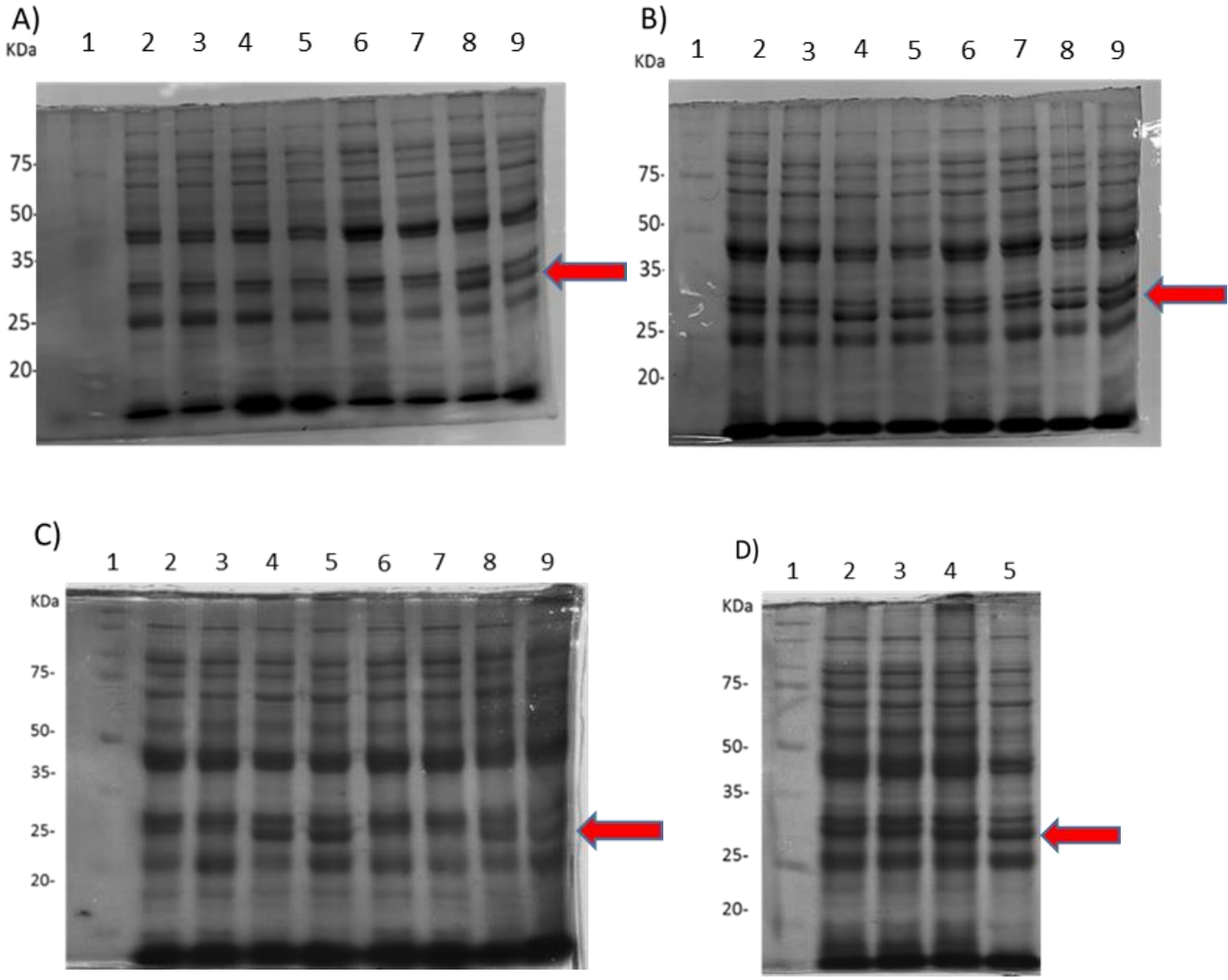


Figura 34. Cinética de inducción de la expresión del gen que codifica para proteína adhesina del operon *flf3* en el fondo genético de la cepa de *E. coli* M15.

La flecha roja indica la zona de la inducción de la proteína esperada de 27.5 kDa

Perfil de proteínas obtenidas por SDS-PAGE al 10 %.
A) carril 1: M.P.M; 2: *E. coli* M15 sin plásmido;3: *E. coli* M15 con pQE-30; 4: clona 18; 5: clona 19, a 0 h de inducción; 6: *E. coli* M15 sin plásmido; 7: *E. coli* M15 con pQE-30; 8: clona 18; 9: clona 19, a 1 hora de inducción.
B) carril 1: M.P.M; 2: *E. coli* M15 sin plásmido;3: *E. coli* M15 con pQE-30; 4: clona 18; 5: clona 19, a 2 h de inducción; 6: *E. coli* M15 sin plásmido; 7: *E. coli* M15 con pQE-30; 8: clona 18; 9: clona 19, a 3 hora de inducción.
C) carril 1: M.P.M; 2: *E. coli* M15 sin plásmido;3: *E. coli* M15 con pQE-30; 4: clona 18; 5: clona 19, a 4 h de inducción; 6: *E. coli* M15 sin plásmido; 7: *E. coli* M15 con pQE-30; 8: clona 18; 9: clona 19, a 5 hora de inducción.
C) carril 1: M.P.M; 2: *E. coli* M15 sin plásmido;3: *E. coli* M15 con pQE-30; 4: clona 18; 5: clona 19, a 24 h de inducción.

Purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad.

Con la certeza de que ocurría la inducción de la expresión de los genes que codifican para las proteínas recombinantes estructural y adhesina, a partir de las construcciones respectivas en las transformantes de *E. coli* M15, se estableció el tiempo de inducción de 3 horas, ya que a esa hora se observó una cantidad suficiente de proteína y no presentaba mucha variación respecto a la que se obtenía varias horas después de la inducción. Y se continuó con la purificación de las proteínas recombinantes.

La purificación de proteínas se hizo por afinidad a níquel y elución por gradiente de concentración de imidazol en condiciones desnaturalizantes con urea 8 M en todos los buffers. En la figura 35 y 28 se muestra la separación de las proteínas en gel SDS-PAGE al 10 % obtenidas del proceso de purificación de la proteína recombinante estructural de *G. anatis*, cepa ESV34, la fracción enriquecida con proteína de 18.2 kDa se observa en los carriles del 7 al 9. En la figura 36 se observa el resultado del proceso de purificación de la adhesina de *G. anatis*, cepa F149^{T}, la fracción enriquecida con proteína de 27.6 kDa se observa en los carriles del 7 al 9.

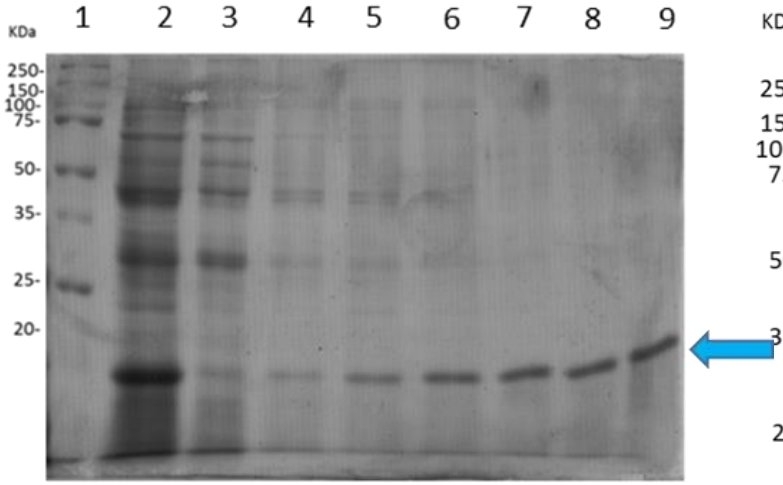


Figura 35. Purificación en condiciones desnaturalizantes de la proteína estructural recombinante de la fimbria F17 de *G. anatis* ESV34, con peso molecular de 18.2 kDa.

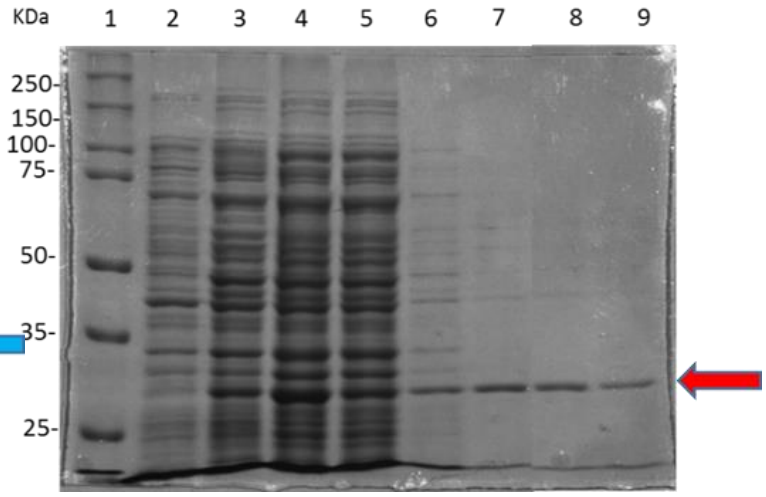


Figura 36. Purificación en condiciones desnaturalizantes de la proteína adhesina recombinante de la fimbria F17 de *G. anatis* F149^{T}, con peso molecular de 27.6 kDa.

Geles de poliacrilamida donde se observa la separación electroforética de las proteínas contenidas en las muestras obtenidas de los diferentes pasos de la purificación por afinidad a columnas cargadas con níquel de las proteínas fimbriales-F17 recombinantes **A)** Alícuotas con proteína estructural; carril 1: M.P.M; 2: muestra de extracto de proteínas con buffer de unión desnaturalizante urea 8 M pH 8 retenido en columna; 3: sobrenadante que paso por la columna de afinidad, 4: Lavado desnaturalizante urea 8 M pH 6.3; 5-9: elusiones con urea 8 M pH 4.5

B) Alícuotas con proteína adhesina; carril 1: M.P.M; 2: proteínas totales de la colonia transformante sin inducir, 3: extracto de proteínas totales de la colonia transformante inducida; 4: muestra de extracto de proteínas con buffer de unión desnaturalizante urea 8 M pH 8 retenido en columna; 5: sobrenadante que paso por la columna de afinidad; 6: Lavado desnaturalizante urea 8 M pH 6.3; 7-9: elusiones con urea 8 M pH 4.5

Diálisis de proteínas recombinantes purificadas en condiciones desnaturalizantes.

Las proteínas recombinantes obtenidas por afinidad a columnas de níquel estaban disueltas en una solución de urea 8 M e imidazol 250 mM, por lo que para ser administradas a conejos e inducir la producción de anticuerpos, fue necesario dializarlas de manera independiente en PBS pH 7.5, y así evitar efectos secundarios a los animales por urea e imidazol. En la figura 37 se muestra la separación electroforética la de proteína recombinante del tipo 6His-estructural y 6His-adhesina, después de ser dializadas. Estas proteínas se utilizaron posteriormente para inmunizar conejos y obtener anticuerpos policlonales.

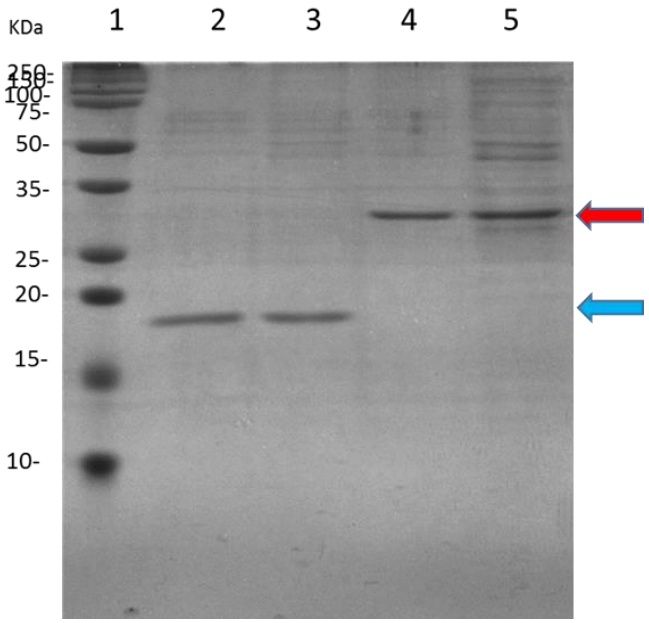


Figura 37. Electroforesis de proteínas recombinantes purificadas y dializadas con PBS pH=7.5.

Gel de poliacrilamida al 15%. Carril 1: M.P.M, 2 y 3: Proteína 6His-estructural; 4 y 5: Proteína 6His-adhesina.

Detección de las proteínas recombinantes por Western blot

Se hizo la separación electroforética de las proteínas recombinantes de la fimbria F17 de *G. anatis* purificadas y dializadas (Figura 38 A) y luego se transfirieron electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa. La detección de la proteína recombinante se hizo de manera indirecta, utilizando una dilución (1:500) del anticuerpo primario generado por inmunización de conejos, antiestructural o antiadhesina según fuera el caso (Elaborado por el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM) y un anticuerpo anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina (1:5000) de SIGMA -ALDRICH. (A4312. SIGMA-ALDRICH, Misuri, EU)

El resultado del inmuno-reconocimiento por western blot muestra una banda tenue a la altura de las proteínas esperadas, de 18.2 kDa para la proteína estructural recombinante y de 27.6 kDa para la proteína adhesina recombinante. El reconocimiento de los anticuerpos anti-proteína-estructural y anti-proteína-adhesina fue pobre posiblemente por un bajo título de anticuerpos (Figura 30 B).

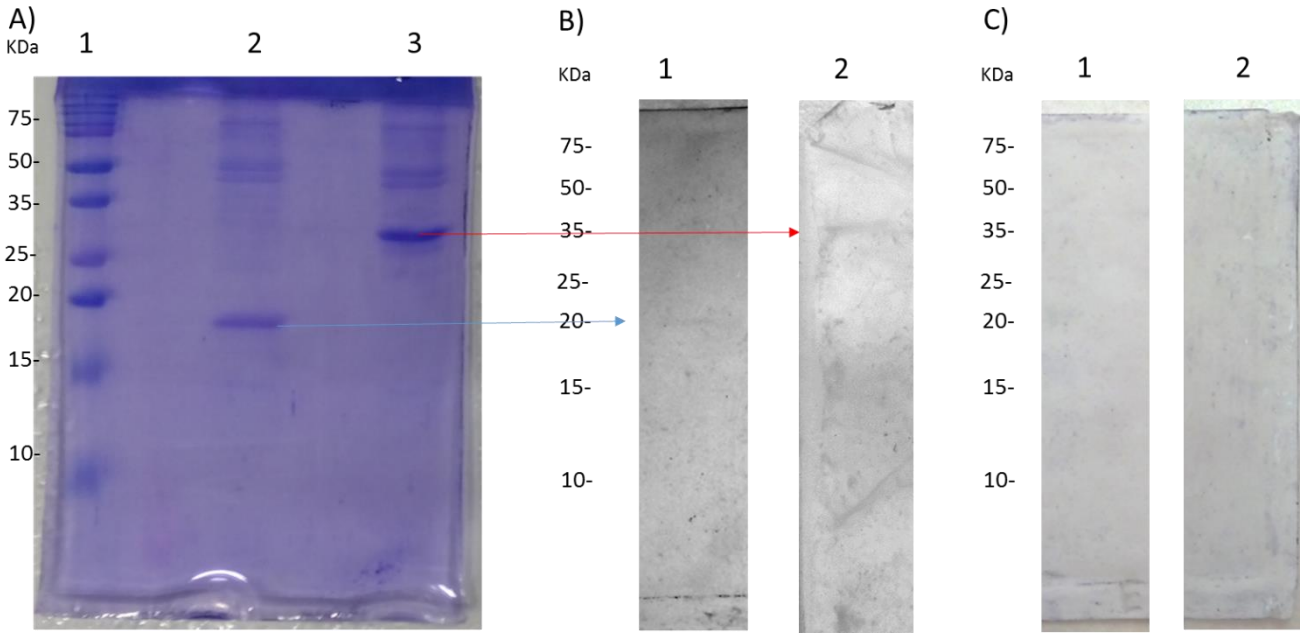


Figura 38. Western blot de proteínas de fimbrias F17 recombinantes sobreexpresadas, purificadas por cromatografía de afinidad y dializadas en PBS.

A). Gel de poliacrilamida al 15% para la separación de proteínas. Carril 1: M.P.M; 2: Proteína Estructural purificada y dializada de 18.2 kDa; 3: Proteína Adhesina purificada y dializada de 27.5 kDa. **B)** Western blot específico 1: inmuno reconocimiento de proteína estructural de 18.2 kDa usando suero anti-proteína estructural 1:500; 2: inmuno reconocimiento de proteína adhesina de 27.5 kDa usando suero anti-proteína adhesina 1:500. **C)** Western blot para visualizar reactividad cruzada 1: ausencia de inmuno reconocimiento de proteína estructural de 18.2 kDa usando suero anti-proteína adhesina 1:500; 2: ausencia de inmuno reconocimiento de proteína adhesina de 27.5 kDa usando suero anti-proteína estructural 1:500.

El resultado del western blot muestra que las proteínas recombinantes estructural y adhesina indujeron una respuesta inmune que produjo anticuerpos tras la inmunización experimental en conejos (Figura 38 B). Cuando se realizó la prueba de reactividad cruzada colocando como blanco la proteína estructural con los sueros anti-proteína-adhesina y viceversa, no se observó reconocimiento en la prueba western blot (Figura 38 C), por lo que el reconocimiento inmune fue específico para cada una de las proteínas probadas con el título de anticuerpos utilizados en esta investigación.

DISCUSIÓN

En general los factores de virulencia de las bacterias, les permiten la colonización, invasión y el crecimiento en diferentes tejidos del hospedero. Esta capacidad de adaptación de un medio a otro con relativa facilidad es motivo de interés científico, especialmente del relacionado con la posibilidad de reducir o evitar la producción de daño en el hospedero (Soutourina O, *et al*., 2001; Adler J, 1996). La expresión de genes que codifican factores de virulencia está estrictamente regulada y responde a estímulos ambientales tales como la temperatura, el pH y la disponibilidad de nutrientes, entre otros. Esta regulación permite la expresión oportuna de proteínas requeridas para el crecimiento y supervivencia de un microorganismo dentro de su hospedero, el cual está dispuesto a rechazar la invasión microbiana (Mekalanos J, 1992).

En las últimas dos décadas se han estudiado intensamente a dos bacterias patógenas de aves *G. anatis* y *A. paragallinarum.* Las infecciones por estas bacterias son importantes y a nivel industrial ocasionan pérdidas económicas significativas. Las bacterias mencionadas poseen alta diversidad antigénica y contienen varios factores de virulencia, entre los que se encuentran las fimbrias. En diversos microorganismos la expresión de fimbrias es muy importante, ya que son las estructuras que participan en el proceso de adherencia a los tejidos del hospedero. La adherencia de *G. anatis* y *A. paragallinarum.* se ha propuesto como un paso crítico en la colonización microbiana y en la invasión de los tejidos de la mucosa, por lo cual la prevención de la adherencia; es una estrategia de intervención atractiva para contrarrestar las infecciones que producen estas bacterias (Klemm P, *et al*., 2010).

En este trabajo se realizó la detección y clonación de los genes que codifican para las proteínas estructurales, Usher y adhesina de fimbrias F17, de cepas de campo de *G. anatis* y *A. paragallinarum.* Al realizar las amplificaciones por PCR utilizando el DNA genómico de las diferentes cepas aisladas de campo como DNA molde y los oligonucleótidos diseñados en base a las secuencias de los genes que codifican para fimbrias F17 de la cepa de *G. anatis* UMN179 (Acceso No. CP002667), los resultados muestran amplificación de secuencias de los genes de interés en algunas de las cepas generando un solo producto específico, como consecuencia de la combinación de DNA genómico y oligonucleótidos utilizados. Lo cual está relacionado con lo descrito por Johnson, *et al*., 2013, que identificaron varios grupos de genes (clúster) que participan en la biosíntesis de fimbrias en *G. anatis* UMN179 las cuales pertenecen al tipo F17. En el estudio hecho por Kudirkienė, *et al*., 2014, usando varias cepas de *G. anatis*, se realizó la agrupación de los genes en 5 diferentes grupos (operones): *flf, flf1, flf2, flf3, flf4;* de acuerdo a la secuencia

aminoacídica de las proteínas estructurales presente en cada grupo, designada como FlfA. Así mismo se determinó que las cepas de *G. anatis* cuentan con 1-3 grupos fimbriales de los 5 descritos. En el presente estudio los oligonucleótidos diseñados correspondieron a los genes fimbriales *flf, flf1 y flf3*, y resultaron ser específicos para la amplificación de estos genes, por lo cual evidenciaron la presencia y distribución de estos en las diferentes cepas de *G. anatis* estudiadas. En el caso donde los oligonucleótidos que no amplificaron se podría inferir que existe la posibilidad de que estas cepas estén posean un grupo fimbrial diferente o los genes estén ausentes. Además, ninguno de los perfiles de amplificación obtenidos en las cepas de *Gallibacterium* utilizadas en este estudio, corresponde al que presenta la cepa de *G. anatis* UMN 179, la cual cuenta con los grupos de genes *flf, flf1 y flf3* (Kudirkienė, *et al*., 2014, por lo tanto, fimbrialmente las cepas son diferentes a *G. anatis* UMN179.

En el caso de *A. paragallinarum*, los resultados de detección por PCR de los genes codificantes para las fimbrias F17 en ADN genómico de las cepas CL, CT, 5 y 6, mostraron varios amplificados incluyendo el amplificado esperado. Este resultado corrobora la evidencia encontrada en los resultados del análisis bioinformático del genoma de la cepa CL (Horta, 2015), en el que se ha detectado la presencia de varios elementos genéticos repetidos. Por lo cual es posible sugerir que la cepa CL contiene un arreglo del operón fimbrial diferente al reportado para *G. anatis* (Johnson, *et al*., 2013). Sin embargo, es necesario realizar más estudios experimentales que sustenten mejor estas dos evidencias, ya que otros estudios en otros microorganismos han reportado la existencia de diferentes arreglos en operones fimbriales (Zav'yalov, *et al*., 2010).

Para lograr la sobrexpresión de probables antígenos fimbriales fue necesario clonar y subclonar los productos de PCR producidos en este trabajo; al final se logró esto con segmentos de dos genes, uno que codifica una proteína estructural y otro que codifica una adhesina de las fimbrias de *G. anatis*. La literatura reporta que estas proteínas poseen la capacidad de inducir una respuesta inmunogénica (Bager, *et al*., 2013). Asimismo, se ha demostrado que es posible obtener anticuerpos policlonales para otras proteínas de fimbrias de otros microorganismos relacionados con las infecciones en aves (Mortezaei, *et al*., 2013) y que es posible utilizarlos como herramienta de diagnóstico en el área veterinaria (Pardo, *et al*., 2008).

El clúster genético fimbrial más frecuente reportado en las cepas de *Gallibacterium* incluye un gen predicho que codifica para una proteína de la subunidad fimbrial de 20.5 kDa designada FlfA (GenBank No. de acceso JX855927), que mostró similitud de secuencia con el precursor de la

proteína fimbrial semejante a F17 identificado en *Escherichia coli* patogénica extraintestinal (ExPEC) Cepa 536 (Dobrindt, *et al*., 2002).

La proteína estructural recombinante obtenida en este trabajo, corresponde a un fragmento del gen que codifica para la proteína estructural del operón *flf3* de la cepa de *G. anatis* ESV34, el tamaño obtenido de esta proteína es de 18.2 kDa y es similar en tamaño a la proteína estructural recombinante de FlfA de la cepa de *G. anatis* 12656-12 de 20.5 kDa reportada por (Bager, *et al*., 2013). La proteína obtenida por Bojesen fue purificada y utilizada para inmunizar y obtener anticuerpos policlonales en conejos, posteriormente se demostró la detección de esta proteína mediante Western Blot. En el estudio de Bojesen también se generó una cepa mutante de *G. anatis* del tipo Δ*flfA*, que mostró una disminución de la capacidad causar lesiones *in vivo*. Además, la inmunización de pollos con la proteína FlfA recombinante resultó en la disminución significativa de lesiones por desafíos posteriores a la inmunización. Apoyando así la hipótesis del papel de las fimbrias F17 como un importante factor de virulencia en la adhesión tisular y patogénesis de *G. anatis* en aves.

La proteína estructural purificada por afinidad en columna con resina cargada con níquel y dializada contra PBS e inyectada para inmunizar conejos, produjo anticuerpos lo que indica que es antigénica al ser visualizada la reacción antígeno anticuerpo en el ensayo Western Blot utilizando anticuerpos anti-conejo (A4312. SIGMA-ALDRICH, Misuri, EU) acoplados a fosfatasa alcalina, sugiriéndose a esta proteína como un prospecto para mayores estudios inmunológicos en aves.

En el presente trabajo también se sobreexpresó un fragmento de la proteína adhesina recombinante del operón *flf*3 y se obtuvieron anticuerpos de conejo contra ésta. Esta proteína es similar a la contenida en la cepa $F149^T$ de *G. anatis*. Hasta el momento no hay reportes de estudios similares, por lo que es relevante la obtención de esta proteína recombinante y posibilita a realizar en un corto plazo evaluaciones *in vivo* para determinar el efecto de protección de dichas proteínas con fines de inmunización en aves.

Los resultados del análisis por Western Blot mostraron que los anticuerpos policlonales de conejo fueron específicos al utilizar ambas proteínas recombinantes como blanco cruzado, entre la proteína estructural y la proteína adhesina, al menos bajo las condiciones ensayadas en este trabajo. Se han utilizado fragmentos de proteínas recombinantes, para desafíos en aves tal y como lo describe (Pors, et al., 2016) induciendo una protección parcial.

Una perspectiva de investigación con respecto a los resultados obtenidos en este trabajo, sería el realizar experimentos utilizando los extractos de las proteínas totales de otras cepas de *G. anatis* y *A. paragallinarum* y determinar si es posible detectar reactividad cruzada entre las proteínas

estructurales y adhesinas de fimbrias F17 en diferentes cepas. Además, se abre la posibilidad de efectuar desafíos con aves para analizar si la inmunización producida por componentes de las fimbrias tipo F17 es apropiada para proteger de infecciones posteriores producidas por bacterias específicas u homologas.

CONCLUSIONES

- El estudio informático mostró la diversidad de secuencias de genes codificantes de fimbrias tipo F17 presentes en *Gallibacterium anatis* y su distribución en el parental *Avibacterium paragallinarum*.
- Se confirmó por PCR la presencia de genes que codifican para fimbrias F17 en las diferentes cepas estudiadas en este trabajo.
- En *A. paragallinarum*, la detección por PCR de secuencias codificantes para las proteínas de las fimbrias F17 mostró amplificaciones de varios fragmentos reiterados para las secuencias estudiadas sugiriendo un posible arreglo en tándem.
- Se obtuvieron dos proteínas recombinantes de fimbrias F17, una correspondiente a un fragmento de la proteína estructural y la otra a un fragmento de la proteína adhesina de la cepa ESV34 y $F149^T$ de *G. anatis*, las cuales son inmunogénicas y podrían servir como antígenos para mejorar las vacunas existentes contra la gallibacteriosis. Estas proteínas no mostraron reactividad inmunológica cruzada en las condiciones usadas para su estudio.

ANEXOS

Extracción de DNA genómico de *Gallibacterium anatis* y *Avibacterium paragallinarum*

Los microorganismos *G. anatis* y *A. paragallinarum* fueron sembrados en placa de agar medio gelosa sangre y fueron incubados 18 h a 37 ºC, a partir de estos cultivos, se tomó una colonia aislada y se inoculó en 5 ml de medio BHI (Brain Heart Infusion). Se incubó con agitación constante a 200 rpm y 37 ºC durante 18h.

El cultivo se dividió en 2 tubos eppendorf de 1.5 ml y fue centrifugado a 13000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 500 µL de buffer de lisis, se les adicionó lisozima y se incubaron por 10 min a 37 ºC, para completar la lisis se adicionaron 40 µL de SDS al 1% y se homogeneizaron manualmente. Posteriormente se agregó 1 Vol. de fenol-Tris pH 8 a cada tubo y se agitaron en vortex, los tubos fueron centrifugados por 10 min a 13000 rpm, posteriormente la fase acuosa fue transferida a otros tubos a los cual se le agregó 1 Vol. de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), cada uno se agitó en vortex y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min. Para cada tubo se tomó la fase acuosa y se pasó a otro tubo, al cual se volvió a adicionar 1 Vol. fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se centrifugo a 13000 rpm durante 10 min, para separar la fase acuosa, nuevamente se transfirió a otro tubo, al cual se adicionó 1 Vol. de cloroformo para retirar el fenol, se agitó en vortex y se centrifugó 10 min a 13000 rpm, la fase acuosa fue transferida y se agregaron 2 Vol. de etanol absoluto frío y 0.1 vol. de acetato de sodio 3M pH 7, el cual se homogeneizó manualmente y se dejó precipitar a -20 °C durante 40 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con etanol frío al 70 %, el tubo fue centrifugado durante 5 min a 13000 rpm, se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. La pastilla seca fue resuspendida en 100 µl de agua pisa estéril y se almacenó a -20 °C para su posterior uso.

Extracción de DNA plasmídico de *E. coli* Método de lisis alcalina

Para la obtención del vector de clonación pBluescriptII KS (-) (Stratagene) y el vector de expresión pQE-30 (Qiagen), a partir de una placa de LB (Luria Bertani con ampicilina (LB-*amp*) 10 g de peptona de caseína, 10 g de cloruro de sodio, 5 g de extracto de levadura pH 7 + 100µg/ml de ampicilina) con los cultivos crecidos de *E. coli* que contenían los plásmido correspondiente, se tomó una colonia aislada de cada una y se inoculó en 50 ml de medio LB (LB + *amp*), los cultivos

fueron incubados con agitación constante a 200 rpm y 37 ºC durante 18 h, posteriormente el cultivo se centrifugó 15 min a 3500 rpm, se desechó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 3 ml de solución Birnboim I (Glucosa 50 mM, Tris HCl 25 mM y EDTA 10 mM pH 8), posteriormente se agregaron 6 ml de solución Birnboim II (NaOH 0.2 N y SDS 1%) y se mezcló. Para finalizar se agregaron 4ml de solución Birnboim III (acetato de potasio 5 M y ácido acético glacial 10 %) y se mezcló, posteriormente se centrifugaron los tubos 15min a 3500 rpm. El sobrenadante de cada uno se trasfirió a un tubo falcón de 50 ml, con ayuda de una gasa estéril para evitar los restos celulares, al sobrenadante se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol y se dejó a -20 °C para precipitar. Esto se centrifugó 15 min a 3500 rpm, se retiró el sobrenadante y la pastilla al fondo del tubo se dejó secar y se resuspendió en 200 µl de agua inyectable PiSA®. Las muestras extraídas de ADN plasmídico fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa a 0.9% para verificar la extracción. Posteriormente los plásmidos se trataron con RNasa y se purificaron por fenolización, el proceso fue verificado mediante electroforesis y las muestras fueron almacenadas a -20 °C.

Digestión de vector de clonación pBluescriptII KS-

Para el caso del plásmido de clonación pBluescriptII KS (-) se realizaron digestiones con la enzima de restricción *EcoRV* (Fermentas®), colocando en un tubo eppendorf estéril 3 µl de buffer 10X (***EcoRV* buffer** 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 0.1 mg/mL BSA.), aproximadamente 1 µg de DNA plasmídico y agua inyectable PiSA® estéril para un volumen final de 30 µl. Se colocó 2 µl de enzima *EcoRV*, se homogeneizo suavemente y se incubó a 37 °C durante 3 horas.

La digestión del vector de clonación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa a 0.8 %, el gel de agarosa fue teñido con Bromuro de etidio.

Obtención de fragmentos con extremos romos mediante amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa.

En un tubo de 200 µl para PCR se agregó agua PiSA® estéril, buffer 10X para Taq DNA Polimerasa/*Pfx*, MgCl (50 mM) /$MgSO_4$ (50 mM), mix de dNTP´s (10 mM), oligonucleótidos directo (10 µM), oligonucleótido reverso (10 µM), DNA genómico de *G. anatis/A. paragallinarum* (100 ng y enzima Taq DNA polimerasa/*Pfx* (0.5/0.2µl), se mezclaron suavemente y se colocaron en termociclador (Biorad®), las condiciones del programa de amplificación fueron las siguientes:

un ciclo a 95 ºC durante 01:30 minutos; 30 ciclos a 94 ºC durante 30 segundos (desnaturalización). La temperatura de alineamiento depende de la TM de cada par de primer a utilizar y el tiempo fue 01:30 minutos, 72 ºC por 02:00 minutos (extensión); y un ciclo final a 72 ºC por 4 minutos. La reacción se realizó en un termociclador Biorad T100. Los productos de PCR amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa en concentración de 0.8 % a 100 V durante aproximadamente 45 min en una cámara de electroforesis (Biorad®). El gel de agarosa se tiñó con Bromuro de etidio y se visualizó mediante transiluminador UV (UVP®).

Ligación de los fragmentos de interés al vector de clonación.

Los diferentes productos de PCR reamplificados con DNA polimerasa *Pfx* (Invitrogene®) se ligaron al vector pBluescriptII KS (-) previamente digerido con la enzima de restricción *EcoR*V, la reacción de ligación contenía: 3 µl de Buffer T4 ligasa (T4 ligasa Buffer 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl2, 100 mM DTT, 5 mM ATP (pH 7.8 at 25 °C), 1 µl de enzima T4-DNA ligasa (5 U/µl), 100 ng de inserto y 300 ng de plásmido. En los experimentos de ligación, la proporción vector: inserto utilizada fue de 1:3. La reacción de ligación se llevó a cabo a 37 °C durante 2 horas y posteriormente se dejó a 16 ºC durante aproximadamente 18 h, posteriormente se realizó el protocolo de transformación por choque térmico en células competentes de *E. coli* DH5α.

Obtención de células competentes de *E coli* por cloruro de rubidio y trasformación por choque térmico.

De una placa con cultivo fresco (18 horas), se tomó una colonia aislada y se inoculó en 5 ml de medio LB (10 g de Peptona de caseína, 10 g de Cloruro de Sodio, 5 g de Extracto de Levadura pH 7.0) se dejó crecer toda la noche a 37 °C en agitación constante, estos precultivos se usaron para inocular matraces con 250 ml de medio LB, los cultivos fueron incubados con agitación contante a 37 °C, hasta alcanzar una $D.O._{600}$=0.6 (aproximadamente 3 horas). Los cultivos fueron centrifugados a 4 °C 4000 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en solución reguladora I (10 mM de RbCl, 45 mM $MnCl_2$, 88 mM KAC, 10 mM $CaCl_2$, 0.5 mM LiCl, 15 % de glicerol pH 5.8), se dejó reposar 15 min en hielo y se centrifugó durante 10 min a 3000 rpm a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se agregaron 2 ml de solución reguladora II (10 mM MOPS, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM RbCl y 15 % de glicerol pH 7.0). Se disolvió la pastilla suavemente

y se dispuso en alícuotas de 200 µl en tubos eppendorf, las cuales se almacenaron a -70 °C hasta su posterior uso.

Para la transformación de *E. coli* DH5α, se comenzó descongelando un vial de células competentes almacenado a -70 °C, manteniéndolos en hielo aproximadamente 3 min, tras los cuales se añadieron 3 µl de producto de ligación (productos amplificados con DNA polimerasa *Pfx* y plásmido pBluescriptII KS (-) digerido con enzima de restricción *EcoR*V) y se homogenizó suavemente. Se dejó reposar los tubos durante 30 min en hielo y a continuación se sometió a las células a un choque térmico de 10 min a 37 ºC, posteriormente se agregó 1 ml de medio LB sin antibiótico y se dejó incubando durante 1 hora. El cultivo se centrifugó y se decantó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 100µl y se sembraron en placas de agar LB suplementadas con ampicilina (100 ng/µl), 40 µl de X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosidasa) 20 mg/ml y 4 µl de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido) 1 mM y se incubaron toda la noche a 37 ºC y se prosiguió a seleccionar clonas recombinantes.

Selección de Clonas Recombinantes

Las células transformadas fueron inoculadas en medio LB sólido con ampicilina (100ng/µl), 40µl de X-Gal 20mg/ml y 4µl de IPTG 1mM, fueron incubadas durante 24 h a 37 ºC. Se seleccionaron aquellas que no fueron capaces de llevar a cabo la α-complementación de la β-galactosidasa, es decir colonias blancas, ya que estaban constituidas por clonas recombinantes en las cuales el amplicón se había insertado correctamente en la zona de clonación múltiple del vector interrumpiendo así el gen *lac*Z y la expresión de la enzima β-galactosidasa. Estas colonias fueron sembradas en otra placa de LB de las mismas características que las anteriores, para comprobar el fenotipo de las transformantes. Las colonias transformantes fueron también sembradas en tubo falcón con 5ml de caldo LB suplementado con ampicilina (100ng/µl), fueron incubados con agitación a 37°C durante 18 horas. Transcurrido este tiempo se extrajo el DNA plasmídico de las posibles transformantes seleccionadas.

Para comprobar la presencia del inserto se realizaron digestiones de DNA plasmídico con enzima de restricción *EcoR*I para linearizar los plásmidos, para la visualización de los diferentes tamaños obtenidos tras la digestión se realizó una electroforesis en gel de agarosa en concentración de 0.8% y se corrió a 100 V durante aproximadamente 45 min en una cámara de electroforesis (Biorad®). El gel de agarosa se tiñó con Bromuro de etidio y se visualizó mediante transiluminador UV (UVP®).

Digestión de construcciones en pBluescriptII KS (-)

Para liberar los productos clonados en el vector pBluescriptII KS(-), fue necesario extraer DNA plasmídico de las cepas transformantes de *E. coli* DH5α que contenían el producto de interés, posteriormente se llevaron a cabo digestiones dobles de los plásmidos de interes de manera independiente y por separado, colocando en un tubo eppendorf estéril 15µl de buffer 10X dependiendo del buffer a utilizar (*Kpn*I buffer 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM $MgCl_2$, 0.02 % Tritón X-100, 0.1 mg/mL BSA.; *HindIII* buffer 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 0.1 mg/mL BSA.; *BamHI* buffer 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 0.02 % Tritón X-100, 0.1 mg/mL BSA.), aproximadamente 1 µg de DNA plasmídico y agua inyectable PiSA® estéril, para un volumen final de 150 µl. Se colocó 2µl de enzima *Kpn*I, *Hind*III y *BamH*I, se homogeneizo suavemente y se incubó a 37 °C durante 3 horas, al terminar el tiempo de incubación de la primera digestión, el DNA se precipitó con etanol absoluto y acetato de sodio 3 M pH 7 a -20 °C, se centrifugó 5 min a 13000 rpm y se lavó 3 veces con etanol al 70 %, posteriormente se dejó secar el DNA y se resuspendió en un volumen final de 135 µl con agua PiSA® estéril. A continuación, se repitieron las condiciones de digestión, agregando el buffer y la enzima de restricción complementaria para la liberación del inserto.

La digestión del vector de clonación, así como la liberación de los insertos se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa a 0.8%, el gel de agarosa se tiñó con Bromuro de etidio y se visualizó mediante transiluminador UV. Se cortó la banda de interés para purificar el DNA liberado que corresponde al inserto, el DNA fue purificado por el método freeze & squeeze (Anal Biochem. 1983) y tras concluir la purificación del DNA digerido, se corrió una electroforesis para verificar dicha purificación. Finalmente, el DNA se almacenó a -20 °C para experimentos de ligación posteriores.

Digestión de vector de expresión pQE-30

Las digestiones del vector de expresión, se realizaron por separado con mezclas de dos enzimas de restricción *Kpn*I/*Hind*III y *BamH*I/*Hind*III (Fermentas®) dependiendo la construcción a digerir. 1µg de DNA plasmídico se digirieron con 2µl de las enzimas *Kpn*I, *Hind*III y *BamH*I Las digestiones se realizaron de manera independiente y por separado colocando en un tubo eppendorf estéril 3 µl de buffer 10X (*Kpn*I buffer 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM $MgCl_2$, 0.02 % Tritón X-100, 0.1 mg/mL BSA.; *Hind*III buffer 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 0.1 mg/mL BSA.; *BamH*I buffer 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 0.02 % Tritón X-100, 0.1 mg/mL

BSA.), aproximadamente 1gµ de DNA plasmídico y agua inyectable PiSA® estéril. Se colocaron 2µl de las enzimas *KpnI*, *HindIII* y *BamHI*, se homogeneizo suavemente y se incubó a 37 °C durante 3 horas.

La digestión del vector de clonación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa a 0.8%, el gel de agarosa se tiñó con Bromuro de etidio y se visualizó mediante transiluminador UV.

Ligación de productos digeridos al vector de expresión pQE-30

El DNA liberado y purificado por fenolización a partir del vector de clonación pBluescriptII KS (-) con las enzimas de restricción *Kpn*I/*Hind*III *y BamH*I/*Hind*III**,** se ligó al vector de expresión pQE-30 previamente digerido con las mismas combinaciones de enzimas de restricción. Las condiciones de ligación fueron las mismas descritas en el apartado de clonación y ligación.

Inducción y Expresión de Proteínas recombinantes

Las transformantes de *E. coli* que contenían el plásmido con la secuencia del gen de interés, fueron cultivadas en 5 ml de caldo LB adicionado con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml). Los cultivos fueron incubados durante 18 h a 37 ºC en agitación. Se inocularon 500 µl de la muestra en 30 ml de caldo LB adicionado con ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml) y se incubó a 37 ºC en agitación durante 3 horas para obtener un crecimiento celular de una D. O_{600nm} de 0.6, una vez alcanzada la D. O, se tomó una muestra de 1 ml y se guardó como tiempo cero sin inducir. A continuación, se agregó IPTG (1 mM/ml) y se incubó el cultivo durante 24 h a 37 ºC en agitación.

Se realizó una cinética de inducción, se tomaron muestras de 1 ml cada hora durante las primeras cinco horas de inducción y a las 24 horas como tiempo final y se colocó en tubo eppendorf, los tubos fueron centrifugados 2 min a 13000 rpm para bajar pastilla, se decantó el sobrenadante y se retiró el exceso, finalmente se guardó el tubo con la pastilla a -20 °C para su posterior análisis

La expresión de las proteínas recombinantes fue evaluada y analizada mediante SDS-PAGE frente a un marcador de peso molecular Biorad dual color de 10-250 KD, se utilizaron como controles cultivos de *E. coli* cepa M15 sin transformar y un cultivo de *E. coli* M15 transformadas con el plásmido pQE-30 vacío.

Obtención de proteínas totales

Las pastillas obtenidas se resuspendieron en 50 µl de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y lisozima (1 mg/ml) (en frío), esta mezcla se dejó incubando durante 20 min a 37 °C, transcurrido el tiempo los tubos se colocaron en hielo y se agregaron 50 µl de buffer 2X de carga con β-mercaptoetanol (5 %), para posteriormente hervirlos durante 5 min, al concluir el tiempo los tubos se depositaron en hielo para su posterior análisis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

Purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad

Las proteínas recombinantes obtenidas en este trabajo, fueron inducidas utilizando IPTG (1 mM) y el vector de expresión pQE-30, el cual tiene una etiqueta de histidinas en el mismo marco de lectura que la proteína clonada, la cual se adiciona en la región amino terminal de la proteína, lo cual fue útil en el proceso de purificación por afinidad en una columna de resina de sefarosa cargada con Ni^{2+} los cuales interactúan con los nitrógenos de los anillos imidazólicos de los residuos de histidina.

En los siguientes apartados se describe la forma en la que se obtienen las fracciones solubles de lisados de células bajo condiciones nativas y desnaturalizantes, los cuales se utilizaran para realizar la purificación de proteínas.

Fraccionamiento de Proteínas solubles

Cultivos de 30 ml que fueron inducidos con IPTG (1 mM/ml), se dividieron en tres y se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 min, se decantó el sobrenadante y se almacenaron las pastillas (fracción celular) a -20 °C para su posterior uso.

La pastilla correspondiente a 10 ml se resuspendió en 1 ml de buffer de unión nativo (fosfato de sodio 50 mM pH 7.7, cloruro de sodio 300 mM, imidazol 10 mM y Tritón X-100 al 0.03 %). Se agitó la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente. Se sonicaron las muestras en hielo con 60 pulsos durante 2 min en intervalos de 10 segundos. Por último, la muestra se centrifugó 5 min a 13000 rpm. De esta manera, las proteínas contenidas en la fracción soluble se separaron de los restos celulares contenidos en el pellet (fracción insoluble). El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf nuevo, la fracción insoluble se resuspendió en Buffer de Unión condiciones

desnaturalizantes (urea 8 M, fosfato de sodio 100 mM, Tris 10 mM, imidazol 10 mM Ajustado a pH 8), de ambas fracciones se tomaron 50 µl para su análisis en SDS-PAGE.

Obtención de Fracción solubles de lisados de células bajo condiciones nativas (Qiagen)

Se resuspendió la pastilla correspondiente a 10 ml de muestra en 1 ml de Buffer de unión nativo, mezclado con lisozima (1 mg/ml), se agitó la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente, el volumen se dividió en 3 tubos eppendorf (1 ml en cada tubo) y se sonicaron las muestras en hielo con 60 pulsaciones durante 2 min en intervalos de 10 segundos. Por último, la muestra se centrifugó 5 min a 13000 rpm. De esta manera, las proteínas contenidas en la fracción soluble se separaron de los restos celulares contenidos en la pastilla celular (fracción insoluble). El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf nuevo y se tomó una alícuota de 50 µl para su análisis en SDS-PAGE, el resto se purificó mediante columna de afinidad.

Obtención de Fracción solubles de lisados de células bajo condiciones desnaturalizantes (Qiagen)

Se resuspendió la pastilla correspondiente a 10 ml de muestra en 1 ml de buffer de unión desnaturalizante (urea 8 M, fosfato de sodio 100 mM, Tris 10 mM, imidazol 10 mM pH 8). Se agitó la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente, el volumen se dividió en 3 tubos eppendorf (1 ml en cada tubo) y se sonicaron las muestras en hielo 60 pulsaciones durante 2 min en intervalos de 10 segundos. Por último, la muestra se centrifugó 5 min a 13000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf nuevo y del sobrenadante se tomó una alícuota de 50 µl para su análisis en SDS-PAGE, el resto se purificó mediante columna de afinidad.

Purificación de proteínas recombinantes bajo condiciones nativas (Qiagen)

Se preparó la columna de purificación con 1 ml de resina NTA-Níquel (Qiagen®) y se dejó sedimentar por gravedad, posteriormente a la columna de purificación NTA-Níquel, se le adicionó 1 ml de sobrenadante obtenido a partir de la lisis de bacterias en condiciones nativas, dejando un tiempo de retención para que la muestra interactúe con el Níquel de 20 min, transcurrido este tiempo se colecto la fracción líquida no retenida y se almacenado a 4 °C para su posterior análisis en SDS-PAGE.

A la columna con la muestra de proteína retenida se le adicionaron 4 ml de buffer de lavado (fosfato de sodio 50 mM pH 7.7, cloruro de sodio 300 mM, imidazol 50 mM y Tritón X-100 al 0.03 %), se colectó la fracción líquida obtenida, la cual se mantuvo 4 °C para su análisis en SDS-PAGE.
Para finalizar se adicionaron a la columna 4 veces 0.5 ml de Buffer de elución (fosfato de sodio 50 mM pH 7.7, cloruro de sodio 300 mM, imidazol 250 mM) y se colectaron fracciones de 0.5 ml, las muestras fueron almacenadas a 4 °C para su análisis en SDS-PAGE.

Purificación de proteínas recombinantes bajo condiciones desnaturalizantes (Qiagen)

Se preparó la columna de purificación con 1 ml de resina NTA-Níquel (Qiagen®) y se dejó sedimentar, posteriormente a la columna de purificación NTA-Níquel, se le adicionó 1 ml de sobrenadante obtenido a partir de la lisis de bacterias en condiciones desnaturalizantes, dejando un tiempo de retención para que la muestra interactúe con el Níquel de 20 min, transcurrido este tiempo se colecto la fracción líquida no retenida y se almacenado a 4 °C para su posterior análisis en SDS-PAGE.
A la columna con la muestra de proteína retenida se le adicionaron 4 ml de buffer de lavado (8M urea, fosfato de sodio 100 mM, Tris 10 mM, imidazol 50 mM ajustado a pH 6.3), se colectó la fracción líquida obtenida, la cual se mantuvo 4 °C para su análisis en SDS-PAGE.
Para finalizar se adicionaron a la columna 4 veces 0.5 ml de buffer de elución desnaturalizante (8M urea, fosfato de sodio 100 mM, Tris 10 mM, imidazol 250 mM ajustado a pH 4.5) y se colectaron fracciones de 0.5 ml, las muestras fueron almacenadas a 4 °C para su análisis en SDS-PAGE.

Diálisis de las proteínas purificadas

Los sacos de diálisis empleados fueron de Membrana tubular de celulosa regenerada (Cellu Sep T2®), tienen un tamaño de poro de 28 µm y tienen un corte de peso molecular (MWCO) de 6000 a 8000 kDa, son planos de 10 mm y su capacidad de diálisis es de 0.32 ml Vol/cm.
Se realizaron diálisis individuales de las proteínas purificadas, por los que se prepararon sacos de diálisis de 25 cm para cada proteína los cuales se cortaron y se hirvieron durante 10 min en una solución de bicarbonato de sodio al 2 % y EDTA 1 mM pH 8, posteriormente los tubos se enjuagaron con agua destilada y se hirvieron nuevamente durante 10 min en solución de EDTA 1 mM pH 8 Los tubos de diálisis se dejaron enfriar y se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso.

Para la diálisis de las proteínas estructurales y adhesinas purificadas, primero se selló un extremo del saco de diálisis, se aseguró que no presentara fuga, se colocó 5 ml de cada proteína purificada, a continuación, se selló el otro extremo del saco de diálisis y se aseguró que no tuviera fuga. El saco de diálisis con la proteína purificada se dejó dializando en PBS (NaCl, KCl, $NaHPO_4$ y KH_2PO_4) a 4 °C en agitación durante 6 horas, realizando un cambio de PBS cada 2 horas.
Al finalizar la diálisis, los sacos de diálisis se pusieron en contacto con sacarosa comercial para disminuir el volumen y concentrar la proteína, para finalizar las muestras se colectaron en fracciones de 0.5 ml y se almacenaron a -20 °C para su análisis en SDS-PAGE.

SDS-Page (Sambrook, *et al*., 1989)

Los ensayos de expresión, purificación y diálisis se evaluaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en condiciones desnaturalizantes (dodecil sulfato de sodio -SDS-), utilizando geles discontinuos: un gel concentrador y uno separador
Las muestras se prepararon con Buffer de carga SDS 2X (Tris-Cl 100 mM pH 6.8, SDS 4 %, Bromofenol Blue 0.2 %, Glicerol 20 % y β-mercaptoetanol 5 %)
Se prepararon geles de SDS-PAGE al 10 % (30 %de acrilamida, 1.5 M tris-Cl pH 8.8, SDS 10 %, persulfato de amonio al 10 % y TEMED). Se cargaron 20 µl de cada muestra tratada como se mencionó anteriormente en cada pozo. El gel se corrió a 80 volts durante 2 horas, el gel fue teñido con azul de Coomassie por 3 horas en agitación, posteriormente se retiró el colorante y de agregó solución desteñidora por 3 horas aproximadamente (ácido acético glacial 10%)

Transferencia de Proteínas a Membrana de Nitrocelulosa (Sambrook, *et al*., 1989)

Las proteínas fueron transferidas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa, dónde quedaron inmovilizadas para permitir la detección con un anticuerpo.
Se agregó buffer de transferencia (39 mM de Glicina, 48 mM de Tris, 0.037 % de SDS y 20 % de metanol ajustado a pH 8.3) a la cámara de electroforesis, donde se colocó el cassette que contenía el gel de poliacrilamida, la membrana de nitrocelulosa, en medio de dos piezas de papel filtro, seguido de dos esponjas. Todo esto se colocó evitando dejar burbujas entre cada pieza. Finalmente se cerró el cassette y se montó en el aparato de transferencia evitando la formación de burbujas. La

cámara se colocó en hielo y se corrió a 0.3 Amperes durante 1.5 horas, al finalizar, la membrana se colocó en solución bloqueadora (Leche en polvo sin grasa al 5 %, TBS-Tween 20 0.1 % pH 7.4) y el gel fue teñido con azul de Coomassie para verificar que se realizó una eficiente transferencia de las proteínas.

Western Blot (con anticuerpos acoplados a fosfatasa alcalina) (Sambrook, *et al*.,1989)

Se corrió un gel SDS-PAGE al 15 %, se realizó la transferencia a membrana de nitrocelulosa. La membrana se bloqueó toda la noche en agitación con 15 ml de solución bloqueadora (Leche en polvo sin grasa al 5 %, TBS-Tween 20 0.1 % pH 7.4). Al finalizar el tiempo de bloqueo, la membrana fue transferida a otro recipiente donde se incubó nuevamente con solución de bloqueo y con el anticuerpo primario en dilución 1:500 durante 2 horas en agitación constante. Concluido el tiempo se realizaron 3 lavados con TBS (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 3 g Tris) por 10 minutos cada uno, transcurrido el tiempo la membrana se trasfirió a otro recipiente y se incubó con solución de bloqueo con el anticuerpo secundario Anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina en dilución 1:5000 durante 1 hora en agitación constante. Tras finalizar este tiempo, se realizaron 3 lavados con TBS por 10 minutos cada uno. Las membranas se incubaron en Buffer para Fosfatasa Alcalina (0.1 M Tris, 0.05 M $MgCL_2$, 0.1 M pH9.5) durante 5 min y se reveló con 66 µl de NBT (Nitro Blue Tetrazolium) y 33 µl de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) en 10 ml de buffer (0.1 M Tris, 0.05 M $MgCL_2$, 0.1 M NaCl pH 9.5).

REFERENCIAS

-Adler J. 1996. Chemotaxis in bacteria. Science. 153(3737): 708-716. ISSN: 1095-9203 (Print) 0036-8075. (Online) https://doi.org/10.1126/science.153.3737.708. DOI: 10.1126/science.153.3737.708

-AVEC ASBL Annual Report. 2014. Association of Poultry Processors and Poultry Trade in the EU Countries. Rue du Luxembourg, Belgium. (Online) http://www.avec-poultry.eu/annual-reports-overview

-Bager RJ, Kudirkiene E, da Piedade I, Seemann T, Nielsen TK, Pors SE, Mattsson AH, Boyce JD, Adler B, Bojesen AM. 2014. In silico prediction of *Gallibacterium anatis* pan-immunogens. Veterinary Research, 45:80. (Online) http://doi.org/10.1186/s13567-014-0080-0. DOI:10.1186/s13567-014-0080-0.

-Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J Clin Pathol, 45:493-496. (Online) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5908210

-Bisgaard M, Korczak BM, Busse HJ, Kuhnert P, Bojesen AM, Christensen H. 2009. Classification of the taxon 2 and taxon 3 complex of Bisgaard within *Gallibacterium* and description of *Gallibacterium melopsittaci sp*. nov., *Gallibacterium trehalosifermentans sp*. nov. and *Gallibacterium salpingitidis sp*. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59:735-744. (Online) http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.005694-0#tab2. DOI: 10.1099/ijs.0.005694-0

-Bisgaard M. 1977. Incidence of *Pasteurella haemolytica* in the respiratory tract of apparently healthy chickens and chickens with infectious bronchitis. Characterisation of 213 strains. Avian Pathology, 6:285-292. (Online) http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03079457708418238

-Blackall PJ, Eaves LE, Regers DG. 1990. Proposal of a New Serovar and Altered Nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume Hemagglutinin Scheme. Journal of Clinical Microbiology. 28(6):1185-1187. (Online). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC267902/

-Blackall PJ. 1999. Infectious Coryza: Overview of the Disease and New Diagnostic Options. Clinical Microbiology Reviews. 12(4):627-632. (Online) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88928/

-Bojesen AM, Nielsen OL, Christensen JP, Bisgaard M. 2004. *In vivo* studies of *Gallibacterium anatis* infection in chickens. Avian Pathology. (33):145-152. (Online) http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03079450310001652059

-Bojesen AM, Vazquez ME, Bager RJ, Ifrah D, Gonzalez C, Aarestrup FM. 2011. Antimicrobial susceptibility and tetracycline resistance determinant genotyping of *Gallibacterium anatis*. Veterinary Microbiology. 148(1):p105-110. (Online) http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113510003834

-Bojesen AM, Christensen P, Bisgaard M. 2008. *Gallibacterium* infections and other avian *Pasteurellaceae*. En: Pattison M., McMullin PF, Bradbury JM, Alexander DJ. Poultry Diseases, 6a. ed. Elsevier Science. pp.160-163. DOI: 10.1016/B978-0-7020-2862-5.50017-9

-Boyce D, Adler B. 2000. The Capsule Is a Virulence Determinant in the Pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). Infection and Immunity. 68(6):3463–3468. (Online) http://iai.asm.org/content/68/6/3463.long . DOI: 10.1128/IAI.68.6.3463-3468.2000

-Christensen H, Bisgaard M, Bojesen M, Olsen J. E. 2003. Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, *'Actinobacillus salpingitidis'* or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53:275-287. (Online) http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.02330-0#tab2

-Diacovich L, Gorvel JP. 2010. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. Nature Reviews Microbiology. 8:117-128. (Online) https://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n2/full/nrmicro2295.html . DOI:10.1038/nrmicro2295

-Dobrindt U, Blum-Oehler G, Nagy G, Schneider G, Johann A, Gottschalk G, Hacker J. 2002. Genetic Structure and Distribution of Four Pathogenicity Islands (PAI I536 to PAI IV536) of Uropathogenic *Escherichia coli* Strain 536. Infection and Immunity. 70(11):6365–6372. (Online) http://iai.asm.org/content/70/11/6365

-Eberle N, Kiess AS. 2012. Phenotypic and genotypic methods for typing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry. Poultry Science. 91(1):255–264. (Online) https://doi.org/10.3382/ps.2011-01414

-Foster J, Moat A. 1980. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Biosynthesis and Pyridine Nucleotide Cycle Metabolism in Microbial Systems. Microbiological Reviews. 44(1):83-105. (Online) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373235/

-Frey J, Kuhnert P. 2002. RTX toxins in *Pasteurellaceae*. International Journal of Medical Microbiology, 292(3-4):149-58. (Online) https://doi.org/10.1078/1438-4221-00200

-García AJ, Angulo E, Blackall PJ, Ortiz AM. 2004. The presence of nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Haemophilus paragallinarum* in México. Avian Dis. 48(2):425-429. (Online) http://dx.doi.org/10.1637/7104 .

-Gerlach H. 1977. The significance of *Pasteurella haemolytica* in poultry. Prakt Tierartz. 58:324-328. (Online) http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XE774M540

-Horner F, Bishop C, Haw C. 2007. An upper respiratory disease of commercial chickens resembling infectious coryza, but caused by a V factor-independent bacteriu. Avian Pathology. 21(3):421-427. (Online) http://dx.doi.org/10.1080/03079459208418860.

-Horta-Valerdi G, Sanchez-Alonso MP, Perez-Marquez VM, Negrete-Abascal E, VacaPacheco S, Hernandez-Gonzalez I, GomezLunar Z, Olmedo-Álvarez G, Vazquez-Cruz C. 2017. The genome sequence of *Avibacterium paragallinarum* strain CL has a large repertoire of insertion sequence elements. Genome Announc 5: e00152-17. (Online) http://genomea.asm.org/content/5/15/e00152-17 .

-Hurtado-Romero S, Iregui-Arturo C. 2010. El lipopolisacarido. Rev. Med. Vet. (Bogotá, Colombia), (19):37-45. ISSN 0122-9354. (Online) http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-93542010000100004.

-Iritani Y, Katagiri K, Arita H. 1980. Purification and properties of *Haemophilus paragallinarum* hemagglutinin. American Journal Veterinary Research. 41(12):2114-8. (Online) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7212446 .

-Johnson TJ, Danzeisen JL, Tramper D, Nolan LK, Seemann T, Bager RJ, Bojesen AM. 2013. Genome Analysis and Phylogenetic Relatedness of *Gallibacterium anatis* Strains from Poultry. PLOS ONE. 8(1):e54844. (Online) https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054844 .

-Keklik M, Demirci A, Puri VM. 2010. Decontamination of unpackaged and vacuum-packaged boneless chicken breast with pulsed ultraviolet light. Poultry Science. 89(3):570-581. (Online) https://doi.org/10.3382/ps.2008-00476.

-Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes A, Molin S, Tolker N. 2003. Biofilm formation by *pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. Molecular Microbiology. 48(6):1511-1524. (Online) http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03525.x .

-Klemm P, Schembri MA. 2000. Bacterial adhesins: Function and structure. International Journal of Medical Microbiology. 290(1):27-35 (Online) https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80102-2.

-Klemm P, Vejborg RM, Hancock V. 2010. Prevention of bacterial adhesion. Springer. 88(2):451–459. (Online) http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-010-2805-y . DOI: 10.1007/s00253-010-2805-y.

-Kristensen BM, Frees D, Bojesen AM. 2009. GtxA from *Gallibacterium anatis*, a cytolytic RTX-toxin with a novel domain organisation. Veterinary Research. 41(3):25. (Online) https://doi.org/10.1051/vetres/2009073 .

-Kristensen BM, Frees D, Bojesen AM. 2011. Expression and secretion of the RTX-toxin GtxA among members of the genus *Gallibacterium*. Veterinary Microbiology. 153(1-2):116-23. (Online) https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.019.

-Kudirkiene E, Bager RJ, Johnson TJ, Bojesen AM. 2014. Chaperone-usher fimbriae in a diverse selection of *Gallibacterium* genomes. BMC Genomics. 15:1093. (Online) https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-1093.**DOI:** 10.1186/1471-2164-15-1093.

-Kume K, Sawata A, Nakai T, Matsumoto M. 1983. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. Journal of Clinical Microbiology, 17(6):958-964. (Online) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC272783/ .

-Larios A. 2007. Expresión de proteínas rguladas por hierro en *Avibacterium* (*Haemophilus*) *paragallinarum*. Tesis de licenciatura Facultad de estudios superiores, Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.

-Le Bouguénec C, Bbertin Y. 1999. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals. Veterinary. Reserch. 30(2-3):317-342. (Online) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10367361 .

-Leon K. 2009. *Gallibacterium anatis.* Avicultura Profesional, 27(6):24-26.

-Lintermans PF, Bertels A, Schlicker C, Deboeck F, Charlier G, Pohl P, Norgren M, Normark S, Van Montagu, M, De Greve H. 1991. Identification, Characterization, and

Nucleotide Sequence of the F17-G Gene, Which Determines Receptor Binding of *Escherichia coli* F17 Fimbriae. Journal of Bacteriology. 173(11):3366-3373. (Online) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC207947/ .

-Lintermans PF, Pohl P, Bertels A, Charlier G, Vandekerkhove J, Van Dame J, Schoup J, Schlicker C, Korhonen T, De Greve H. 1988. Characterization and purification of the F17 adhesin on the surface of bovine enteropathogenic and septicemic *Escherichia coli*. American Journal of Veterinary Reserch. 49(11):1794-1799. (Online) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2907846

-Machota-Vadillo S, Duran-Piriz S, Yanes-Mateos EM. 2002. Manual de microbiología veterinaria. España: S.A. MCGRAW-HILL.

-Mekalanos JJ. 1992. Enviromental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. Journal of Bacteriology. 174(1):1-7. (Online) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC205668/

-Mendoza K, Rodríguez J, Koga Y, Alvarado A. 2015. *Gallibacterium anatis*: Un patógeno aviar importante. Bioservice SRL. Artículo técnico. (Online) https://bioservice.com.pe/gallianatis.pdf

-Meylan E, Tschopp J, Karin M. 2006. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. Nature. 442:39-44. (Online) https://www.nature.com/nature/journal/v442/n7098/full/nature04946.html . DOI:10.1038/nature04946

-Montes-García JF, Vaca S, Vázquez-Cruz C, Soriano-Vargas E, Aguilar-Romero F, Blackall PJ, Negrete-Abascal E. 2016. Identification of a Hemagglutinin from *Gallibacterium anatis*. Current Microbiology. 72(4):450-6. ISSN: 0343-8651 (Print) 1432-0991 (Online). https://link.springer.com/journal/284. Doi: 10.1007/s00284-015-0969-5

-Morgan Bihannic, Reza Ghanbarpour, Frédéric Auvray, Laurent Cavalié, Pierre Châtre, Michèle Boury, Hubert Brugère,Jean-Yves Madec, Eric Oswald. 2014. Identification and detection of three new F17 fimbrial variants in *Escherichia coli* strains isolated from cattle. Veterinary Research 45:76 (Online) http://doi.org/10.1186/s13567-014-0076-9. DOI:10.1186/s13567-014-0076-9.

-Mortezaei N, Singh B, Bullitt E, Uhlin EB, Andersson M. 2013. P-fimbriae in the presence of anti-PapA antibodies: new insight of antibodies action against pathogens. Scientific Report. 3:3393. (Online) https://www.nature.com/articles/srep03393 . DOI:10.1038/srep03393

-Neubauer C, De Souza-Pilz M, Bojesen AM, Bisgaard M, Hess. 2009. Tissue distribution of haemolytic *Gallibacterium anatis* isolates in laying. Avian Patholpgy. 38(1):1–7. (Online) http://dx.doi.org/10.1080/03079450802577848

-Pardo G, Barreto A, León B, Fuentes A, Castro M, Arteaga M, Campal E. 2008. Monoclonal antibodies that recognize different conformational epítopes in enterotoxigenic *Escherichia coli* F41 fimbriae. Revista. Electronica de Veterinaria (REDVET). 8(8). (Online) http://www.veterinaria.org/revistas/redvet .

-Pedrajo-Gonzáles B, Dreyfus G. 2003. Sistema de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. Mensaje Bioquímico. 27:45-63. (Online)

http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje_Bioq03v27p045_Gonzalez_Pedrajo.pdf

-Persson G, Bojesen AM. 2015. Bacterial determinants of importance in the virulence of *Gallibacterium anatis* in poultry. Veterinary Research. 46(1):57. (Online) http://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13567-015-0206-z. DOI: 10.1186/s13567-015-0206-z

-Pors SE, Skjerning RB, Flachs EM, Bojesen AM. 2016. Recombinant proteins from *Gallibacterium anatis* induces partial protection against heterologous challenge in egg laying hens. Veterinary Reserch. 47:36. (Online) http://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13567-016-0320-6 . DOI: 10.1186/s13567-016-0320-6.

-PoultryMed Home, 2000-2017. Bacterial Diseases: Infectious Coryza. Recuperado de http:// http://www.poultrymed.com/Poultrymed/index.asp

-Ragnhild J. Bager, Barbara Nesta, Susanne E. Pors, Marco Soriani, Laura Serino, John D. Boyce, Ben Adler, Anders M. Bojesen. 2013. The fimbrial protein FlfA from *Gallibacterium anatis* is a virulence factor and vaccine candidate. Infection and Immunity. 81(6):1964-1973 (Online) http://doi.org/10.1128/IAI.00059-13. DOI:10.1128/IAI.00059-13.

-Ramón-Rocha MO, García-González O, Pérez Méndez A, Ibarra Caballero J, Pérez Márquez VM, **Vaca S, Negrete-Abascal E.** 2006. Membrane vesicles released by *Avibacterium paragallinarum* contain putative virulence factors. FEMS Microbiol Lett. 257(1): 63-8. (Online) https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00154.x .

-Rzewuska M, Karpiñska E, Szeleszczuk P, Binek M. 2007. Isolation of *Gallibacterium spp*. from peacocks with respiratory tract infections. Medycyna Weterynaryjna. 63(11):1431-1433. (Online) https://www.researchgate.net/publication/275212379

-Salgado-Lucio ML, Vaca S, Vázquez C, Zenteno E, Rea I, Pérez Márquez VM, Negrete-Abascal E. 2012. Adhesion of *Gallibacterium anatis* to Chicken Oropharyngeal Epithelial Cells and the Identification of putative fimbriae. Advances in Microbiology. 2(4):505-51. (Online) 10.4236/aim.2012.24064

-Samadder P, Xicohtencatl-Cortes J, Saldana Z, Jordan D; Tarr PI; Kaper JB, Giron JA.. 2009. The *Escherichia coli* ycbQRST operon encodes fimbriae with laminin-binding and epithelial cell adherence properties in Shiga-toxigenic *E. coli* O157:H7. Environ Microbiol. 11(7):1815–1826. (Online) 10.1111/j.1462-2920.2009.01906.x

-Sawata A, Kume K. 1983. Relationships Between Virulence and Morphological or Serological Properties of Variants Dissociated from Serotype 1 *Haemophilus paragallinarum* Strains. Journal of Clinical Microbiology. 18(1):49-55. (Online) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC270743/

-Sean-Paul N; Ba¨umler A. 2007. Evolution of the Chaperone/Usher Assembly Pathway: Fimbrial Classification Goes Greek. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 71(4):551–575. (Online) 10.1128/MMBR.00014-07

-Soriano-Vargas E, Sánchez-Morales J, Morales-Erasto V, García-Sánchez A. 2012. Isolation and identifcation of NAD-independent *Avibacterium paragallinarum* (serovar C-1) from growing

layer hens with infectious coryza. Veterinaria. México. 44 (1):57-62. (Online) http://hdl.handle.net/20.500.11799/39218

-Soutourina O, Semenova E, Parfenova V, Danchin A, Bertin P. 2001. Control of bacterial motility by environmental factors in polarly agellated and peritrichous bacteria isolated from Lake Baikal. Appl Applied and Environmental Microbiology. 67(9):3852. (Online) http://aem.asm.org/content/67/9/3852

-Stordeur P, Marlier D, Blanco J, Oswald E, Biet F, Dho-Moulin M, Mainil J. 2002. Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesin genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*. Veterinary Microbiology. 84(3):231–241. (Online) https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00464-3

-Tautz D, Renz, M. 1983. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. Analytical Biochemistry. 132(1):14-19. (Online) https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90419-0

-Terzolo H. 2000. Coriza Infecciosa: una revisión. Propuestas de investigación para su diagnóstico y control. Revista de medicina veterinaria. 81(4):262-269. (Online) https://www.researchgate.net/publication/280741318

-Touhami A, Jericho H, Boyd M, Beveridge J. 2006. Nanoscale characterization and determination of adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* pili. Journal of Bacteriol. 188(2):370-377. (Online) http://jb.asm.org/content/188/2/370.

-Willis ML, Whitfield C. 2013. Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways. Carbohydrate research. 378:35-44. (Online) https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.05.007

-Wurpel D, Beatson SA, Totsika M, Petty NK, Schembri MA. 2013. Chaperona.Usher Fimbriae of *Escherichia coli*. Plos One. 8(1):e52835. (Online) https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052835

-Zav'yalov G, Zavialov A, Zav'yalov V, Korpela T. 2010. Adhesive organelles of Gram-negative pathogens assembled with the classical chaperone/usher machinery: structure and function. FEMS. Microbiology Reviews. 34(3):317-78. (Online) https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00201.x