



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

**POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**CONSTRUCCION DE VECTORES PARA LA  
EXPRESION DE ANTIGENOS DE  
*Avibacterium paragallinarum***

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

**CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

**PRESENTA:**

Q.C. MARÍA ELENA COBOS JUSTO

**ASESOR DE TESIS:**

D.C. CANDELARIO VÁZQUEZ CRUZ

## INDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCION .....	7
ANTECEDENTES.....	8
JUSTIFICACION .....	15
OBJETIVOS .....	16
ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO.....	17
MATERIALES Y METODOS .....	18
RESULTADOS .....	24
DISCUSIÓN .....	48
CONCLUSIONES .....	52
PERSPECTIVAS .....	53
ANEXOS.....	53
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	60

## Agradecimientos

A los integrantes del comité revisor:

- ❖ D.C. Patricia Sánchez Alonso
- ❖ D.C. Erasmo Negrete Abascal
- ❖ D.C. Luis Javier Martínez Morales
- ❖ D.C. Norma Elena Rojas Ruiz

A mi asesor de tesis el D.C Candelario Vázquez Cruz, por su confianza, paciencia y apoyo en este proyecto.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Microbiología Molecular y Celular, por su amistad, por su apoyo y valiosas enseñanzas.

Este trabajo fue apoyado por el proyecto CB-2010-01-157028.

Este trabajo fue parcialmente apoyado por PAPIIT IN222313 UNAM.

Al Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas.

## DEDICATORIAS

A Dios, por darme esta maravillosa vida, porque me ha permitido ser testigo de su grandeza y de su amor, porque muestra su fuerza en mi debilidad. No tengo como pagarte mi Dios todo el bien que me haces.

A mis papitos hermosos (Sol y Lázaro), porque me han amado desde que supieron de mi existencia, por su maravilloso ejemplo, gracias por sus enseñanzas y consejos, porque me han dado alas para volar y me han impulsado en todos mis proyectos. Gracias por cada uno de sus sacrificios, porque han puesto mis sueños antes que los suyos. Son las personas más maravillosas que Dios me pudo haber dado como padres, ustedes son mi orgullo y los amo con todas las fuerzas de mi ser. Aun a pesar de la distancia van conmigo a cada momento, porque somos uno mismo unidos por el amor.

A mis pequeños hermanos (David y Oscar) por ser unos niños maravillosos, por todo el amor y la alegría que me dan. Gracias mis niños por sus abrazos, por cuidarme y hacer sacrificios para que yo logre mis sueños. Los amo, son los mejores hermanos que Dios me dio.

Al amor de mi vida Migue, por ser mi mejor amigo y mi cómplice en esta aventura, por poner mi felicidad antes que la suya, gracias por todo tu apoyo, amor y comprensión, por todas tus palabras de aliento, por escucharme y estar a mi lado en los momentos más difíciles, haces que cada día sea maravilloso. Eres el hombre más maravilloso que Dios pudo poner en mi vida. Porque tu y yo somos una sola vida. Te amo infinitamente.

A la comunidad "Emanuel" por estar conmigo a pesar de la distancia, por su intercesión y sus muestras de amor, son seres humanos increíbles, gracias porque cada uno me llena de enseñanzas. Algún día volveré a reunirme con ustedes.

A mi querido D.C. Cande, por su amistad y apoyo en momentos amargos, por poner en mis manos su querido proyecto, por ser un maravilloso investigador, pero sobre todo un maravilloso ser humano, me quedo con muchas enseñanzas tuyas y siempre lo llevare en mi corazón.

A mi querido D.C. Erasmo, por su paciencia, por todo el apoyo y enseñanzas que me brindó en estos años, sin usted mucho de este proyecto no hubiera sido posible. Lo llevo en mi corazón.

## RESUMEN

*Avibacterium paragallinarum* (Avpg) es una bacteria de la familia Pasteurellaceae y es el agente etiológico de la coriza infecciosa; una enfermedad del tracto respiratorio superior de las aves. Esta bacteria produce daño por medio de varios factores de virulencia, como: la cápsula, hemaglutininas y algunas toxinas. La distribución de este microorganismo es mundial incluyendo a México, afectando a la industria avícola con importantes pérdidas económicas. Para controlar la coriza infecciosa se usan algunas vacunas que con frecuencia pueden ser poco efectivas y se requiere mejorar su efectividad; una posibilidad es enriquecer la vacuna con proteínas antigénicas provenientes de algunos factores de virulencia de Avpg, obtenidas por recombinación *in vitro*. Con esta idea se planteó este proyecto cuyo objetivo fue la elaboración de construcciones plasmídicas para expresar heterológamente algunos polipéptidos de Avpg con potencial antigénico para suplementar a futuras vacunas. Para esto se diseñaron oligonucleótidos que se usaron como iniciadores para amplificar por PCR, diferentes fragmentos de los genes que codifican las proteínas Hemaglutinina, Rtx y OmpA. Los amplificados fueron clonados en el vector pBluescriptII KS (-) y posteriormente subclonados en el vector de expresión pQE30. Los experimentos de expresión se hicieron en *E. coli* M15, o BL21 pLysS, por inducción con diferentes concentraciones de IPTG, sin observar expresión de nuevas proteínas en SDS-PAGE. El estudio por secuenciación de las construcciones plasmídicas mostró una mutación por delección en la región (-10) del promotor que dirigiría la expresión en el vector pQE30, para las construcciones de la región uno de hemaglutinina y la región uno de OmpA. Esta mutación también se encontró en pQE31 y pQE32 con la región dos de OmpA (OmpA2). En la construcción pQE30-OmpA2 la mutación se encontró en el fragmento clonado, pero no en el promotor. Estos resultados sugieren hacer una selección muy amplia de transformantes heterólogas para lograr tener la construcción apropiada de acuerdo al diseño original o cambiar el vector, usar cepas con fondos genéticos menos recombinogénicos o ajustar el uso preferencial de codones de las secuencias para expresarlas en *E. coli*.

## INTRODUCCION

El microorganismo *Avibacterium paragallinarum* (Avpg) es una bacteria Gram negativa de la familia *Pasteurellaceae* y es el agente etiológico de la coriza infecciosa, una enfermedad respiratoria aguda. (Morales *et al.* 2014). Esta bacteria fue descrita por primera vez en 1932 y requiere NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) para su crecimiento. Inicialmente fue clasificada en el género *Haemophilus* (Biberstein y White, 1969), aunque también se han aislado cepas NAD independientes (Horner *et al.* 1992; García *et al.* 2014) Algunos de los signos característicos de esta enfermedad incluyen descarga nasal, hinchazón facial y lagrimeo en las aves que la padecen. (Blackall y Soriano, 2008).

El impacto de Avpg en la producción de aves de corral es muy significativo, ya que disminuye el crecimiento y reduce la producción de huevo, causando pérdidas que van del 10% al 40%. (Morales *et al.* 2014).

Las vacunas inactivadas contra Avpg tienen varias desventajas: Primero, Avpg ha sido tipificada en serovares A, B y C de acuerdo al esquema de Page (Blackall *et al.* 1990), y las vacunas inactivadas confieren protección solo contra un serovar específico presente en la vacuna (Blackall y Soriano, 2008). Es decir, si la vacuna inactivada es de una bacteria serotipo A, no conferirá protección contra bacterias de serotipo B o C. Segundo, el crecimiento *in vitro* de la mayoría de las cepas de Avpg requiere medios complejos que contienen NAD (Rimler *et al.* 1977), y algunas cepas requieren suero de caballo para su crecimiento. Tercero, las vacunas inactivadas emulsificadas con un adyuvante oleoso pueden producir granulomas u otras lesiones después de ser inyectadas en pollos. (Droual *et al.* 1990).

A la fecha se conoce poco de los factores de virulencia de Avpg, dentro de los más estudiados se encuentran: hemaglutinina (Sawata *et al.* 1985; Wu *et al.* 2010), capsula (Boulnois y Roberts, 1990; Whitfield, 2006), lipopolisacarido (LPS) (Chiang *et al.* 2013; Iritani *et al.* 1981), toxinas RTX (Kume y Frey, 2013; Pan *et al.* 2012), metaloproteasas (Rivero *et al.* 2005; Rocha *et al.* 2006) y Toxinas Distensoras Citoletales (CDT) (Chen *et al.* 2013).

## ANTECEDENTES

### Etiología de la coriza infecciosa

*Avibacterium paragallinarum* (Avpg) es el agente etiológico de la enfermedad llamada coriza infecciosa (CI), una enfermedad del tracto respiratorio superior de aves, como pollos y gallinas entre otras, no representa peligro para la salud humana. Su distribución es mundial y causa importantes pérdidas económicas en la industria avícola debido al retraso del crecimiento, pérdida de peso, y disminución de la producción de huevo (Blackall *et al.* 2003). Avpg se ha aislado de pollos y gallinas en granjas de países como Argentina, Australia, Bulgaria, Canadá, Egipto, Gran Bretaña, Guatemala, Holanda, India, Indonesia, Irak y Suiza, entre otros. En México se han reportado aislamientos en los estados de Sonora, Michoacán, Morelos, Puebla y Yucatán (Soriano y Terzolo, 2004). Considerando que en México la avicultura equivale al 63.1% de la producción pecuaria (Unión Nacional de Avicultores, 2014), el estudio de la CI es de relevancia científica y trascendencia socioeconómica.

La CI se caracteriza por ser aguda, con duración aproximada de dos semanas y puede curarse de forma espontánea. Es común la asociación de Avpg con otros agentes bacterianos y virales, lo que prolonga la duración de la enfermedad hasta siete semanas (Terzolo, 2000). Esto en términos monetarios, significa un gasto muy grande o incluso incosteable para los sistemas intensivos de producción de huevo o de carne de ave, y toda una calamidad para los sistemas de traspatio.

La bacteria que causa la CI se conoce desde 1932 y ha sido reclasificada en varias ocasiones. El manual de bacteriología de Bergey la cataloga en el Super reino: *Procaryotae*, Reino: *Eubacteria*, División: *Gracilicutes*, Clase: *Protobacteria*, Familia: *Pasteurellaceae*, Género: *Haemophilus*, Especie: *paragallinarum* (Kilian *et al.* 1984). Sin embargo, en un estudio reciente, mediante análisis de filogenia molecular se reasignaron varios miembros de la familia (*Haemophilus paragallinarum*, *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella avium* y *Pasteurella volantium*), en un nuevo género llamado *Avibacterium*, los que ahora constituyen un grupo

monofilético con una similitud del 98% en sus secuencias de rDNA, quedando como *Avibacterium gallinarum*, *Av. paragallinarum*, *Av. avium* y *Av. volantium* (Blackall *et al.* 2005).

El microorganismo *Av. paragallinarum* es una bacteria Gram negativa, no esporulada, de morfología celular cocobacilar con propensión a la formación de cadenas cortas (Blackall *et al.* 1998). Aunque esta descrita como microorganismo inmóvil, se ha reportado que puede ser móvil en medio de cultivo semigelificado cuando se cultiva en microaerofilia (Negrete *et al.* 2009; Serrano *et al.* 2005). Este microorganismo requiere la forma reducida u oxidada del NAD (NADH) para su crecimiento *in vitro*, aunque han sido aisladas cepas independientes de NAD en Sudáfrica (Miflin *et al.* 1995) y México (García *et al.* 2004).

### **Descripción de la coriza infecciosa**

Avpg produce inflamación catarral aguda de las mucosas de la nariz y senos infraorbitarios, y con frecuencia se produce edema subcutáneo de la cabeza y barbillones, así como conjuntivitis. En la mucosa del tracto respiratorio superior se puede observar descamación, desintegración e incluso hiperplasia del epitelio glandular y mucosa, edema e hiperemia con infiltración de heterófilos, mastocitos y macrófagos en la lámina propia. Cuando se afecta el tracto respiratorio inferior se produce bronconeumonía catarral aguda con presencia de heterófilos y restos celulares que ocupan la luz de los bronquiolos secundarios y terciarios; las células epiteliales de los capilares se encuentran inflamadas y existe hiperplasia. Los alvéolos presentan inflamación catarral caracterizada por tumefacción e hiperplasia celular con abundante infiltración de heterófilos. Los productos de la inflamación de los mastocitos, heterófilos y macrófagos pueden ser los responsables de los severos cambios vasculares y del daño celular causado por la CI (Blackall *et al.* 1997).

## Factores de virulencia de Avpg

Entre los factores de virulencia asociados a la patogenicidad de Avpg se han identificado a las hemaglutininas, la cápsula, la hemocina, el lipopolisacárido, las metaloproteasas, toxinas Rtx (Rivero *et al.* 2005) y las Toxinas Distensoras Citoletales (CDT). (Chen *et al.* 2013).

Se ha descrito que esta bacteria utiliza hemaglutininas para su adhesión durante la infección, como la proteína bacteriana HgA de 39 kDa que es reconocida por anticuerpos monoclonales anti-hemaglutinina. El análisis de la secuencia N-terminal de la hemaglutinina indica que pertenece a la familia de las proteínas de membrana externa del tipo OmpA (Hobb *et al.* 2002). La hemaglutinina (HA) es una proteína que tiene un papel importante en la inmunogenicidad y patogenicidad de Avpg; recientes estudios han reportado la presencia de una región hipervariable en serovares A y C. En un ensayo Western blot donde se usó antisuero contra antígenos de células completas de Avpg, se mostró que la región hipervariable fue más antigénica que otras regiones. En un experimento de desafío de Avpg serotipo C, contra suero de pollos previamente inmunizados con una HA recombinante se observó una protección que va de 83-100% (Jim-Ru *et al.* 2011), confirmando la importancia de esta secuencia aminoacídica a nivel inmunológico. La hemaglutinina es el antígeno más estudiado, en investigaciones similares se observó que tiene un gran potencial aplicativo porque se puede utilizar para serotipificar a los aislados de Avpg, y porque tiene un papel directo en la patogenicidad de esta bacteria. (Wu *et al.* 2011). Este comportamiento es semejante al observado en *E. coli*, en la que se ha encontrado a OmpP5 como factor de virulencia, OmpA de Avpg y OmpA5 de *E. coli*, son responsables de la integridad de la membrana externa pero también pueden inducir una fuerte respuesta por anticuerpos, por lo que se les considera como antígenos protectores (Requena *et al.* 2013).

La cápsula tiene un papel importante al delimitar el acceso de varias moléculas a la bacteria. Ésta cubierta celular participa en la adherencia a superficies tisulares e incrementa la tolerancia bacteriana a la desecación, también protege a la bacteria contra los anticuerpos, el complemento y evita la fagocitosis por los leucocitos

polimorfonucleares (Boyce y Adler, 2000). La cápsula también desempeña una función importante en la virulencia de Avpg ya que se ha demostrado que bacterias capsuladas forman colonias lisas y son virulentas, mientras que las que no tienen cápsula forman colonias rugosas y son avirulentas. En relación con la severidad de las lesiones, se ha observado que las variantes capsuladas inoculadas en pollos generan una inflamación aguda en la cavidad nasal y los senos paranasales; en contraste, los pollos inoculados con una variante no capsulada muestran ausencia de los signos característicos de la CI (Sawata *et al.* 1985).

Entre las proteínas secretadas por Avpg se han descrito dos, una de 110 y otra de 120 kDa aproximadamente. La proteína de 110 kDa fue reconocida por una mezcla de sueros de cerdos convalecientes de pleuroneumonía (infectados por *Actinobacillus pleuropneumoniae*), así como por un suero contra la leucotoxina de *Mannheimia haemolytica*, sugiriendo que la proteína de 110 kDa pertenece a la familia de toxinas RTX (Mena-Rojas, *et al.* 2004). Cuando se inocularon las proteínas de 110 kDa (proteína putativa RTX) y 120 kDa secretadas por Avpg a embriones de pollos se provocó la muerte de éstos (Pérez *et al.* 2008). En los tres serotipos de Avpg se han descrito toxinas RTX, estas tienen actividad citotóxica para macrófagos aviares y líneas celulares HD11, pero no para macrófagos de bovinos, sugiriendo especificidad en su actividad biológica. Ya se han generado proteínas recombinantes marcadas con histidinas (His-AvxA), estas se han inoculado a conejos para hacer antisueros y se ha demostrado que son totalmente neutralizadas por IgG en todos los serotipos. (Kung *et al.* 2013).

Avpg también secreta proteasas dependientes de iones metálicos divalentes (Rivero *et al.* 2005), las cuales son activas en rangos amplios de pH (3-10, con un óptimo a 7.5) y de temperatura (37-60°C). En otros patógenos de la familia *Pasteurellaceae* las proteasas se consideran factores de virulencia porque degradan inmunoglobulinas séricas del hospedero infectado, por lo que se ha propuesto que las proteasas de Avpg podrían jugar un papel importante en la invasión y el establecimiento del proceso infeccioso, ya que le permitirían a la bacteria obtener nutrientes por la degradación de sustratos de diferentes fuentes,

así como modificar o evadir los sistemas defensivos del hospedero al degradar las inmunoglobulinas. Con base en estas evidencias se ha pensado en el potencial que tienen como factor de virulencia las metaloproteasas, algunas de las cuales se ha descrito como secretadas y son capaces de degradar IgG de pollos. (Rivero-García *et al.* 2005; Rocha *et al.* 2006). Algunas proteasas de Avpg, aunque inactivas, se han detectado en vesículas de membrana, relacionando a las enzimas y a las vesículas como medios de virulencia que requieren una caracterización bioquímica y funcional de mayor profundidad para esclarecer esta vía de virulencia (Ramón *et al.* 2006). El gen de la proteasa IgA fue encontrado en el genoma de Avpg, lo que sugiere que esta especie puede ser capaz de hidrolizar inmunoglobulinas de tipo IgA. (Requena *et al.* 2013). En términos de la caracterización molecular de proteasas en Avpg se sabe que estas enzimas en bacterias de la familia *Pasteurellaceae* varían aproximadamente un 30% entre las secuencias de la misma familia de proteasas, esto quizás tenga relación con la virulencia por afinidades diferenciales hacia los sustratos encontrados en el hospedero y se han propuesto como marcadores auxiliares para la clasificación molecular de esta clase de bacterias patógenas de animales (Martínez, 2012 y Pedraza, 2013)

Otras proteínas secretadas importantes de Avpg son las CDT's, éstas son una familia de proteínas citotóxicas que pueden producir arresto del ciclo celular y apoptosis en las células eucariotas. El análisis de la secuencia del genoma de Avpg muestra que estas toxinas existen en todas las cepas de Avpg. (Chen *et al.* 2013). En términos generales se ha propuesto que las CDT's son producidas por un gran número de bacterias patógenas Gram negativas (Gargi *et al.* 2012; Jinadasa *et al.* 2011; Lara-Tejero y Galan, 2002).

La producción de hemocinas por Avpg al parecer también es importante durante la colonización, debido a que estas moléculas inhiben el crecimiento de otras bacterias Gram negativas que habitan el tracto respiratorio de los pollos y que pueden ser desplazadas por la bacteria patógena (Terry *et al.* 2003). Algunas de estas hemocinas están codificadas por plásmidos de multirresistencia a antimicrobianos, cuyos pesos moleculares oscilan entre las 5 y 10 kb (Hsu *et al.* 2007).

En el genoma de Avpg se ha encontrado un transposón Tn10, mismo que ha sido encontrado en otros patógenos de pollos. También se sabe de la existencia de pilis tipo IV, algunos de estos quizás están involucrados en la transferencia de plásmidos y locomoción independiente de flagelo (Requena *et al.* 2013).

### **Importancia del hierro para las bacterias**

El hierro es el más importante micronutriente usado por todos los organismos. Este ión metálico es esencial para el metabolismo celular; actúa como cofactor de un gran número de enzimas tales como catalasas, peroxidasas, oxidasas y citocromos que participan en la síntesis de pirimidinas y aminoácidos (Wackett *et al.* 2004). Se ha observado que la adquisición de este nutriente por microorganismos patógenos es crucial para su habilidad de causar enfermedades (Litwin y Calderwood, 1993). Los organismos superiores disponen de mecanismos constitutivos para mantener un bajo nivel extracelular de hierro basados en proteínas que secuestran los iones de hierro, como transferrinas, hemoglobina, hemopexina, ferritina y albúmina. Existen tres tipos de transferrinas: la serotransferrina que se encuentra en el plasma y líquido linfático, la lactoferrina que se localiza en el interior de neutrófilos y en la mayoría de fluidos seminales e intestinales, (moco cervical, leche, etc.); y la ovotransferrina que se encuentra en la albúmina de los huevos (Ratledge y Dover, 2000).

### **Metabolismo del hierro y regulación genética en la familia *Pasteurellaceae***

La familia *Pasteurellaceae* incluye bacterias patógenas de animales y humanos, que adquieren el hierro necesario directamente de la transferrina del hospedero, por medio de los receptores TbpA y TbpB, (Gray-Owen y Schryvers, 1996). Aunque, algunas bacterias adquieren hierro de la hemoglobina como: *P. multocida*, *H. influenzae*, *H. ducreyi* y *A. pleuropneumoniae* (Srikumar *et al.* 2004).

En Avpg el primer mecanismo de adquisición de hierro descrito fue a partir del uso de la ovotransferrina mediante dos proteínas de unión a transferrina TBP1 y TBP2, similares a las de otras especies bacterianas. Se ha observado que los fragmentos

lóbulo-N y lóbulo-C de la ovotransferrina y la transferrina humana mantienen el crecimiento de *Av. paragallinarum* y *Neisseria meningitidis* respectivamente, en condiciones limitadas de hierro, sugiriendo que este mecanismo es más general para la adquisición de hierro (Alcantara y Schryvers, 1996).

## JUSTIFICACION

La bacteria *Avibacterium paragallinarum* produce una infección en aves conocida como coriza infecciosa, se han estudiado algunas moléculas bacterianas secretadas, con el fin de saber si son relevantes en el desarrollo de la enfermedad, sin embargo muchas no se conocen y podrían ayudarnos a tener una mejor comprensión de las herramientas con las que cuenta el microorganismo para su virulencia. La eliminación de las aves enfermas es la medida de control más eficiente que se tiene, sin embargo, no es práctica, por lo que se sugiere la vacunación como principal control de la coriza infecciosa. (Blackall, 1995). Hasta la fecha se cuenta con vacunas que emplean células inactivas de *A. paragallinarum* para controlar la enfermedad, sin embargo, estas inducen protección sólo contra algunos serotipos. (Dávila 2010; Requena *et al.* 2013). La falta de efectividad en las vacunas requiere de mayores esfuerzos y nuevos enfoques desde un punto de vista molecular. La creación de nuevas vacunas como proteínas recombinantes no sólo es benéfica desde el punto de vista de control de la enfermedad, sino que también tiene impacto en el desarrollo de la industria avícola, evitando pérdidas económicas. El estudio que se propone con *A. paragallinarum* es de relevancia científica y trascendencia económica.

# OBJETIVOS

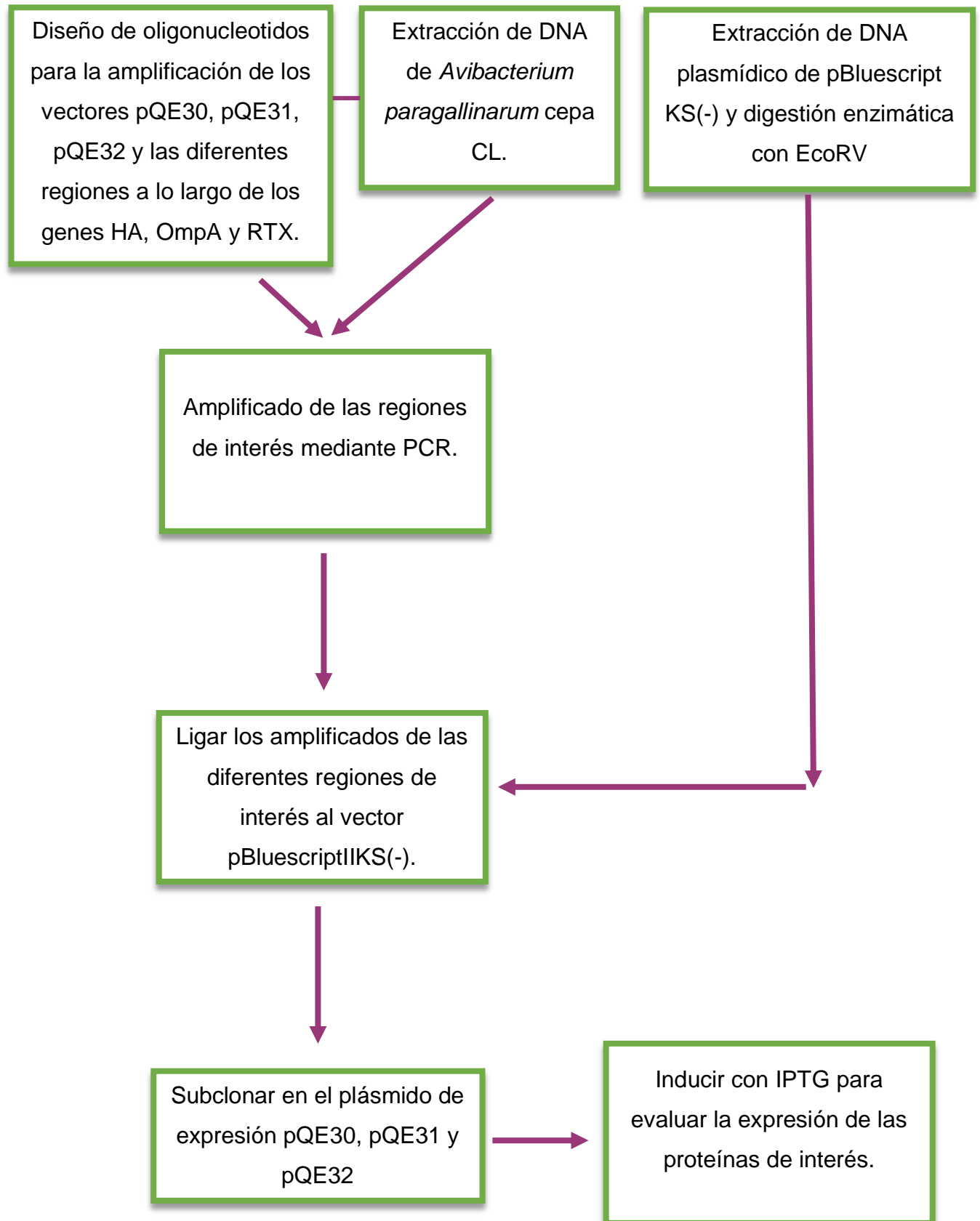
## **Objetivo general:**

Elaboración de construcciones plasmídicas heterólogas para la expresión de antígenos de *Avibacterium paragallinarum*.

## **Objetivos específicos:**

- a) Diseñar oligonucleótidos para genes de Hg, Rtx y OmpA de Avpg.
- b) Verificar la existencia de los genes elegidos por la estrategia de secuenciación
- c) Clonación de las secuencias de interés
- d) Construir los vectores para la expresión de los antígenos de Avpg
- e) Verificar la expresión de los genes de Avpg en las construcciones

## ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



## MATERIALES Y METODOS

**Tabla 1.** Cepas y medios

Cepas	Características	Medios de crecimiento
<i>Avibacterium paragallinarum</i> CL. (Laboratorio de Microbiología Molecular y Celular, CICM ICUAP).	Cepa con fenotipo virulento. Serotipo C.	Medio Infusión Cerebro Corazón (BHI) suplementado con suero de caballo (5%) y NAD (10-20 µg/ml). Agar sangre de carnero con una cepa nodriza ( <i>Staphylococcus aureus</i> )
<i>Escherichia coli</i> DH5α. (Gibco-BRL).	(F <sup>-</sup> Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44</i> λ- <i>thi-1 gyrA96 relA1</i> )	Medio líquido y sólido LB (Luria Bertani).
<i>Escherichia coli</i> M15. (Qiagen).	(F <sup>-</sup> , Φ80Δ <i>lacM15</i> , <i>thi</i> , <i>lac</i> -, <i>mtl</i> -, <i>recA</i> +, Km <sup>R</sup> )	Medio líquido y sólido LB (Luria Bertani) adicionado con 25 µg/ml de Kanamicina
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS. (Invitrogen).	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon</i> <i>hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i> λ( <i>DE3</i> ) pLysS(m <sup>R</sup> )	Medio líquido y sólido LB con 34 µg/ml de Cloranfenicol

### Diseño de oligonucleótidos

En la base de datos Genbank se buscaron las secuencias de genes que codifican para la hemaglutinina (Hg), para la toxina tipo Rtx y para OmpA de Avpg y otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Haemophilus influenzae* y *Pasteurella multocida*). Las secuencias se alinearon en la plataforma Clustal W para localizar regiones conservadas. Considerando estas secuencias se diseñaron juegos de oligonucleótidos (directo y reverso) con ayuda

del programa DNASTar. Se agregaron sitios de corte *Bam*HI a los oligonucleótidos directos y *Hind*III a los oligonucleótidos reversos para hacer la fusión de secuencias en el vector de expresión pQE30. Adicionalmente se diseñaron oligonucleotidos que amplificaban río arriba y río abajo del sitio de clonación múltiple del vector de expresión pQE30, para poder verificar las construcciones obtenidas por PCR y secuenciación de nucleótidos.

### **Obtención de DNA total bacteriano**

Se prepararon cultivos de Avpg en 3 ml de medio BHI, incubando a 37°C hasta la interfase fase-log/fase-estacionaria. Una vez crecidos los cultivos se centrifugaron en tubos Eppendorf y se desechó el sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió en 150 µl de buffer de lisis (TrisHCl 50 mM pH=8, NaCl 0.1 M, EDTA 10 mM pH=7.5), se agitó fuertemente para resuspender, con ayuda de un palillo se agregó una pizca de lisozima y se incubó 10 min a 37°C, se añadió sarcosil a una concentración final de 1.5% para completar la lisis, a la solución viscosa que se formó se le añadió un volumen de fenol y se mezcló varias veces, la suspensión se centrifugó 10 min a 11000 rpm y la fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo, a la fase acuosa se agregó un volumen de cloroformo, se agitó fuertemente y se centrifugó 10 min a 11000 rpm, el sobrenadante se pasó a un tubo Eppendorf nuevo y se agregó un volumen de cloroformo, se agitó y se centrifugó nuevamente, el sobrenadante se pasó a un tubo Eppendorf nuevo, a este se le agregó un volumen de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH7, se guardó a -20°C por 30 min y posteriormente se centrifugó 10 min a 11,000 rpm. Una vez obtenida la pastilla de DNA se lavó con 200 µl de etanol al 70%. Se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 150 µl de agua inyectable marca PiSA<sup>R</sup>.

Se agregó RNAsa y se dejó incubar durante 2 h a 37°C, pasado este tiempo se agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se agitó fuertemente y se centrifugó 10 min a 11000 rpm, el sobrenadante se pasó a un nuevo tubo y se agregó cloroformo, se agito fuertemente y se centrifugó 10 min a 11000 rpm (este último paso se repite dos veces). El sobrenadante se pasó a un tubo Eppendorf

nuevo, a este se le agregó un volumen de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 7, se guardó a -20°C por 30 min y posteriormente se centrifugó 10 min a 11,000 rpm. Una vez obtenida la pastilla de DNA, ésta se lavó con 200 µl de etanol al 70%. Se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 150 µl de agua inyectable marca PiSA<sup>R</sup>. El DNA se guardó a -20°C hasta su uso.

### **Extracción de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina de Birnboim**

Para la obtención del vector de clonación pBluescriptII KS (-) y el vector de expresión pQE30 se hicieron cultivos de 50 ml en un matraz con medio LB adicionado con 100 µg/ml de ampicilina, e inoculado con una colonia de *E. coli* DH5α que contenía el plásmido respectivo, este se incubó con agitación constante a 37°C por 24 h. El cultivo se centrifugó 10 min a 3500 rpm, se desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió con 3 ml de solución Birnboim I, posteriormente se agregaron 6 ml de solución Birnboim II y se mezcló fuertemente, se añadieron 4 ml de solución Birnboim III y se dejaron en hielo 5 min, posteriormente centrifugó a 3500 rpm por 15 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo falcón de 50 ml con ayuda de una gasa estéril para separar DNA de restos celulares, al DNA del tubo se agregan 0.6 volúmenes de isopropanol para precipitarlo, se centrifugó a 3500 rpm/15min. El DNA plasmídico se resuspendió en 200 µl de agua inyectable marca PiSA<sup>R</sup>, se purificó por fenolización y se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

A un tubo Eppendorf de 0.2 ml para PCR se le agregaron: agua, buffer para Taq DNA polimerasa/Pfx (10X), MgCl(50mM)/MgSO<sub>4</sub>(50mM), dNTP's (10mM), oligonucleótido directo (10µM), oligonucleotido reverso(10µM), DNA de Avpg (10ng) y enzima Taq DNA polimerasa/Pfx (.2µl). Se mezclaron suavemente y se dejaron en el termociclador, en condiciones específicas para cada gen

### **Ligación de los productos amplificados al vector pBluescript KS (-)**

Los diferentes productos de PCR obtenidos con DNA polimerasa Pfx se ligaron al

vector pBluescriptII KS(-) previamente digerido con la enzima *EcoRV*, que produce un corte romo. La ligación se incubó toda la noche a temperatura ambiente con 1µl de T4 DNA ligasa (5U/µl) en el buffer proporcionado por el fabricante.

### **Preparación de células competentes de *E. coli***

Tubos conteniendo medio LB fueron inoculados con *E. coli* DH5α, *E. coli* M15 y *E. coli* BL21 (DE3) pLysS y se incubaron durante 24 h a 37°C con agitación constante. Estos cultivos se usaron para inocular matraces con 250 ml de medio LB que se incubaron con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) de 0.5 a 550 nm. Se centrifugaron a 4°C, a 4000 rpm/10 min y a las pastillas se les agregaron 10 ml de solución I RbCl (RbCl 100mM, MnCl 45mM, CH<sub>3</sub>COOK 35mM, CaCl<sub>2</sub> 10mM, y glicerol 15%), se resuspendieron y se dejaron 15 min en hielo. Se centrifugaron nuevamente a 4°C, a 4000 rpm/10 min, se desechó el sobrenadante y se agregaron 2 ml de solución II RbCl (MOPS 10mM, CaCl<sub>2</sub> 75mM, RbCl 10mM y glicerol 15%), se resuspendieron y se hicieron alícuotas de 200 µl. Se guardaron a -70°C hasta su uso para la transformación.

### **Transformación de células competentes**

Se tomó una alícuota de células competentes (100µl) obtenidas con RbCl y a estas se les agregó 10 µl de ligación. Se mezclaron suavemente y se dejaron 30 min en hielo. Posteriormente se sometió a choque térmico incubando a 37°C durante 10 min. Para favorecer la recuperación de las células transformadas se añadió 1 ml de medio LB y se incubó a 37°C durante 1 h. La suspensión se centrifugo 15 seg, la pastilla se resuspendió y se sembró homogéneamente con ayuda de una varilla de vidrio en cajas Petri con medio LB/Ampicilina/X-gal e IPTG. Las cajas se incubaron durante 18 horas a 37°C para determinar la presencia de colonias transformantes, se eligieron las colonias blancas, estas se producen al encontrarse el inserto ligado al vector, puesto que el inserto interrumpe al gen lacZ. Las colonias azules fueron descartadas por contener el vector vacío. Con ayuda de palillos estériles las colonias blancas se sembraron en una nueva caja Petri con medio LB/Ampicilina/X-

gal e IPTG así como en medio líquido LB/ampicilina y la pastilla fue cosechada por centrifugación para analizar el patrón de restricción plasmídico.

### **Restricciones enzimáticas para liberar el fragmento de interés del vector pBluescriptII KS(-)**

Se extrajo DNA plasmídico de las transformantes, se hicieron digestiones dobles con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, para liberar los fragmentos de interés clonados. Se hizo una electroforesis preparativa con todo el producto de digestión en un gel de agarosa 0.8%, se tiñó el gel con bromuro de etidio (BET), se observó con luz UV y se cortó la banda de interés para purificar el DNA y hacer la subclonación pertinente.

### **Ligación de los productos digeridos al vector de expresión pQE30**

El DNA liberado del vector de clonación pBluescriptII KS (-) con *Bam*HI y *Hind*III, se ligó con el vector de expresión pQE30 previamente digerido con las mismas enzimas. Para esto se empleó 1µl de T4 DNA ligasa (5U/µl), incubando la mezcla toda la noche a temperatura ambiente. Esta ligación se usó para transformar posteriormente células de *E. coli* DH5α y se hizo la selección correspondiente.

### **Transformación de construcciones en pQE30 en células de expresión *E. coli* M15**

El DNA de las construcciones con pQE30 obtenido en *E. coli* DH5α fue transferido a la cepa M15 de *E. coli* por la técnica de choque térmico mencionada anteriormente. La selección se hizo en cajas de Petri que contenían medio LB/Ampicilina (100 µg/ml) /Kanamicina (50 µg/ml).

### **Inducción con IPTG**

Las construcciones en la cepa *E. coli* M15 se inocularon en 20ml de medio LB adicionado con Ampicilina (100 µg/µl) y Kanamicina (50 µg/µl). los cultivos se incubaron hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de 0.6. Se tomó una alícuota de 1 ml de cultivo sin inducir, se centrifugó y las pastilla se guardó a -20°C. Al resto del cultivo se le

agregó una concentración de IPTG específica, que fue desde .5mM hasta 10mM, se incubó con agitación constante a 150rpm, durante seis horas y cada hora se tomó una alícuota del cultivo, se centrifugaron y las pastillas se guardaron a -20°C.

## **SDS-PAGE**

Se centrifugaron los cultivos inducidos y a las pastillas se les agregó 50 µl de Tris-HCl 50 mM pH 7.5. Se incubaron a 37°C por 10 min y se les agregó 50 µl de buffer 2X de carga con β mercaptoetanol (5%), los tubos con las muestras se hirvieron 5 min y se dejaron en hielo hasta su uso.

15 µl de cada muestra preparada previamente fueron cargados por pozo y separadas electroforéticamente en un gel de acrilamida al 10% (anexo K). Una vez que terminó el corrimiento el gel se tiñó con Azul de Coomassie por dos horas. Posteriormente se quitó el colorante y se dejó en solución desteñidora (ácido acético glacial 10%).

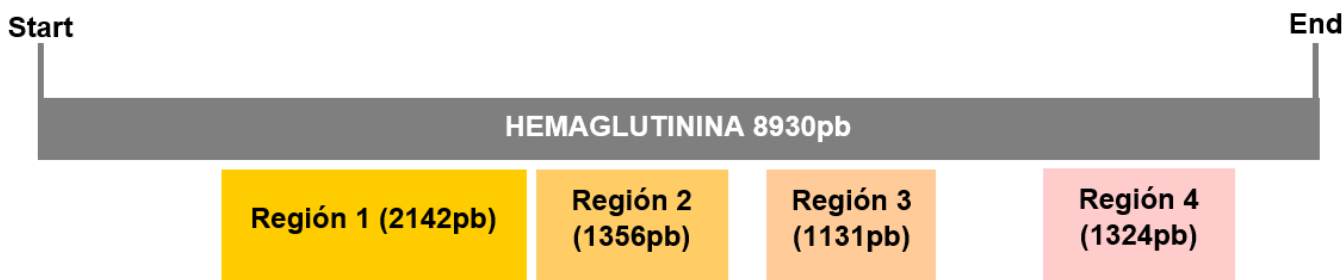
# RESULTADOS

## Diseño de oligonucleótidos

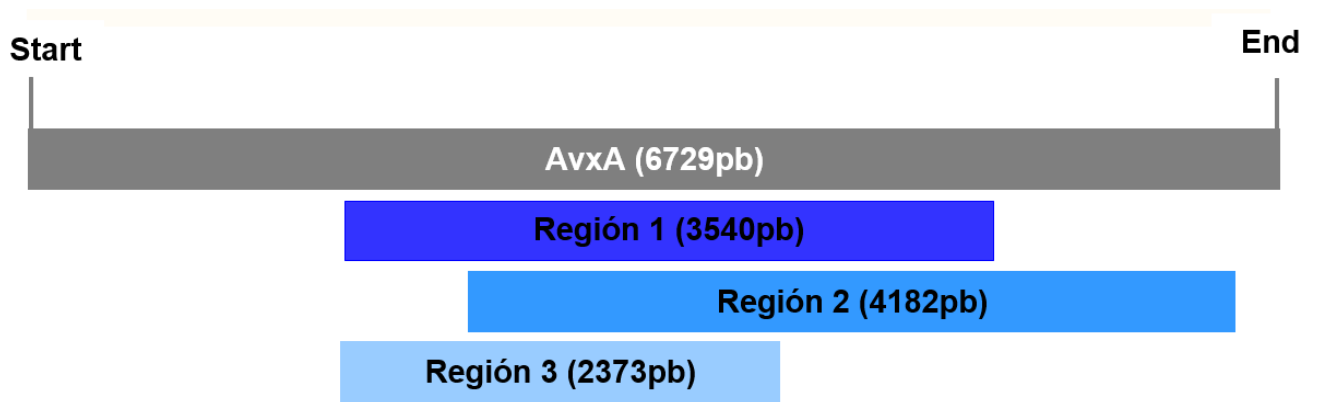
Se diseñaron cuatro juegos de oligonucleotidos a lo largo del gen de Hemaglutinina Hg, tres juegos para Rtx y dos juegos para OmpA. Se muestran en la tabla 2.

Gen de interés	Región	Oligonucleótido directo	Oligonucleótido reverso	Tamaño del amplificado	Temperatura de amplificación
<b>Hemaglutinina</b>	R.1	CCGCAGTGGGTTGTTAGC	CTCCCCAGCCGTTCCGATACTT	2142 pb	64°C
	R.2	TCACAGCTTTATGCAACGAAC TTT	TCATCAGTAAGGTTAGAGGCATCC	1358 pb	60°C
	R.3	TCGCGTGTATGGTGATGAAG	AATCGTTGTTTTCCCTGGTA	1132 pb	59°C
	R.4	AATTTTGCGGTTGTTCTCG	AAACGATATCATTCTGTCTGTCAA	1325 pb	58°C
<b>Rtx</b>	R.1	TATGGTGTAGCCTCCGTGAAT	GATATCATCACCAGCACCTCCAC	3540 pb	61°C
	R.2	GATGGAGGTGATGATTTTCTTGA	ATCACCAGCAATAATCGTTTCTA	4182 pb	58°C
	R.3	TATGGTGTAGCCTCCGTGAAT	CGCATTGCTCACCGTCACAGAA	2373 pb	62°C
<b>OmpA</b>	R.1	ATGAAAAAACTGCAATCGCA	TGAGATTTCTACACGACG	1017 pb	57°C
	R.2	GTAGCACAAGCTGCACCA	CGCGCCAGTTACTGGGTT	894 pb	63°C

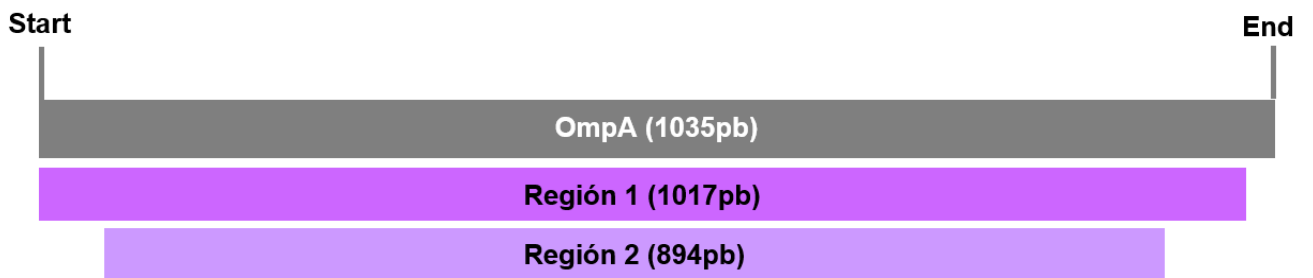
**Tabla 2.** Listado y secuencia de oligonucleótidos empleados para amplificar por PCR regiones internas de tres genes: de Hemaglutinina, de la toxina tipo AvxA (Rtx) y OmpA. Se indica el tamaño del amplificado para cada combinación de oligonucleótidos.



**Figura 1.** Esquema que muestra cuatro regiones que se amplificaron para el gen de 8930 bases que codifica para la hemaglutinina de Avpg, se indica la ubicación y el tamaño en pb. Las cuatro regiones son distintas y no sobrelapan.



**Figura 2.** Esquema que muestra las tres regiones que se amplificaron para el gen que codifica la toxina AvxA (Rtx), se indica la ubicación y el tamaño en pb. Los tres amplificados contienen regiones comunes que se sobrelapan.



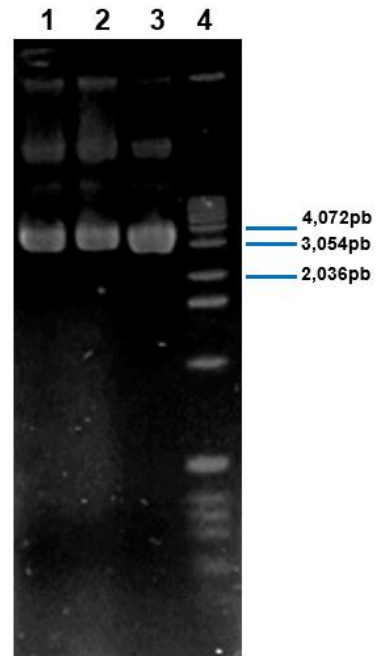
**Figura 3.** Esquema que muestra las dos regiones que se amplificaron para el gen que codifica a OmpA, se indica la ubicación y el tamaño en pb. La región corta es una región interna de la región larga.

## Obtención de DNA total de Avpg y extracción de DNA plasmídico

Un DNA total se obtuvo a partir de cultivos de Avpg cepa CL y mantuvo su integridad después de ser tratado con RNAsa 0.1% (figura 4). También se extrajo DNA de pBluescriptII KS(-) de 2958 pb por el método de lisis alcalina de Birnboim, este plásmido mostro varias bandas de DNA superenrollado que se mantuvieron incluso después de tratarlo con RNAsa 0.1% (figura 5).



**Figura 4.** Gel de agarosa 0.8%, en el que se muestra DNA genómico de Avpg purificado por lisis celular y por fenolización. Los carriles uno y dos corresponden a dos muestras obtenidas independientemente.

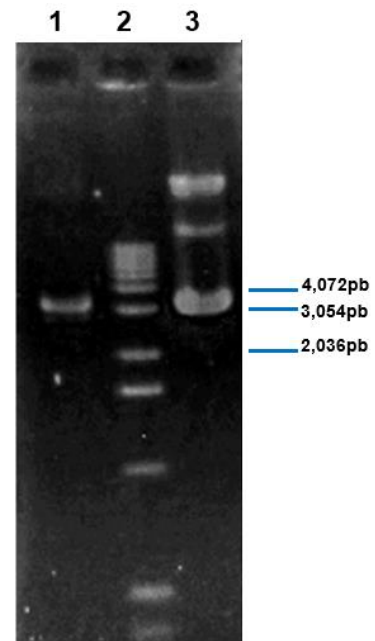


**Figura 5.** Gel de agarosa 0.8%, donde se observa DNA plasmídico pBluescrip KS(-) obtenido en tres purificaciones independientes. En el carril cuatro se muestra el marcador de peso molecular.

## Digestión del vector pBluescriptII KS (-)

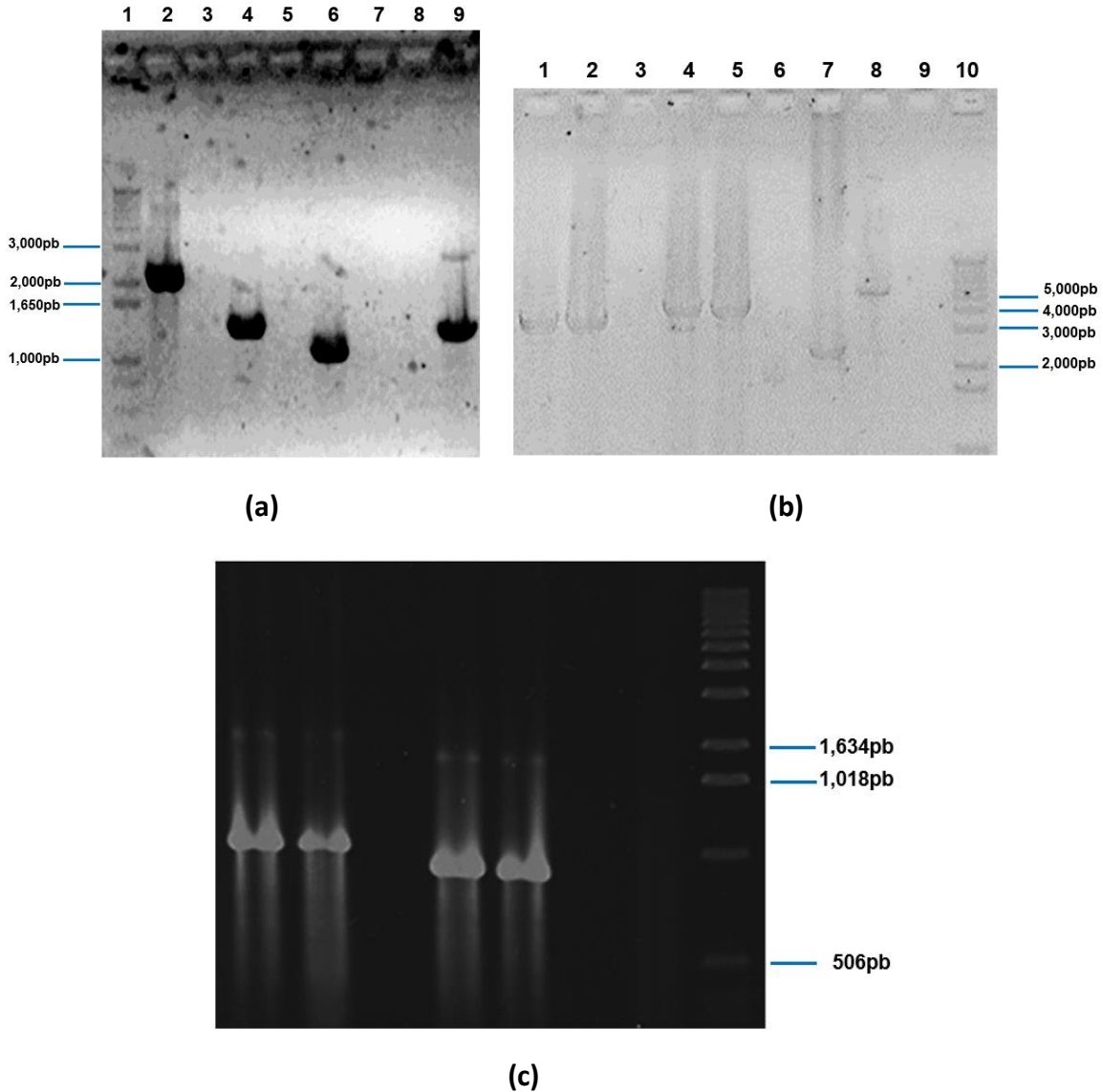
El plásmido pBluescriptII KS(-) se digirió con la enzima de restricción *EcoRV*, esta enzima produce una molécula lineal que puede ser visualizada en gel de agarosa-BET para estimar el peso molecular del plásmido, la enzima además deja extremos romos en el vector, compatibles para clonar directamente los productos obtenidos por PCR que tengan extremos romos (figura 6).

**Figura 6.** Amplificado del plásmido pBluescriptII KS (-) tratado con la enzima *EcoRV*. Carril 1 -DNA digerido, Carril 2 - marcador de peso molecular, Carril 3 - plásmido sin digerir.



## Amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Con los diferentes juegos de oligonucleótidos se amplificaron las cuatro regiones internas del gen que codifica para Hg, tres regiones para el gen que codifica la AvxA (Rtx) y dos regiones para el que codifica a OmpA (Fig. 7). La primera amplificación se hizo con Taq DNA polimerasa y posteriormente se reamplificó con DNA polimerasa Pfx para obtener extremos romos.



**Figura 7.** amplificados que muestran los productos obtenidos por PCR de segmentos de DNA que corresponden a los genes hg(a), avxA(b) y ompA(c). En la figura **7(a)** se observan los productos amplificados de 2142pb (carril 2), 1356pb (carril 4), 1131pb (carril 6) y 1324pb (carril 9). Los carriles 3, 5 7 y 8 corresponden a los controles negativos. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular. En la figura **7(b)** se observan los productos amplificados de 3540pb (carriles 1 y 2), 4182pb (carriles 4 y 5) y 2373pb (carril 7). Los carriles 3, 6 y 9 corresponde a los controles negativos. En el carril 10 se muestra el marcador de peso molecular. En la figura **7(c)** se observan los productos amplificados de 1017pb (carriles 1 y 2) y 894pb (carriles 4 y 5). Los carriles 3 y 6 corresponden a controles negativos. En el carril 8 se muestra el marcador de peso molecular.

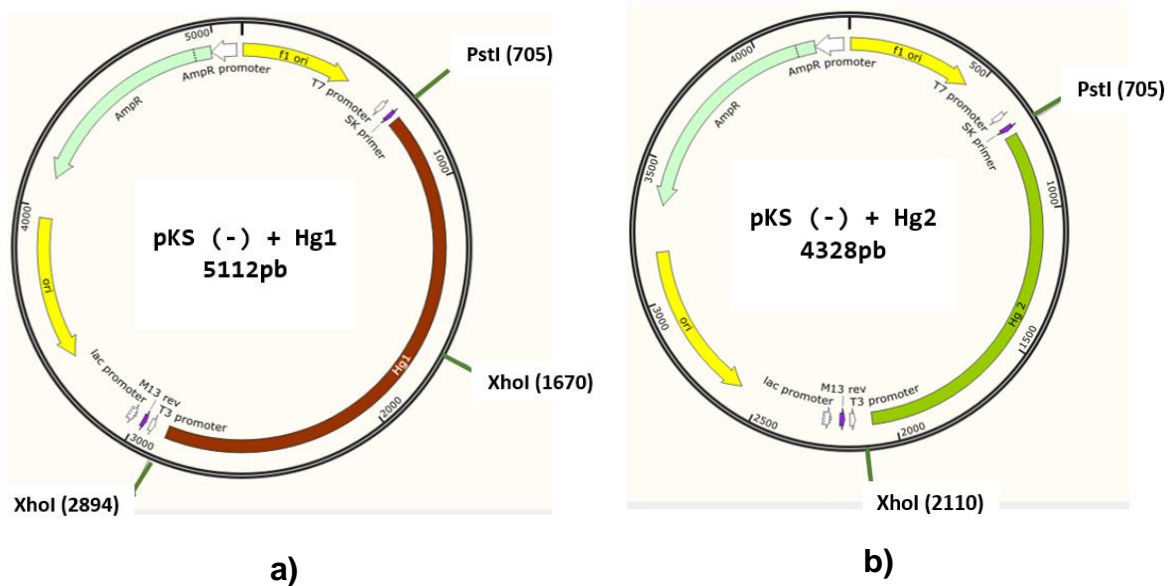
## Clonación de las nueve regiones de interés en pBluescriptII KS(-)

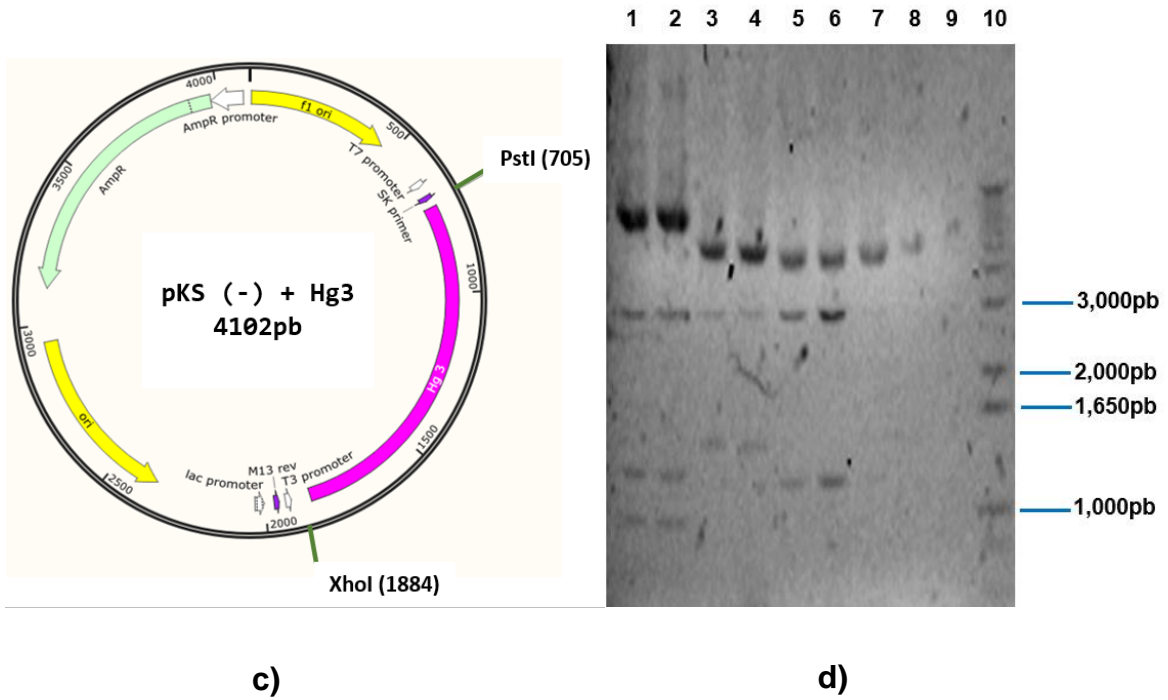
Los productos de PCR de las nueve reacciones de amplificación se ligaron al vector pBluescriptII KS(-), cada una por separado y se transformaron en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las transformantes que contenían el vector más el inserto se seleccionaron en agar LB/Amp(100 $\mu$ g/ml), 40 $\mu$ l X-gal(20mg/ml) y 4 $\mu$ l IPTG(200mg/ml), se seleccionaron colonias blancas, se sembraron toda la noche como se indica en materiales y métodos y se extrajo el DNA plasmídico para verificar la clonación del inserto. El DNA fue digerido completamente con enzimas de restricción *Pst*I y *Xho*I para ver si cumplía con el patrón de bandeo específico de esta construcción y así comprobarla, posteriormente se hizo la digestión con *Bam*HI y *Hind*II para liberar el producto clonado.

## HEMAGLUTININA

### Construcciones Hg1, Hg2 y Hg3

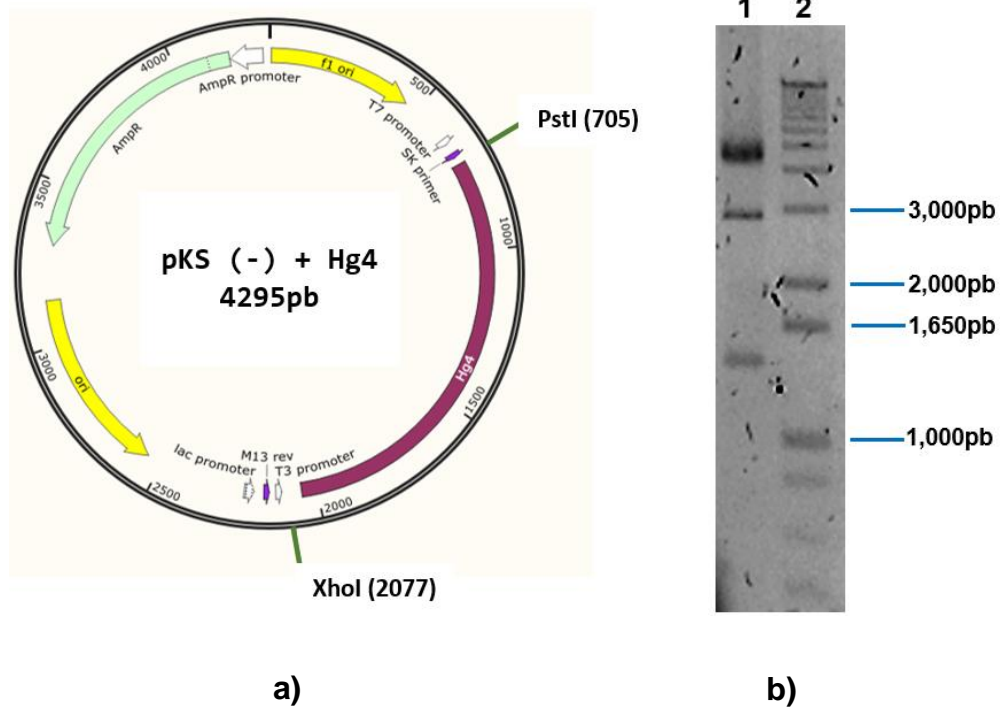
Se hicieron clonaciones en el vector pBluescript KS (-), posteriormente para verificar la construcción se hicieron digestiones enzimáticas con *Pst*I y *Xho*I, esperando cortes específicos para cada construcción (Fig. 8 y 9).





**Figura 8. a)** Mapa de la construcción pKS (-) y Hg1. **b)** Mapa de la construcción pKS (-) y Hg2. **c)** Mapa de la construcción pKS (-) y Hg3. **d)** Verificación de las construcciones que contienen segmentos del gen de hemaglutinina. En los 9 carriles se muestra DNA plasmídico digerido con enzimas de restricción *PstI* y *XhoI*. Los carriles 1 y 2 nos muestran un patrón de bandeo que se espera para la construcción Hg1(2926pb, 1224pb y 965pb). Los carriles 3 y 4 muestran el patrón de bandeo esperado para la construcción Hg2 (2926pb y 1405pb). Los carriles 5 y 6 muestran el patrón de bandeo esperado para la construcción Hg3 (2926pb y 1179pb). El carril 7, 8 y 9 muestran DNA que no muestra las bandas esperadas y el carril 10 muestra el marcador de peso molecular.

## Construcción Hg4



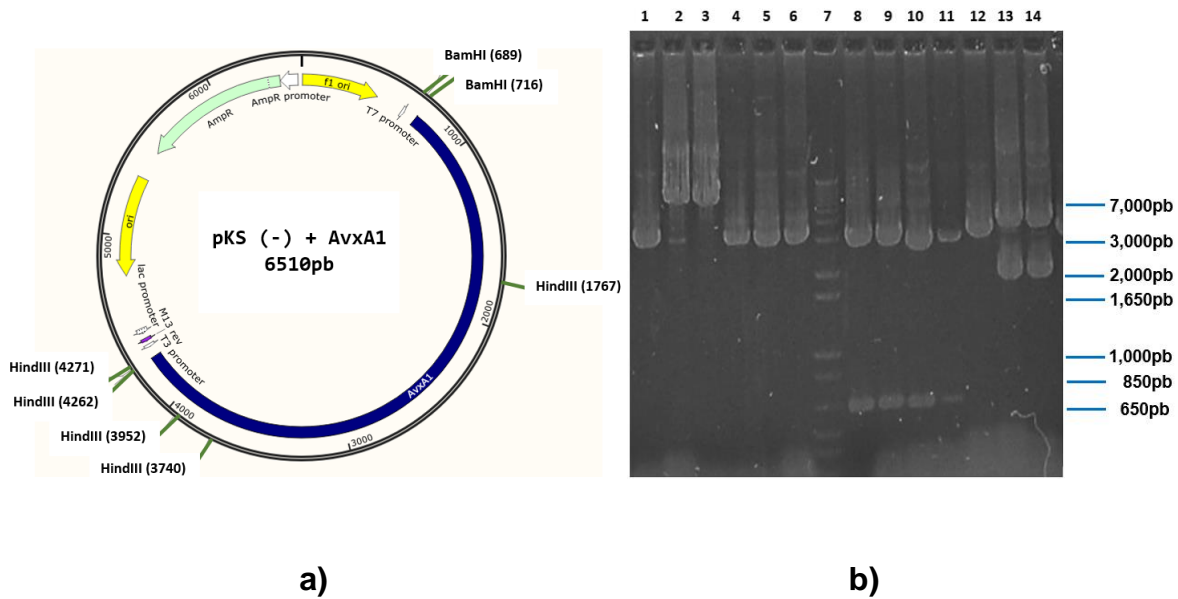
**Figura 9. a)** Mapa de la construcción pKS (-) y Hg4. **b)** Verificación de la construcción Hg4. En el carril 1 se muestra DNA plasmídico digerido con *PstI* y *XhoI*, se observa una banda de 2926 pb y una de 1372 pb, este patrón de bandeo indica la existencia de la construcción Hg4. En el carril 2 se muestra el marcador de peso molecular. El gel fue teñido con EtBr y visualizado en transiluminador UV.

## AvxA (RTX)

Se obtuvieron tres construcciones con los tres diferentes fragmentos de AvxA (RTX) en el vector pBluescriptII KS (-).

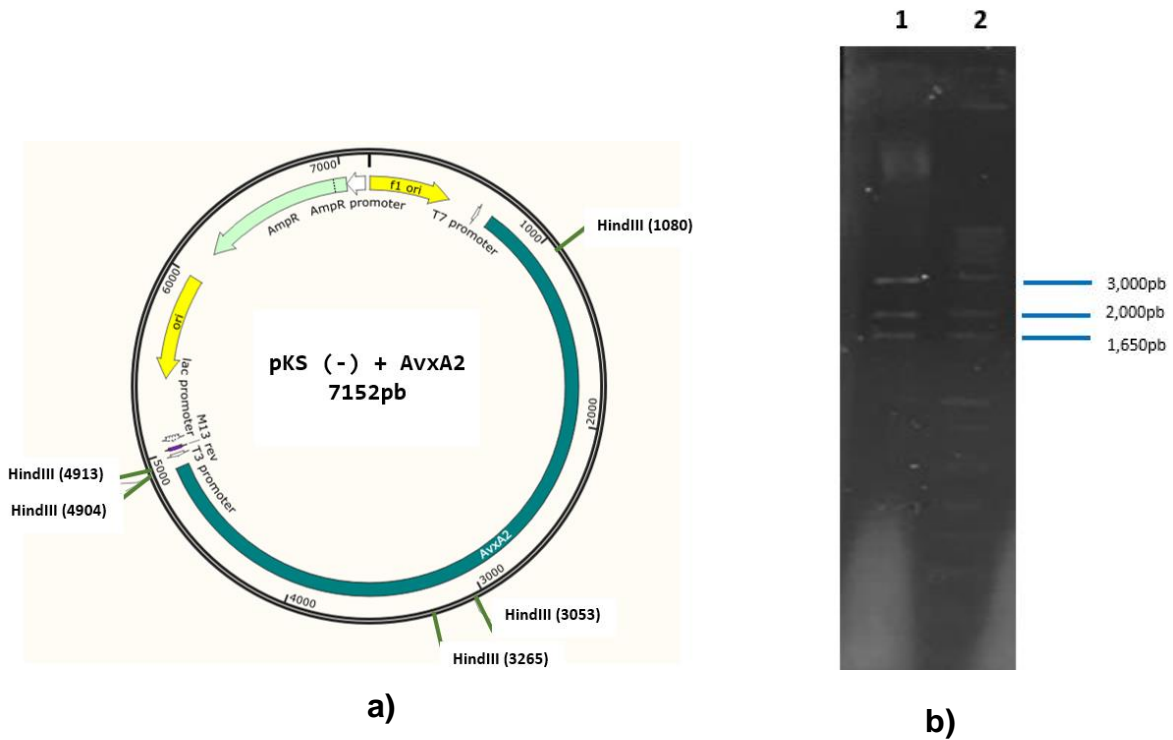
Las construcciones en pBluescriptII KS (-) con diferentes secuencias del gen *avxA* (Rtx) fueron digeridas con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, esperando tamaños de pesos moleculares específicos (Fig. 10, 11 y 12).

### Construcción AvxA1



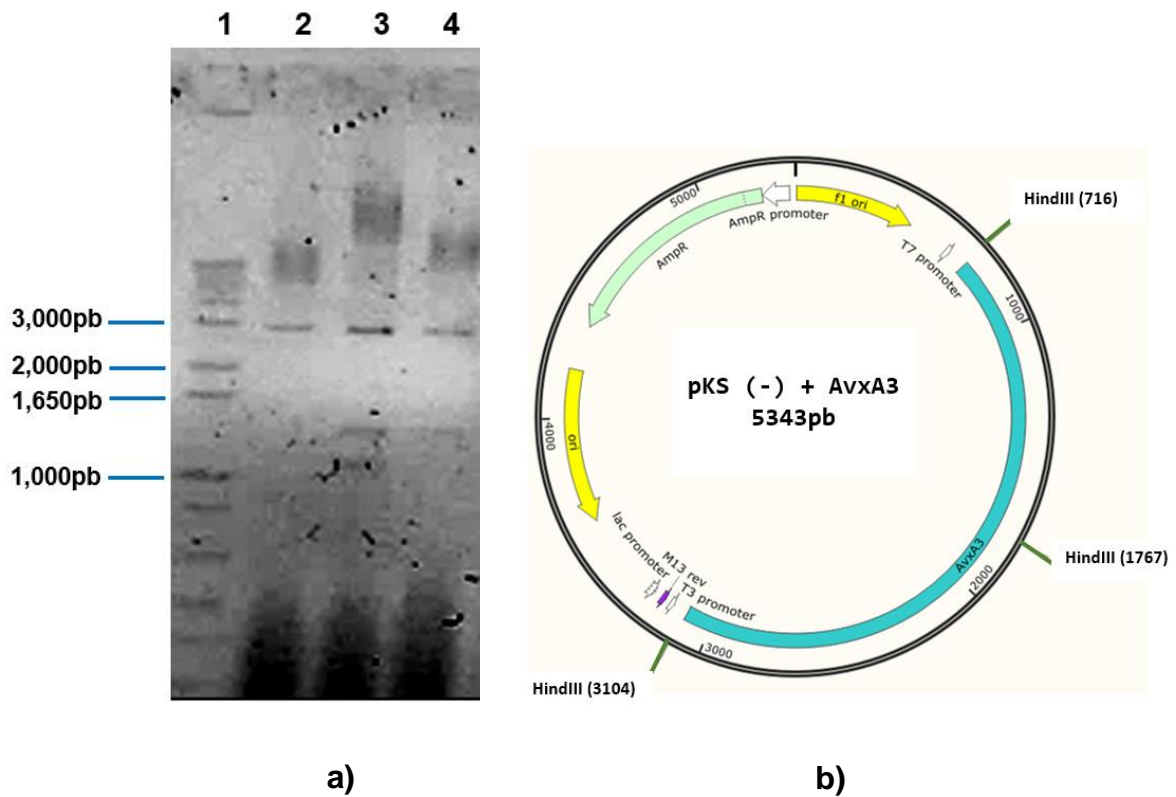
**Figura 10. a)** Mapa de la construcción pKS (-) y AvxA1. **b)** Digestiones *Bam*HI y *Hind*III de las construcciones del plásmido pBluescriptII KS(-) con las secuencias de AvxA de Avpg. Como producto de digestión con *Bam*HI, se observa una banda de 6510pb (carriles 2 y 3), la banda de 27pb no se observa por su tamaño pequeño. Como producto de digestión con *Hind*III, se observa una banda de 4006pb y una de 1973pb (carriles 13 y 14). Las bandas de 310 pb, 212 pb y 9 pb no se observan por ser muy pequeñas. En el carril 7 se muestra el marcador de peso molecular. Los demás carriles corresponden a construcciones que no liberaron el fragmento esperado.

## Construcción AvxA2



**Figura 11. a)** Mapa de la construcción pKS (-) y AvxA2. **b)** Verificación de la construcción AvxA2 por digestión *HindIII*. La digestión liberó un fragmento de 3322pb, uno de 1973pb y uno de 1639pb (carril 1), los fragmentos de 212pb y 9pb no se logran observar. En el carril 2 se observa el marcador de peso molecular.

## Construcción AvxA3

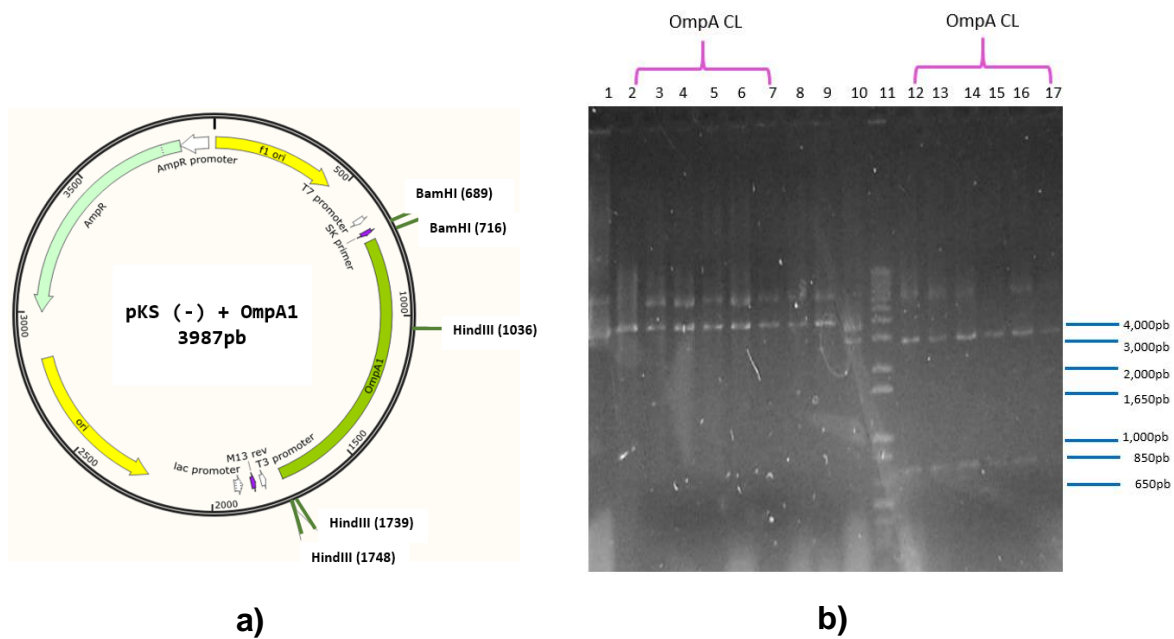


**Figura 12. a)** Mapa de la construcción pKS (-) y AvxA3. **b)** Verificación de la construcción AvxA3 por digestiones *HindIII*. La digestión liberó un fragmento de 2958pb, uno de 1337pb y uno de 10510pb (carril 3). En los carriles 2 y 4 no se observan con claridad el DNA digerido. El carril 1 contiene el marcador de peso molecular.

## OmpA

Se verificaron las construcciones de OmpA en pBluescriptII KS (-) con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III juntas y por separado, esperando tamaños de bandas específicos para la construcción (Fig. 13).

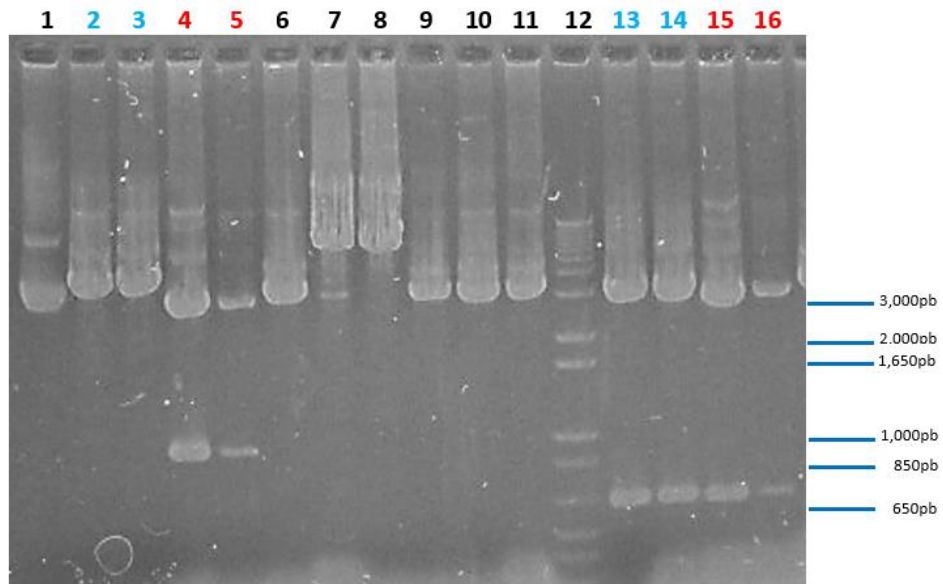
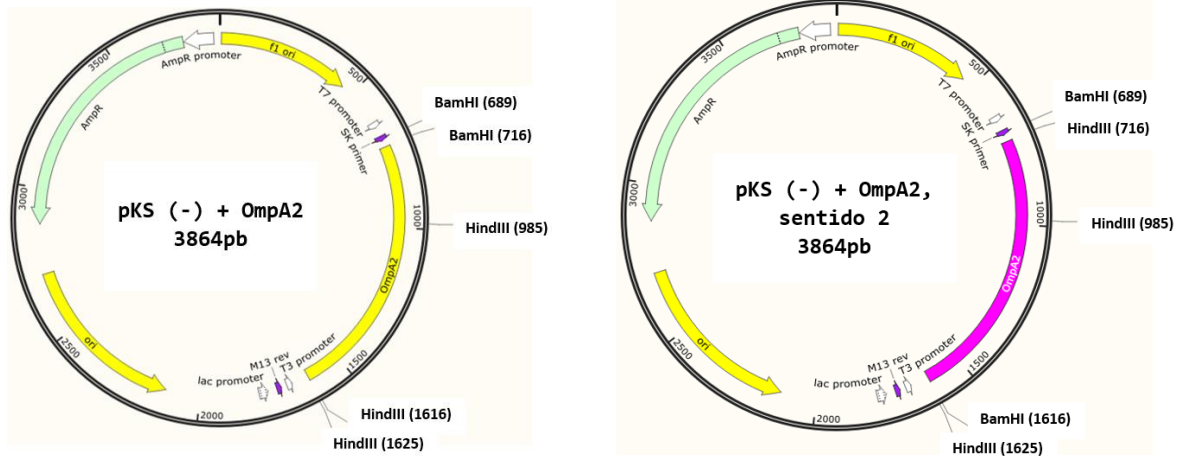
### Construcción OmpA1



**Figura 13. a)** Mapa de la construcción pKS (-) y OmpA1. **b)** Análisis de las construcciones OmpA1. En los carriles 2 al 7 se muestran digestiones *Bam*HI de las construcciones hechas con DNA de la cepa CL, se observó una banda de 3963 pb que se esperaba. La banda de 27 pb no se pudo observar en este análisis. En los carriles 12 al 17 se muestran construcciones de la cepa CL digeridas con *Bam*HI y *Hind*III juntas, se observaron dos bandas, una de 2931 y otra de 703 pb, lo que es concordante con el patrón esperado. Las bandas de 320 pb, 27 pb y 9 pb no se observaron debido a su tamaño y baja fluorescencia. El carril 11 contiene el marcador de peso molecular.

## Construcción OmpA2

La construcción de OmpA2 se obtuvo en dos orientaciones, su identificación por medio de digestiones se muestra a continuación (Fig. 14).



**c)**

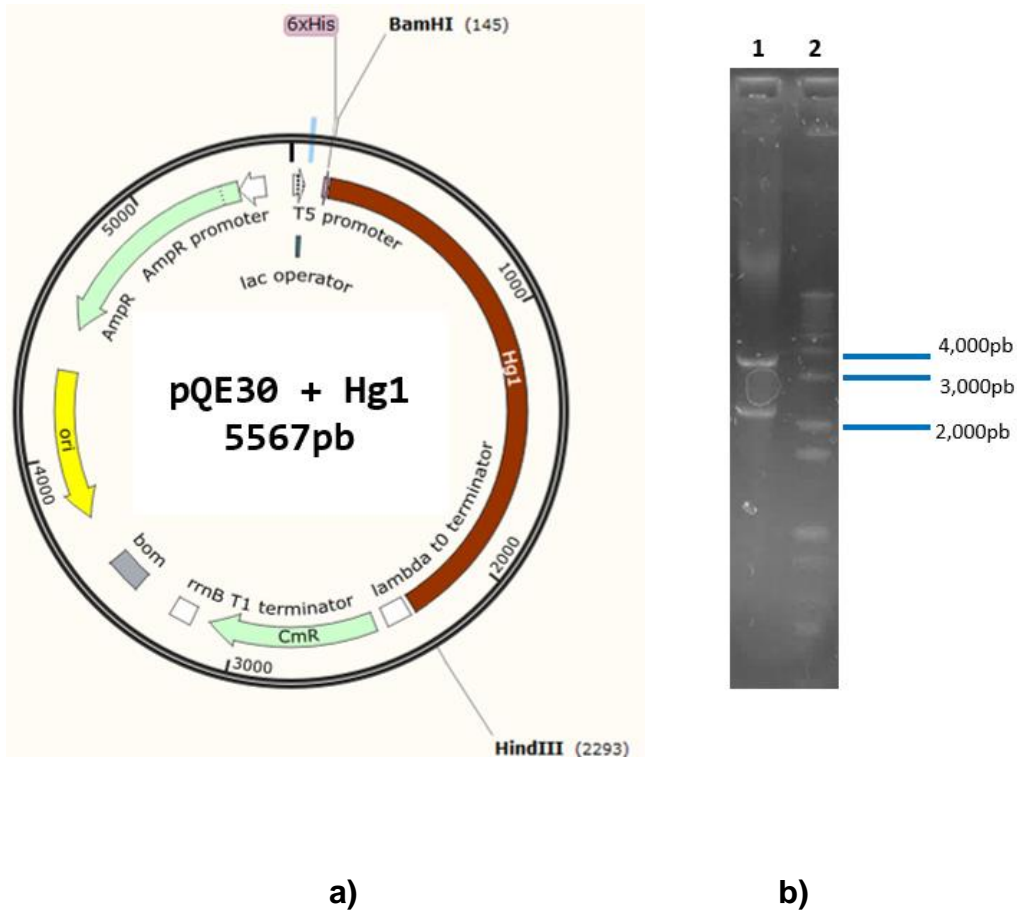
**Figura 14. a)** Mapa de la construcción pKS (-) y OmpA2 sentido 1. **b)** Mapa de la construcción pKS (-) y OmpA2 sentido 2. **c)** Análisis de la construcción OmpA2. En los carriles 2 y 3 se muestra DNA plasmídico de OmpA2 orientación 1 digerido con *Bam*HI, que contiene una banda esperada de 3840 pb, la banda de 27 pb no se observa debido a su corto tamaño. En los carriles 4 y 5 se muestra DNA plasmídico de OmpA2 orientación 2 digerido con *Bam*HI, que contiene dos bandas de 2940 y 927 pb respectivamente. En los carriles 13 y 14 se muestra DNA plasmídico de OmpA2 orientación 1 digerido con *Hind*III, que produce dos bandas de 3227 y 631 pb respectivamente, la banda de 9 pb no es posible observarla. En los carriles 15 y 16 se muestra DNA plasmídico de OmpA2 orientación dos digerido con *Hind*III, que contiene las dos bandas de 2958 y 640 pb respectivamente. La banda de 269 pb no se logra observar. En el carril 12 se muestra el marcador de peso molecular. Los carriles 1, 9, 10 y 11 fueron de muestras negativas, puesto que no liberaron el fragmento esperado.

### **Subclonación de los productos digeridos de *hg*, *ompA* y *avxA* a los vectores de expresión pQE30, pQE31 y pQE32**

Las regiones de interés de los genes que codifican para Hg, OmpA y AvxA clonadas en pBluescriptII KS (-) fueron digeridas con las enzimas de restricción *Bam*HI-*Hind*III y *Bam*HI-*Kpn*I, con el fin de liberarlas del vector y ligarlas al vector de expresión pQE30, que también fue digerido con *Bam*HI-*Hind*III y *Bam*HI-*Kpn*I según fuera el caso.

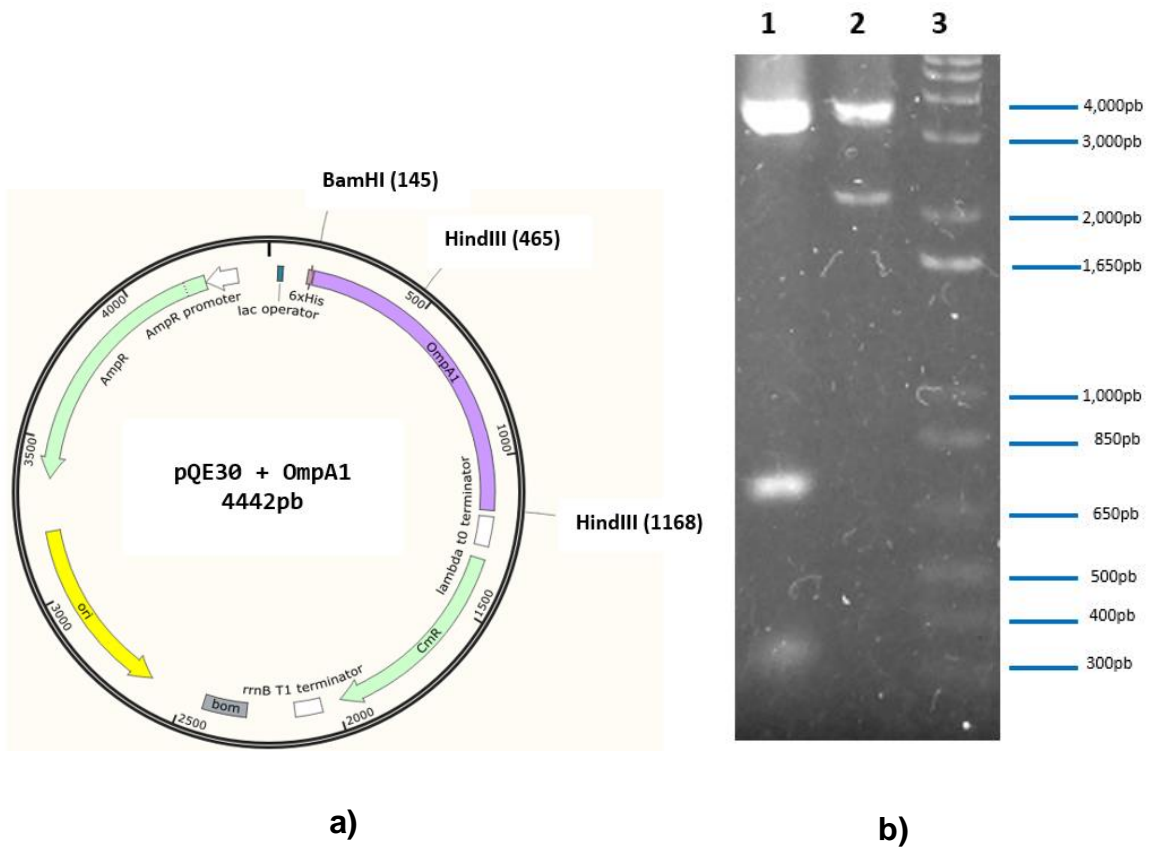
## Región uno del gen de Hemaglutinina subclonada en pQE30

La verificación de la subclonación se hizo por liberación del inserto con una digestión con *Bam*HI/*Hind*III (Fig. 15).



**Figura 15. a)** Mapa de la construcción pQE30 y Hg1. **b)** Liberación del fragmento clonado en la construcción pQE30-Hg1 por digestión enzimática simultánea *Bam*HI/*Hind*III. Se liberó un fragmento de 3419pb y uno de 2148pb (carril 1). El carril 2 contiene el marcador de peso molecular.

## Región uno del gen OmpA subclonada en pQE30



**Figura 16. a)** Mapa de la construcción pQE30 y OmpA1. **b)** Verificación de la construcción de pQE30 y OmpA1 en gel de agarosa 0.8%. En el carril 1 se muestran las bandas de 3419, 703 y 320pb, que corroboran la construcción. El carril 2 corresponde a otra construcción que no es de nuestro interés en este momento. El carril 3 contiene el marcador de peso molecular.



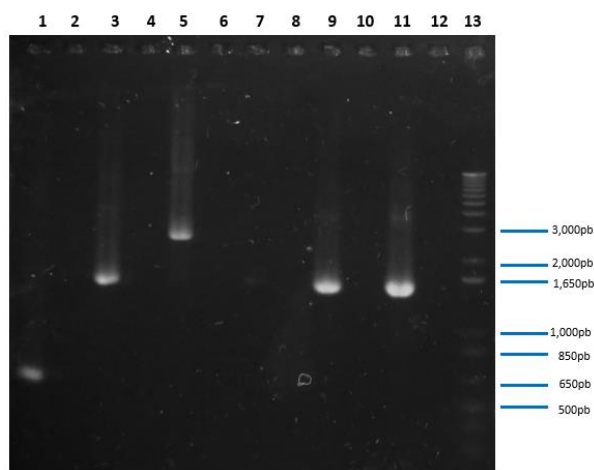
## Diseño de primers para amplificar pQE30, pQE31 y pQE32 rio arriba y rio abajo del sitio de clonación múltiple del vector.

**Tabla 3.** Secuencias de los oligonucleótidos diseñados para amplificar los tres vectores de expresión pQE30, pQE31 y pQE32. La región que se amplificó abarca una región rio abajo y rio arriba del sitio múltiple de clonación.

Juego de oligonucleótidos	Primer directo	Primer reverso	Tamaño del amplificado
1	CTCGTGCACCCAACTGATCT	GGCAACCGAGCGTTCTGAA	605 pb

**Tabla 4.** Muestra el tamaño de los amplificados que se esperan para el vector pQE30, pQE31 y pQE32 y las construcciones obtenidas en estos.

	Tamaño del amplificado
<b>pQE30</b>	605 pb
<b>OmpA1/pQE30</b>	1600 pb
<b>Hg1/pQE30</b>	2725 pb
<b>OmpA2/pQE30</b>	1532 pb
<b>OmpA2/pQE31</b>	1534 pb
<b>OmpA2/pQE32</b>	1533 pb



**Figura 18.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para las construcciones hechas en los vectores de expresión pQE. Carril 1 amplificado de pQE30, carril 3 amplificado de OmpA1/pQE30, carril 5 Hg1/pQE30, el carril 7 se observa de una manera muy tenue, OmpA2/pQE30, carril 9 OmpA2/pQE31 y carril 11 OmpA2/pQE32. Los carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12 corresponden a los controles negativos. El carril 13 contiene el marcador de peso molecular.

## Transformación de las construcciones en pQE30, pQE31 y pQE32 a células de expresión *E. coli* M15 y *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

Una vez obtenidas las construcciones en los vectores de expresión, estas se pasaron a las células de expresión *E. coli* M15 y *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, para hacer las curvas de inducción con IPTG.

### Inducción con IPTG para la expresión de los fragmentos clonados

Se hicieron curvas de inducción con IPTG ajustando sus concentraciones, medios de cultivo, cepas para la expresión, plásmidos de expresión y horas de inducción (tabla 5).

**Tabla 5.** Diferentes condiciones usadas para la inducción y la expresión de proteínas. Los círculos en color

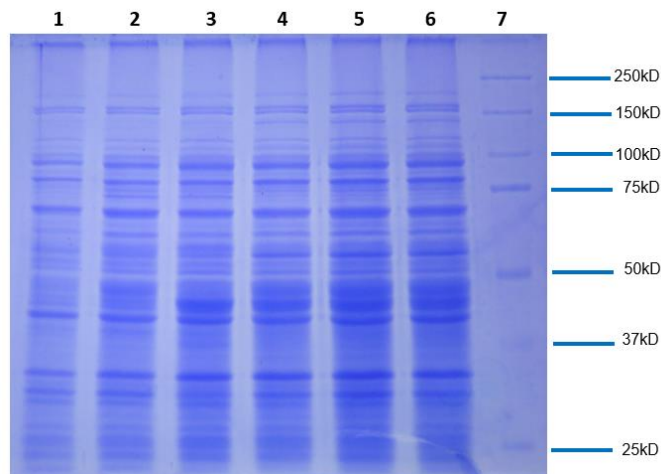
Variables	Hemaglutinina	OmpA1	OmpA2
Vectores en los que se clonaron los genes de interés			
pQE30	●	●	●
pQE31			●
pQE32			●
Medios en los que se crecieron las construcciones para su expresión			
Medio LB	●	●	●
Medio Terrific broth			●
Concentraciones de IPTG que se usaron para la inducción			
.5 mM IPTG	●	●	●
1 mM IPTG	●	●	●
2 mM IPTG	●	●	●
3 mM IPTG	●	●	
4 mM IPTG	●	●	
10 mM IPTG			●
Cepas de expresión en las que se encontraba la construcción			

<b>Cepa <i>E. coli</i> M15</b>	●	●	●
<b>Cepa <i>E. coli</i> BL21(CE3) pLysS</b>	●	●	●
Horas de induccion			
<b>1h</b>	●	●	●
<b>2h</b>	●	●	●
<b>4h</b>	●	●	●
<b>6h</b>	●	●	●

## SDS-PAGE

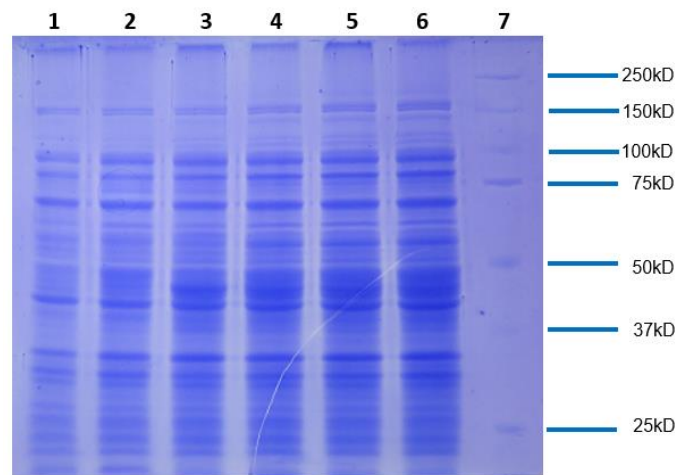
Se hicieron geles de acrilamida al 10% y se corrieron las muestras de las proteínas previamente inducidas con IPTG, para poder observar la proteína inducida, sin embargo, el patrón de proteínas se mostró similar en cada una de las condiciones probadas (figuras 19-23).

## Hemaglutinina



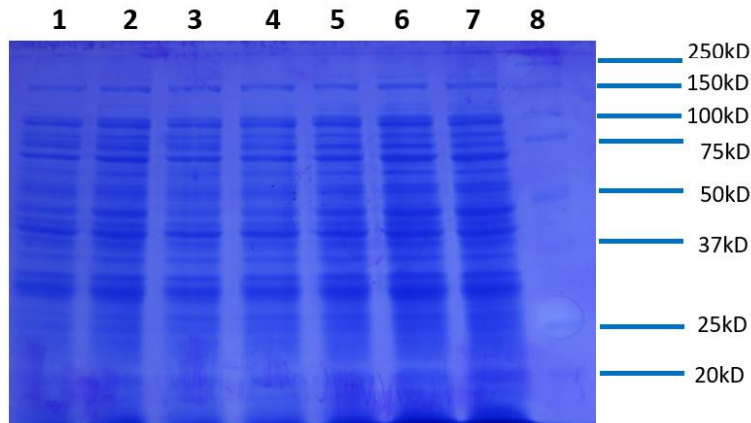
**Figura 19.** Gel de acrilamida 10%. Se muestra el patrón de proteínas obtenido después de hacer curvas de inducción con IPTG a la cepa M15 con la construcción pQE30/Hg (región 1). En el carril 1 se encuentra la cepa M15 vacía, en el carril 2 la cepa M15 con el vector pQE30 vacío, en el carril 3 M15 con la construcción pQE30-Hg1 sin inducir, del carril 4 al 6 la cepa M15 con la construcción pQE30-Hg1 con 1h, 2h y 4h de inducción respectivamente, en el carril 7 se encuentra el marcador.

## OmpA1

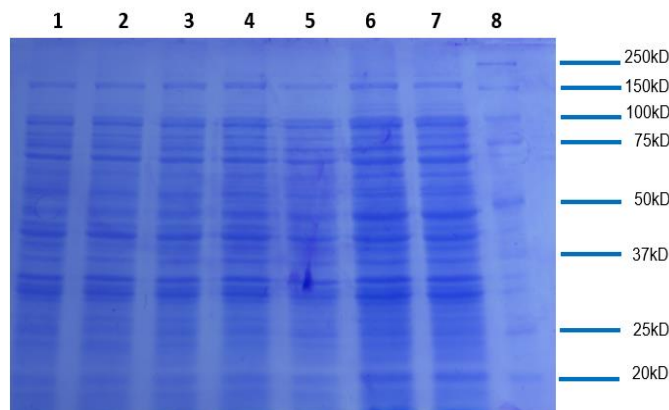


**Figura 20.** Gel de acrilamida 10%. Se muestra el patrón de proteínas obtenido después de hacer curvas de inducción con IPTG a la cepa M15 con la construcción pQE30/OmpA (región 1). En el carril 1 se encuentra la cepa M15 vacía, en el carril 2 la cepa M15 con el vector pQE30 vacío, en el carril 3 M15 con la construcción pQE30-OmpA1 sin inducir, del carril 4 al 6 la cepa M15 con la construcción pQE30-OmpA1 con 1h, 2h y 4h de inducción respectivamente, en el carril 7 se encuentra el marcador.

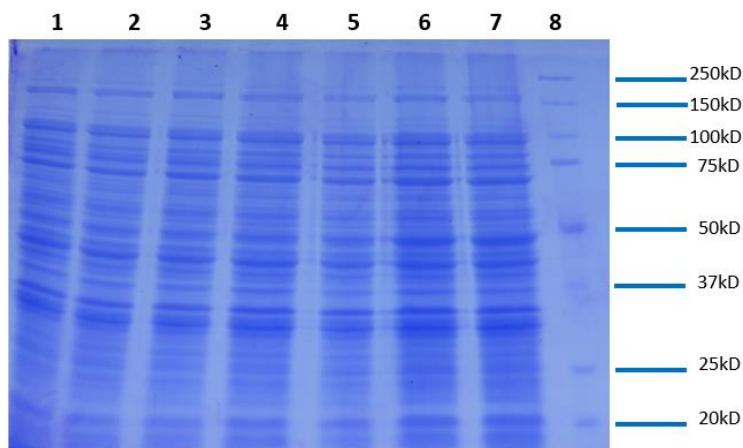
## OmpA2



**Figura 21.** Gel de acrilamida 10%. Se muestra el patrón de proteínas obtenido después de hacer curvas de inducción con IPTG a la cepa M15 con la construcción pQE30/OmpA (región 2). En el carril 1 se encuentra la cepa M15 vacía, en el carril 2 la cepa M15 con el vector pQE30 vacío, en el carril 3 M15 con la construcción pQE30-OmpA2 sin inducir, del carril 4 al 7 la cepa M15 con la construcción pQE30-OmpA2 con 1h, 2h, 4h y 6h de inducción respectivamente, en el carril 8 se encuentra el marcador.



**Figura 22.** Gel de acrilamida 10%. Se muestra el patrón de proteínas obtenido después de hacer curvas de inducción con IPTG a la cepa M15 con la construcción pQE31/OmpA (región 2). En el carril 1 se encuentra la cepa M15 vacía, en el carril 2 la cepa M15 con el vector pQE31 vacío, en el carril 3 M15 con la construcción pQE31-OmpA2 sin inducir, del carril 4 al 7 la cepa M15 con la construcción pQE31-OmpA2 con 1h, 2h, 4h y 6h de inducción respectivamente, en el carril 8 se encuentra el marcador.



**Figura 23.** Gel de acrilamida 10%. Se muestra el patrón de proteínas obtenido después de hacer curvas de inducción con IPTG a la cepa M15 con la construcción pQE32/OmpA (región 2). En el carril 1 se encuentra la cepa M15 vacía, en el carril 2 la cepa M15 con el vector pQE32 vacío, en el carril 3 M15 con la construcción pQE32-OmpA2 sin inducir, del carril 4 al 7 la cepa M15 con la construcción pQE32-OmpA2 con 1h, 2h, 4h y 6h de inducción respectivamente, en el carril 8 se encuentra el marcador.

## DISCUSIÓN

El impacto de (Avpg) en la producción de aves de corral genera pérdidas cuantiosas que van del 10% al 40% (Morales *et al.* 2014). La contención de la enfermedad “coriza infecciosa” se hace con vacunas que contienen bacterias atenuadas, sin embargo tienen varias desventajas. Existen varios serovares A, B y C de acuerdo al esquema de Page. (Blackall *et al.* 1990). Y confieren protección sólo contra los serovares presentes en la vacuna. (Blackall y Soriano, 2008). Además, el crecimiento de Avpg *in vitro* requiere medios complejos que contienen suero de caballo y NAD (Rimler *et al.* 1977) lo que hace que dichos medios sean caros y fastidiosos y la calidad de los excipientes en otras ocasiones produce efectos indeseables al suministrarse a las aves. (Droual *et al.* 1990).

El presente trabajo se enfocó sobre tres importantes funciones relacionadas con virulencia en Avpg, la hemaglutinina (HA), (Sawata *et al.* 1985; Wu *et al.* 2010), la toxina tipo RTX (AvxA) (Kume y Frey, 2013; Pan *et al.* 2012), y la porina OmpA que es catalogada como importante hemaglutinina (Hg, Rtx y OmpA) para sobreexpresarlas de forma heteróloga. La idea era crear proteínas recombinantes para poder posteriormente potenciar la calidad de las vacunas, enriqueciéndolas con los antígenos proteicos mencionados.

En este trabajo se partió desde el diseño de los oligonucleótidos que permitirían hacer la síntesis de DNA de fragmentos planteados por medio de PCR's. Así se lograron amplificar cuatro regiones seleccionadas para el gen de Hg, tres regiones para el gen Rtx y dos regiones para el gen OmpA, a partir de DNA genómico de Avpg cepa CL serotipo C. Los productos amplificados por PCR se clonaron en el vector pBluescriptII KS (-), porque tiene un gen reportero (*lacZ*) que facilita la identificación de las transformantes con insertos clonados, por alfa complementación, además, que el vector es de alto número de copias (Sambrook y Russell; 2001). Con esta estrategia se obtuvieron nueve construcciones en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ , porque es una cepa está diseñada para no llevar a cabo recombinación.

Los fragmentos de genes contenidos en pBluescriptII KS(-) posteriormente se subclonaron en el vector de expresión pQE30, para utilizar la etiqueta de histidinas (6X) que permite purificar las proteínas recombinantes de interés por cromatografía de afinidad, después de que se inducen con IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido). Los fragmentos subclonados en el vector pQE fueron la región uno de Hg (Hg1), la región uno de OmpA (OmpA1) y la región dos de OmpA (OmpA2). Esta última región también se subclonó en los vectores pQE31 y pQE32; puesto que pQE31 corre la fase de lectura por dos bases y pQE32 por solo una base de más, esto modificaría el marco de lectura de los transcritos y podríamos observar inhibición o expresión de la proteína, podríamos hacer comparaciones en la expresión si se hubiera presentado algún desfase por mutagénesis espontánea en el proceso de PCR. Para estas clonaciones se siguió el razonamiento anterior, de que DH5 $\alpha$  está diseñada para no hacer recombinación de DNA extraño; las segundas construcciones también se elaboraron en este fondo genético (QiaExpressionist).

Las cepas de *E. coli* M15 y BL21 (DE3) pLysS, se usaron sólo como cepas hospederas para las construcciones en la evaluación de la expresión a nivel de proteína, con base en que son cepas reducidas en su actividad proteolítica y eso facilitaría la visualización de la acumulación de las proteínas recombinantes. En estas cepas la cinética de crecimiento es rápida en condiciones ambientales óptimas (sales o glucosa) con un tiempo de replicación estándar de 20 min. (Sezonov *et al.* 2007)

La expresión de los diferentes fragmentos clonados se intentó usando las concentraciones de IPTG sugeridas por el fabricante (QiaExpressionist), creciendo las transformantes en medio LB, pero los resultados fueron negativos. Pensando que el medio de cultivo influyera en la expresión, se probaron los medios Terrific y mínimo, obteniendo los mismos resultados, así que se cambió la cepa M15 por la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS para transformar. (Hsu *et al.* 2007).

Debido a la falta de expresión de las diferentes construcciones (en pQE30, 31 y 32), estas se secuenciaron para corroborar que estuvieran en fase y descartar algún problema en las fusiones traduccionales, quizás generadas por el proceso de subclonación (Anexo A-J). El análisis mostró que las construcciones pQE30/Hg1, pQE30/OmpA1 se encontraban es fase, pQE31/OmpA2 y pQE32/OmpA2 se corrieron una y dos bases respectivamente, como se había diseñado, sin embargo, en el vector se encontró una deleción de 32 bases, de secuencia (ACAATTATAATAGATTCAATTGTGAGCGGATA), y dentro de estas bases se encuentra la región -10 del promotor T5, esto explica la no expresión de los fragmentos clonados. En cuanto la construcción pQE30/OmpA2 no presentaba daño en el vector, pero el fragmento clonado no correspondía con el amplificado original.

En este proyecto se encontró con un efecto de inactivación de la secuencia codificante de la proteína recombinante, esto se ha reportado que puede deberse a cualquier mutación puntual, deleción, inserción, o reordenamiento (Palomares et al., 2004), se ha descrito que esto sucede cuando la proteína es toxica para la célula hospedera (Rosano y Ceccarelli, 2014).

Además de mutaciones en las secuencias codificantes, en este trabajo se observó que el vector de expresión también sufrió una reorganización genética que condujo a la perdida de expresión de la proteína recombinante. En trabajos previos se ha descrito que esto permite a la cepa hospedera de las construcciones sobrevivir al nuevo DNA recombinante (Corchero y Villaverde, 1998). Una proteína recombinante resulta toxica cuando no es necesaria para el huésped o su función es perjudicial e interfiere con la proliferación normal y homeostasis del microorganismo (Doherty *et al.* 1993; Dong *et al.* 1995).

Al analizar las posibles causas de la perdida de función de las secuencias codificantes de la proteína existe la posibilidad que haya un sesgo en el uso preferencial de codones, esto sucede cuando la frecuencia de aparición de codones sinónimos en el DNA extraño, es significativamente diferente al de la célula que alberga la construcción. En el mecanismo de expresión ocurre una incorporación

errónea de aminoácidos o truncamiento del polipéptido, lo que afecta la expresión de proteínas. (Gustafsson *et al.* 2004). El sesgo de codones se puede detectar, e incluso una manera de resolverlo es optimizando la secuencia codificante externa y aumentando la disponibilidad de los tRNA's menos presentes en la cepa hospedera (Sorensen y Mortensen, 2005).

En este trabajo de investigación no se lograron obtener las proteínas recombinantes que se esperaban, sin embargo, los resultados obtenidos son de gran valor para el seguimiento de este proyecto en el laboratorio, ya que aportan información sobre la selección que debe hacerse para expresar péptidos antigénicos de las proteínas analizadas de genes de Avpg, y esto nos da una pauta para saber a dónde y cómo dirigirnos en la producción de proteínas recombinantes de este microorganismo.

## CONCLUSIONES

- Se amplificaron por PCR las regiones seleccionadas para cada gen codificante de Hg, Rtx y OmpA, confirmando la veracidad del proceso de secuenciación previo en la cepa CL de Avpg.
- Se clonaron en el vector pBluescriptII KS(-) las cuatro regiones de Hg, las tres regiones de Rtx y las dos regiones de OmpA.
- Se subclonaron en el vector pQE30: la región uno de Hg1, la región uno de OmpA1 y la región dos de OmpA2.
- Se clonó en el vector de pQE31 y pQE32 la región dos de OmpA2.
- Se secuenciaron las construcciones y se determinó una alta tasa de inactivación de las secuencias clonadas en el vector de expresión.

## PERSPECTIVAS

- Detectar la presencia de codones poco frecuentes o incompatibles en *E. coli* para las proteínas recombinantes de AvpG.
- Optimizar los codones del gen de interés para la expresión heteróloga de antígenos de AvpG.
- Terminar las construcciones en el vector de expresión que no se abordaron, con el fin de establecer la viabilidad de expresión de acuerdo al diseño planteado en este proyecto.
- Obtener las construcciones en otras cepas deficientes en recombinación o en las cepas usadas para la sobreexpresión para evaluar la factibilidad de obtención de clonas sin alteraciones en secuencias funcionales.
- Probar nuevos vectores de expresión.

# ANEXOS

## Anexo A

### Secuencia de Hg en pQE30 (derecho)

GTGACTAGTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGG  
GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATT  
GTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCC  
CCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATC  
ACGAGGCCCTTTCGTCTTCACCTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTT  
CACACAGAATTCATTAAGAGGAGAAAATTAACCTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCAAGGATCC  
CGCAGTGGGTTTCGTTAGCCTTTGCATTGGCAGATAGATCCACCGCAATGGGGTTACGTTCTTTTGTGCT  
AAAGACGCCGTAGGTGGAACGGCGATCGGGGAAGAATCTCGAACCTTTGCTAAAGATTCCGTTGCCATTG  
GTAATAAACTGAAGCCTCAAATGCTGGCTCAATGGCTTATGGTTATAAGGCGAAAGCAGTAGGTGCGGG  
AGCAATCGCAATTGGGACAGAAGTCGCAGCAGGGGCTAAATTTAATAGCCATCAAACAGGAAATTTACTA  
CAGGATAATAATGCTTATGCTACCTTAAAAATGCCGATAAATCAGATGATACTAAAACCGGAAATGCGA  
TTACTGTATTTACCCAGTCTTTTGATAATATGCTTACTAATGGATTACCGCTGGTAAGTGAAAAACGAAAC  
CTATTTAACGACCTCAGCGGGAGCAATTAAAAAACTGCAACAACAGACAGCAGTGCAGGGGGGAGGTAA  
AAATGCCATTGCAATTGGTAGTAAAACTTTGCCTCTAAAGCAAATTCGTGTGGCATTAGGGAGCTATGCC  
TTAGCCGATGCCAAAATGCCTTTGCACTAGGTCCTTATTCTTTGTGGAATCTTCAGCAACAAAATACAT  
CACACTGGTGGTGGGGAAGTAATGCCAAAGGAAAAACAGATTCCTAGGGGGACTTGGGCATCACCCCTT  
CAGATCGACAGTGTGCTAGGAGTCACCTCATTAGCCTCAAGTCTCCGAATGCATAGCAATCAGCGTGAGG  
ACC

## Anexo B

### Secuencia de Hg en pQE30 (reverso)

CTGCAATGGCATCTGAGGTCATTACTGGATCTATCAACAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAAGCTTCTCT  
CCCAGCCGTTCCGATACTTAACACACCCGAGTGTTTCAGGGGAACCTGCAAAATTATTGAATATTAAACCA  
TTTATCATCGGTGAACCTTGTACGGCTAATTGCGGAATTGGCAACCGTCGAATCTTGCCCCAATGCAATGG  
AAGGTTTTCCACCCGAGTAACCGTTGCACCTTACCAATCGCCACTGCCCTGTCAATTGAGGTATCCGA  
ATTCGTGCCGATTGAAATGGCATTTCAGCGGAAGAATTGCTTGGAAACCAATCGCAATGGCTTGTTTC  
CCTGCTAATCCATTATTAGCTCCTGAGGTTTTTGCCTGCCAGCCAAATGCAATACTGTCTTGCCCTTTTG  
CACCATCATTAAAGATAGTTATTATTGGCTTTTTAACTGTGCAATTGCTTGAGGGGTTAAGCCGCCTACATT  
TCTTGCTGAATCCGCATTGCTTGCATTCTCAATCTGCGTTTTATATTGATTAAATTTGTGCAAGTTATTT  
GTGGTTACTTCTTGCTCTAATTGTGTTGCAACCTGATTGAGAGCTGACGCGGTTGTTTTAACTCGCCAC  
TATATTCCGCTTCAAGTTCTTGCCTACCGCACGAATTTTGTTTAATGAATTTTGATCAAACCTTCTCTCC  
ATTTAATTTTCCCTCGTGCATCTAAAATAGAGCAATTGTGTTTTAATTTACATATCGCTCATAATTTTCC  
CCTTTACGAATTTGGCTAGCCACTCTCCCGATTGTCCATTGATATTCGTTTTTTCAACAGAGAGATATT  
TCACCCACCGCCATTTTGTAAATAAATTAATTTAGATAGGAAACGTTCTTCAACGGTTTTTAACTGAGC  
AACATTCACGGCATCAGTATCAGAGAACCCGAAGCAAGATTCACAATACGACGTTCTGAACCTTTTGAAC  
CCACAGAGATAACCCAGTTTACCTGAAGTTGGGATACTGATTGCCCTTCAGATACCCAAGGATCGGTT  
TCCACTGTTCCAGTGAATCTGTTTAAAGCCTACCCAGTGCGGTGAATTTGCCAAGTGCTTGAGCTAA  
ACACAAATCGCCATCGAGTTATTTCCGTTTCAATTTTGCACCCACGCGAACCTAGC

## Anexo C

### Secuencia de OmpA1 en pQE30 (derecho)

ATGACGTCGTTCCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGG  
CGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTG  
TCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCC  
CGAAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCA  
CGAGGCCCTTTTCGTCTTCACCTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTC  
ACACAGAATTCATTAAGAGGAGAAAATTAECTATGAGAGGATCG **CATCACCATCACCATCACGGATCCAT**  
**GAAAAAACTGCAACGCA**TTAGCAATCGCTGGTTAACTGCTGCGTCAGTAGCACAAGCTGCACCACAAG  
CAAACTTTCTATGCTGGTGCAAAAGCGGGCTGGGCATCTTTCCACGATGGTTTAAACCAATTTGAAGA  
TCAAGCAAATGCACAAGGTAATTTACGTAATTTCTGTTACTTATGGTGTGTTCCGGTGGTTACCAAAATTA  
GATAACTTCGCTGTTGAGCTAGGTTATGATGACTTTGGGCGTGCTAACTCCGTCAAGAGGGTGAACCG  
TTAGAAAACATACAAATCACGGGGCTCACTTAAGCTTAAAAGCAAGTTATCCAGTGCTTGAAGGATTAGA  
TGTTTATGCTCGCGTTGGAGCTGCGTTAATTCGTTCTGATTATAAAACCACTAAAAGAGCAGCCCCAAT  
GAGACGCACGAACATAGCTTAAAAGTTCTCCAGTGTGTTGCTGGTGGTTTAGAGTATAACTTACCATCAT  
TACCAGAACTTGCATTACGTGTTGAATATCAATGGGTAAATAAAGTACGGCGTTGGGAAAACGATGGTAG  
CCGTGTAGATTATACCAAGCATCGGTTCTGTAAGTGTGATTATCTTACCCTTTTGGTCAAAGTGCA  
CCAGTTGTTGAACCTAAGGTTGTTGCAAAAACATTTGCATTAAATTCAGATGGTACTTTTCGCATTGGTTA  
AAGCAAATTACGTCCCGCAAGCACAAAAATGTATTTAAACCGGAAGTAATG

## Anexo D

### Secuencia de OmpA1 en pQE30 (reverso)

CTGCAAGCATCTGAGGTCATTACTGGATCTATCAACAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGATA **AAG**  
**CTTTGAGATTTCTACACGACG**ATCGTCTGCTAAACAAGCGATTAATGCTTTGCGTCCTTTAACCGCATCA  
CATTTTCGCACCAGTTACTGGGTTTGGCTTACCATAACCCGTTGAAGAAATCACTTCTTGAGCAACACCTT  
TAGAAACTAAGTAGTTAGCCACAGTGTCAGCACGACGTTGTGATAATTTTAAGTTGGCTGCTTCGCTACC  
AATACGGTCAGTATAACCAGCAACATCTACTTGTACTGATTTTAACTGTGCAATTTTACCATAAAATACCG  
TCTAATACATTTTGTGCTTCTGGACGTAAATTTGCTTTACCAATGCGAAAGTAACATCTGAATTTAATG  
CAAAATGTTTTTGAACAACCTTAGGTTCAACAAGTGGTGCACCTTTGACCAAAACGGTAAGATAAACCCAGC  
AGTTACAGAACCGATGCTTGGTGTATAATCTACACGGCTACCATCGTTTTCCCAACGCCCTACTTTATTT  
ACCCATTGATATTCAACACGTAATGCAAGTTCTGGTAATGATGGTAAGTTATACTCTAAACCACCAGCAA  
ACACTGGAGAACTTTTTAAGCTATGTTCTGCTGCTCATTAGGGGCTGCTCTTTTAGTTGGTTTATAATC  
AGAACGAATTAACGCAGCTCCAACGCGAGCATAAACATCTAATCCTTCAAGCACTGGATAAATGCTTTT  
AAGCTTAAGTGAGCCCCGTGATTTGTATGTTTTCTAACGGTTTACCCTCTTGACGGAGTTTAGCACGCC  
CAAAGTCATCATAACCTAGCTCAACAGCGAAGTTATCAGTAATTTGGTAACCACCGAACACACCATAAGT  
AACAGAATTACGTAAAGTACCTTGTGCATTTGCTTGATCTTCAAATGGTTTTAAACCATCGTGGAAAAGAT  
GCCAGCCGCTTTTGCACCAGCATAGAAAGTGTGTTGCTTGTGGGTGCAGCTTGTGCTACTGACGCAGCAG  
TTAAACCAGCGATTGCTAATGCGTTGCAGTTTTTTTTCTGGATCCTGATATGAATGATGAATGCCAATCCT  
CTCATAGATAAATCTCTTTTATAGAATTTTTTTGGA

## Anexo E

### Secuencia de OmpA2 en pQE30 (derecho)

GACGGACGTAGTTCCAGCGTTTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGC AAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAG  
GGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTAT  
TGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTT  
CCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTAT  
CACGAGGCCCTTTTCGTCTTACCTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATT  
ATAATAGATTCAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACATGA  
GAGGATCG **CATCACCATCACCATCAGGGATCC** CGGTAATCTTCTCCTCGTCGCCAAACTAGATGAAGATT  
ATCGGGTTTTTTGCTTTTCTGGCTCCTGTAAATCCACATCAGAACAGTTCCCTGCCACCTTATGGCGTG  
GCCAGCCACAAAATTCCTTAAACGATCAGCAATCTATCACTCACGCCTGAGATAAGCAAGAATGTGAATA  
TTTACAAAGTCGCTCTGCGTTTTAGCTCTGATTCAATCAGTTTTTCAAGCATCTGCGCCTGGGTAAATACC  
TTCTCATCTGCCAGTTCACTCAGCCTGTCTTTTAAACGGGCCTGGATAACCGCATGAAAAGCCTTATGA  
GTGTTGCTTCTGCGAGCTAGAGAAGCCCTTTCCTCTCTCTGGCCGGAACAGGGTTACCTTTCCGGTATG  
CACGCTTGTACCTGATGAGGAAGTCACTGCATTTTCTGTCTGCGACATCTCGCCCCCTCAATATTTAAA  
CAGGGATCGTTTTGCGAGAGGATACTACAGTTTTTTGAAATCAGCGACTTGAGAATTGTGACAATGATCTG  
TGTTGGCGCACAAATCATGTCTGATTACGACCGTTTAAATGTGATTTTGATAATGAAATGACTGAAAAGCA  
GGAAATGCCTGATCCTGGGTGCCGGCCGGGCGGGACCGGCTGTTTCTGGCATGTCCGGGTGTCTGCCCC  
TGAAATACCTCACACTTTCTGAAGCG

## Anexo F

### Secuencia de OmpA2 en pQE30 (reverso)

GCAAGGCGTCTGAGGTCATTACTGGATCTATCAACAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATT **AAGCTT** GGCTGCA  
GGTCGACCCGGGTACCAGAAATGCGAAGACCCCACTTGTAAATCCATTAACCTCGTGAGGTCTGCATGAA  
GTACCTTAACACTACTGATTGTAGCCTCTTCTTGCAGAGAGGTCAAAGTTTTATGACGAAATATGCCCTT  
ATCGGGTTGCTCGCCGTGTGCGCTACGGTGTGTGTTTTTCACTGATATTCAGGGAACGGTTATGTGAGC  
TGAATATTCACAGGGGAAATACAGTGGTGCAGGTAACCTCTGGCCTACGAAGCACGGAAGTAAGCTGCCGG  
GCGGGGACGGAAGTCCCCGCTTTCCGGAAGTGTGAGGTATTTAGGGGCGAGACACCCGACATGCCAGAAA  
CAGCCGGTCCC GCCCGGGGCCGACCCAGGTT CAGGCATTTCTGCTTTT CAGTCATTT CATTATCAAA  
ATCACATTAACGGTCGTAATCAGACATGATTTGTGCGCAACACAGATCATTGTCACAATTTCTCAAGTC  
GCTGATTTCAAAAACTGTAGTATCCTCTGCGAAACGATCCCTGTTTAAATATTGAGGGGGCGAGATGTC  
GCAGACAGAAAATGCAGTGAATTCCTCATCAGGTAACAAGCGTGATACCGGAAAGGTAACCCCTGTTCCG  
GCCAGAGAGAGGCAAAGGGCTTCTCTAGCTCGCAGAAGCAACTCATAAGGCTTTTTCATGCGGTTATCC  
AGGCCCCGTTAAAAGACAGGCTGAGTGAAC TGGCAGATGAGGAAGGTATTACCCAGGCGCAGATGCTTGA  
AAAACTGATTGAATCAGAGCTGAAACGCGAGAGCGACTTTTGAAAATTCACATTCTTGCTTATCTCAGCG  
TGAGTGATAGATTGCTGATCGTTTAAAGGAATTTTGTGGCTGGCCACGCCATAAGGTGGCAGGGAAGTGGT  
TCTGATGTGGATTTACAGGAGCCAGAAAAGCAAAACCCCGATAATCTTCATCTAGTTTGGCGACGAGGA  
GAGATTACCGGGATCCGTGATGGTGATGGGTGATGCGATCCTCCTCATAGTTAAATTCCTCCCTCTTTAA  
TGAACTCTGGGTGAAATGGTTATCCGCCTCACA ACTGGAATCCAATATAATGGTATCCGCCCTACCAAAC  
AAAAAAAATTTTTTATGAGGTGCT

## Anexo G

### Secuencia de OmpA2 en pQE31 (derecho)

TGGACTTAGTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAA  
GGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTA  
TTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTT  
CCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTA  
TCACGAGGGCCCTTTCGTCTTCACCTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAAT  
TTCACACAGAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACCTATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATACGGGA  
TCCGTAGCACAAGCTGCACCA CAAGCAAATACTTTCTATGCTGGTGCAAAAGCGGGCTGGGCATCTTTCC  
ACGATGGTTTAAACCAATTTGAAAACCTACAAAATGCATATGGTACATTGCGTAATTCTGTAACCTATGG  
GGTGTTTGGTGGTTATCAAATTAAGTAAATTTGCTGTTGAGCTAGGTTATGATGACTTTGGACGTGCG  
AAACTTCGTCAAGACGGTGAACCTGTTGGAAAACATACAAATCACGGGGCTCATTTAAGCTTAAAAGCAA  
GTTATCCAGTGCTGAAGGATTAGATGTTTATGCTCGCGTTGGAGCTGCGTTAATTCTGTTCTGATTATAA  
ACCAACTAAAAGAGCAGCCCCTAATGAGACGCACGAACATAGCTTAAAAGTTTCTCCAGTGTGTTGCTGGT  
GGCTTAGAGTATAACTTACCATCATACCAGAACTTGCATTACGTGTTGAATATCAATGGGTGAATAAAG  
TAGGGCGTTGGGAAAAAGATGGTAGTCGTGTAGATTATACACCAAGCATCGGTTCTGTAACCTGCTGGTTT  
ATCTTACCGTTTGGCCAAAGTGCAACAGTTGTTGAACCTAAGTGTGCAAAACATTTGCATTAATAATCA  
GACGTTACTTTTCGCATTTGGTAAAGCAAATTTACGTGAGAAAGCAGCAAAAATGTATTAGACGGTATTTATGG  
TGAAATCGCACAGTAAATCAGTACAAGTAGATCTTGCTGGTATACTGAACCGTATTGGTAGCGAAGCAGC  
CAACTTTAAATTTTCCC

## Anexo H

### Secuencia de OmpA2 en pQE31 (reverso)

GGCTATGGCATCTGAGGTCATTACTGGATCTATCAACAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTG  
CAGGTTCGACCCGGGTACCGGGCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGAT AAGCTTCGCGCC  
AGTTACTGGGTT CGCTTACCATAACCTGTTGAAGAAATCACTTCTTGAGCAACACCTTTAGAACTAAG  
TAGTTAGCCACAGTGTGACGACGACGTTGTGATAATTTAAGTTGGCTGCTTCGCTACCAATACGGTCAG  
TATAACCAGCAAGATCTACTTGTACTGATTTTTA ACTGTGCGATTTACCATAAATACCGTCTAATACAT  
TTTGTGCTTCTGGACGTAAATTTGCTTTACCAAATGCGAAAGTAACGTCTGAATTTAATGCAAATGTTTT  
TGCAACAACCTTAGGTTCAACAACCTGGTGCACCTTTGGCCAAAACGGTAAGATAAACCAGCAGTTACAGAA  
CCGATGCTTGGTGTATAATCTACACGACTACCATCTTTTTTCCCAACGCCCTACTTTATTACCCATTGAT  
ATTCAACACGTAATGCAAGTTCTGGTAATGATGGTAAGTTATACTCTAAGCCACCAGCAAACTGGAGA  
AACTTTTAAGCTATGTTTCGTGCGTCTCATTAGGGGCTGCTCTTTTAGTTGGTTTATAATCAGAACGAATT  
AACGCAGCTCCAACGCGAGCATAAACATCTAATCCTTCAAGCACTGGATAACTTGCTTTTAAGCTTAAAT  
GAGCCCCGTGATTTGTATGTTTTCCAACAGTTTACCCTGTTGACGAAGTTTTCGCACGTCCAAAGTCATC  
ATAACCTAGCTCAACAGCAAAATATCAGTAATTTGATAAACCACCAACACCCCATAGTTACAGAATTA  
CGCAATGTACCATATGCATTTTGTGAGTTTTCAAATGGTTTTAAACCATCGTGGAAAGATGCCAGCCCCG  
CTTTTGCACCAGCATAGAAAGTATTTGCTTGTGGTGCAGCTTGTGCTACGGATCCGTATGGTGATGGTGG  
ATGGTGAGATCCTCTCATAGTTAATTTCTCTCTTTAATGAATTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAA  
AGCAAAATAGATTTCTTATGACTTTCTCGAAGGTGAAGACGAAAAGGCCCTCGGGATACGCCATTTTTTTA  
TAGGTAATGGTCATGGAGTAAATAAATGGGGTTCTCTT

## Anexo I

### Secuencia de OmpA2 en pQE32 (derecho)

AGAACTTCTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAA  
GGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTA  
TTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTT  
CCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTA  
TCACGAGGCCCTTTTCGTCTTACCTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAAT  
TTCACACAGAATTCATTAAGAGAGGAGAAATTAECTATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATGGAT  
CCGTAGCACAAGCTGCACCA CAAGCAAATACTTTCTATGCTGGTGCAAAAGCGGGCTGGGCATCTTTCCA  
CGATGGTTTAAACCAATTTGAAAATCACAATAATGCATATGGTACATTGCGTAATTCTGTAACCTATGGG  
GTGTTTGGTGGTTATCAAATTAAGTATAATTTGCTGTTGAGCTAGGTTATGATGACTTTGGACGTGCGA  
AACTTCGTCAAGACGGTGAAACTGTTGGAAAACATACAAATCACGGGGCTCATTAAAGCTTAAAAGCAAG  
TTATCCAGTGCTTGAAGGATTAGATGTTTATGCTCGCGTTGGAGCTGCGTTAATTCGTTCTGATTATAAA  
CCAATAAAAAGAGCAGCCCTAATGAGACGCACGAACATAGCTTAAAAGTTTCTCCAGTGTTTGTGGTG  
GCTTAGAGTATAAATTACCATCATTAACGAACTTGCATTACGTGTTGAATATCAATGGGTGAATAAAGT  
AGGGCGTTGGGAAAAGATGGTAGTCGTGTAGATTATACCAAGCATCGGTTCTGTAACCTGCTGGTTTA  
TCTTACCGTTTTGGCCAAAGTGACCCAGTTGTTGAACCTAAGTTGTTGCAAAAACATTTGCATTAAATTC  
AGACGTTACTTTTCGATTTGGTTAAAGCAAATTTACGTGAGCAGCACAAAATGTATTAGACGGTATTTTA  
TGGTGAAATCGCACAGTTAAATCAGTACAAGTAGAATCTTGTCTGCTTATAACCTGAACGCGAATTTGTTAC

## Anexo J

### Secuencia de OmpA2 en pQE32 (reverso)

CCGATGCATCTGAGGTCTTACTGGATCTATCAACAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTTGGCTGACG  
GTCGACCCGGGGTACCGGGCCCCCTCGAGGTGACGGTATCGATAAGCTTGAT AAGCTTCGCGCCAGT  
TACTGGGTT CGCTTACCATAACCTGTTGAAGAAATCACTTCTTGAGCAACACCTTTAGAAAATAAGTAG  
TTAGCCACAGTGTCAGCACGACGTTGTGATAATTTTAAAGTTGGCTGCTTCGCTACCAATACGGTCAGTAT  
AACCAGCAAGATCTACTTGTACTGATTTTAACTGTGCGATTTACCATAAATACCGTCTAATACATTTTG  
TGCTTCTGGACGTAAATTTGCTTTACCAAATGCGAAAGTAACGTCTGAATTTAATGCAAATGTTTTTGCA  
ACAACCTTAGGTTCAACAACCTGGTGCACTTTGGCCAAAACGGTAAGATAAACAGCAGTTACAGAACCGA  
TGCTTGGTGTATAATCTACACGACTACCATCTTTTTCCCAACGCCCTACTTTATTCACCCATTGATATTC  
AACACGTAATGCAAGTTCTGGTAATGATGGTAAGTTATACTCTAAGCCACCAGCAAACACTGGAGAACT  
TTTAAAGCTATGTTTCGTGCGTCTCATTAGGGGCTGCTCTTTTAGTTGGTTTATAATCAGAACGAATTAACG  
CAGCTCCAACGCGAGCATAAACATCTAATCCTTCAAGCACTGGATAACTTGCTTTTAAAGCTTAAATGAGC  
CCCGTGATTTGTATGTTTTTCCAACAGTTTACCCTTGTGACGAAAGTTTCGCACGTCCAAAGTCATCATAA  
CCTAGCTCAACAGCAAATTTATCAGTAATTTGATAACCACAAAACACCCATAAGTTACAGAATTACGCA  
ATGTACCATATGCATTTTGTGAGTTTCAAATTTGTTTAAACCATCGTGGAAGATGCCAGCCCGCTTT  
TGCACCAGCATAGAAAGTATTTGCTTGTGGGTGACGCTTGTGCTACGGATCCCATGGTGATGTGGAGAGT  
GGTGAGATCCTCCTCATAAGTTAATTTCTCCTCTTTAATGGAATTTGTTGTGAAAATTTGTTATCCGCTC  
ACAAAGCAAATAATTTTTATGATTTCTCAGGGGAAAACAAAAGGGGCT

## Anexo K

### Gel de acrilamida 10% (15ml)

<b>COMPONENTES</b>	<b>Volumen (ml)</b>
H <sub>2</sub> O	5.9
Acrilamida 30%	5.0
Tris 1.5M (pH 8.8)	3.8
SDS 10%	0.15
Persulfato de amonio 10%	0.15
TEMED	0.006

### Gel concentrador (6ml)

<b>COMPONENTES</b>	<b>Volumen (ml)</b>
H <sub>2</sub> O	4.1
Acrilamida 30%	1.0
Tris 1.5M (pH 6.8)	0.75
SDS 10%	0.06
Persulfato de amonio 10%	0.06
TEMED	0.006

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alcantara J and Schryvers A. B.** (1996). Transferrin binding protein two interacts with both the N-lobe and C-lobe of ovotransferrina. *Microbial. Pathogen.* 20:73-85.
- Biberstein, E.L., White, D.C.** (1969). A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. *J. Med. Microbiol.* 2, 75–78.
- Blackall PJ, Eaves LE, Aus G.** (1990). Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* by the Page scheme: comparison of the use of agglutination and hemagglutination inhibition tests. *Avian Dis.* 34: 643–5.
- Blackall P. J, Matsumoto M. and Yamamoto R.** (1997). Infectious coryza. In: *Diseases of Poultry.* Calnek B., Barnes HJ., Beard C., McDougald L., and Saif YM., ed. 10th, Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 179-190.
- Blackall P. J. and Yamamoto R.** (1998). Infectious coryza. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4th ed D.E. Swayne, J.R. Glisson, M.W. Jackwood, J.E. Pearson, and W.M. Reed, eds. American Association of Avian Pathologists Kennett Square, PA. 29–34.
- Blackall PJ and Matsumoto M.** (2003) Infectious Coryza. IN: Saif YM., Barnes HJ., Fadly AM., McDougald LR., Swayne DE (Editors). *Diseases of Poultry*, Ames: Iowa State Press, pp. 691-703.
- Blackall P. J, Christensen H, Beckenham T, Blackall L. L. and 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 volantium* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:353–362.
- Blackall PJ, Soriano EV.** (2008) Infectious coryza. In: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DA, editors. *Diseases of poultry.* 12th ed. Ames, IA: Blackwell Publishing; p. 789–803.
- Boulnois G.J; Roberts I.S.** (1990). Genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Inmunol.* 150: 1-18.
- Chen Y.C, Tan D. H, Shien J. H; Hsieh M. K, Yen T. Y; Chang P. C.** (2013). Identification and functional analysis of the cytolethal distending toxin gene from *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Pathology.* 1-16.
- Chiang, Y.T., Shien, J.H., Tan, D.H., Shieh, M.K., Liu, C.C., Chen, Y.S. & Chang, P.C.** (2013). Identification of the lic1ABCD operon that controls the phase-variable

expression of phosphorylcholine on lipopolysaccharide from *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Pathology*, 42, 72-78.

**Corchero, J. L., and Villaverde, A.** (1998). Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnol. Bioeng.* 58, 625–632. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19980620)58:6<625::AID-BIT8>3.0.CO;2-K.

**Doherty A. J, Connolly B. A, and Worrall A. F.** (1993). Overproduction of the toxic protein, bovine pancreatic DNaseI, in *Escherichia coli* using a tightly controlled T7-promoter-based vector. *Gene* 136, 337–340. doi: 10.1016/03781119(93)90491-K.

**Dong H, Nilsson L, and Kurland C. G.** (1995). Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J. Bacteriol.* 177,1497–1504.

**Droual R, Bickford AA, Charlton BR, Kuney DR.** (1990). Investigation of problems associated with intramuscular breast injection of oil-adjuvanted killed vaccines in chickens. *Avian Dis.* 34(2):473–8.

**García AJ, Angulo E, Blackall PJ, Ortiz AM.** (2014). The presence of nicotinamide adenine dinucleotide independent *Haemophilus paragallinarum* in Mexico. *Avian Dis* 48:425-429.

**Garcia F. A, Angulo E, Ortiz A. M. and Blackall P. J.** (2004). The presence of nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Haemophilus paragallinarum* in Mexico. *Avian Dis* 48:425-429.

**Gargi, A., Tamilselvam, B., Powers, B., Prouty, M.G., Lincecum, T., Eshraghi, A., Maldonado-Arocho, F.J., Wilson, B.A., Bradley, K.A. & Blanke, S.R.** (2013). Cellular interactions of the cytolethal distending toxins from *Escherichia coli* and *Haemophilus ducreyi*. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 7492-7505.

**Gray-Owen S. D. and Schryvers A. B.** (1996). Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol* 4:185-192.

**Gustafsson, C., Govindarajan, S., and Minshull, J.** (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol.* 22, 346–353. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.04.006.

**Horner RF, Bishop GC, Haw C.** (1992). An upper respiratory disease of commercial chickens resembling infectious coryza, but caused by a V factor-independent bacterium. *Avian Pathol* 21:421-427.

**Hsu Y. M, Shieh H. K, Chen W. H, Sun T. Y, Shiang J. H.** (2007). Antimicrobial susceptibility, plasmid profiles and haemocin activities of *Avibacterium paragallinarum* strains. *Vet Microbiol* 124:209-218.

**Hsu Y. M, Shieh H. K, Chen W. H, Shiang J. H, Chang P. C.** (2007). Immunogenicity and haemagglutination of recombinant *Avibacterium paragallinarum* HagA. *Vet Microbiol* 122(3-4):280-9.

**Jinadasa, R.N., Bloom, S.E., Weiss, R.S. & Duhamel, G.E.** (2011). Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiology*, 157, 1851-1875.

**Jin-Ru Wua, Yi-Ru Wub, Jui-Hung Shienb, Yuan-Man Hsuc, Chih-Feng Chend, Happy K. Shiehb, Poa-Chun Changa.** (2011). Recombinant proteins containing the hypervariable region of the haemagglutinin protect chickens against challenge with *Avibacterium paragallinarum*. 29: 660-667.

**Kume, E; Frey, J.** (2013). AvxA, a composite serine-protease-RTX toxin of *Avibacterium paragallinarum*. *Veterinary Microbiology*. 6049, 1-9.

**Lara-Tejero, M. & Galan, J.E.** (2002). Cytolethal distending toxin: limited damage as a strategy to modulate cellular functions. *Trends in Microbiology*, 10, 147-152.

**Litwin C. M and Calderwood S. B.** (1993). Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* 6:137–149.

**Mena-Rojas E, Vázquez C, Vaca S, García O, Pérez-Márquez V, Pérez-Méndez A, Ibarra J, de la Garza M, Zenteno E. and Negrete E.** (2004). Antigenic secreted proteins from *Haemophilus paragallinarum*. A 110 kDa putative RTX-protein. *FEMS Microbiol. Lett* 232: 83.87.

**Mifflin J. K, Horner R. F, Blackall P. J, Chen X, Bishop G. C and Morrow C. J.** (1995). Phenotypic and molecular characterization of V-factor (NAD)-independent *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 39: 304-308.

**Morales, V. E; Fernández, P. R; Negrete, E. A; Salazar, F. G; Blackall, P. J; and Soriano, E. V.** (2014). Genotyping, Pathogenicity, and Immunogenicity of *Avibacterium paragallinarum* Serovar B-1 Isolates from the Americas. 58: 293-296.

**Negrete A. E, Chantes G. A, Serrano A, Tenorio V, Vázquez C. C, Zenteno E, Paniagua G, and Pacheco V. S.** (2009). Identification of iron-acquisition proteins of *Avibacterium paragallinarum*. *Avian pathology*. 38:209-213.

**Palomares L. A., Estrada-Mondaca S., and Ramirez O. T.** (2004). Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol. Biol.* 267, 15–52. doi: 10.1385/1-59259-774-2:015

**Pan, Y.C., Tan, D.H., Shien, J.H., Liu, C.C., He, Y.S., Shen, P.C. & Chang, P.C.** (2012). Identification and characterization of an RTX toxin-like gene and its operon from *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Diseases*, 56, 537-544.

**Pérez M. V, Pérez M. A, Ibarra C. J, Gómez L. G, Vázquez C. C, Vaca P. S. and Negrete A. E.** (2008). Secreted proteins of *Avibacterium paragallinarum* are lethal for chicken embryo. *Animal biodiversity and emerging diseases. Annals of the New York Academy of sciences.* 1149:380-383.

**Ramon R. M, García G. O, Perez M. A, Ibarra C. J, Pérez V. M, Vaca S, and Negrete Abascal E.** (2006). Membrane vesicles released by *Avibacterium paragallinarum* contain putative virulence factors. *FEMS Microbiol. Lett.* 257:63-68.

**Ratledge C and Dover L. G.** (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 54:881-941.

**Requena D, Chumbe A, Torres M, Alzamora O, Ramírez M, and Valdivia H.** (2013). Genome sequence and comparative analysis of *Avibacterium paragallinarum*. *Bioinformatics.* 528-536.

**Rimler RB, Shotts Jr EB, Brown J, Davis RB.** (1977) The effect of sodium chloride and NADH on the growth of six strains of haemophilus species pathogenic to chickens. *J Gen Microbiol.* 98(2):349–54.

**Rivero G, Vázquez C, Sánchez A. P, Vaca S and Negrete Abascal E.** (2005). *Haemophilus paragallinarum* secretes metalloproteases. *Can. J. Microbiol* 51:893-896.

**Rosano G.L, Ceccarelli E. A.** (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Apr* 17;5: 172 doi: 10.3389/fmicb.2014.00172. eCollection 2014.

**Sambrook J. and Russell D.W.** (2001). *Molecular cloning a Laboratory Manual.* New York.

**Sawata, A., Nakai, T., Kume, K., Yoshikawa, H. & Yoshikawa, T.** (1985). Lesions induced in the respiratory tract of chickens by encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*. *American Journal of Veterinary Research*, 46, 1185-1191.

**Sawata A, Nakai T, Kume K, Yoshikawa H. and Yoshikawa T.** (1985). Intranasal inoculation of chickens with encapsulated or nonencapsulated variants of

*Haemophilus paragallinarum*: Electron microscopic evaluation of the nasal mucosa. Am. J. Vet. Res 46: 2346 – 2353.

**Sezonov G, Joseleau-Petit D, and D'Ari R.** (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. J. Bacteriol. 189, 8746–8749. doi: 10.1128/JB.01 368-07

**Serrano V. A, García P. R, Vaca S, and Negrete E.** (2005). Motilidad *in vitro* de *Haemophilus paragallinarum*. Avances de Biotecnología Agropecuaria y Forestal en México. ANABAF: 229-236.

**Sorensen H. P; and Mortensen K. K.** (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Echerichia coli*. J. Biotechnol. 115, 113-128. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.08.004.

**Soriano V. E. and Terzolo H. R.** (2004). Epizotiología, prevención y control de la Coriza Infecciosa. Vet Méx. 35: 261-279.

**Soriano V. E. and Terzolo H. R.** (2004). *Haemophilus paragallinarum*: etiología de la coriza infecciosa. Vet México 35(3):245-259.

**Srikumar R, Mikael L. G, Pawelek P. D, Khamessan A, Gibbs B. F and Jacques M.** (2004). Molecular cloning of haemoglobin-binding protein HgbA in the outer membrane of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microbiology. 150:1723-1743.

**Terry T. D, Yaramah MZ, Shannon LW, Blackall PJ and Michael PJ.** (2003). Genetic analysis of a plasmid encoding haemocin production in Genetic analysis of a plasmid encoding haemocin production in *Haemophilus paragallinarum*. Microbiology. 149:3177-3184.

**Terzolo H. R.** (2000). Revisión sobre coriza infecciosa: propuestas de investigación para su diagnóstico y control. Rev. Med. Vet. (Bs. As.). 81: 262-269.

**Wackett, L. P, Dodge A. G. and Ellis LBM.** (2004). Microbial Genomics and the Periodic Table. Appl Environ Microbiol 70: 647-655.

**Wu, J.R., Chen, P.Y., Shien, J.H., Shyu, C.L., Shieh, H.K., Chang, F. & Chang, P.C.** (2010). Analysis of the biosynthesis genes and chemical components of the capsule of *Avibacterium paragallinarum*. Veterinary Microbiology, 145, 90-99.

**Whitfield, C.** 2006. Biosynthesis and assembly of capsular polisaccharides in *Echerichia coli*. Annu. Rev. Biochem. 75:39-68.