



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

CLONACIÓN DE GENES QUE CODIFICAN  
PROTEÍNAS FIMBRIALES EN *AVIBACTERIUM*  
*PARAGALLINARUM* PARA LA GENERACIÓN DE  
PROTEÍNAS RECOMBINANTES.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTAN:

BRENDA ROMERO HERNÁNDEZ

FERNANDO PÉREZ CORTÉS

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. CANDELARIO VÁZQUEZ CRUZ



DICIEMBRE 2018

El proyecto de investigación “Clonación de genes que codifican proteínas fimbriales en *Avibacterium paragallinarum* para la generación de proteínas recombinantes” 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.

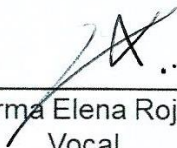
# JURADO



Dra. Patricia Sánchez Alonso  
Presidente



Dr. Candelario Vázquez Cruz  
Secretario



Dra. Norma Elena Rojas Ruiz  
Vocal

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a Dios por ser nuestra guía, por brindarnos salud, fortaleza, capacidad y por estar siempre con nosotros.

Al Dr. Candelario Vázquez Cruz, por la paciencia, apoyo, dedicación y confianza que nos brindó para desarrollar nuestra tesis.

A los integrantes de nuestro comité revisor:

- Dra. Patricia Sánchez Alonso.
- Dra. Norma Elena Rojas Ruiz.

Por la dedicación y tiempo a nuestro trabajo, la revisión fue de gran beneficio en la elaboración de nuestra tesis.

A la M. C. María Elena Cobos Justo, por todo el apoyo, conocimiento y paciencia que nos brindó a lo largo de la realización del proyecto, siempre representaste una gran guía para los dos.

A nuestros amigos que estuvieron siempre con nosotros para apoyarnos, presionarnos y mejorar como personas. Presentes o no los llevamos siempre en la mente.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por ser la sede de todo el conocimiento adquirido en estos cinco años, así como a nuestros docentes por compartir su conocimiento a lo largo de la preparación de nuestra profesión.

Al CONACyT por financiar la beca de este proyecto.

“Debemos aceptar la decepción finita, pero nunca perder la esperanza infinita”.

Martin Luther King

## **DEDICATORIA**

A mis padres Graciela Teresa Hernández Martínez y Pablo Romero Montaña, por su amor incondicional, por brindarme todo su apoyo, confianza y dedicación, por su trabajo y sacrificio todos estos años. Gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí, es un orgullo y privilegio ser su hija, son los mejores padres, muchas gracias por los consejos valores y principios que me han inculcado. A mis hermanos: Adriana, Pablo y Luisito, por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por sus consejos para ser una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

**Brenda**

Dedico este trabajo a mis padres, Marcela Cortés Velázquez y Fernando Pérez Romero, por ser ese pilar fuerte que sostiene mi voluntad en los momentos en los que llega a tambalear, ya saben que los quiero, pero sepan también que este éxito también es suyo. A mi hermana, Estefanía, que de no ser por su compañía algunas tardes serían más largas de lo que deberían ser, al menos te debo probar que si se puede, así que... aquí esta. A mi familia, todos y cada uno de ustedes me dieron algo, todo eso lo he tratado de usar.

**Fernando**

Quien diría que nos encontraríamos de esta forma, supongo que tuvimos suerte, pues de no hacerlo nos faltaría un pedazo esencial de lo que conocemos como vida... es un placer el tener la compañía uno del otro, gracias, definitivamente te volviste mi persona favorita.

“Quiero vivir y ser fuerte para amarte con toda la ternura que te mereces, para entregarte todo lo bueno que haya en mi”.

Frida Kahlo

## ÍNDICE GENERAL

JURADO.....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
DEDICATORIA.....	iv
ÍNDICE GENERAL.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN .....	xiv
INTRODUCCIÓN .....	1
¿Qué es <i>Avibacterium paragallinarum</i> ? .....	1
Organismo fastidioso .....	2
Características del cultivo .....	2
Coriza infecciosa.....	3
Signos clínicos.....	3
Control de la coriza infecciosa .....	4
Daño económico en la industria avícola.....	5
Vacunación contra CI.....	6
¿Porque es mejor vacunar?.....	6
Factores de virulencia .....	7

Fimbrias tipo F17 .....	8
Estrategias de protección inmunológica contra <i>A. paragallinarum</i> . .....	9
JUSTIFICACIÓN .....	11
HIPÓTESIS .....	12
OBJETIVOS .....	12
Objetivo general .....	12
Objetivos específicos .....	12
ESQUEMA DE TRABAJO .....	13
MATERIAL Y MÉTODOS .....	14
Microorganismos y plásmidos empleados en esta investigación. ....	14
Estrategias de amplificación y clonación de genes que codifican para proteínas de fimbrias F17 de <i>A. paragallinarum</i> . ....	15
Amplificación por PCR de los genes de interés .....	16
Digestión del vector de clonación pBluescript II KS (-) y del vector de expresión pQE-30 o pQE-32. ....	18
Ligación y transformación .....	20
Inducción de proteínas recombinantes .....	21
Purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad en columnas de sefarosa-níquel .....	22
RESULTADOS .....	23
Microorganismos y plásmidos empleados en esta investigación. ....	23

Amplificación y clonación de genes que codifican para proteínas de fimbrias F17 en <i>A. paragallinarum</i> . .....	24
Ligación y transformación en pBluescript II KS (-). .....	25
Digestión del vector de expresión pQE-30/pQE-32 y de los fragmentos en las construcciones pBT-1, pBT-2 y pBT-3. ....	28
Ligaciones en pQE-30 y pQE-32 y transformación en <i>E. coli</i> M15 .....	30
Mapas de las construcciones en pQE-30 y pQE-32. ....	32
Análisis por alineamiento de las secuencias de los insertos contenidos en los plásmidos de expresión PQT-1, PQT-2 y PQT-3. ....	37
Inducción de proteínas recombinantes .....	40
DISCUSIÓN .....	47
CONCLUSIONES.....	51
REFERENCIAS.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cultivos de <i>A. paragallinarum</i> en base de agar con 10% de sangre de ovino con colonia nodriza de <i>Staphylococcus epidermidis</i> . Colonias dependientes de NAD.....	2
<b>Figura 2.</b> Grados de severidad de la CI en aves inoculadas experimentalmente y observadas al segundo día post-infección. ....	4
<b>Figura 3.</b> Arreglo genético del operón que codifica para fimbrias F17.....	8
<b>Figura 4.</b> Dibujo esquemático del ensamble de fimbrias F17 por la vía de CU. ....	9
<b>Figura 5.</b> Esquema de trabajo .....	13
<b>Figura 6.</b> Esquema que muestra el arreglo de los genes en el operón fimbrial de <i>A. paragallinarum</i> .....	16
<b>Figura 7.</b> Mapa del vector de clonación pBluescript II KS (-).....	19
<b>Figura 8.</b> Mapas de los vectores pQE-30 y pQE-32. ....	19
<b>Figura 9.</b> DNA plasmídico de pBluescript II KS (-).....	23
<b>Figura 10.</b> Productos de la amplificación de los genes que codifican para proteínas fimbriales en <i>A. paragallinarum</i> . ....	24
<b>Figura 11.</b> Productos de las segundas amplificaciones de los genes que codifican para proteínas de la fimbria F17 en <i>A. paragallinarum</i> con la enzima <i>Pfx</i> . ....	25
<b>Figura 12.</b> Transformantes de <i>E. coli</i> con los genes de proteína estructural y adhesina.....	26
<b>Figura 13.</b> Mapa de las construcciones obtenidas con el plásmido pBluescript II KS (-) digerido con <i>EcoRV</i> y ligado con los fragmentos de DNA obtenidos con <i>Pfx</i> ...	26

<b>Figura 14.</b> Análisis de digestión con las enzimas <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III, de las construcciones pBT-1, pBT-2 y pBT-3 para comprobar la presencia del inserto. .	27
<b>Figura 15.</b> Análisis por amplificación tipo PCR de las construcciones pBT-1, pBT-2 y pBT-3 para comprobar la presencia del inserto.....	28
<b>Figura 16.</b> DNA plasmídico de los vectores de expresión. ....	29
<b>Figura 17.</b> Perfil de restricción de los plásmidos aislados de las clonas pBT-1, pBT-2 y pBT-3.....	29
<b>Figura 18.</b> Análisis de amplificadós de fragmentos de DNA que albergan los genes que codifican para proteínas fimbriales en <i>A. paragallinarum</i> en la construcción pQT-1 Y pQT-3.....	30
<b>Figura 19.</b> Análisis de restricción con las enzimas <i>Pst</i> I/ <i>Hind</i> III o <i>Bam</i> HI/ <i>Kpn</i> I para verificar la presencia del inserto.....	31
<b>Figura 20.</b> Análisis para la verificación de fragmentos de los genes que codifican para proteínas fimbriales en <i>A. paragallinarum</i> en la construcción PQT-2.....	31
<b>Figura 21.</b> Análisis de restricción del plásmidos pQT-2 con las enzimas <i>Bam</i> HI/ <i>Kpn</i> I para comprobar la presencia del inserto. ....	32
<b>Figura 22.</b> Mapa de las construcciones obtenidas con el plásmido pQE-30 y pQE-32, se indican los sitios <i>Pst</i> I/ <i>Hind</i> III para la adhesina (1137 pb), y <i>Bam</i> HI/ <i>Kpn</i> I para el gen estructural (993 pb) respectivamente. ....	33
<b>Figura 23.</b> Análisis de la secuencia del plásmido pQT-1. ....	34
<b>Figura 24.</b> Análisis de la secuencia del plásmido pQT-2. ....	35
<b>Figura 25.</b> Análisis de la secuencia del plásmido pQT-3. ....	36

<b>Figura 26.</b> Alineamiento de la secuencia de DNA que codifica para la adhesina (en la cepa 2015), en la construcción pQT-1 vs la secuencia del mismo gen reportado en GenBank para <i>A. paragallinarum</i> cepa 2015.....	37
<b>Figura 27.</b> Alineamiento de las secuencias de DNA que codifican para la proteína estructural (de la cepa 2015), en la construcción pQT-2 vs la secuencia reportada en GenBank para el mismo gen de <i>A. paragallinarum</i> cepa 2015. ....	38
<b>Figura 28.</b> Alineamiento de las secuencias de DNA que codifican para la proteína estructural (de la cepa 6), en la construcción pQT-3 vs la secuencia reportada en GenBank para el gen de <i>A. paragallinarum</i> cepa 2015.....	39
<b>Figura 29.</b> Inducción de proteínas en cepa M15 control, M15 (pQE-32) y construcción pQT-2. ....	40
<b>Figura 30.</b> Resultado de la inducción de proteínas de pQT-2 con 5 medios de cultivo: LB, TSB, TB, BHI y caldo nutritivo.....	41
<b>Figura 31.</b> Resultado de la inducción de proteínas de pQT-2 en tres diferentes medios; LB, TSB y caldo nutritivo con inductor IPTG a 1mM. Las muestras se analizaron a las 3 horas de la inducción. ....	42
<b>Figura 32.</b> Efecto del IPTG sobre la producción de proteínas en pQT-2. ....	43
<b>Figura 33.</b> Resultado de la inducción de proteínas en TSB, con lactosa al 2% como inductor.....	44
<b>Figura 34.</b> Proteínas totales de <i>E. coli</i> M15 (pQT-2), después de 5 horas de inducción en medio TSB, con 2% de lactosa como inductor.....	45
<b>Figura 35.</b> Resultado de la purificación de proteínas por afinidad a sepharosa-níquel. ....	45

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Cepas de <i>A. paragallinarum</i> .....	14
<b>Tabla 2.</b> Cepas de <i>E. coli</i> .....	14
<b>Tabla 3.</b> Plásmidos utilizados y obtenidos en este trabajo.....	15
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos utilizados en la amplificación de genes que codifican para dos proteínas de la fimbria F17 en <i>A. paragallinarum</i> CL. ....	16
<b>Tabla 5.</b> Componentes para la reacción de PCR.....	17
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de PCR para los oligonucleótidos del gen de la proteína adhesina o estructural. ....	17

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Micromolar
<i>A. paragallinarum</i>	<i>Avibacterium paragallinarum</i>
a.a.	Aminoácidos
Amp	Ampicilina
BHI	Infusión cerebro corazón
C	Citocina
CI	Coriza infecciosa
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CU	Chaperona usher
D.O.	Densidad óptica
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
G	Guanina
<i>G. anatis</i>	<i>Gallibacterium anatis</i>
h	Hora
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranósido
kDa	KiloDalton
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
M.P.M.	Marcador de peso molecular
mg	Miligramos
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnesio
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar

NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
ONPG	Orto-nitrofenil-galacto piranósido
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
RTX	Toxina con repeticiones de secuencias-“Repeat in toxin”
s/i	Sin inducir
TB	Terrific Broth
TSB	Caldo soya tripticaseína
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranósido

## RESUMEN

*Avibacterium paragallinarum* es el agente causal de la coriza infecciosa, la cual provoca pérdidas económicas significativas en la industria avícola en todo el mundo. Para reducir los daños asociados con esta enfermedad es esencial el diagnóstico rápido y preciso, lo mismo que el desarrollo de vacunas y métodos más precisos de genotipificación. En *A. paragallinarum*, se han identificado varios factores de virulencia importantes tales como el antígeno de hemaglutinina, la cápsula, el lipopolisacárido, la toxina RTX, la toxina de distensión citoletal y las proteínas fimbriales. La investigación de estos factores de virulencia es importante para aumentar la comprensión de los mecanismos subyacentes en la patogenicidad producida por *A. paragallinarum*, es por ello que este trabajo se centró en validar la existencia de genes que codifican fimbrias tipo F17 en el genoma de cepas de *A. paragallinarum*. La parte inicial correspondió a la identificación por PCR de tres genes que codifican para proteínas fimbriales tipo F17. Los fragmentos de DNA amplificados se clonaron en el plásmido vector pBluescriptII KS (-), utilizando como cepa hospedera a *E. coli* DH5 $\alpha$ . Los fragmentos se subclonaron posteriormente en el vector de expresión pQE-30 para el gen de la adhesina y pQE-32 para el gen de la proteína estructural, utilizando como cepa hospedera a *E. coli* M15. Se obtuvieron tres construcciones que corresponden a las secuencias de *A. paragallinarum* del operón *fff*: 1) pQT-1 con un inserto de 1137 pb del gen que codifica para la proteína adhesina de 379 a.a. de la cepa 2015; 2) pQT-2 con un inserto de 1080 pb del gen que codifica para la proteína estructural de 360 a.a. de la cepa 2015; 3) pQT-3 con un inserto de 1086 pb del gen que codifica para la proteína estructural de 362 a.a. de la cepa 6. Se realizó el proceso de inducción de proteínas modificando algunas variables como: concentración del inductor (0.25mM, 0.5mM, 1mM, 1.5mM, 2mM y 3mM), cepa de expresión (M15 o SG13009), fuente de carbono y nitrógeno (Terrific Broth, LB, tripticaseína, infusión cerebro corazón y caldo nutritivo) y el inductor (IPTG o lactosa 2%). Los mejores resultados se obtuvieron con el inductor lactosa al 2% y como fuente medio de cultivo caldo soya tripticaseína. Las proteínas inducidas y esperadas se purificaron por cromatografía de afinidad en columnas de

níquel y elución por gradiente de imidazol obteniéndose muy poca proteína posiblemente por toxicidad para la célula hospedera.

## INTRODUCCIÓN

### ¿Qué es *Avibacterium paragallinarum*?

Esta bacteria es el agente causal de la coriza infecciosa (CI), un germen Gram negativo, anteriormente nombrado *Haemophilus paragallinarum* (Blackall, Christensen, Beckenham, Blackall, & Bisgaard, 2005). La mayoría de los aislamientos de *A. paragallinarum* aglutinan eritrocitos de pollo y los antígenos son conocidos como hemoaglutininas, con gran valor para predecir su virulencia (Soriano-Vargas, Sánchez-Morales, Morales-Erasto, & García-Sánchez, 2013).

Los aislamientos de *A. paragallinarum* muestran crecimiento simbiótico con una cepa nodriza y un requisito para su crecimiento *in vitro* es tener condiciones de 5-10% de CO<sub>2</sub>. La reacción de catalasa es negativa. La reacción de fosfatasa es variable mientras la prueba ONPG es negativa. Estas bacterias producen ácido a partir de D-mannitol y D-sorbitol, pero no a partir de glicerol, D-arabitol, L-arabinosa, D-arabinosa, meso-inositol, D-galactosa, lactosa, trehalosa o rafinosa. La producción de ácido de D-ribosa, D-xilosa, L-fucosa, maltosa y dextrina es variable. La cepa CL de *A. paragallinarum* tiene un estimado de 2,410,835 pb y contenido de G+C de 41.3 % (Horta-Valerdi et al., 2017). Empleando la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, actualmente se reconocen tres serogrupos: A, B y C, con nueve serovariedades distribuidas de la siguiente manera: A-1, A-2, A-3, A-4; B-1; C-1, C-2, C-3 y C-4 (Soriano-Vargas & Terzolo, 2004).

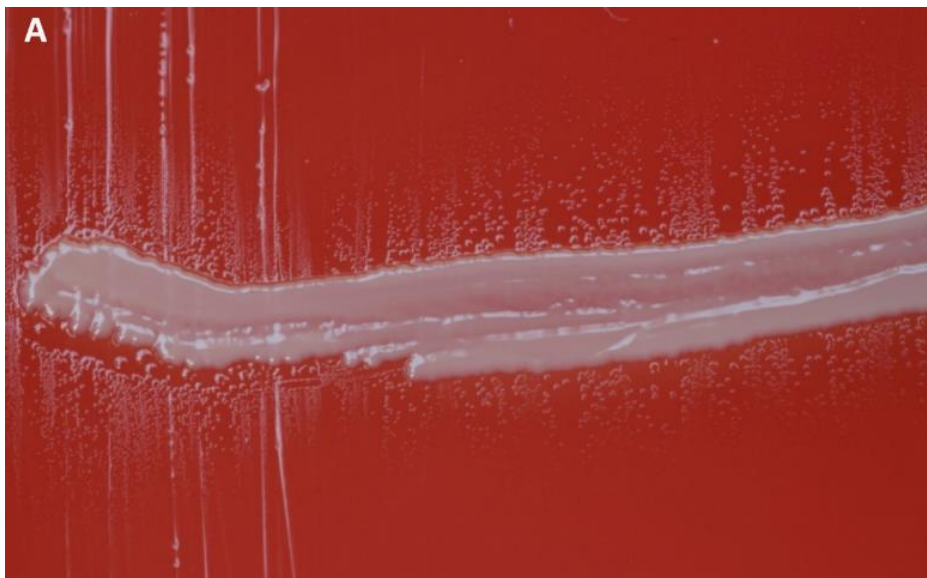
En muchas especies bacterianas la síntesis de dinucleótido de adenina nicotinamida (NAD, por sus siglas en inglés, nicotinamide adenine dinucleotide; o factor V) ocurre inicialmente a partir del ácido quinolínico o por la vía del ácido nicotínico (Foster & Moat, 1980). Algunos miembros de la familia *Pasteurellaceae*, a la cual pertenece *A. paragallinarum*, no tienen estas vías de biosíntesis de NAD y deben obtenerlo directamente del medio o a partir de precursores. Para el cultivo de *A. paragallinarum*, los medios son complementados con NAD o se incorpora una estría nodriza de *Staphylococcus epidermidis* para liberar algunos de sus precursores (Soriano-Vargas et al., 2013).

## Organismo fastidioso

*A. paragallinarum* es una bacteria de crecimiento lento, la mayoría de las cepas requieren factor V para su crecimiento (Christensen, Blackall, & Bisgaard, 2016). Es una bacteria delicada, que muere rápidamente fuera de los tejidos del huésped. La supervivencia fuera del cuerpo del ave de granja no es más de 48 horas a 18-24°C (Blackall & Hinz, 2008).

## Características del cultivo

*A. paragallinarum* es una bacteria no móvil por flagelo, presenta morfología cocobacilar con tendencia a la formación de cadenas cortas y algunos filamentos (Terzolo, 2000). Las colonias tienen forma de gotas de rocío de 0.3 mm a 1 mm de diámetro (Kume *et al.*, 1983) con tendencia a degeneración morfológica después de un período de incubación de más de 24 horas (Blackall & Hinz, 2008). En cultivos en caldo, es frecuente observar formas pleomórficas e inclusive bacterias degradadas que aparecen como si fueran manchas de colorantes (Terzolo, 2000).



**Figura 1.** Cultivos de *A. paragallinarum* en base de agar con 10% de sangre de ovino con colonia nodriza de *Staphylococcus epidermidis*. Colonias dependientes de NAD.

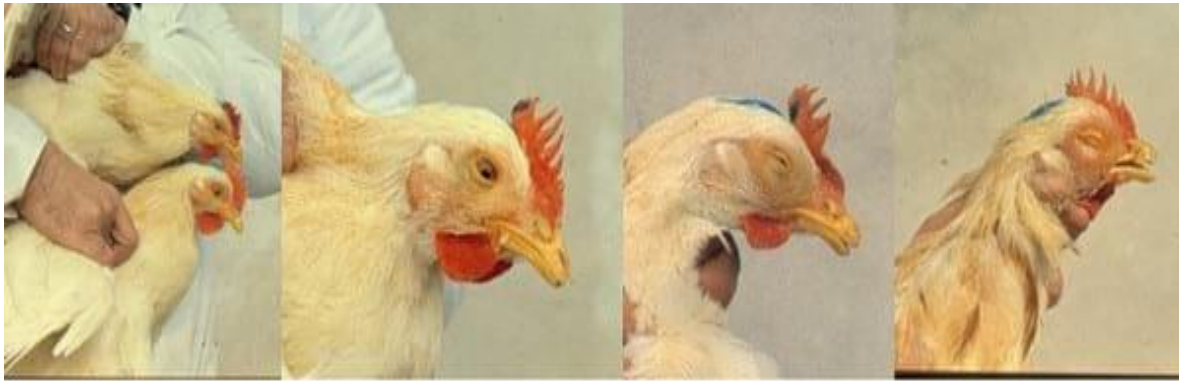
Imagen tomada de: Soriano-Vargas, E., Sánchez-Morales, J., Morales-Erasto, V., & García-Sánchez, A. (2013).

## **Coriza infecciosa.**

La coriza infecciosa (CI) es una enfermedad contagiosa y aguda del tracto respiratorio superior, de pollos y gallinas (*Gallus gallus*), también se ha reportado su presencia en órganos no respiratorios, como el hígado, bazo y riñón (Droual *et al.*, 1990). Una enfermedad respiratoria complicada puede desarrollarse cuando se asocia con otros patógenos. La enfermedad está limitada a pollos y no es relevante para la salud pública (Blackall & Hinz, 2008). La principal fuente de infección es por aves portadoras. Al requerir de pocos organismos para la infección, se puede transmitir al beber agua contaminada por secreciones nasales y por medios aéreos en distancias cortas (Blackall & Hinz, 2008).

### Signos clínicos

La enfermedad se caracteriza por una rápida diseminación, alta morbilidad y baja mortalidad. El período de incubación es 1-3 días después de la infección por contacto y todas las aves susceptibles de la parvada mostrarán signos dentro de 7-10 días. Si no se complica con otras infecciones, el curso de la enfermedad no es más de aproximadamente 10 días en la forma leve y aproximadamente 3 semanas en la forma más grave. Los primeros signos típicos incluyen secreción nasal y ocular seromucosa y edema facial. En casos severos, se puede observar conjuntivitis con ojos cerrados, barbillas hinchadas (enfermedad de la zarza) y dificultad para respirar (Blackall & Hinz, 2008).



**A**

**B**

**C**

**D**

**Figura 2.** Grados de severidad de la CI en aves inoculadas experimentalmente y observadas al segundo día post-infección.

**A.** Grado 0. (ave inferior) sin lesiones y Grado 1 (ave superior) con leve conjuntivitis.

**B.** Grado 2. Conjuntivitis con el ojo parcialmente cerrado e hinchazón de zona periorbital y senos paranasales.

**C.** Grado 3. Conjuntivitis con el ojo parcialmente cerrado, párpados no adheridos e hinchazón notable de la zona periorbital y senos paranasales.

**D.** Grado 4. Conjuntivitis con el ojo totalmente cerrado, párpados adheridos e hinchazón muy severa de la zona periorbital y senos paranasales.

Imagen obtenida de: Soriano-Vargas, E., & Terzolo, H.-R. (2004).

### Control de la coriza infecciosa

Mejoras en el manejo de las aves como, reducción de la población de aves, buena higiene, adecuada bioseguridad y el evitar que las granjas tengan poblaciones de diferentes edades, pueden reducir el ciclo de la enfermedad. Para eliminar al agente de una granja, es necesario despoblar la pollada infectada, ya que estas aves siguen siendo un reservorio del agente bacteriano. Después de limpiar, desinfectar y descansar el edificio durante al menos 1 semana, pueden introducirse nuevas aves. Sólo los pollos que se sabe que están libres de *A. paragallinarum* se deben utilizar para la repoblación. Esto puede ser inviable en las granjas con población de diferentes edades (Blackall & Hinz, 2008).

## **Daño económico en la industria avícola**

A nivel mundial, *A. paragallinarum* se encuentra distribuida en varios países como: Australia, Bulgaria, Canadá, Egipto, Gran Bretaña, Holanda, India, Indonesia, Iraq, Suiza, China, Japón, Alemania, debido a que es más común en países con una industria avícola desarrollada. En Estados Unidos se ha informado la presencia de esta bacteria en California, Alabama y Oregón. Se considera exótica en Nueva Zelanda, único país que parece estar libre de *A. paragallinarum* (Luna, 2010).

En México, Argentina, Guatemala, Brasil se han encontrado cepas de *A. paragallinarum* A, B y C. En Argentina y Brasil se han distinguido cepas A variantes. Las cepas B de Argentina son genéticamente distintas a otras cepas del mundo de cualquier serovariedad, mientras que las cepas C de éste mismo país según investigaciones que se han realizado, no tienen protección cruzada (Luna, 2010). En México se han registrado brotes en Sonora, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Puebla, Yucatán (Soriano-Vargas & Terzolo, 2004).

Se puede ver que esta enfermedad es de importancia económica en todo el mundo, afecta tanto a pollos de engorda como a gallinas ponedoras, la enfermedad se manifiesta principalmente con una caída en la producción de huevos ( $10 \pm 40\%$ ) en lotes de ponedoras y retraso del crecimiento, debido a la disminución de consumo de alimento y agua (Blackall, 1995). La CI provoca importantes pérdidas económicas asociadas a la baja productividad, el aumento de la mortalidad hasta un 48% y una reducción de hasta el 75% de la producción de huevos (Calderón, Thomas, Morales-Erasto, Salgado-Miranda, & Soriano-Vargas, 2010).

La CI puede tener un impacto significativo en los pollos de engorda (Blackall & Soriano-Vargas, 2013). En California, 2 casos de CI, una complicada por la presencia de *Mycoplasma synoviae*, causaron mayores sacrificios, principalmente debido a la aerosaculitis, que variaron entre 8,0% -15% (Droual et al., 1990). En Alabama, un brote de CI en pollos de engorda que no se complicó con ningún otro agente infeccioso causó una tasa de morbilidad del 69.8%, virtualmente todo debido a la aerosaculitis. (Hoerr, Putnam, Rowe-Rossmann, Cowart, & Martin., 1994)

## Vacunación contra CI

### ¿Porque es mejor vacunar?

Para controlar la enfermedad de CI se prefiere utilizar la vacunación, esto es debido a que representa un menor costo y no deja rastros químicos, en la producción de huevo y carne.

Diversas sulfonamidas y antibióticos son útiles para aliviar los peores efectos de la enfermedad. Después de 5-7 días de tratamiento, los signos clínicos a menudo desaparecen por completo, pero pueden producirse recaídas después de suspender el tratamiento. Esto se debe a que el medicamento es incapaz de eliminar a *A. paragallinarum* de todas las aves en una gran población. Los signos clínicos no desaparecen por completo hasta que se ha desarrollado una inmunidad específica en la mayoría de las aves afectadas del lote. La recuperación de la producción de huevos se ve semanas después de la desaparición de los signos clínicos de CI. (Blackall & Hinz, 2008).

La vacunación utilizando células completas inactivadas (bacterinas) que contienen un adyuvante puede proteger a los pollos contra la enfermedad. Dicha vacuna proporciona inmunidad específica de serogrupo pero no protegerá hacia otros serogrupos; es decir, una vacuna que contiene el serovar A (serogrupo A de Kume) no protegerá contra el serovar C (serogrupo C de Kume). Existe evidencia de que la protección cruzada dentro de las serovariedades B y C (equivalente a los serogrupos B y C de Kume) puede ser limitada, posiblemente requiriendo el uso de más de una cepa en la vacuna para estos serogrupos. Si una bacterina comercial no puede inducir una inmunidad protectora, se debe usar una bacterina autógena. La vacunación apropiada es económicamente rentable, ya que generalmente protege contra las caídas más severas en la producción de huevos. Se recomiendan dos dosis de vacuna, cada una de las cuales debe consistir en al menos 108 unidades formadoras de colonias, administradas por vía subcutánea con una separación de 3 a 6 semanas. El momento de administración de las dosis de vacuna está entre las 12 y 16 semanas de edad (Blackall & Hinz, 2008).

## Factores de virulencia

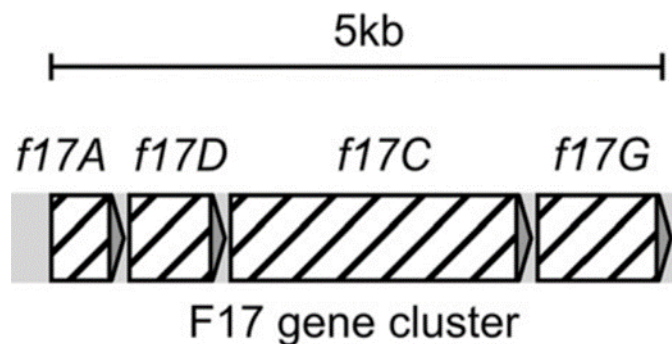
La patogenicidad es la capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un huésped susceptible. La virulencia es un término cuantitativo que define el grado en que un patógeno puede causar enfermedad; esto a menudo está relacionado con el número de microorganismos que se requieren para causar la infección o la frecuencia de infección en una población dada y los determinantes de virulencia de la cepa. Los mecanismos de patogenicidad están mediados por factores de virulencia, estos son mecanismos con los que cuenta un microorganismo que le permiten entrar al hospedero, invadir los tejidos y provocar enfermedad. La ausencia de estos atenúa la virulencia del microorganismo (Forrellad et al., 2013).

Se han identificado varios factores de virulencia en *A. paragallinarum*, incluyendo el antígeno de hemaglutinina (Wang et al., 2014), la cápsula (Tu et al., 2014), el lipopolisacárido (Chiang et al., 2013), la toxina RTX (repeat in toxin) (Pan et al., 2012), y la toxina de distensión citoletal (Chen et al., 2013). La investigación de estos factores de virulencia es importante para aumentar la comprensión de los mecanismos subyacentes a la patogenicidad de *A. paragallinarum* (Liu et al., 2016).

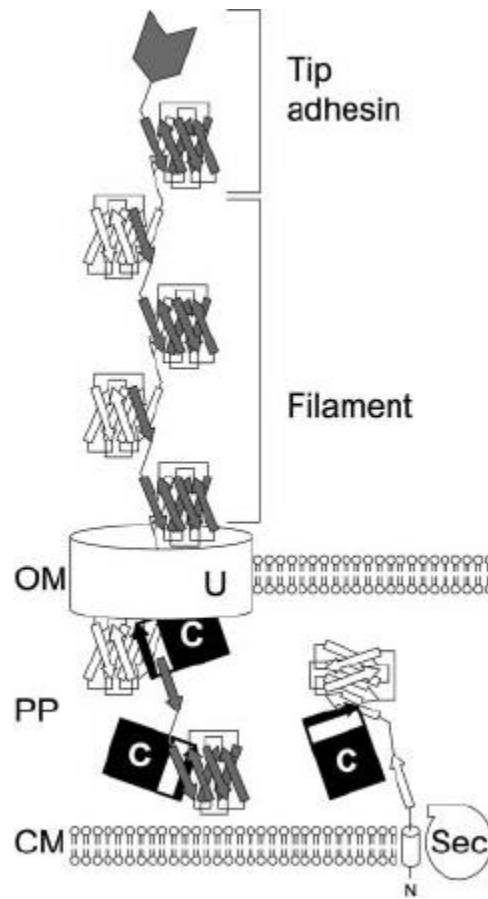
La adherencia a la mucosa ciliada del tracto respiratorio superior es el primer paso de la infección de CI. La cápsula y el antígeno de hemaglutinación juegan un papel importante en la colonización. Las sustancias tóxicas liberadas del organismo durante la proliferación se asocian con la producción de lesiones en la mucosa y la aparición de los signos clínicos. La cápsula puede actuar como defensa natural ante bactericidas. *A. paragallinarum* es un agente bacteriano no invasivo con un fuerte tropismo para las células ciliadas y migra hacia el tracto respiratorio inferior (pulmones, saco aéreo) solo después de la interacción sinérgica con otros agentes infecciosos y/o si es alentado por la inmunosupresión (Blackall & Hinz, 2008).

## Fimbrias tipo F17

Las fimbrias son filamentos proteicos expresados en la superficie de muchas bacterias patógenas. Estos filamentos están involucrados en la adhesión bacteriana a las células del huésped y se consideran importantes para la virulencia (Connell et al., 1996). La ruta de chaperón-usher (CU) es común en el ensamblaje de fimbrias bacterianas (figura 4), Este ensamblaje requiere cuatro componentes proteicos: la subunidad fimbrial principal, la chaperona, la proteína usher y una proteína de adhesión (Wurpel, Beatson, Totsika, Petty, & Schembri, 2013)(Velázquez, 2017). Estudios previos mostraron que múltiples copias de CU pueden presentarse en un solo genoma bacteriano (Clegg, Wilson, & Johnson, 2011). La formación de las fimbrias F17 requiere de la expresión de un cluster de cuatro genes designados como *f17D*, *f17C*, *f17G* y *f17A* respectivamente (Lintermans et al., 1991).



**Figura 3.** Arreglo genético del operón que codifica para fimbrias F17. Imagen obtenida de: Bihannic et al. (2014).



**Figura 4.** Dibujo esquemático del ensamblaje de fimbrias F17 por la vía de CU. Imagen obtenida de: Nuccio & Bäumler (2007).

La punta de la adhesina codifica varios receptores que reconocen ligandos específicos en los tejidos del huésped. En consecuencia, la interacción de la fimbria CU con el huésped es altamente específica, y la expresión de las diferentes fimbrias puede estar asociada con diferentes etapas y sitios de la infección (Kudirkienė, Bager, Johnson, & Bojesen, 2014).

#### Estrategias de protección inmunológica contra *A. paragallinarum*.

Se identificó a la proteína de la subunidad fimbrial (FifA) F17 de *Gallibacterium* como un candidato prometedor que puede usarse para vacunar a las gallinas ponedoras (Bager et al., 2014). Los estudios *in vitro* utilizando células epiteliales de pollo, así como la infección animal demostraron que esta fimbria podría estar involucrado en la colonización de *G. anatis* del tracto respiratorio superior (Lucio et al., 2012) y así

jugar un papel importante en la patogénesis de los pollos (Bager et al., 2013). Las proteínas usher y chaperonas de las fimbrias CU, F1f, F1f1, F1f3 y F1f4 fueron similares a los encontrados en *Gallibacterium* cepa UMN179 y *A. paragallinarum* (Kudirkiene et al., 2014). La pérdida de F1fA disminuye la virulencia de *A. paragallinarum* y la inmunización con la proteína r-F1fA confiere al pollo protección contra *A. paragallinarum* (Liu et al., 2016). Se ha identificado F1fa como un factor de virulencia y una potencial vacuna antigénica de *A. paragallinarum* (Liu et al., 2016).

## JUSTIFICACIÓN

La CI produce importantes pérdidas económicas debido a que ocurre la reducción en la producción de huevo de hasta el 40%, el retraso de crecimiento y la pérdida de peso en pollos de engorde. Actualmente el uso de vacunas con algunos serotipos de células de *A. paragallinarum* inactivadas, son la mejor manera de controlar la enfermedad (Chukiatsiri K., *et al.*, 2009). Sin embargo, estas vacunas tienen la desventaja de inducir protección limitada a los serotipos incluidos en el biológico fabricado. Estudios recientes se han enfocado a obtener la secuencia del genoma y estudiarla como una importante fuente de información para tener una mejor comprensión de la biología de este patógeno. Con esta información se ha propuesto a las fimbrias como posibles factores de virulencia y posibles antígenos de vacunas contra las bacterias patógenas. Sin embargo, la función específica de las fimbrias de *A. paragallinarum* es conocida parcialmente. Por ello es importante realizar estudios de *A. paragallinarum* para conocer el contenido y la variedad de genes similares al operón *fff* y así determinar si las proteínas fimbriales pueden ser utilizadas como antígenos para mejorar la calidad de las vacunas contra la CI.

## **HIPÓTESIS**

*A. paragallinarum* contiene genes que codifican probables proteínas fimbriales, estas son probables factores de virulencia, y son similares a las de *Gallibacterium anatis*, por lo que son potenciales antígenos para la elaboración de vacunas.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

- Realizar la clonación de genes que codifican para proteínas fimbriales tipo F17 en *A. paragallinarum*, para la generación de proteínas recombinantes.

### **Objetivos específicos**

- Obtener amplificadores por PCR, de genes que codifican para proteínas fimbriales tipo F17 en *A. paragallinarum*, de cepas aisladas de campo.
- Realizar la clonación de los genes amplificados en *E. coli*.
- Hacer la expresión de tres proteínas fimbriales tipo F17 de *A. paragallinarum* en *E. coli*.
- Realizar la purificación de proteínas por medio de cromatografía de afinidad

## ESQUEMA DE TRABAJO

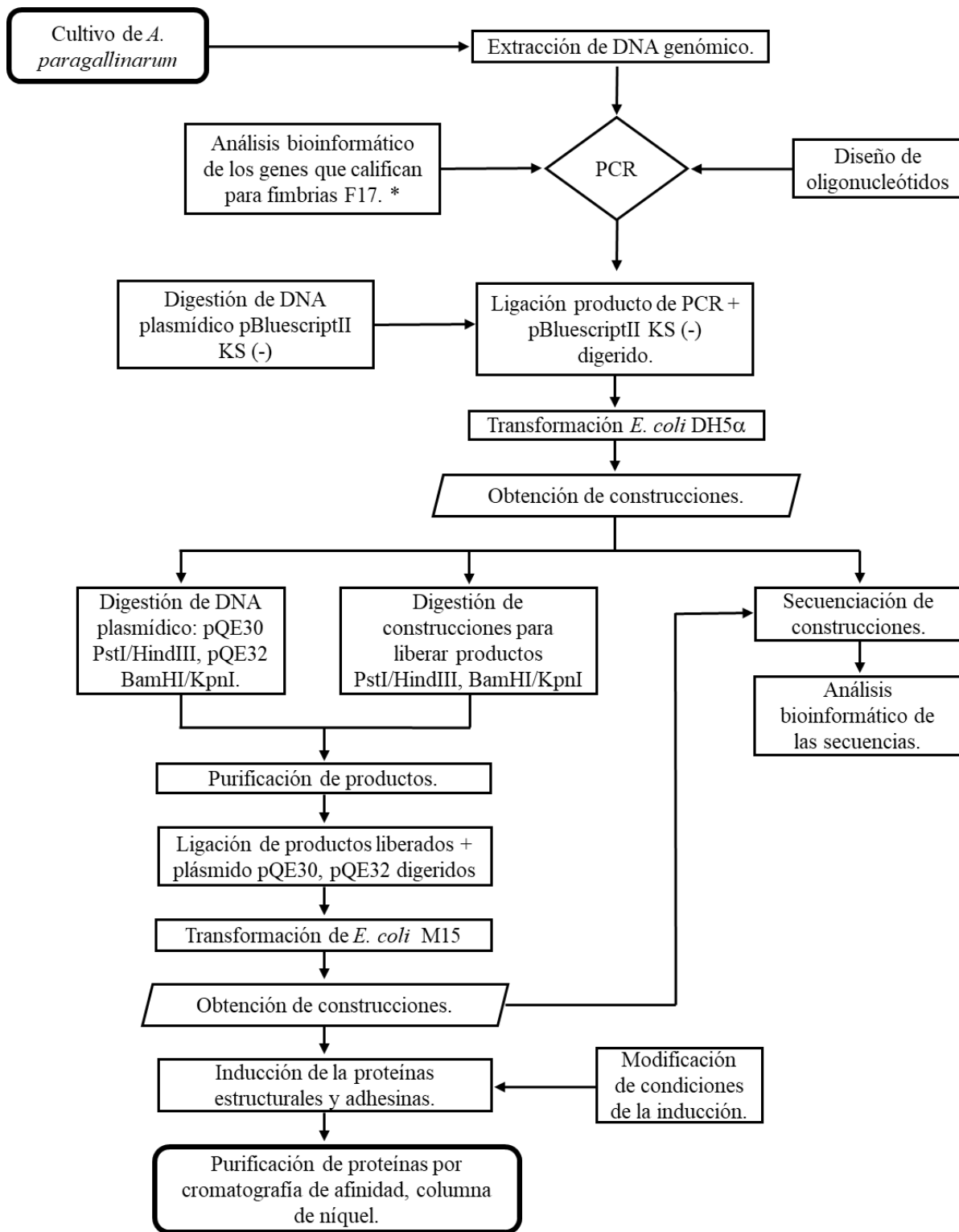


Figura 5. Esquema de trabajo

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Microorganismos y plásmidos empleados en esta investigación.

Las cepas de *A. paragallinarum* utilizadas en este trabajo, su origen y Biovar se indican en la tabla 1. Las cepas de *E. coli* utilizadas y sus características se muestran en la tabla 2. En la tabla 3 se muestran los plásmidos utilizados en la clonación y los obtenidos en este trabajo.

**Tabla 1.** Cepas de *A. paragallinarum*

Cepa	Origen	Biovar
2015	Aislado de campo	NAD dependiente
CL	Aislado de campo	NAD dependiente
6	Aislado de campo	NAD dependiente
7	Aislado de campo	NAD dependiente

**Tabla 2.** Cepas de *E. coli*

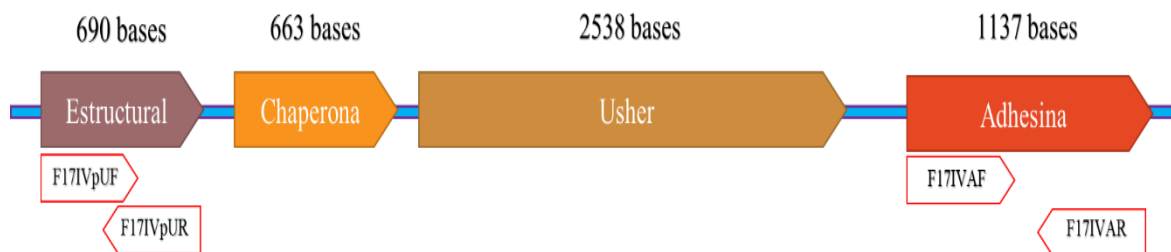
Cepa	Características relevantes	Fuente
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>gal<sup>-</sup> phoA supE44 <math>\lambda^-</math> thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
M15	F <sup>-</sup> , $\Phi$ 80 <i>lacM15</i> , <i>thi</i> , <i>lac<sup>-</sup></i> , <i>recA<sup>+</sup></i> , KmR	Qiagen

**Tabla 3.** Plásmidos utilizados y obtenidos en este trabajo

Plásmidos	Características	Origen
pBluescriptII KS (-)	ColE1, LacZ <sup>+</sup> , Amp <sup>r</sup>	Stratagene
pQE-30	Etiqueta N-terminal 6xHis, Amp <sup>+</sup>	Qiagen
pQE-32	Etiqueta N-terminal 6xHis, Amp <sup>+</sup>	Qiagen
pBT-1	pBluescriptII KS(-) – proteína adhesina1 de Avpg 2015	Este trabajo
pQT-1	pQE-30 – proteína adhesina 1 de Avpg 2015	Este trabajo
pBT-2	pBluescriptII KS(-) – proteína estructural 1 de Avpg 2015	Este trabajo
pQT-2	pQE-32 – proteína estructural 1 de Avpg 2015	Este trabajo
pBT-3	pBluescriptII KS(-) – proteína estructural 2 de Avpg 6	Este trabajo
pQT-3	pQE-32– proteína estructural 2 de Avpg 6	Este trabajo

### **Estrategias de amplificación y clonación de genes que codifican para proteínas de fimbrias F17 de *A. paragallinarum*.**

A partir del genoma reportado por Horta, *et al.*, en el 2015 para *A. paragallinarum* cepa CL, se elaboró un esquema de los probables operones fimbriales. Para ello se tomó en consideración identidad, de la secuencia conservada de la proteína usher, con lo cual se dedujeron dos probables operones. Las secuencias de los genes del operón fimbrial también se alinearon con las secuencias de los genes descritos en *G. anatis* UMN179, encontrándose similitud entre ambas secuencias. Con base a esta información se construyó el esquema de la Figura 6, donde se observa la organización de un operón fimbrial *fff* de la cepa CL de *A. paragallinarum*.



**Figura 6.** Esquema que muestra el arreglo de los genes en el operón fimbrial de *A. paragallinarum*.

Cada fragmento especifica el tipo de proteína para el que codifica, así como el tamaño de bases del gen. Los recuadros rojos inferiores indican los oligonucleótidos utilizados para obtener la amplificación de los genes que codifican las probables proteínas estructurales y adhesinas.

La estrategia de investigación de este trabajo consistió en amplificar por PCR las secuencias de las proteínas estructurales y adhesinas de los operones fimbriales para su posterior clonación y secuenciación para su identificación. Los oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones por PCR empleando DNA genómico total de *A. paragallinarum* ya se habían diseñado en la investigación de Velázquez Valtierra en 2017 y forman parte de la colección del laboratorio de Microbiología Molecular y Celular CIMC-ICUAP. Las características de estas moléculas se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos utilizados en la amplificación de genes que codifican para dos proteínas de la fimbria F17 en *A. paragallinarum* CL.

Gen	Operón fimbrial	Tamaño esperado	Tamaño obtenido	Oligonucleótidos
Adhesina	<i>fff</i>	1137 pb	1137 pb	F17IVA F: ATG AAA GGG AAA ATA ATT CA
				F17IVA R: TCA ATC ATA ATA AAT ATT GT
Proteína estructural	<i>fff</i>	690pb	1086 pb	F17IVPu F: TTG AAA TTT TTT TCA CCA TC
				F17IVPu R: TCA GTT TTT TAA ATC TAA CA

### Amplificación por PCR de los genes de interés

La identificación por amplificación inicial (PCR) de los genes de la proteína estructural y de la adhesina se hizo con la enzima *Taq* DNA polimerasa, utilizando el DNA genómico de los aislados de campo de *A. paragallinarum* con los oligonucleótidos de la tabla 4. Para la clonación posterior se utilizó la enzima DNA

polimerasa de alta fidelidad *Pfx* (Invitrogen®). Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador Biorad®, adicionando los componentes que se muestran en la tabla 5, las condiciones de tiempo y temperatura de reacción para cada par de oligonucleótidos se muestran en la tabla 6.

**Tabla 5.** Componentes para la reacción de PCR.

Polimerasa	Componentes de reacción
Taq DNA polimerasa	Agua piSA® esteril Buffer 10X para Taq DNA polimerasa MgCl <sub>2</sub> (50µM) Mix de dNTP's(10µM) Oligonucleótido delantero (10µM) Oligonucleótido reverso (10µM) DNA genómico <i>A. paragallinarum</i> (100µg) Enzima Taq DNA polimerasa.
<i>Pfx</i> DNA polimerasa	Agua piSA® esteril Buffer 10X para <i>Pfx</i> DNA polimerasa MgSO <sub>4</sub> (50µM) Mix de dNTP's(10µM) Oligonucleótido delantero (10µM) Oligonucleótido reverso (10µM) DNA genómico <i>A. paragallinarum</i> (100µg) Enzima <i>Pfx</i> DNA polimerasa.

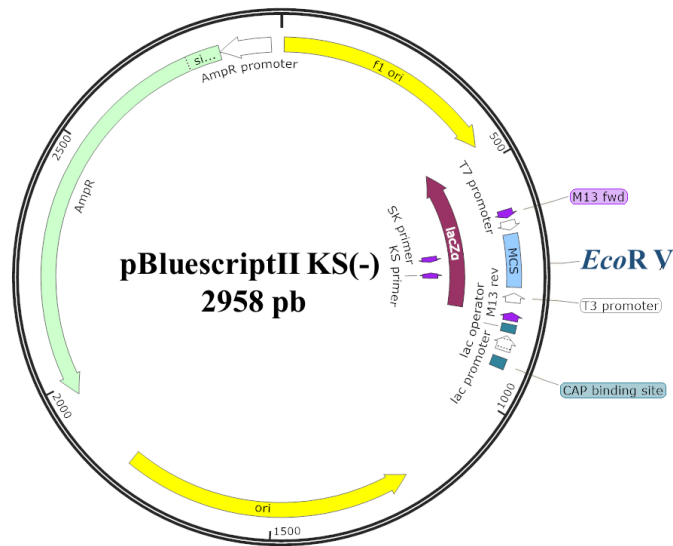
**Tabla 6.** Condiciones de PCR para los oligonucleótidos del gen de la proteína adhesina o estructural.

Gen	Condiciones			
Adhesina	Desnaturalización	4 minutos	94°C	} 28 ciclos
	Desnaturalización	30 segundos	94°C	
	Alineación	30 segundos	41.9°C	
	Elongación	2 minutos	72°C	
	Elongación final	4 minutos	72°C	
	Temperatura final	∞	15°C	
Estructural	Desnaturalización	4 minutos	94°C	} 28 ciclos
	Desnaturalización	30 segundos	94°C	
	Alineación	30 segundos	43.6°C	
	Elongación	2 minutos	72°C	
	Elongación final	4 minutos	72°C	
	Temperatura final	∞	15°C	

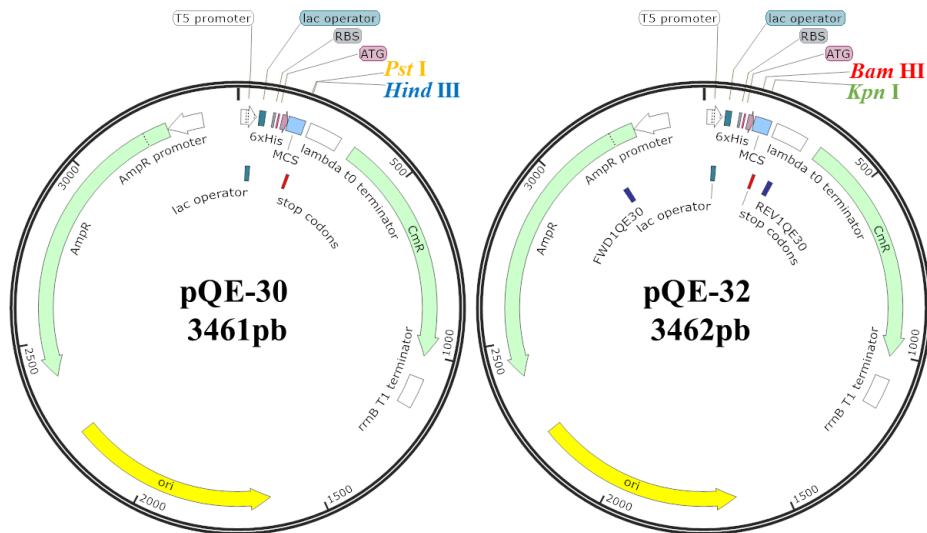
## **Digestión del vector de clonación pBluescript II KS (-) y del vector de expresión pQE-30 o pQE-32.**

El DNA del vector de clonación pBluescript II KS (-) purificado a partir de cultivos de *E. coli* DH5 $\alpha$  se usó para la digestión en la secuencia única *EcoRV* (GATATC) del vector con la enzima de restricción específica (Invitrogen<sup>®</sup>), como se muestra en la figura 7. La digestión se llevó a cabo por medio de 1  $\mu$ l de enzima *EcoRV* (10 unidades), 3  $\mu$ l de buffer D, 1  $\mu$ l de DNA plasmídico (equivalente a 1 microgramo de DNA) y agua destilada PISA<sup>®</sup> en un volumen final de 30  $\mu$ l. La mezcla se homogeneizó suavemente y se incubó durante 3 horas a 37°C.

Para el caso de los plásmidos que contenían los productos de PCR clonados en el vector pBluescript II KS (-), se extrajo el DNA plasmídico de las colonias transformantes de *E. coli* DH5 $\alpha$  que contenían el producto de interés, y se hicieron digestiones dobles utilizando las enzimas que se muestran en la figura 8. Para las reacciones se colocó agua PISA estéril, 3  $\mu$ g de DNA, para el primer caso de pQE-30 y el inserto que codifica la adhesina se utilizaron 30 unidades de cada una de las enzimas *Pst*I y *Hind*III (equivalente a 3  $\mu$ l) con buffer 4 de Invitrogen. Para el caso de pQE-32 y el inserto que codifica la proteína estructural se utilizaron 30 unidades de cada una de las enzimas *Bam*HI y *Kpn*I (equivalente a 3  $\mu$ l), en presencia del buffer 2.



**Figura 7.** Mapa del vector de clonación pBluescript II KS (-). Este se utilizó para hacer las clonaciones de los genes que codifican las proteínas adhesina y estructurales de la fimbria F17 de *A. paragallinarum*. En la imagen se puede observar el sitio de restricción *EcoRV* utilizado para abrir el plásmido y posteriormente ligar los fragmentos de DNA de interés amplificados por PCR.



**Figura 8.** Mapas de los vectores pQE-30 y pQE-32. Se indican los sitios de restricción utilizados para hacer la subclonación con los fragmentos de DNA que codifican la proteína adhesina o estructural de la fimbria F17 de *A. paragallinarum*.

Las digestiones totales de DNA y los productos purificados se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, teñido con Bromuro de etidio y se visualizaron en el transiluminador de luz UV (UVP®).

Para disminuir el fondo de vector sin inserto y hacer la purificación de DNA linealizado de vectores e insertos, se hicieron electroforesis preparativas. El producto linealizado, localizado con ayuda del marcador de peso molecular, se retiró del gel con un escalpelo. El DNA contenido en el trozo de gel de agarosa se recuperó por el método freeze-squeeze (Tautz and Renz, 1983, Analytical Biochemistry) y precipitación con etanol frío y acetato de sodio. El procedimiento se llevó a cabo sobre cortes de agarosa conteniendo los fragmentos derivados de DNA sometido a digestiones simples o dobles según fuera necesario para recuperar vectores o insertos específicos.

### **Ligación y transformación**

Los productos obtenidos de la amplificación con *Pfx* (Invitrogen®) se ligaron al vector pBluescript II KS (-), digerido con la enzima de restricción *EcoRV*. La reacción de ligación contenía 3 µl de buffer T4 ligasa, 1 µl (10U) de enzima T4-DNA ligasa, 100 ng de vector y 300 ng de inserto, (tomando en cuenta la proporción vector-inserto 1:3). La reacción de ligación se llevó a cabo a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) durante toda la noche.

Posteriormente se llevó a cabo la transformación de la cepa de *E.coli* DH5α con el vector de clonación pBluescript II KS (-) y *E. coli*. M15 para el caso del vector de expresión pQE-30/pQE-32. Las cepas mencionadas se prepararon como células competentes con el procedimiento químico descrito por Hanahan (1983). La transformación para ambas se hizo por la adición del 50% de la reacción de ligación de DNA en un volumen de células de 50 µl equivalente a  $1 \times 10^7$  UFC en frío durante 30 minutos y posterior choque térmico a 37°C durante 1 minuto. La mezcla de transformación fue agregada a 1 ml de medio LB sin antibiótico e incubada durante 1 hora a 37°C para posteriormente sembrarse en condiciones selectivas.

La selección de clonas recombinantes para el caso del DH5 $\alpha$ , se hizo por espatulado en cajas con medio LB gelificado que contenía ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ), 50  $\mu\text{l}$  de X-Gal (20mg/ml) y 5  $\mu\text{l}$  de IPTG (1mM). Las cajas inoculadas se incubaron por 24 horas a 37°C y se seleccionaron las colonias que tenían interrumpido el gen *LacZ*, por su aspecto de colonias blancas. Se corroboró que las clonas mantuvieran esta característica sembrándolas nuevamente en el mismo medio. Posteriormente se hizo la extracción del DNA plasmídico, se verificó la presencia de insertos específicos mediante PCR, digestión con la enzima *EcoRV* y secuenciación del DNA clonado utilizando primers universales.

Para el caso de las transformaciones con M15, las mezclas se sembraron en medio LB con ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ), y kanamicina (50  $\mu\text{g/ml}$ ) y se incubaron a 37°C por 24 horas. Las colonias que crecieron que adquirieron el plásmido con la resistencia a ampicilina, se verificaron mediante PCR y digestión con *Pst*I y *Hind*III para el caso del gen de la proteína adhesina, o *Bam*HI y *Kpn*I para el gen de la proteína estructural

### **Inducción de proteínas recombinantes**

Se determinó una cinética de crecimiento de las clonas candidatas para llevar a cabo la inducción de proteínas, utilizando medio LB líquido a 37°C en agitación constante empleando como inductor IPTG 1mM. El ensayo se hizo con las colonias que contenían el gen de la proteína estructural clonado en el vector de expresión pQE-32, y se corrieron como controles la cepa M15 y M15 (pQE-32 vacío). Se tomaron muestras previamente a la colocación del inductor en cultivos con una DO=0.5 a 600nm y cada hora durante las primeras 6 horas de inducción y una más a las 24 horas.

Se hicieron modificaciones por separado de algunas variables para la inducción como: la concentración del inductor (0.25mM, 0.5mM, 1.5mM, 2mM y 3mM), la cepa de expresión (M15 o SG13009). Para el caso de la fuente de carbono y nitrógeno, se probaron cinco medios: LB, Terrific Broth(TB), soya tripticaseína(TSB), infusión

cerebro corazón(BHI) y caldo nutritivo. Para el cambio del inductor se optó por Lactosa a una concentración de 2%.

Las muestras de proteína elegidas inicialmente se trataron con lisozima (1mg/ml) durante 10 min a 37°C, se colocaron en hielo y se adicionó buffer 2X de carga con  $\beta$ - mercaptoetanol (5%). Las muestras tratadas se hirvieron por 10 min y luego se colocaron en hielo y se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida tipo SDS-PAGE al 10%.

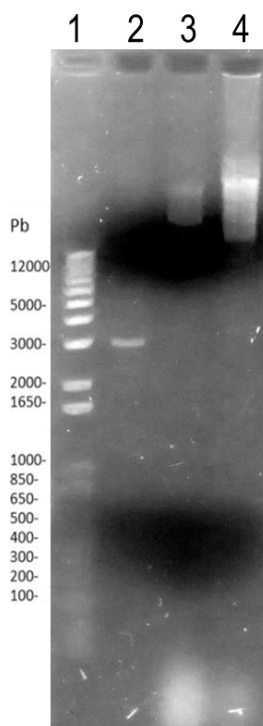
### **Purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad en columnas de sefarosa-níquel**

Un volumen 10 ml de cultivo de células inducidas se colectó, se centrifugó a 12 mil rpm y se recuperó el paquete celular. Las células se resuspendieron en 2 ml de buffer de fosfato de sodio 50 mM pH 7.7, cloruro de sodio 300 mM, imidazol 10 mM y Tritón X 100 al 0.03%. Las muestras se sonicaron a 1000W en hielo durante 3 minutos en intervalo de 5 segundos y 10 segundos de descanso. La muestra sonicada se centrifugó 10 min. a 4000 rpm., el sobrenadante se separó y se le adicionó 0.5 ml del gel de afinidad sefarosa-níquel. El gel con sobrenadante se agitó durante tres horas mezclando por inversión cada 30 min, la muestra se centrifugó a 11000 rpm por 1 minuto. Se quitó el sobrenadante del gel y agregó buffer de lavado (buffer de fosfato de sodio 50 mM pH 7.7, cloruro de sodio 300 mM, imidazol 50m M, Tritón al 0.03%), se agitó durante 5 min. por medio de inversiones. Se repitió la centrifugación a 11000 rpm. 1 minuto. Se quitó el sobrenadante y el lavado se repitió. Por último, se agregaron 100  $\mu$ l de buffer de elución (buffer de fosfato de sodio 50 mM pH 7.7, cloruro de sodio 300 mM, imidazol 250 mM) y se agitó durante 5 minutos. Al sobrenadante que contenía las proteínas purificadas se le agregó 1 volumen de buffer 2X de carga con  $\beta$ -mercaptoetanol (5%). Las muestras acondicionadas se desnaturalizaron por ebullición y enfriamiento y posteriormente se analizaron mediante electroforesis y tinción con azul de Coomassie de geles de poliacrilamida tipo SDS-PAGE al 10%.

## RESULTADOS

### Microorganismos y plásmidos empleados en esta investigación.

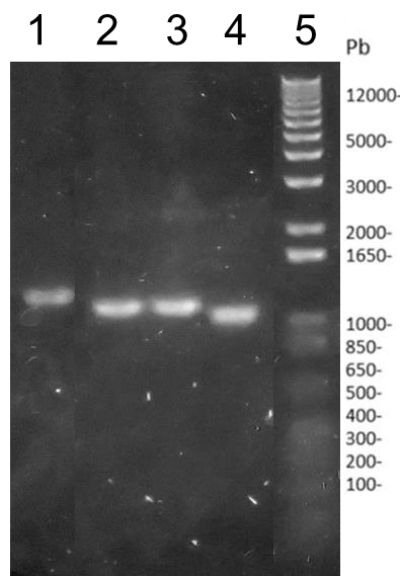
Se utilizaron varias muestras de DNA, que previamente que previamente se habían obtenido y purificado en el laboratorio, ya que *A. paragallinarum* es un organismo fastidioso y se requiere de experiencia en la extracción de DNA genómico de experiencia para la extracción del DNA genómico. Las cepas de *A. paragallinarum* utilizadas se enlistan en la tabla 1. Se obtuvo el DNA plasmidico del vector de clonacion pBluescript II KS (-) de 2958 pb, cuyo mapa se muestra en la figura 7. En la figura 9 se observa el vector de clonacion pBluescript II KS (-) sin digerir (carril 3 y 4), tambien se puede observar el plásmido digerido con la enzima *EcoRV* (carril 2). El vector abierto linealizado fue ligado con los productos de PCR de los genes que codifican para proteínas de la fimbria F17: adhesina y proteína estructural.



**Figura 9.** DNA plasmídico de pBluescript II KS (-).  
Carril 1: Marcador de Peso Molecular (M.P.M); carril 2: plásmido pBluescript II KS (-) digerido con la enzima *EcoRV*; carril 3 y 4: pBluescriptII KS (-) sin digerir.

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

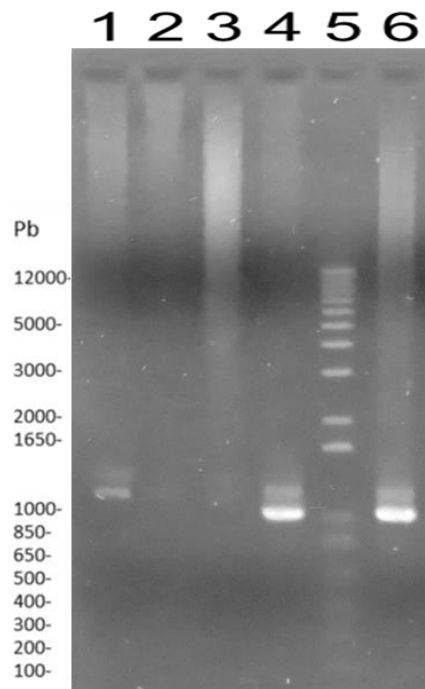
De acuerdo a las condiciones descritas en materiales y métodos, se obtuvieron los amplificadores de las cepas 2015, CL y 6 como se muestran en la figura 10, para este experimento se usó la enzima *Taq* DNA polimerasa y los oligonucleótidos de la tabla 4. En este experimento se obtuvieron amplificadores de los genes que codifican para la proteína estructural y adhesina de las fimbrias F17. En el caso del gen que codifica a la proteína adhesina se obtiene el tamaño esperado  $\approx 1137$ pb, tomando en cuenta el marcador de peso molecular, para el caso del gen que codifica para la proteína estructural se obtuvieron amplificadores de  $\approx 1000$  pb, 300 pb más que el tamaño esperado (690 pb).



**Figura 10.** Productos de la amplificación de los genes que codifican para proteínas fimbriales en *A. paragallinarum*.

Carril 5: marcador de peso molecular; carril 1: gen que codifica para la proteína adhesina en la cepa 2015; carril 2 y 3: gen que codifican para la proteína estructural (690pb) de la cepa 2015 y 6 respectivamente; carril 4: gen de la proteína estructural (615pb) de la cepa CL.

Los productos de PCR elegidos fueron reamplificados con la enzima DNA polimerasa *Pfx* como se muestran en la figura 11, se obtuvieron tres: el gen que codifica para la proteína adhesina de la cepa 2015, y el gen que codifica para la proteína estructural de las cepas 2015 y 6, los cuales se utilizaron para hacer las ligaciones.

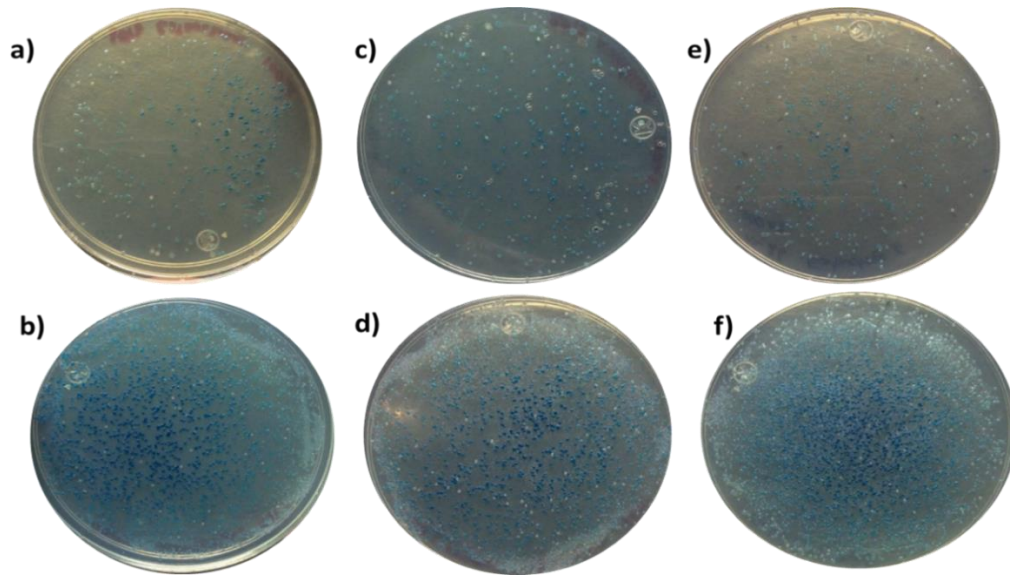


**Figura 11.** Productos de las segundas amplificaciones de los genes que codifican para proteínas de la fimbria F17 en *A. paragallinarum* con la enzima *Pfx*.

Carril 5: Marcador de peso molecular; carril 1: gen que codifican para la proteína adhesina de la cepa 2015; carril 2 y 3: resultado negativo para el gen que codifica para la proteína estructural en la cepa 6 y 7 respectivamente; carril 4: gen que codifican para la proteína estructural de la cepa 2015; carril 6: gen que codifican para proteína estructural de la cepa 6.

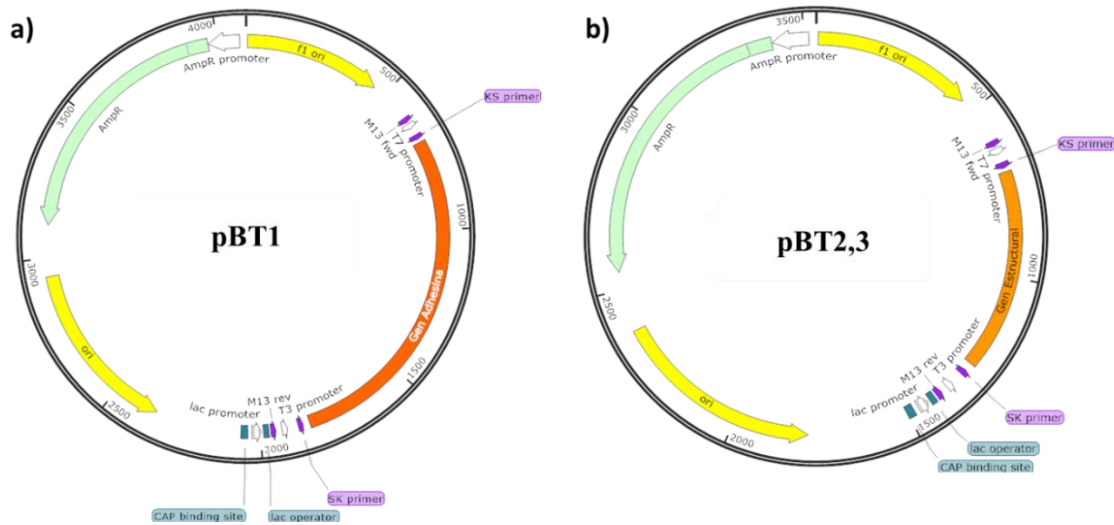
### Ligación y transformación en pBluescript II KS (-).

En el experimento de transformación del vector de clonación, se obtuvieron diferentes colonias, como se muestra en la figura 12. De estas se obtuvieron tres clones con los siguientes nombres: pBT-1, pBT-2 y pBT-3. Estas contienen los genes que codifican para la proteína adhesina de la cepa 2015, estructural de la cepa 2015 y estructural de la cepa 6, las construcciones se muestran en la figura 13.



**Figura 12.** Transformantes de *E. coli* con los genes de proteína estructural y adhesina.

**a) y b)** Células transformadas con la ligación de pBluescript II KS (-) y la proteína adhesina de la cepa 2015. **c) y d)** Células transformadas con la ligación de pBluescript II KS (-) y la proteína estructural de la cepa 2015. **e) y f)** Células transformadas con la ligación de pBluescript II KS (-) y la proteína estructural de la cepa 6.

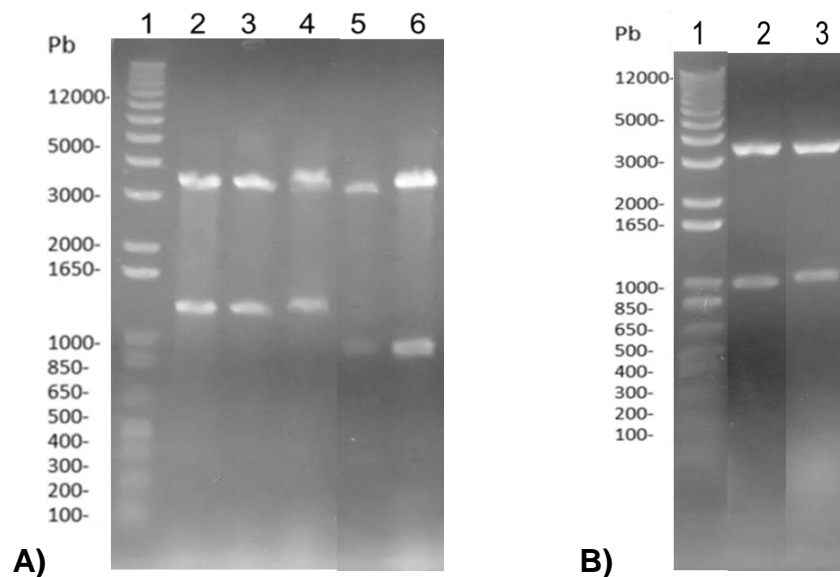


**Figura 13.** Mapa de las construcciones obtenidas con el plásmido pBluescript II KS (-) digerido con *EcoRV* y ligado con los fragmentos de DNA obtenidos con *Pfx*.

**a)** Construcción con el gen de la proteína adhesina de la cepa 2015. **b)** Construcción con el gen de la proteína estructural de la cepa 2015.

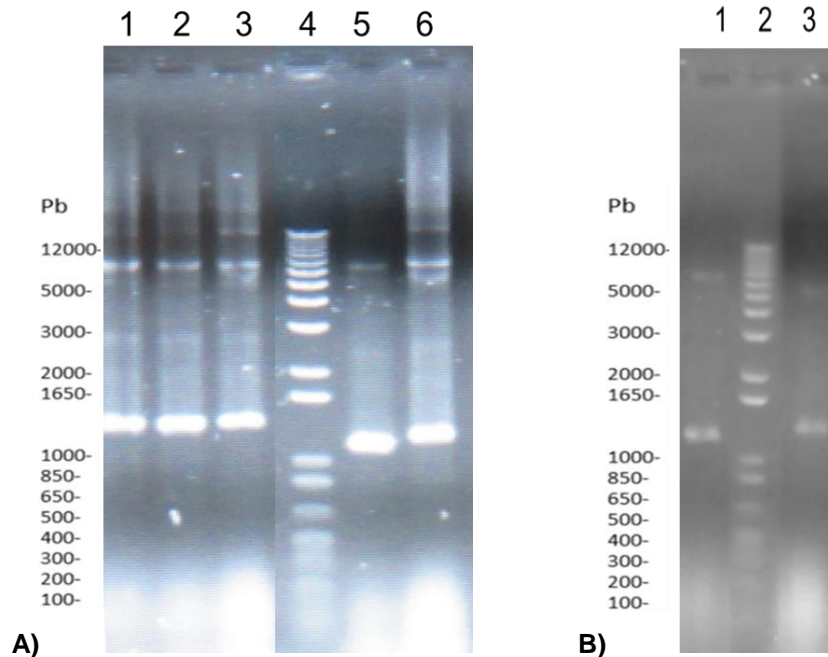
Las clonas obtenidas se verificaron para determinar la presencia del gen de interés, usando los mapas de la figura 13, mediante restricciones, los productos de las digestiones se muestran en la figura 14, y posteriormente por medio de amplificaciones tipo PCR, como se muestra en la figura 15.

Una vez confirmada la presencia de los insertos (figura 14), y correspondiendo la ubicación de la banda a los tamaños de los fragmentos: 1137 y 1086, las construcciones fueron enviadas a secuenciar y se realizó un análisis de las secuencias por comparación con los genes de la cepa referencia. Se determinó el número de bases del inicio del marco de lectura y con base en ello se eligió el vector apropiado para realizar la subclonación y la fusión traduccional. Deduciendo así la conveniencia de uso del vector pQE-30 para la construcción pBT-1 y pQE-32 para las construcciones pBT-2 y pBT-3.



**Figura 14.** Análisis de digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, de las construcciones pBT1, pBT2 y pBT3 para comprobar la presencia del inserto.

**A)** Carril 1: Marcador de peso molecular; carriles 2, 3 y 4 digestión de la construcción con el gen de la proteína adhesina en la cepa 2015; carriles 5 y 6: digestiones de las construcciones que contienen el gen de la proteína estructural en la cepa 2015. **B)** Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2 y 3 digestión de la construcción con el gen que codifica para la proteína estructural en la cepa 6.

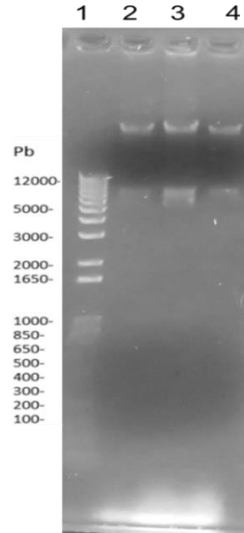


**Figura 15.** Análisis por amplificación tipo PCR de las construcciones pBT1, pBT2 y pBT3 para comprobar la presencia del inserto.

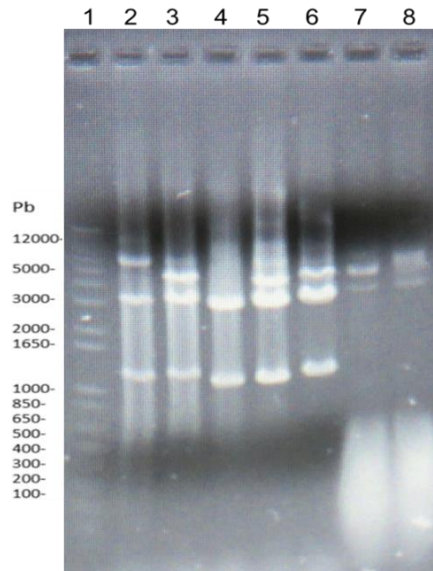
**A)** Carril 4. Marcador de peso molecular; carril 1, 2 y 3: amplificado del gen que codifica para la proteína adhesina de la cepa 2015; carril 5 y 6: amplificado del gen que codifica para proteína estructural de la cepa 2015. **B)** Carril 2: Marcador de peso molecular; carril 1 y 3: amplificado del gen que codifica para la proteína estructural de la cepa 6.

### Digestión del vector de expresión pQE-30/pQE-32 y de los fragmentos en las construcciones pBT-1, pBT-2 y pBT-3.

Se obtuvo el DNA de los plásmidos de expresión como se muestra en la figura 16, posteriormente se hicieron las digestiones de pQE-30 (figura 8) y de la construcción pBT-1 con las enzimas de restricción *Pst*I y *Hind*III (figura 13). También se hizo la digestión del plásmido pQE-32 (figura 8) y de las construcciones pBT-2 y pBT-3 (figura 13) con las enzimas *Bam*HI y *Kpn*I. Se extrajeron los productos de DNA linearizados de plásmidos e insertos a partir del gel de agarosa por freeze-squeeze (figura 17) y se usaron para la ligación de marcos de lectura abierto de los genes de interés con la secuencia reguladora y la etiqueta de 6Xhis del vector en una fusión traduccional.



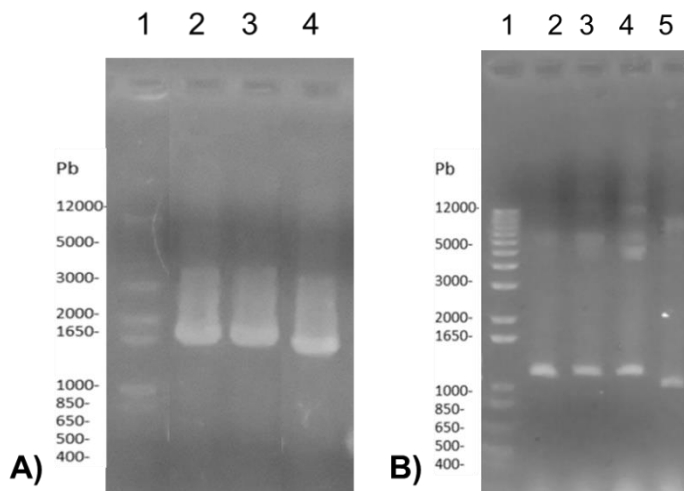
**Figura 16.** DNA plasmídico de los vectores de expresión.  
 Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: plásmido pQE-30; carril 3: plásmido pQE-31 carril 4: plásmido pQE-32.



**Figura 17.** Perfil de restricción de los plásmidos aislados de las clonas pBT1, pBT2 y pBT3.  
 Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: y 3: digestión con las enzimas *Pst*I/*Hind*III del plásmido pBT1; carril 4: digestión con las enzimas *Bam*HI/ *Kpn*I del plásmido pBT2; carril 5 y 6: digestión con las enzimas *Bam*HI/ *Kpn*I del plásmido pBT3; carril 7: digestión con las enzimas *Pst*I/*Hind*III del plásmido pQE-30; carril 8: digestión con las enzimas *Bam*HI/ *Kpn*I del plásmido pQE-32

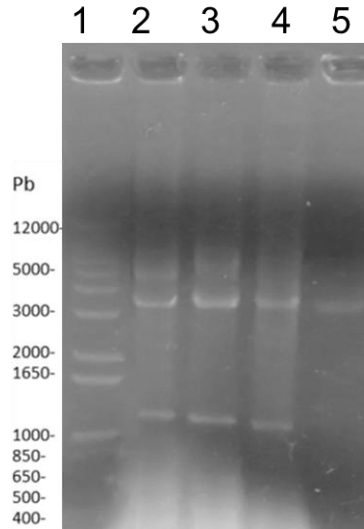
## Ligaciones en pQE-30 y pQE-32 y transformación en *E. coli* M15

Después de realizar la ligación de los fragmentos del gen que codifican para la proteína estructural o la adhesina con los correspondientes vectores de expresión pQE-30 y pQE-32, y su transformación en la cepa de expresión M15, se obtuvieron las construcciones pQT-1, pQT-2 y pQT-3. Dichas construcciones se corroboraron por medio de PCR, con dos juegos de primers, los específicos de pQE-30 (FWD1QE30/REV1QE30), y con los primers que alinean con el inserto (F17IVAF/F17IVAR), para el caso del gen de la proteína adhesina cuyos amplificadores se muestran en la figura 18, y con (F17IVPuF/F17IVPuR) para el gen de la proteína estructural, y cuyos amplificadores se pueden ver en la figura 20. También se hizo una verificación por digestión doble con enzimas de restricción *Pst*I/*Hind*III o *Bam*HI/*Kpn*I para observar el plásmido de expresión y el inserto liberado, como se muestra en las figuras 19 y 21. Una vez comprobado que el inserto se encontraba en el plásmido, al tener una banda del tamaño esperado para cada fragmento (1137 y 1086) la construcción se envió a secuenciar para observar en detalle los nucleótidos de la fusión.

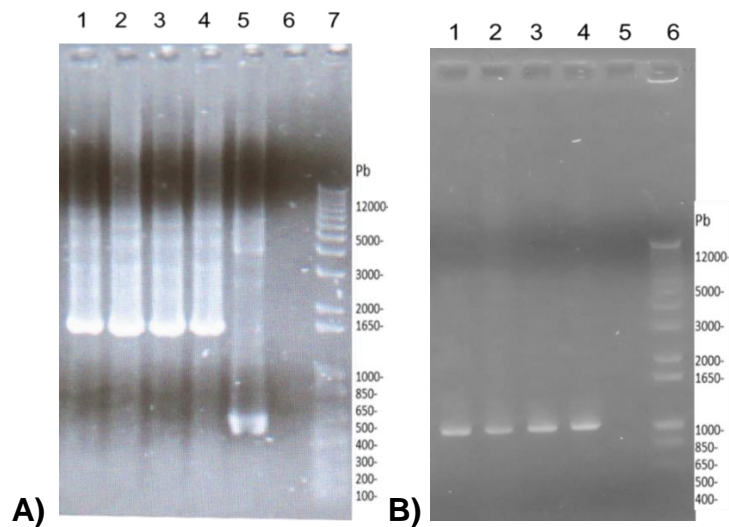


**Figura 18.** Análisis de amplificadores de fragmentos de DNA que albergan los genes que codifican para proteínas fimbriales en *A. paragallinarum* en la construcción pQT1 Y pQT3.

**A)** Amplificaciones obtenidas con los oligonucleótidos FWD1QE30/REV1QE30, Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2 y 3: clonas 40 y 41 (pQT1), carril 4: clona 36 (pQT3). **B)** Carril 1: marcador de peso molecular; carril 2, 3 y 4: fragmentos obtenidos con los oligonucleótidos F17IVAF/F17IVAR de las clonas 40, 41 y 42 (pQT1); carril 5: fragmentos obtenidos con los oligonucleótidos F17IVPuF/F17IVPuR, de la clona 36 (pQT3).

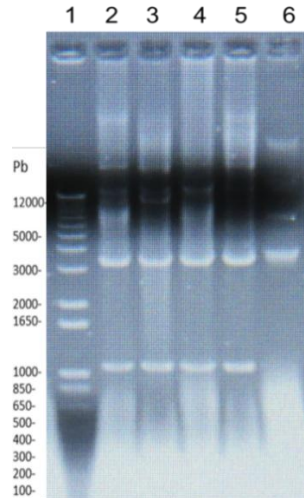


**Figura 19.** Análisis de restricción con las enzimas *PstI/HindIII* o *BamHI/KpnI* para verificar la presencia del inserto. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril: 2 y 3: clonas 40 y 41 (pQT1); carril 4: clona 36 (pQT2); carril 5: control plásmido pQE-32 sin inserto.



**Figura 20.** Análisis para la verificación de fragmentos de los genes que codifican para proteínas fimbriales en *A. paragallinarum* en la construcción PQT2.

**A)** Carril 1, 2, 3 y 4: amplificaciones obtenidas con los oligonucleótidos FWD1QE30/REV1QE30, de las clonas 1, 3, 8 y 10 obtenidas de la subclonación del gen que codifica para la proteína estructural en la cepa 2015.; carril 5: control amplificado del plásmido pQE-32 sin inserto; Carril 7: marcador de peso molecular. **B)** Carril 1, 2, 3 y 4: fragmentos obtenidos con los oligonucleótidos F17IVPuF/F17IVPuR, de las clonas 1, 3, 8 y 10 obtenidas de la subclonación del gen que codifica para la proteína estructural en la cepa 2015; carril 5: control plásmido pQE-30 sin inserto; carril 6: marcador de peso molecular.

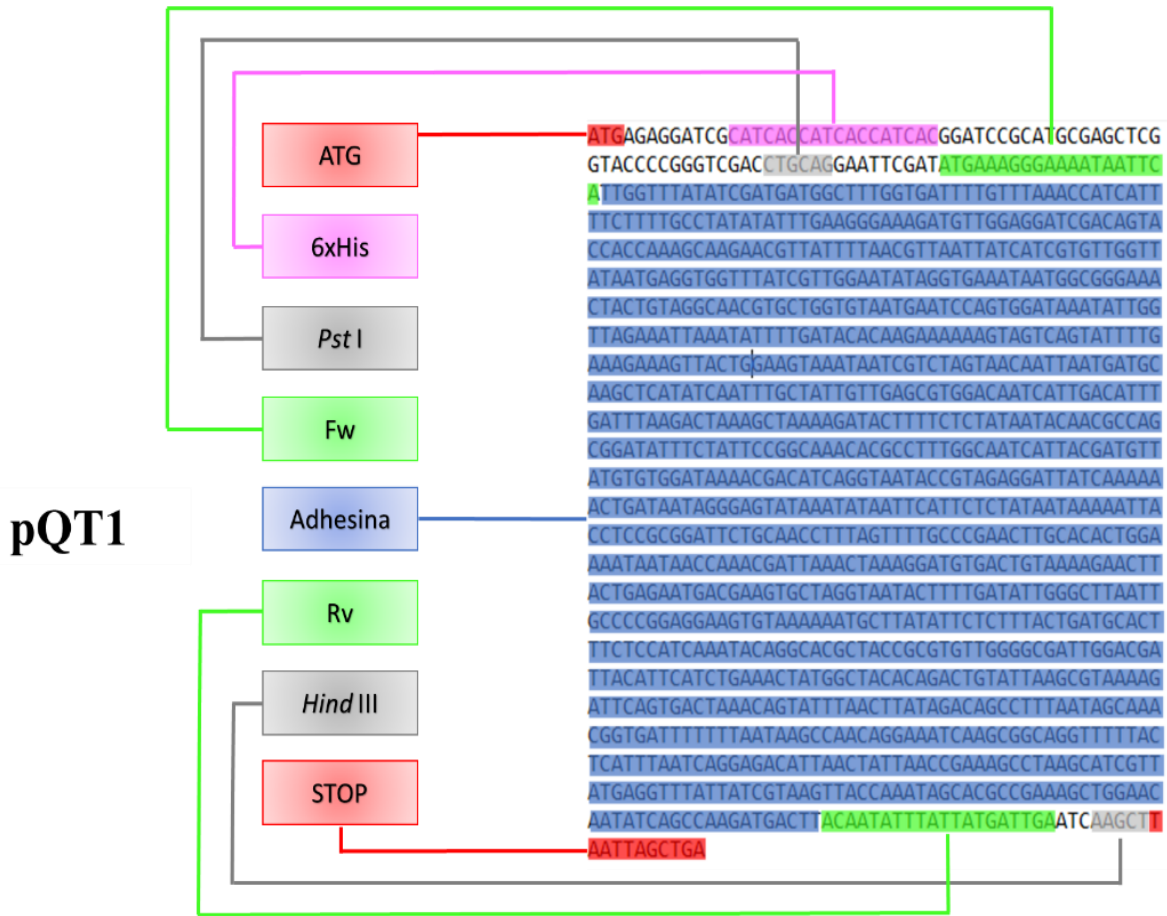


**Figura 21.** Análisis de restricción del plásmidos pQT2 con las enzimas *Bam*HI/*Kpn*I para comprobar la presencia del inserto. Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2, 3, 4 y 5: clonas 1, 3, 8 y 10, obtenidas de la subclonación (pQT2); carril 6: control plásmido pQE-32 sin inserto.

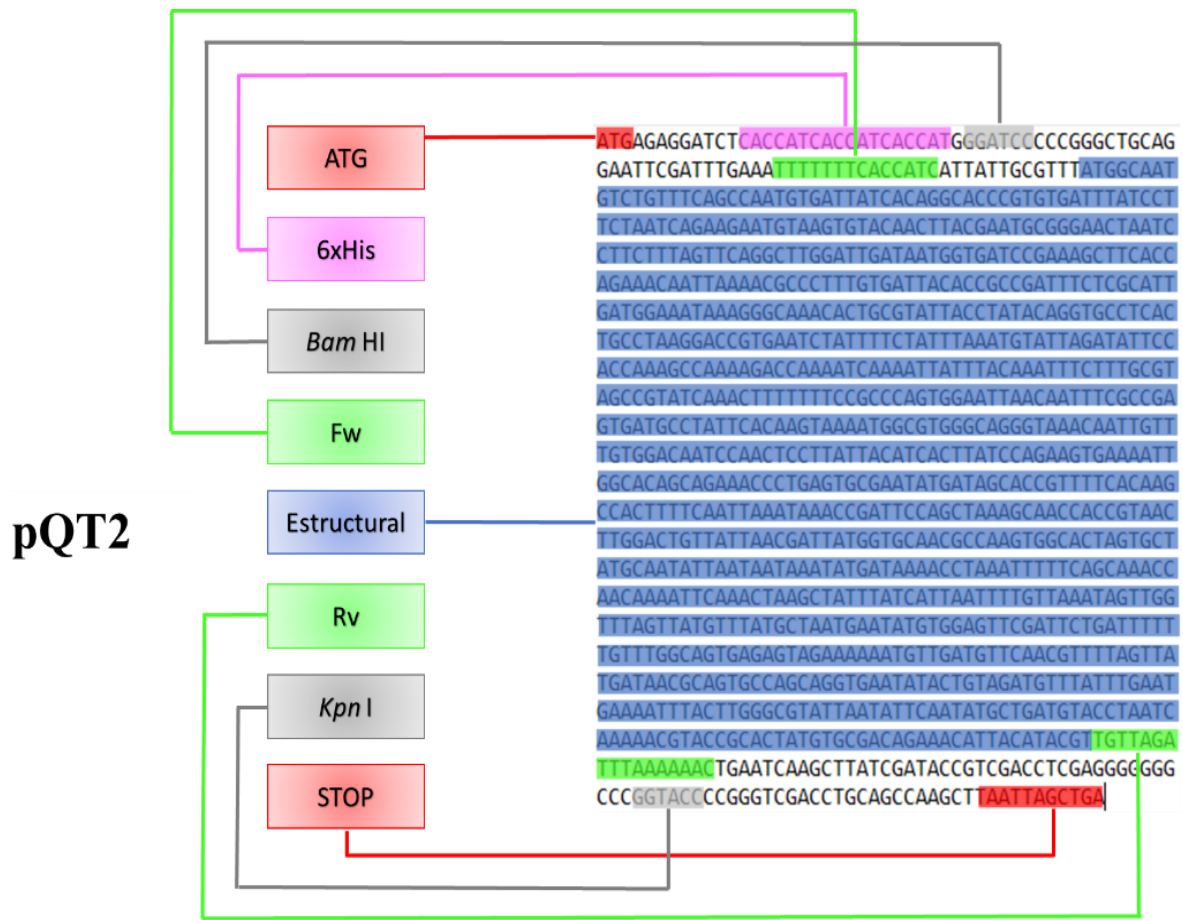
### **Mapas de las construcciones en pQE-30 y pQE-32.**

Se obtuvieron las siguientes construcciones (figura 22), las cuales se corroboraron con los datos obtenidos de la secuenciación.

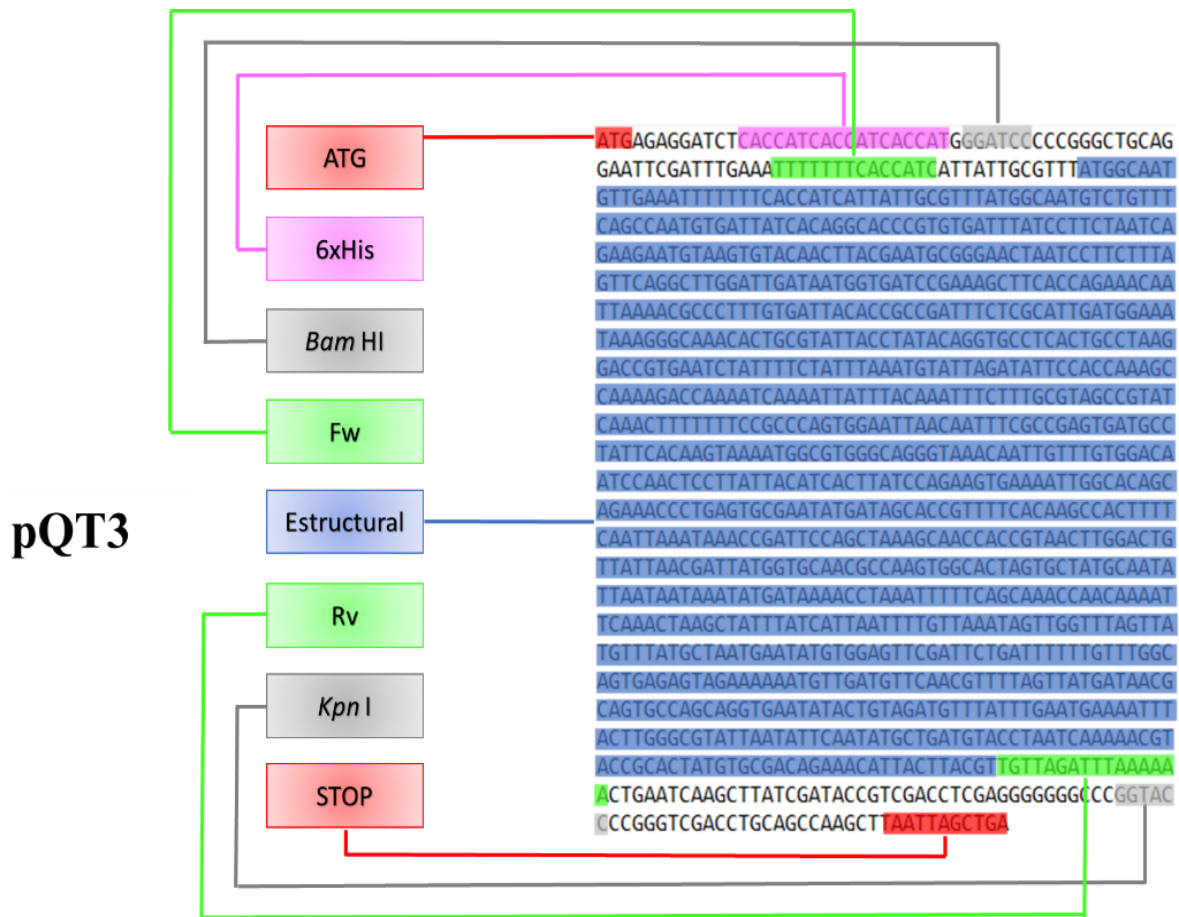




**Figura 23.** Análisis de la secuencia del plásmido pQT1. Diagrama en la que se señalan las características distintivas de la fusión traduccional entre pQE-30 y la secuencia del gen de la adhesina, se indican las secuencia: del codón ATG, secuencias histidínicas (6xHis), gen de interés, blancos de las enzimas de restricción utilizadas para la clonación, secuencia directa y reversa de los oligonucleótidos utilizados y el codón de paro.



**Figura 24.** Análisis de la secuencia del plásmido pQT2. Diagrama en la que se señalan las características distintivas de la fusión traduccional entre pQE-32 y la secuencia del gen de la proteína estructural, se indican las secuencia: del codón ATG, secuencias histidínicas (6xHis), gen de interés, blancos de las enzimas de restricción utilizadas para la clonación, secuencia directa y reversa de los oligonucleótidos utilizados y el codón de paro.



**Figura 25.** Análisis de la secuencia del plásmido pQT3. Diagrama en la que se señalan las características distintivas de la fusión traduccional entre pQE-32 y la secuencia del gen de la proteína estructural, se indican las secuencia: del codón ATG, secuencias histidínicas (6xHis), gen de interés, blancos de las enzimas de restricción utilizadas para la clonación, secuencia directa y reversa de los oligonucleótidos utilizados y el codón de paro.

## Análisis por alineamiento de las secuencias de los insertos contenidos en los plásmidos de expresión PQT-1, PQT-2 y PQT-3.

En la figura 26 se muestra el alineamiento hecho en Clustal omega, a la secuencia de nucleótidos clonada en la construcción pQT-1, del gen que codifica para la adhesina en *A. paragallinarum* de la cepa 2015, alineado respecto al gen reportado en GenBank para *A. paragallinarum* cepa 2015. La secuencia alineada tiene un tamaño de 1,137 pb, y muestra una identidad del 99% (1135/1137), con un E. value de 0.0 y no presenta gaps.

```

AVPG_2015_Adh      ATGAAAGGGAAAAAATTCATTGGTTTATATCGATGATGGCTTTGGTGATTTGTTTAAA 60
pQT1_Adh_2015     ATGAAAGGGAAAAAATTCATTGGTTTATATCGATGATGGCTTTGGTGATTTGTTTAAA 60
*****

AVPG_2015_Adh      CCATCATTTTCTTTTGCCCTATATATTTGAAGGGAAAGATGTTGGAGGATCGACAGTACCA 120
pQT1_Adh_2015     CCATCATTTTCTTTTGCCCTATATATTTGAAGGGAAAGATGTTGGAGGATCGACAGTACCA 120
*****

AVPG_2015_Adh      CCAAAGCAAGAAGCTTATTTTAAAGTAAATATCATCGTGTGGTTATAATGAGGTGGTT 180
pQT1_Adh_2015     CCAAAGCAAGAAGCTTATTTTAAAGTAAATATCATCGTGTGGTTATAATGAGGTGGTT 180
*****

AVPG_2015_Adh      TATCGTTGGAATATAGGTGAAATAATGCCGGGAAACTACTGTAGGCAACGTGCTGGTGT 240
pQT1_Adh_2015     TATCGTTGGAATATAGGTGAAATAATGCCGGGAAACTACTGTAGGCAACGTGCTGGTGT 240
*****

AVPG_2015_Adh      ATGAATCCAGTGGATAAATATGGTTAGAAATTAATATTTTGATACACAAGAAAAAAGT 300
pQT1_Adh_2015     ATGAATCCAGTGGATAAATATGGTTAGAAATTAATATTTTGATACACAAGAAAAAAGT 300
*****

AVPG_2015_Adh      AGTCAGTATTTTGAAGGAAGTTACTGGAAGTAAATAATCGTCTAGTAACAATTAATGAT 360
pQT1_Adh_2015     AGTCAGTATTTTGAAGGAAGTTACTGGAAGTAAATAATCGTCTAGTAACAATTAATGAT 360
*****

AVPG_2015_Adh      GCAAGCTCATATCAATTTGCTATTGTTGAGCGTGGACAATCATTGACATTTGATTAAGA 420
pQT1_Adh_2015     GCAAGCTCATATCAATTTGCTATTGTTGAGCGTGGACAATCATTGACATTTGATTAAGA 420
*****

AVPG_2015_Adh      CTAAGCTAAAAGATACTTTTCTCTATAATACAACGCCAGCGGATATTCTATTCGGCA 480
pQT1_Adh_2015     CTAAGCTAAAAGATACTTTTCTCTATAATACAACGCCAGCGGATATTCTATTCGGCA 480
*****

AVPG_2015_Adh      AACACGCCCTTTGGCAATCATTACGATGTTATGTGGATAAAACGACATCAGGTAATACC 540
pQT1_Adh_2015     AACACGCCCTTTGGCAATCATTACGATGTTATGTGGATAAAACGACATCAGGTAATACC 540
*****

AVPG_2015_Adh      GTAGAGSATATCAAAAAAC TGATAATAGGGAGTATAAAATAAATTCATCTCTATAATA 600
pQT1_Adh_2015     GTAGAGSATATCAAAAAAC TGATAATAGGGAGTATAAAATAAATTCATCTCTATAATA 600
*****

AVPG_2015_Adh      AAAATTACC TCCGCGGATCTGCAACCTTAGTTTGGCCGAACTTGACACATGGAAAAAT 660
pQT1_Adh_2015     AAAATTACC TCCGCGGATCTGCAACCTTAGTTTGGCCGAACTTGACACATGGAAAAAT 660
*****

AVPG_2015_Adh      AATAACCAAACGATTAACCTAAAGGATGTGACTGTAAAAGAACTTAATGAGAATGACGAA 720
pQT1_Adh_2015     AATAACCAAACGATTAACCTAAAGGATGTGACTGTAAAAGAACTTAATGAGAATGACGAA 720
*****

AVPG_2015_Adh      GTGCTAGGTAATACTTTTGATATGGGCTTAATTGCCCCGGAGGAAGTGAATAAATGCT 780
pQT1_Adh_2015     GTGCTAGGTAATACTTTTGATATGGGCTTAATTGCCCCGGAGGAAGTGAATAAATGCT 780
*****

AVPG_2015_Adh      TATATTCCTTTACTGATGCACCTTCCATCAAATACAGGACAGCTACCAGTGTGGG 840
pQT1_Adh_2015     TATATTCCTTTACTGATGCACCTTCCATCAAATACAGGACAGCTACCAGTGTGGG 840
*****

AVPG_2015_Adh      GCGATTGGACGATTACATTCATCTGAAACTATGGCTACACAGAGCTGATTAAGCGTAAAA 900
pQT1_Adh_2015     GCGATTGGACGATTACATTCATCTGAAACTATGGCTACACAGAGCTGATTAAGCGTAAAA 900
*****

AVPG_2015_Adh      GATTCAAGTAAACAGTATTTAACTTATAGACAGCCTTAATAGCAAAACGGTGATTTT 960
pQT1_Adh_2015     GATTCAAGTAAACAGTATTTAACTTATAGACAGCCTTAATAGCAAAACGGTGATTTT 960
*****

AVPG_2015_Adh      TTTAATAAGCCAACAGGAAATCAAGCGGCAGGTTTTACTCATTAAATCAGGAGACATTA 1020
pQT1_Adh_2015     TTTAATAAGCCAACAGGAAATCAAGCGGCAGGTTTTACTCATTAAATCAGGAGACATTA 1020
*****

AVPG_2015_Adh      ACTATTAAACGAAAGCCTAAGCATCGTTATGAGGTTTATATCGTAAGTTACCAAATAGC 1080
pQT1_Adh_2015     ACTATTAAACGAAAGCCTAAGCATCGTTATGAGGTTTATATCGTAAGTTACCAAATAGC 1080
*****

AVPG_2015_Adh      ACGCCGAAAGCTGGAACAAATACAGCCAGATGACTTACAATATTTATTGATTTGA 1137
pQT1_Adh_2015     ACGCCGAAAGCTGGAACAAATACAGCCAGATGACTTACAATATTTATTGATTTGA 1137
*****

```

**Figura 26.** Alineamiento de la secuencia de DNA que codifica para la adhesina (en la cepa 2015), en la construcción pQT1 vs la secuencia del mismo gen reportado en GenBank para *A. paragallinarum* cepa 2015.

En la figura 27 se muestra el alineamiento hecho en Clustal omega, a la secuencia de nucleótidos clonada en la construcción pQT-2, del gen que codifica para la proteína estructural en *A. paragallinarum* de la cepa 2015, alineado respecto al gen reportado en GenBank para *A. paragallinarum* cepa 2015. La secuencia alineada tiene un tamaño de 997 pb, y muestra una identidad del 99% (996/997), con un E. value de 0.0 y no presenta gaps.

```

AVPG.2015.Est      TTTTTCACCATCATTATTGCGTTTATGGCAATGCTGTTTCAGCCAATGTGATTATCA 60
pQT2.Est.2015     -----ATGGCAATGCTGTTTCAGCCAATGTGATTATCA 34
*****

AVPG.2015.Est      CAGGCACCCGTGTGATTTATCCTTCTAATCAGAAGAATGAAGTGTACAACCTACGAATG 120
pQT2.Est.2015     CAGGCACCCGTGTGATTTATCCTTCTAATCAGAAGAATGAAGTGTACAACCTACGAATG 94
*****

AVPG.2015.Est      CGGGAACTAATCCTTCTTTAGTTCAGGCTGGATTGATAATGGTGATCCGAAAGCTTCAC 180
pQT2.Est.2015     CGGGAACTAATCCTTCTTTAGTTCAGGCTGGATTGATAATGGTGATCCGAAAGCTTCAC 154
*****

AVPG.2015.Est      CAGAAACAATTAACGCCTTTGTGATTACACGGCCGATTTCTCGCATTGATGAAATA 240
pQT2.Est.2015     CAGAAACAATTAACGCCTTTGTGATTACACGGCCGATTTCTCGCATTGATGAAATA 214
*****

AVPG.2015.Est      AAGGGCAAACTGCGTATTACCTATACAGGTGCCCTACTGCCCTAAGGACCGTGAATCTA 300
pQT2.Est.2015     AAGGGCAAACTGCGTATTACCTATACAGGTGCCCTACTGCCCTAAGGACCGTGAATCTA 274
*****

AVPG.2015.Est      TTTTCTATTTAAATGATTAGATATTCACCAAGCCAAAAGACAAAATCAAATTTATT 360
pQT2.Est.2015     TTTTCTATTTAAATGATTAGATATTCACCAAGCCAAAAGACAAAATCAAATTTATT 334
*****

AVPG.2015.Est      TACAAATTTCTTTCGCTAGCCGTATCAAACCTTTTTTCGCCAGTGGAAATTAACAATTT 420
pQT2.Est.2015     TACAAATTTCTTTCGCTAGCCGTATCAAACCTTTTTTCGCCAGTGGAAATTAACAATTT 394
*****

AVPG.2015.Est      CGCCGAGTGATGCCATTACAAAGTAAATGGCGTGGGAGGGTAAACAATTTGTTGTGG 480
pQT2.Est.2015     CGCCGAGTGATGCCATTACAAAGTAAATGGCGTGGGAGGGTAAACAATTTGTTGTGG 454
*****

AVPG.2015.Est      ACAATCCAACCTCCTTATTACATCACTTATCCAGAAGTGAAATGGCACAGCAGAAACCC 540
pQT2.Est.2015     ACAATCCAACCTCCTTATTACATCACTTATCCAGAAGTGAAATGGCACAGCAGAAACCC 514
*****

AVPG.2015.Est      TGAGTGCGAATATGATAGCACCGTTTTACAAAGCCACTTTTCAATTAATAAACCGATTTC 600
pQT2.Est.2015     TGAGTGCGAATATGATAGCACCGTTTTACAAAGCCACTTTTCAATTAATAAACCGATTTC 574
*****

AVPG.2015.Est      CAGCTAAAGCAACCACCGTAACTTGGACTGTTATTAACGATTATGGTCAACGCCAAGTG 660
pQT2.Est.2015     CAGCTAAAGCAACCACCGTAACTTGGACTGTTATTAACGATTATGGTCAACGCCAAGTG 634
*****

AVPG.2015.Est      GCACTAGTGCTATGCAATATTAATAAATAAATATGATAAAACCTAAATTTTTCAGCAAACC 720
pQT2.Est.2015     GCACTAGTGCTATGCAATATTAATAAATAAATATGATAAAACCTAAATTTTTCAGCAAACC 694
*****

AVPG.2015.Est      AACAAAATCAAACTAAGCTATTTATCATTAAATTTGTTAAATAGTTGGTTAGTTATGT 780
pQT2.Est.2015     AACAAAATCAAACTAAGCTATTTATCATTAAATTTGTTAAATAGTTGGTTAGTTATGT 754
*****

AVPG.2015.Est      TTATGCTAATGAATATGTGGAGTTCGATTCGATTTTTTTGTTGGCAGTGAGAGTAGAAA 840
pQT2.Est.2015     TTATGCTAATGAATATGTGGAGTTCGATTCGATTTTTTTGTTGGCAGTGAGAGTAGAAA 814
*****

AVPG.2015.Est      AAATGTTGATGTTCAACGTTTTAGTTATGATAACGCAGTGCCAGCAGGTGAATATACTGT 900
pQT2.Est.2015     AAATGTTGATGTTCAACGTTTTAGTTATGATAACGCAGTGCCAGCAGGTGAATATACTGT 874
*****

AVPG.2015.Est      AGATGTTTATTGAATGAAAAATTAATTTGGGCGTATTAATATCAATATGCTGATGTACC 960
pQT2.Est.2015     AGATGTTTATTGAATGAAAAATTAATTTGGGCGTATTAATATCAATATGCTGATGTACC 934
*****

AVPG.2015.Est      TAATCAAAAACGTACCGCACTATGTGCGACAGAAACATTACTACGTTGTTAGATTTAAA 1020
pQT2.Est.2015     TAATCAAAAACGTACCGCACTATGTGCGACAGAAACATTACTACGTTGTTAGATTTAAA 994
*****

AVPG.2015.Est      AAA 1023
pQT2.Est.2015     AAA 997
***

```

**Figura 27.** Alineamiento de las secuencias de DNA que codifican para la proteína estructural (de la cepa 2015), en la construcción pQT2 vs la secuencia reportada en GenBank para el mismo gen de *A. paragallinarum* cepa 2015.

En la figura 28 se muestra el alineamiento hecho en Clustal omega, a la secuencia de nucleótidos clonada en la construcción pQT-3, del gen que codifica para la proteína estructural en *A. paragallinarum* de la cepa 6, alineado respecto al gen reportado en GenBank para *A. paragallinarum* cepa 2015. La secuencia alineada tiene un tamaño de 1038 pb, y muestra una identidad del 100% (1023/1023), con un E. value de 0.0 y no presenta gaps.

```

AVPG. 2015. Est  -----TTTTTCCACCATCATTATTGCGTTTATGGCAATGCTGTTTCAG 45
pQT3. Est. 6    ATGGCAATGTTGAAATTTTTTCCACCATCATTATTGCGTTTATGGCAATGCTGTTTCAG 60
                *****

AVPG. 2015. Est  CCAATGTGATTATCACAGGCACCCGTGTGATTATCCTTCTAATCAGAAGAATGTAAGTG 105
pQT3. Est. 6    CCAATGTGATTATCACAGGCACCCGTGTGATTATCCTTCTAATCAGAAGAATGTAAGTG 120
                *****

AVPG. 2015. Est  TACAACCTACGAATGCGGGAACCTAATCCTTCTTTAGTTGAGGCTTGGATTGATAATGGTG 165
pQT3. Est. 6    TACAACCTACGAATGCGGGAACCTAATCCTTCTTTAGTTGAGGCTTGGATTGATAATGGTG 180
                *****

AVPG. 2015. Est  ATCCGAAAGCTTCCACAGAAACAATTAACGCCCCCTTTGTGATTACACCGCCGATTCTC 225
pQT3. Est. 6    ATCCGAAAGCTTCCACAGAAACAATTAACGCCCCCTTTGTGATTACACCGCCGATTCTC 240
                *****

AVPG. 2015. Est  GCATTGTGGAATAAAGGGCAAACTGCGTATTACCTATACAGGTGCCTCACTGCCTA 285
pQT3. Est. 6    GCATTGTGGAATAAAGGGCAAACTGCGTATTACCTATACAGGTGCCTCACTGCCTA 300
                *****

AVPG. 2015. Est  AGGACCGTGAATCTATTTCTATTTAAATGTATTAGATATCCACCAAGCCAAAGACC 345
pQT3. Est. 6    AGGACCGTGAATCTATTTCTATTTAAATGTATTAGATATCCACCAAGCCAAAGACC 360
                *****

AVPG. 2015. Est  AAAATCAAATATTTACAAATTTCTTTGCGTAGCCGTATCAAACCTTTTTCCGCCAG 405
pQT3. Est. 6    AAAATCAAATATTTACAAATTTCTTTGCGTAGCCGTATCAAACCTTTTTCCGCCAG 420
                *****

AVPG. 2015. Est  TGGAATTAACAATTTCCGCGAGTGATGCCTATTCACAAGTAAATGGCGTGGGCAGGGTA 465
pQT3. Est. 6    TGGAATTAACAATTTCCGCGAGTGATGCCTATTCACAAGTAAATGGCGTGGGCAGGGTA 480
                *****

AVPG. 2015. Est  AACAAATGTTTGTGGCAATCCAACCTCTTATTACATCACTTATCCAGAAGTAAAAATTG 525
pQT3. Est. 6    AACAAATGTTTGTGGCAATCCAACCTCTTATTACATCACTTATCCAGAAGTAAAAATTG 540
                *****

AVPG. 2015. Est  GCACAGCAGAAACCTGAGTGCGAATATGATAGCACCGTTTTCCAAAGCCACTTTTCAAT 585
pQT3. Est. 6    GCACAGCAGAAACCTGAGTGCGAATATGATAGCACCGTTTTCCAAAGCCACTTTTCAAT 600
                *****

AVPG. 2015. Est  TAAATAAACCGATTCCAGCTAAAGCAACCACCGTAACCTGGACTGTATTAAAGATTATG 645
pQT3. Est. 6    TAAATAAACCGATTCCAGCTAAAGCAACCACCGTAACCTGGACTGTATTAAAGATTATG 660
                *****

AVPG. 2015. Est  GTGCAACGCCAAGTGGCACTAGTGCATGCAATATTAATAATAAATATGATAAAACCTAA 705
pQT3. Est. 6    GTGCAACGCCAAGTGGCACTAGTGCATGCAATATTAATAATAAATATGATAAAACCTAA 720
                *****

AVPG. 2015. Est  ATTTTTAGCAAAACCAAAAATCAAACTAAGCTATTTATCATTAAATTTGTTAAATAG 765
pQT3. Est. 6    ATTTTTAGCAAAACCAAAAATCAAACTAAGCTATTTATCATTAAATTTGTTAAATAG 780
                *****

AVPG. 2015. Est  TTGGTTAGTTATGTTTATGCTAATGAATATGGAGTTGCGATTCTGATTTTTGTTTGG 825
pQT3. Est. 6    TTGGTTAGTTATGTTTATGCTAATGAATATGGAGTTGCGATTCTGATTTTTGTTTGG 840
                *****

AVPG. 2015. Est  CAGTGAGAGTAGAAAAATGTTGATGTTCAACGTTTTAGTTATGATAACGCAGTGCCAGC 885
pQT3. Est. 6    CAGTGAGAGTAGAAAAATGTTGATGTTCAACGTTTTAGTTATGATAACGCAGTGCCAGC 900
                *****

AVPG. 2015. Est  AGGTGAATATACTGTAGATGTTTATTTGAATGAAAAATTAACCTGGGCGTATTAATATTCA 945
pQT3. Est. 6    AGGTGAATATACTGTAGATGTTTATTTGAATGAAAAATTAACCTGGGCGTATTAATATTCA 960
                *****

AVPG. 2015. Est  ATATGCTGATGTACCTAATCAAAAACGTACCGCACTATGTGCGACAGAAACATTACTTAC 1005
pQT3. Est. 6    ATATGCTGATGTACCTAATCAAAAACGTACCGCACTATGTGCGACAGAAACATTACTTAC 1020
                *****

AVPG. 2015. Est  GTTGTAGATTTAAAAAA 1023
pQT3. Est. 6    GTTGTAGATTTAAAAAA 1038
                *****

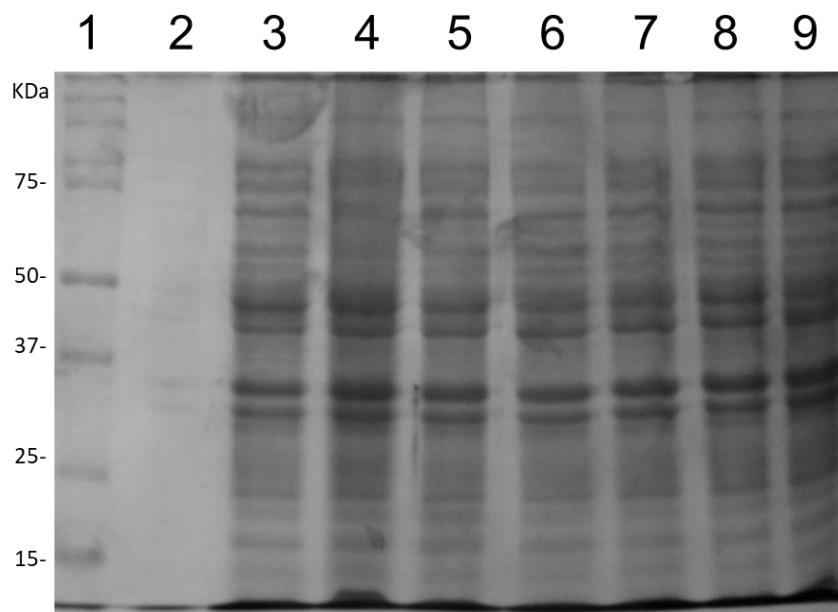
```

**Figura 28.** Alineamiento de las secuencias de DNA que codifican para la proteína estructural (de la cepa 6), en la construcción pQT3 vs la secuencia reportada en GenBank para el gen de *A. paragallinarum* cepa 2015.

De acuerdo con lo observado en los alineamientos se deduce que las construcciones pQT-1, pQT-2 y pQT-3 contienen el fragmento del gen de interés y que es mínimo el porcentaje de variación, con de identidad mayor a 99% en la secuencia. En el caso de pQT-2 la inducción de proteína debería producir una proteína similar a la expresada por la cepa silvestre de *A. paragallinarum*.

### Inducción de proteínas recombinantes

Considerando los resultados anteriores de las fusiones, se utilizó la construcción pQT-2 para realizar la inducción de proteínas. Se realizó una comparación del perfil de proteínas expresadas por pQT-2 a diferentes tiempos (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24hrs) y se comparó con los controles la cepa M15 y la cepa M15 con el plásmido pQ32.



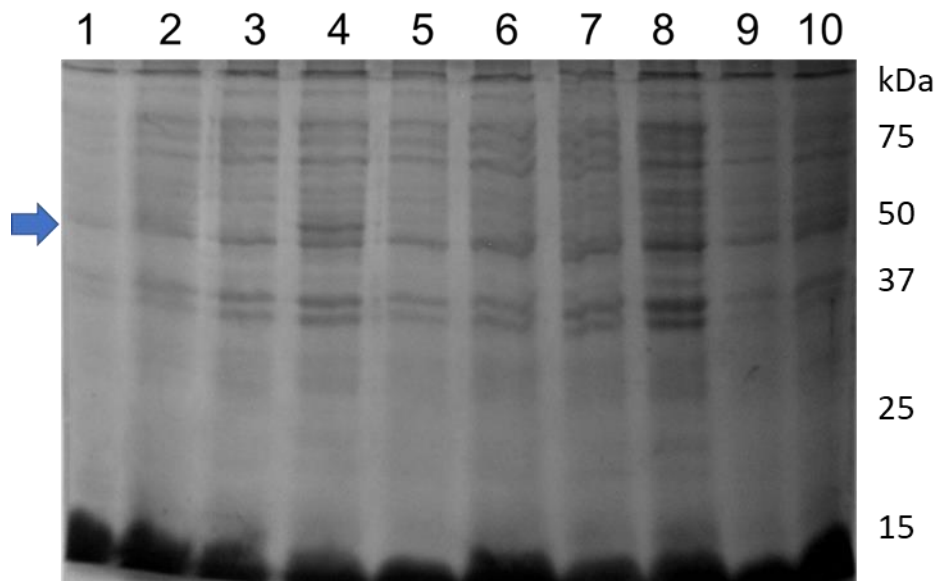
**Figura 29.** Inducción de proteínas en cepa M15 control, M15 (pQE-32) y construcción pQT2.

Se muestra el resultado de la inducción de proteínas de la construcción pQT2, en medio LB con inductor IPTG a una concentración de 1mM.

Carril 1: Marcador de peso molecular, 3: M15 h-0, 4: M15 (pQE-32) h-0, Carriles 5-9 inducción de pQT2; 5: 0-h, 6: 1-h, 7: 2-h, 8: 3-h, 9: 24-h.

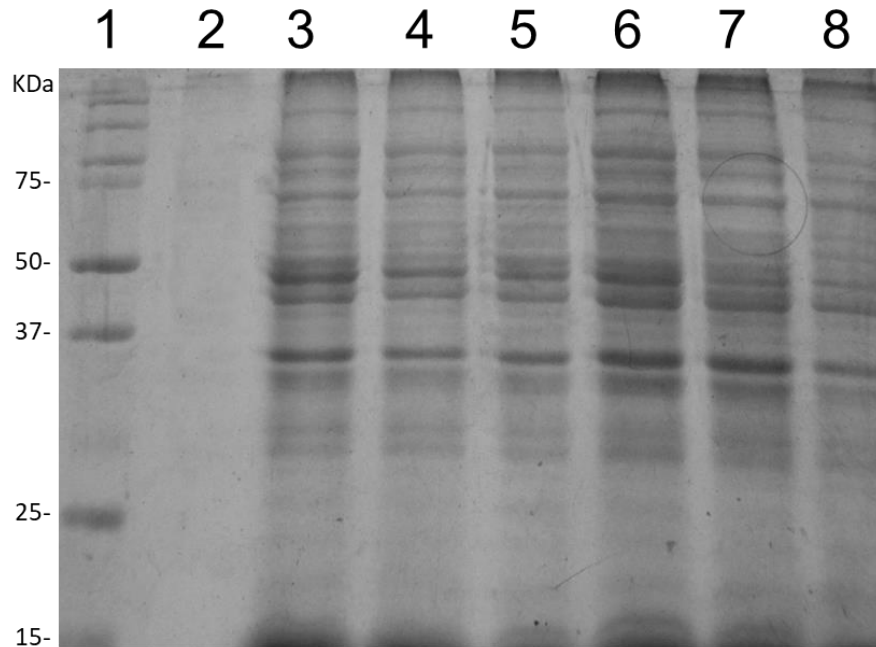
Después de varias repeticiones del protocolo de inducción de proteínas, no se observó una expresión aparente de la proteína de interés, por lo que se optó por cambiar el medio de cultivo para las inducciones, cambiando así la fuente de

carbono y nitrógeno para la bacteria. Se compararon 5 diferentes formulaciones de medios de cultivo: TB, LB, TSB, BHI y caldo nutritivo. Se obtuvieron dos resultados positivos con este cambio, en el medio TSB y caldo nutritivo. La banda observada en el perfil de proteínas que es diferente coincide con la proteína esperada para la construcción (43 kDa).



**Figura 30.** Resultado de la inducción de proteínas de pQT2 con 5 medios de cultivo: LB, TSB, TB, BHI y caldo nutritivo. Las muestras se analizaron a las 3h después de la inducción. El carril 4 y 10 muestran un resultado positivo de la inducción de proteínas comparándolos con sus carriles control (3 y 9). La flecha azul indica la altura a la que se puede ver la banda de proteína inducida. Carril 1: LB pQT2 s/i, 2: LB pQT2 inducido, 3: TSB pQT2 s/i, 4: TSB pQT2 inducido, 5: TB pQT2 s/i, 6: TB pQT2 inducido, 7: BHI pQT2 s/i, 8: BHI pQT2 inducido, 9: caldo nutritivo pQT2 s/i, 10: caldo nutritivo pQT2 inducido. (s/i) sin inducir.

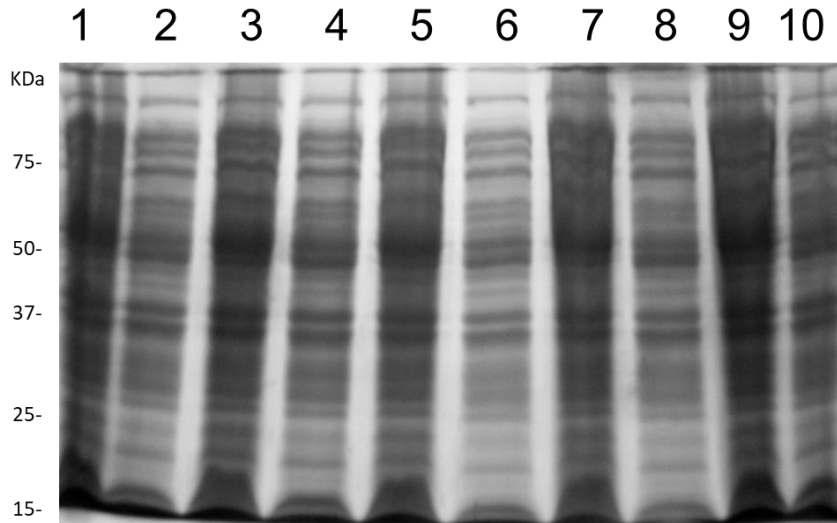
Utilizando los resultados del uso de los 5 medios de cultivo, se redujo la experimentación a 3 medios, dejando a LB como medio de baja o nula expresión y TSB y caldo nutritivo como mejores medios para la inducción de la proteína de 43 kDa. El perfil de proteínas inducidas en LB, TSB y caldo nutritivo se muestra en la figura 31, en donde se observa que la expresión no varía tanto. Sin embargo, en el caso del medio TSB (carril 3 y 4) se observó una mejor inducción. Esta condición se usó para experimentos posteriores.



**Figura 31.** Inducción de la proteína estructural de pQT2 en tres diferentes medios; LB, TSB y caldo nutritivo con inductor IPTG a 1mM. Las muestras se analizaron a las 3 horas de la inducción.

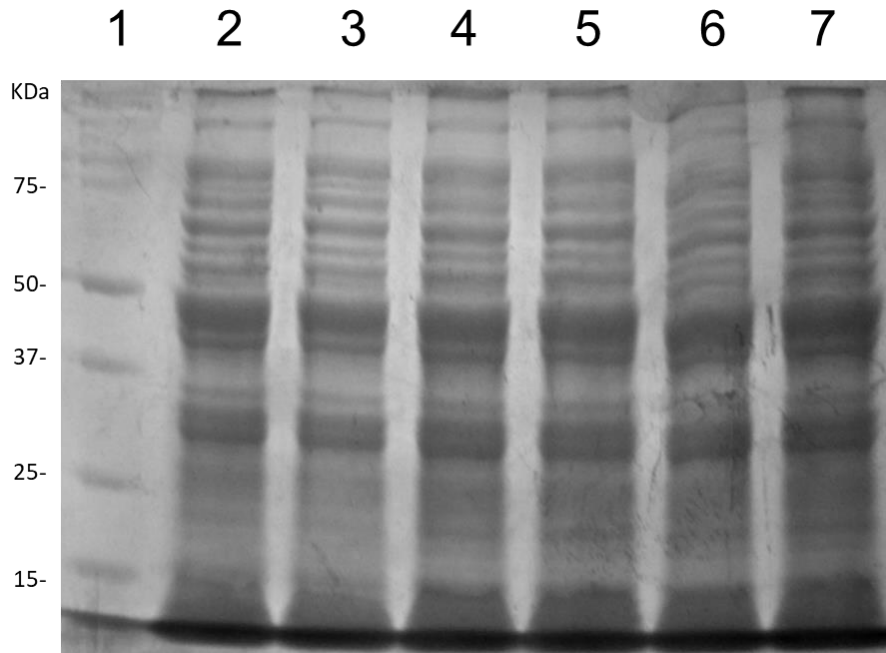
Carril 1: Marcador de peso molecular, 3: LB s/i, 4: LB inducido, 5: TSB s/i, 6: TSB inducido, 7: caldo nutritivo s/i, 8: caldo nutritivo inducido.

Se observó que el inductor IPTG provocaba cambios en la morfología y crecimiento del cultivo de M15, presentando un crecimiento lento en caldo de cultivo TSB, Al observar al microscopio se apreciaron diferencias entre las células inducidas y no inducidas: las inducidas se presentaron en una menor cantidad de células, su tamaño fue reducido y tenían menor movilidad, lo cual influye en la disminución del contenido de proteínas en perfil electroforético con el inductor, como se puede ver en la figura 32.



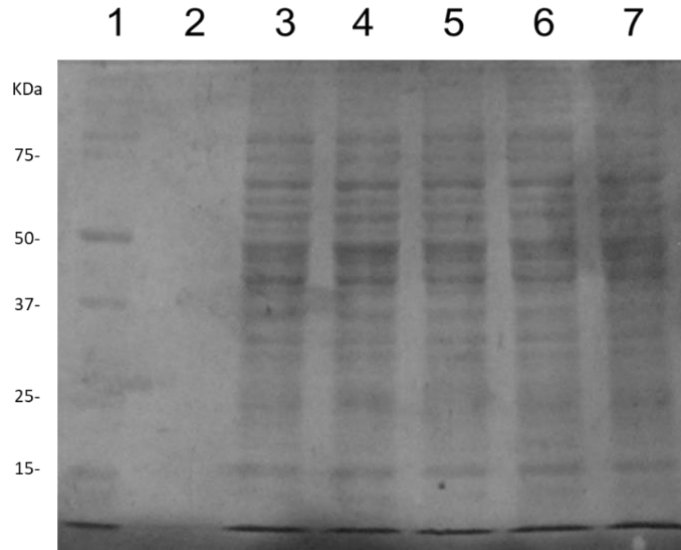
**Figura 32.** Efecto del IPTG sobre la producción de proteínas en pQT2. Se muestra el resultado de la inducción de proteínas de 5 colonias con la construcción pQT2 usando TBS con el inductor IPTG a 1mM. Se observa una reducción en la concentración de proteínas en las muestras inducidas con IPTG. Carril 1: pQT2 s/i 2: pQT2 inducido, 3: pQT2 s/i, 4: pQT2 inducido, 5: pQT2 s/i, 6: pQT2 inducido, 7: pQT2 s/i, 8: pQT2 inducido, 9: pQT2 s/i, 10: pQT2 inducido.

Para aminorar el efecto indeseado del IPTG se cambió el inductor por la lactosa. El resultado que se observa en la figura 33, en ésta son indistinguibles los tratamientos inducidos de los carentes del inductor.

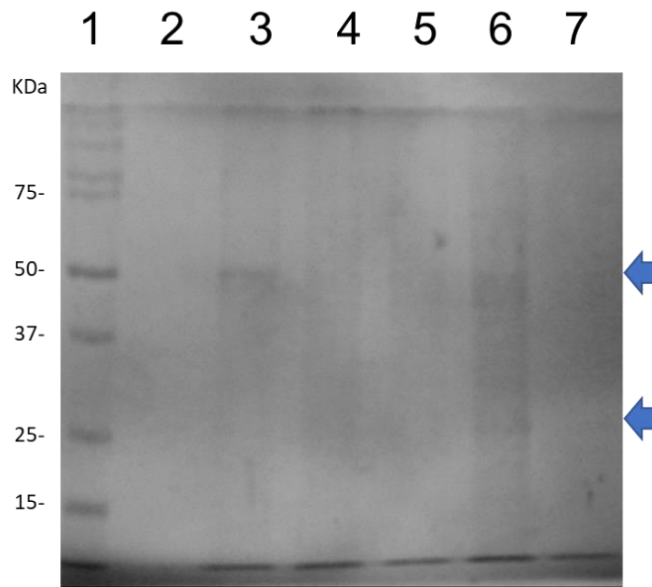


**Figura 33.** Resultado de la inducción de proteínas en TSB, con lactosa al 2% como inductor.  
 Carril 1: Marcador de peso molecular, 2: pQT2.4 s/i, 3: pQT2.4 inducido, 4: pQT2.5 s/i, 5: pQT2.5 inducido, 6: pQT2.10 s/i, 7: pQT2.10 inducido.

Debido a que no fue posible apreciar una banda con mayor intensidad entre las proteínas totales de *E. coli* M15(pQT-2) a consecuencia de la inducción con lactosa se siguió el procedimiento de purificación de proteínas por afinidad a la resina de sepharosa enriquecida con níquel. En la figura 34 se muestran las proteínas totales en un momento previ0 a la purificación. Y en la figura 35 se observa el gel de resultado después de aplicar el procedimiento de purificación de proteínas.



**Figura 34.** Proteínas totales de *E. coli* M15 (pQT2), después de 5 horas de inducción en medio TSB, con 2% de lactosa como inductor. Carril 1: Marcador de peso molecular, 3: Megan, 4: Sucky, 5: pQT2-col4, 6: pQT2-col5, 7: pQT2-col10. Megan y Sucky son dos clones que tiene fusiones traduccionales de proteínas similares a la clonada en PQT2.



**Figura 35.** Resultado de la purificación de proteínas por afinidad a sepharosa-níquel. Purificación en condiciones desnaturalizantes de la proteína obtenida por la inducción de la construcción de pQT2, Megan y Sucky. En el gel de poliacrilamida se observa la separación electroforética de las proteínas contenidas en las muestras obtenidas de los diferentes pasos de la purificación por afinidad a sepharosa-níquel de las posibles proteínas fimbriales-F17 recombinantes. Carril 1: M.P.M, 3: Megan, 4: Sucky, 5: pQT2.4, 6: pQT2.5, 7: pQT2.10.

En la figura 35 se pueden observar dos bandas, 1 de ellas es la proteína obtenida de la construcción Megan, con un peso aproximado de 50 KDa, y otra de más de 25 KDa en el carril 6, correspondiente a la construcción pQT-2, esta banda es más tenue que la banda de 50 kDa.

## DISCUSIÓN

La coriza infecciosa es una enfermedad que se ha controlado de una forma suficiente por medio de las bacterinas elaboradas con las bacterias que se aíslan de los cuadros infecciosos recurrentes. Sin embargo, se ha propuesto que la ineficacia de las bacterinas ocurre por variación de antígenos de las bacterias infectantes (Blackall, 1999), por lo tanto, la respuesta inmune de las aves entrenadas no es efectiva para las nuevas variantes antigénicas. Si bien la vacunación con bacterinas es buena en términos prácticos, también deja que desear, al desconocer las moléculas que están involucradas en la conservación de la respuesta inmune efectiva de las vacunas.

Como fuentes de variación antigénica tenemos a las proteínas, polisacáridos y fracciones lipídicas, sin embargo, la potencia de la respuesta inmune es diferente por cada uno de estos componentes químicos ya sea por su antigenicidad, así como por su localización sub-celular. Para el caso de este proyecto con *A. paragallinarum* ya se han hecho trabajos sobre la hemaglutinina (Wang et al., 2014) y la cápsula o cubiertas celulares (Tu et al., 2014). Sin embargo, estructuralmente existen componentes antigénicos de carácter soluble y otros de fácil desprendimiento de las células. La bacteria *A. paragallinarum* no posee flagelos, pero si contiene fimbrias que han sido observadas al microscopio y que se han deducido por identidad al comparar las secuencias de genes y genomas de *A. paragallinarum* con organismos filogenéticamente relacionados.

La secuenciación de genomas completos de *A. paragallinarum* y su ensamble computacional ha mostrado que esta bacteria posee más de una copia de secuencias relacionadas con fimbrias. La pista para deducir esto, es por medio de la conservación de la proteína usher, una chaperona que acompaña a otros genes en los operones para la biosíntesis de la Fimbria F17-like.

Horta Valerdi (2017), mostró que los indicios de las fimbrias F17 se conservaron en dos genomas publicados en GenBank. Mientras que Velázquez Valtierra (2017) encontró experimentalmente algunas aberraciones en la amplificación de genes

relacionados con la fimbria F17, sugiriendo posibles variantes de los genes de las fimbrias, esto se ha observado en *E. coli* por lo que resulta muy novedoso de explorarse porque puede ser fuente de variación antigénica y de variación en la respuesta patogénica de *A. paragallinarum*.

Como la fimbria F17 está compuesta mayoritariamente por la proteína estructural y de la adhesina en el extremo distal de la célula, son quizás las proteínas que pueden estar rigiendo la colonización del hospedero y con ello los posibles cuadros de patogenicidad de la CI. La situación con bacterias que poseen dos operones fimbriales es que puede estar ocurriendo variación antigénica frecuente. Incluso en una cepa se sugirieron hasta tres operones, considerando los tres operones y las posibles variaciones de secuencia en las proteínas estructurales y adhesinas, el panorama se ve complicado para generar una vacuna eficaz si no terminamos de conocer la importancia de los motivos de secuencia proteica más inmunogénica y las secuencias más conservadas en este tipo de proteínas.

Para el presente trabajo se propuso la clonación de los genes y la expresión de tres proteínas relacionadas con las fimbrias F17, con el fin de sobreexpresarlas y analizar su capacidad de inducir la respuesta inmune en modelos animales o de ser posible evaluar su comportamiento en el hospedero natural de *A. paragallinarum*. Siguiendo la proyección del trabajo se logró la amplificación de secuencias homólogas a los genes que potencialmente codifican proteínas estructurales y adhesinas, en las cepas 2015 y 6 de *A. paragallinarum*. Un asunto curioso fue la amplificación y clonación consistente de secuencias con tamaños diferentes a los esperados por la información de GenBank, lo que nos sugiere la existencia de secuencias que no fueron resueltas apropiadamente por el proceso computacional empleado en los ensambladores de genomas. Esto es muy relevante para la investigación con *A. paragallinarum*, pues la información de GenBank debe ser tomada como referencia de trabajo mas no como información 100% confiable, especialmente para secuencias redundantes y que son muy frecuentes en bacterias.

Las subclonaciones en los vectores de expresión de las secuencias trabajadas en este proyecto, ocurrió como se tenía previsto, logrando tener tres posibles construcciones para llevar a cabo la inducción de proteínas recombinantes con un motivo de 6XHis, útil para la purificación de proteínas por el proceso de afinidad al ion metálico níquel. De las tres posibles construcciones se eligió la pQT-2 porque aparentemente mantenía la fusión del marco de lectura abierto con las secuencias codificantes de las histidinas y así generar una proteína híbrida marcada en el extremo amino terminal con las histidinas.

Podemos afirmar por las pruebas efectuadas a las secuencias obtenidas en el laboratorio, y las construcciones intermediarias y las de las fusiones traduccionales, que no hubo novedad más allá de la variación de la secuencia propia de *A. paragallinarum*.

Respecto a la expresión de proteínas inducidas en el laboratorio con construcciones que tienen marcos de lectura fusionados, observamos que la riqueza de condiciones no mejoró la acumulación de proteínas recombinantes. Lo que fue significativo es que se reduce el estrés generado por el inductor en el medio TSA, manteniendo la población bacteriana en el mismo nivel que el cultivo carente de inductor y ello lo refleja el perfil de proteínas. Si bien fue escasa la cantidad de proteínas que se contrasta en los perfiles de proteínas inducidas respecto a las faltantes de inductor, se observa que es posible llevar a cabo la inducción de algunas proteínas. Este comportamiento debe evaluarse más detalladamente para mejorar la acumulación de proteínas de interés biotecnológico.

En un intento de purificar la proteína recombinante se agregó la resina-níquel al extracto de proteínas totales y se observó una unión pobre de proteína. Aquí se tienen varias opciones que también están sujetas a mejorarse en el futuro inmediato:

- 1) La proteína para unirse mejor debe incrementarse en su concentración respecto a las proteínas totales para mejorar la nucleación de las proteínas respecto a la columna de afinidad.
- 2) Se tiene que evaluar consistentemente la composición del medio pues el medio LB ha sido considerado un buen medio para sustentar el desarrollo de las *E. coli* típicas del laboratorio.
- 3) Se debe evaluar la validez de la

expresión de proteínas recombinantes de *A. paragallinarum* en *E. coli*, pues podría haber problemas de toxicidad de proteínas similares a las que pueda contener *E. coli*. Se puede utilizar la cepa BL21 de Stratagene. Esto quizás provoque que la bacteria se deshaga de las proteínas fastidiosas, por medio de la proteólisis, en lugar de llevar a cabo la deposición en cuerpos de inclusión, que serían más provechosos para el proyecto, en lugar de la desaparición de proteínas; pues existen procedimientos apropiados para la recuperación de proteínas cristalizadas en el citoplasma bacteriano. 4) Surge como posibilidad el estudio de péptidos cortos de proteínas de *A. paragallinarum* para conocer el potencial protector de péptidos generados en el modelo heterólogo de *E. coli*.

## CONCLUSIONES

Se confirmó por amplificación y secuenciación la presencia de genes que codifican potencialmente para proteínas fimbriales (*flfA* y *flfG*) en las cepas 2015 y 6 de *A. paragallinarum*.

La secuencia obtenida de *flfA* en *A. paragallinarum*, es similar a la secuencia reportada de *Gallibacterium anatis*, lo cual resalta su potencial uso como antígeno contra CI.

Se obtuvieron tres construcciones para llevar a cabo la inducción de proteínas fimbriales de *A. paragallinarum*.

La expresión de proteínas fimbriales en *A. paragallinarum* es posible, sin embargo, se requiere optimizar el procedimiento y estudiar los factores que están involucrados en la expresión para obtener mejores resultados.

## REFERENCIAS

- Bager, R. J., Kudirkiene, E., Piedade, I., Seemann, T., Nielsen, T. K., Pors, S. E., ... Bojesen, A. M. (2014). In silico prediction of Gallibacterium anatis pan-immunogens. *Veterinary Research*, 1–12.
- Bager, R. J., Nesta, B., Pors, S. E., Soriani, M., Serino, L., Boyce, J. D., ... Bojesen, M. (2013). The Fimbrial Protein FlfA from Gallibacterium anatis Is a Virulence Factor and Vaccine Candidate, *81*(6), 1964–1973. <http://doi.org/10.1128/IAI.00059-13>
- Blackall. (1995). Vaccines against infectious coryza. *World's Poultry Science Journal*, *51*(01), 17–26. <http://doi.org/10.1079/WPS19950003>
- Blackall. (1999). Infectious Coryza : Overview of the Disease and New Diagnostic Options Infectious Coryza : Overview of the Disease and New Diagnostic Options, *12*(4), 627–632. <http://doi.org/0893-8512>
- Blackall, Christensen, H., Beckenham, T., Blackall, L. L., & Bisgaard, M. (2005). Reclassification of Pasteurella gallinarum, [Haemophilus] paragallinarum, Pasteurella avium and Pasteurella volantium as Avibacterium gallinarum gen. nov., comb. nov., Avibacterium paragallinarum comb. nov., Avibacterium avium comb. nov. and Avibacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*(1), 353–362. <http://doi.org/10.1099/ij.s.0.63357-0>
- Blackall, & Hinz. (2008). *Infectious coryza and related diseases. Poultry Diseases*. Elsevier Ltd. <http://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2862-5.50016-7>
- Blackall, & Soriano-Vargas, E. (2013). Infectious Coryza and Related Bacterial Infections, *1955*(127), 859–873.
- Calderón, E. N., Thomas, K., Morales-Erasto, V., Salgado-Miranda, C., & Soriano-Vargas, E. (2010). Identification of Avibacterium paragallinarum Serovar B-1 from Severe Infectious Coryza Outbreaks in Panama. *Avian Diseases*, *54*(3),

1095–1097. <http://doi.org/10.1637/9123-110409-Case.1>

Chen, Y., Tan, D., Shien, J., Hsieh, M., Yen, T., & Chang, P. (2013). Identification and functional analysis of the cytolethal distending toxin gene from *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Pathology*, (August 2014), 37–41. <http://doi.org/10.1080/03079457.2013.861895>

Chiang, Y. T., Shien, J. H., Tan, D. H., Shieh, M. K., Liu, C. C., Chen, Y. S., & Chang. (2013). Identification of the lic1ABCD operon that controls the phase-variable expression of phosphorylcholine on lipopolysaccharide from *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Pathology*, (February), 37–41.

Christensen, H., Blackall, P. J., & Bisgaard, M. (2016). Pasteurellaceae: Pasteurella, *Avibacterium*, *Gallibacterium* species. *A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens, 6th ed.*, 2016.

Clegg, S., Wilson, J., & Johnson, J. (2011). More than One Way To Control Hair Growth: Regulatory Mechanisms in Enterobacteria That Affect Fimbriae Assembled by the Chaperone / usher Pathway, *193*(9), 2081–2088. <http://doi.org/10.1128/JB.00071-11>

Connell, H., Agace, W., Klemm, P., Schembri, M., Marild, S., & Svanborg, C. (1996). Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Medical Sciences*, *93*(September), 9827–9832.

Droual, R., Bickford, A. A., Charlton, B. R., Cooper, G. L., & Channing, S. E. (1990). Infectious Coryza in Meat Chickens in the San Joaquin Valle. *Avian Diseases*, *34*(4), 1009–1016.

Forrellad, M. A., Klepp, L. I., Gioffré, A., Sabio, J., Morbidoni, H. R., De, M., ... Bigi, F. (2013). Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Landes Bioscience*, 3–66.

Foster, J. W., & Moat, a G. (1980). Nicotinamide Adenine-Dinucleotide Biosynthesis and Pyridine-Nucleotide Cycle Metabolism in Microbial Systems.

*Microbiological Reviews*, 44(1), 83–105.

- Hoerr, F. J., Putnam, M., Rowe-Rossmann, S., Cowart, W., & Martin, J. (1994). Case report: Infectious coryza in broiler chickens in Alabama. *43rd Western Poultry Disease Conference*.
- Horta-Valerdi, G., Sanchez-Alonso, M. P., Perez-Marquez, V. M., Negrete-Abascal, E., Vaca-Pacheco, S., Hernandez-Gonzalez, I., ... Vázquez-Cruz, C. (2017a). The Genome Sequence of *Avibacterium paragallinarum* Strain CL Has a Large Repertoire of Insertion Sequence Elements. *Genome Announcements*, 5(15), e00152-17. <http://doi.org/10.1128/genomeA.00152-17>
- Kudirkienė, E., Bager, R. J., Johnson, T. J., & Bojesen, A. M. (2014). Chaperone-usher fimbriae in a diverse selection of *Gallibacterium* genomes. *BMC Genomics*, 15, 1093. <http://doi.org/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.
- Lintermans, P. F., Bertels, A., Schlicker, C., Deboeck, F., Charlier, G., Pohl, P., ... 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. <http://doi.org/10.1128/jb.173.11.3366-3373.1991>
- Liu, C.-C., Ou, S., Tan, D., Hsieh, M., Shien, J., Chang, P., ... Acd, P. C. (2016). The Fimbrial Protein is a Virulence Factor and Potential Vaccine Antigen of *Avibacterium paragallinarum*, 60(3), 649–655. Retrieved from <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1637/8563-121908-Reg.1>
- Lucio, M. L. S., Vaca, S., Vázquez, C., Zenteno, E., Rea, I., Pérez-márquez, V. M., & Negrete-abascal, E. (2012). Adhesion of *Gallibacterium anatis* to Chicken Oropharyngeal Epithelial Cells and the Identification of Putative Fimbriae.

*Advances in Microbiology*, 2012(December), 505–510.  
<http://doi.org/http://dx.doi.org/10.4236/aim.2012.24064>

Luna, A. (2010). *Evaluación de dos bacterinas en gallinas de postura, mediante detección de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación y protección ante un desafío con Avibacterium paragallinarum, en Tehuacán, Puebla*. Universidad Veracruzana.

Pan, A. Y., Tan, D., Shien, J., Liu, C., He, Y., Chang, P., ... Ade, P. C. (2012). Identification and Characterization of an RTX Toxin – Like Gene and Its Operon from *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Diseases*, 56(3), 537–544.

Soriano-Vargas, E., Sánchez-Morales, J., Morales-Erasto, V., & García-Sánchez, A. (2013). Isolation and identification of NAD-independent *Avibacterium paragallinarum* (serovar C-1) from growing layer hens with infectious coryza, 52(55), 389–396.

Soriano-Vargas, E., & Terzolo, H.-R. (2004). Epizootiología , prevención y control de la coriza infecciosa Epizootiology , prevention and control of infectious coryza. *Epizootiología, Prevención y Control de La Coriza Infecciosa . Veterinaria México*. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/423/42335309.pdf>

Terzolo, H. R. (2000). Coriza Infecciosa: una revisión. Propuestas de investigación para su diagnóstico y control. *Revista de Medicina Veterinaria*, 81(4)(January 2000), 262–269.

Tu, T., Hsieh, M., Tan, D., Ou, S., Shien, J., Yen, T., ... Yen, B. T. (2014). Loss of the Capsule Increases the Adherence Activity but Decreases the Virulence of *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Diseases*, 59(1), 87–93.

Velázquez, J. P. (2017). *ESTUDIO GENÉTICO E INMUNOGÉNICO COMPARATIVO DE FIMBRIAS F17 EN Gallibacterium anatis y Avibacterium paragallinarum*. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Wang, Y.-P., Hsieh, M.-K., Tan, D.-H., Shien, J.-H., Ou, S.-C., Chen, C.-F., & Chang, P.-C. (2014). The haemagglutinin of *Avibacterium paragallinarum* is a trimeric autotransporter adhesin that confers haemagglutination, cell adherence and biofilm formation activities. *Veterinary Microbiology*, 174(3–4), 474–482. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.10.013>

Wurpel, J., Beatson, S. A., Totsika, M., Petty, N. K., & Schembri, M. A. (2013). Chaperone-usher Fimbriae of *Escherichia coli*, 8(1). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0052835>