



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**



**ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE GENES
RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DE
CARBOHIDRATOS (CONDROITINA) Y VIRULENCIA
EN *Avibacterium paragallinarum*.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

PRESENTA:

MVZ. DORCAS FLOR RAMOS SALAS

DIRECTOR:

DC. CANDELARIO VÁZQUEZ CRUZ

CODIRECTOR:

DC. ERASMO NEGRETE ABASCAL



BUAP

Puebla, Pue. a 11 de octubre 2022.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Dorcas Flor Ramos Salas**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

"Estudio de expresión de genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos (condroitina) y virulencia en *Avibacterium paragallinarum*"

A nuestro juicio, la alumna **Dorcas Flor Ramos Salas** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"


D.C. Claudia F. Martínez de la Peña


D.C. María Patricia Sánchez Alonso


M.C. Alejandra P. Espinosa Texeira


D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia


D.C. Luis Javier Martínez Morales

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@comco.buap.mx



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Proyecto apoyado por CB-2015-01-259209, BUAP 100103133-VIEP2022, DGAPA-PAPIIT-UNAM IN219919 e IN204122, y como becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT con número de becario 488144.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue desarrollada en medio de una pandemia causada por un nuevo virus, el SARS-CoV-2.

El mundo se detuvo. Pero mi trabajo de tesis no.

Trabajar bajo esas condiciones dejó ver el compromiso y el apoyo de mucha gente, en favor de la amistad y de los logros personales, pero al final, su granito de arena hacia la ciencia, que quizás en ese momento no fue mucho para algunos, pero significó todo para mí.

A mi asesor de tesis **Dr. Candelario Vázquez Cruz**, por todos sus conocimientos, enseñanzas, paciencia y por apoyarme siempre, ha sido el mejor en todo y siempre voy a agradecer haberme apoyado y haber creído en mí.

A **María Elena Cobos Justo**, por toda tu ayuda, enseñanzas y compromiso para realizar este proyecto bajo las condiciones que teníamos, en medio de risas, mudanzas de laboratorio y desvelos, siempre lo recordaré.

A TODOS USTEDES, GRACIAS SIEMPRE.

Dr. Erasmo Negrete Abascal
Juan Diego Pérez de la Rosa
Karina Rocha
Keren Ortiz
Willian Freysser Urbina López
Irene Guadalupe Ochoa Pérez

A mi **madre**, por ayudarme e incitarme a estudiar y superarme siempre.

A mi **hermana**, por ser más que una hermana, ser mi amiga y apoyarme a concretar este paso en mi vida.

A la maestra **Violeta Vázquez Montero**, por toda su hospitalidad y ayuda, gracias por mostrarme que la familia no solo es de sangre.

A **Mauricio Amaro Nápoles**, no hay palabras para agradecerte, mi agradecimiento a ti es y será infinito, siempre creíste en mí y me apoyaste en *todo* de una forma impresionante. Al final, fuiste el único que me levantó cuando sentía que ya no podía más y me dió las fuerzas que yo ya no tenía para seguir.
Gracias por conocerme y aun así amarme.

DEDICADO A

Mauricio Amaro Nápoles, amor de todas mis vidas, mi inspiración, mi cómplice y el ser humano que más admiro en este mundo. A ti te debo este manuscrito.

A mi hijo, ojalá que para cuando leas esto comprendas que lo que uno empieza, lo debe terminar, no importa cuán difícil llegue a ser el camino.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Coriza infecciosa	2
1.1.1. Importancia Económica.....	2
1.2. <i>Avibacterium paragallinarum</i>	2
1.2.1. Clasificación.....	2
1.2.2. Propiedades celulares, bioquímicas y fisiológicas	3
1.3 Sulfato de condroitina	3
1.4. Condroitina liasas.....	4
1.4.1. Clasificación.....	4
1.5. Factores de virulencia en <i>A. paragallinarum</i>	5
1.5.1. Metaloproteasas.....	6
1.5.2. Toxina citoletal distendente (CDT)	6
1.5.3. Toxinas RTX.....	7
1.5.4. Adhesinas Autotransportadoras Triméricas (HMTPp210)	7
1.5.5. OMP	8
1.5.6. Hemaglutinina filamentosa FHA	8
1.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)	9
1.7. Análisis de expresión genética mediante el uso de RT-qPCR.....	10
II. ANTECEDENTES	11
III. JUSTIFICACIÓN	13
IV. OBJETIVOS	14
4.1. General.....	14
4.2. Particulares.....	14
V. ESQUEMA DE TRABAJO	15
VI. METODOLOGÍA	16
6.1. Cultivo de cepas y extracción de ADN.....	16
6.2. Análisis bioinformático, diseño y selección de oligonucleótidos	16
6.3. Valoración del desempeño de los oligonucleótidos	17
6.4. Cultivo de cepas, extracción de RNA y	19
tratamiento con DNAsas.....	19

6.5.	Estandarización de RT-qPCR.....	19
6.6.	Elección del normalizador.....	20
6.7.	Validación del Rango Dinámico.....	20
6.8.	Validación de la eficiencia de amplificación.....	20
6.9.	Desarrollo de las corridas de las muestras a evaluar.....	20
6.10.	Análisis de datos	21
VII.	RESULTADOS.....	22
7.1.	Cultivo primario de cepas y extracción de ADN.....	22
7.2.	Análisis bioinformático, diseño y selección de oligonucleótidos	23
7.3.	Valoración del desempeño de los oligonucleótidos	25
7.4.	Extracción de RNA y tratamiento con DNasas	29
7.5.	Estandarización de RT-qPCR.....	34
7.6.	Elección del normalizador.....	36
7.7.	Validación del Rango dinámico	39
7.8.	Validación de la eficiencia de amplificación.....	39
7.9.	Resultado de las corridas de los genes target.....	41
7.10.	Análisis de resultados mediante $2^{-\Delta\Delta Ct}$	42
7.10.1.	Expresión de los genes en fase exponencial y estacionaria de la cepa COJ7 de <i>A. paragallinarum</i>	42
7.10.2.	Expresión de los genes en fase exponencial y estacionaria de la cepa AVPG2015 de <i>A. paragallinarum</i>	50
VIII.	DISCUSIÓN	62
IX.	CONCLUSIONES.....	68
X.	PERSPECTIVAS.....	70
XI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
XII.	ANEXOS	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	<i>Genes normalizadores y de virulencia seleccionados.</i>	17
Tabla 2.	<i>Concentraciones estandarizadas de la PCR convencional.</i>	18
Tabla 3.	<i>Condiciones estandarizadas de la PCR convencional.</i>	18
Tabla 4.	<i>Diseño de cultivo de cepas.</i>	19
Tabla 5.	<i>Cuantificación del ADN de las cepas AVPG2015 y COJ7.</i>	22
Tabla 6.	<i>Listado de oligonucleótidos sintetizados.</i>	24
Tabla 7.	<i>Listado de oligonucleótidos seleccionados para el estudio.</i>	28
Tabla 8.	<i>Resultados de la cuantificación del RNA obtenido del cultivo de la cepa COJ7 en diferentes estados de desarrollo y condiciones nutricionales.</i>	30
Tabla 9.	<i>Resultados de la cuantificación del RNA obtenido del cultivo de la cepa AVPG2015 en diferentes estados de desarrollo y condiciones nutricionales.</i>	31
Tabla 10.	<i>Resultados de la cuantificación del RNA obtenido después del tratamiento con DNasas del cultivo de la cepa COJ7.</i>	33
Tabla 11.	<i>Resultados de la cuantificación del RNA obtenido después del tratamiento con DNasas del cultivo de la cepa AVPG2015.</i>	33
Tabla 12.	<i>Concentraciones estandarizadas de la RT-qPCR.</i>	36
Tabla 13.	<i>Condiciones estandarizadas de la RT-qPCR.</i>	36
Tabla 14.	<i>Resultados de evaluación por NormFinder para la selección de normalizadores.</i>	37
Tabla 15.	<i>Resultados de evaluación por NormFinder para la selección de normalizadores excluyendo recN.</i>	37
Tabla 16.	<i>Niveles de expresión de genes de A. paragallinarum.</i>	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de GAG's y la estructura química del sulfato de condroitina.	4
Figura 2. Especificidades de las condroitinas liasas.....	5
Figura 3. Evaluación de la integridad del ADN extraído de <i>A. paragallinarum</i>	22
Figura 4. Tm de los pares de oligonucleótidos.	25
Figura 5. Evaluación de gradiente de temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos de <i>gyrA</i> (diseño 1) que amplifica un producto de 159 pb a una concentración de 0.8 μ M.	26
Figura 6. Evaluación de gradiente de temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos <i>rpoB</i> y <i>gyrA</i> utilizando una concentración de 0.2 μ M.....	26
Figura 7. Ubicación de todos los juegos de oligonucleótidos diseñados en el proyecto.....	27
Figura 8. Imagen de electroforesis del RNA obtenido del cultivo de la cepa COJ7 en fase exponencial.	30
Figura 9. Imagen de electroforesis del RNA obtenido del cultivo de la cepa COJ7 en fase estacionaria.	31
Figura 10. Imagen de electroforesis del RNA obtenido del cultivo de la cepa 2015 en fase exponencial.	32
Figura 11. Imagen de electroforesis del RNA obtenido del cultivo de la cepa 2015 en fase exponencial.	32
Figura 12. Prueba de concentración de oligonucleótidos.	35
Figura 13. Análisis de Curva de disociación (Melting).....	35
Figura 14. Evaluación del gen <i>16S</i> como normalizador.	38
Figura 15. Curva de amplificación de los genes <i>rpoB</i> y <i>atpD</i> para el grupo de muestras EX7 en los cuatro tratamientos.....	38
Figura 16. Curva estándar de evaluación del Rango Dinámico de la RT.	39
Figura 17. Curva estándar de validación de la eficiencia de amplificación. El gen utilizado fue <i>gyrA</i>	40
Figura 18. Ejemplo de resultados obtenidos de las corridas..	41
Figura 19. Cambios en la expresión del gen <i>avxA</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa COJ7 en dos fases de crecimiento.....	42
Figura 20. Cambios en la expresión del gen <i>cdtA</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa COJ7 en dos fases de crecimiento.....	43
Figura 21. Cambios en la expresión del gen <i>cdtB</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa COJ7 en dos fases de crecimiento.....	44
Figura 22. Cambios en la expresión del gen <i>cdtC</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa COJ7 en dos fases de crecimiento.....	44

Figura 23. Cambios en la expresión de la Toxina Citoletal Distendente (CDT por sus siglas en inglés) en <i>A. paragallinarum</i> cepa COJ7 en las dos fases de crecimiento.....	45
Figura 24. Cambios en la expresión del gen <i>fur</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa COJ7 en dos fases de crecimiento.....	45
Figura 25. Cambios en la expresión del gen <i>pepN</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa COJ7 en dos fases de crecimiento.....	46
Figura 26. Cambios en la expresión del gen <i>chl1</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa COJ7 en dos fases de crecimiento.....	47
Figura 27. Cambios en la expresión del gen <i>chl2</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa COJ7 en dos fases de crecimiento.....	48
Figura 28. Cambios en la expresión de la condroitina liasa en <i>A. paragallinarum</i> cepa COJ7 en dos fases de crecimiento.....	48
Figura 29. Cambios en la expresión del gen <i>ompA</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa COJ7 en dos fases de crecimiento.....	49
Figura 30. Cambios en la expresión del gen <i>hntp210</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa COJ7 en dos fases de crecimiento.....	50
Figura 31. Cambios en la expresión del gen <i>phaB</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa COJ7 en dos fases de crecimiento.....	50
Figura 32. Cambios en la expresión del gen <i>avxA</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa 2015 en dos fases de crecimiento.....	51
Figura 33. Cambios en la expresión del gen <i>cdtA</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa 2015 en dos fases de crecimiento.....	52
Figura 34. Cambios en la expresión del gen <i>cdtB</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa 2015 en dos fases de crecimiento.....	52
Figura 35. Cambios en la expresión del gen <i>cdtC</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa 2015 en dos fases de crecimiento.....	53
Figura 36. Cambios en la expresión de la Toxina Citoletal Distendente (CDT por sus siglas en inglés) en <i>A. paragallinarum</i> cepa 2015 en dos fases de crecimiento.	54
Figura 37. Cambios en la expresión del gen <i>fur</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa 2015 en dos fases de crecimiento.....	54
Figura 38. Cambios en la expresión del gen <i>pepN</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa 2015 en dos fases de crecimiento.....	55
Figura 39. Cambios en la expresión del gen <i>chl1</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa 2015 en dos fases de crecimiento.....	56
Figura 40. Cambios en la expresión del gen <i>chl2</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa 2015 en dos fases de crecimiento.....	56
Figura 41. Cambios en la expresión de la condroitina liasa en <i>A. paragallinarum</i> cepa 2015 en dos fases de crecimiento.....	57

Figura 42. Cambios en la expresión del gen <i>ompA</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa 2015 en dos fases de crecimiento.....	58
Figura 43. Cambios en la expresión del gen <i>hntp210</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa 2015 en dos fases de crecimiento.....	59
Figura 44. Cambios en la expresión del gen <i>fhaB</i> en <i>A. paragallinarum</i> cepa 2015 en dos fases de crecimiento.....	59
Figura 45. Cambios en la expresión de los genes de virulencia en las cepas COJ7 y 2015 de <i>A. paragallinarum</i> -fase exponencial y estacionaria.	61

RESUMEN

La Coriza Infecciosa es una enfermedad respiratoria aguda que afecta a pollos de engorda y aves de postura, y es causa de pérdidas económicas importantes a nivel mundial. Esta enfermedad se debe a *Avibacterium paragallinarum*, una bacteria Gram negativa que *in vitro* requiere condiciones microaerobias y la adición de NAD y suero al medio de cultivo. Es una bacteria de difícil crecimiento, en gelosa sangre forma colonias como de gotas de rocío adyacentes a una colonia nodriza de *Staphylococcus*. sp. que les proporciona el NADH. En estudios recientes del CICM-BUAP (no reportados), se han demostrado que la adición de sulfato de condroitina tiene un efecto promotor y/o potenciador del crecimiento de *A. paragallinarum*, incluso con la presencia de glucosa en el medio. En estudios genómicos de distintas cepas de *A. paragallinarum* se han identificado *in silico* genes que codifican enzimas degradadoras de sulfato de condroitina, conocidas como condroitina liasas (*Chl1* y *Chl2*). Aunque están pendientes las valoraciones transcripcionales y traduccionales sobre los mecanismos de incorporación o utilización de estos dos carbohidratos. En este trabajo se realizaron evaluaciones transcripcionales de tipo cuantitativo en *A. paragallinarum* considerando como variables, los suplementos Fe (III), 2,2'-dipyridyl y sulfato de condroitina en medio de cultivo líquido BHI. Para ello se estudiaron las cepas de *A. paragallinarum*, COJ7 y AVPG2015, a) cultivadas en BHI solo, b) BHI con hierro suplementado, c) BHI deficiente en hierro y d) BHI con sulfato de condroitina; adicionalmente se compararon dos fases de crecimiento: la exponencial y la estacionaria. El estudio se centró en comparar el nivel transcripcional relativo de once genes de virulencia, utilizando cinco genes normalizadores. Entre los genes de virulencia se estudiaron *chl1* y *chl2*, que codifican para condroitinas liasas. Los resultados obtenidos revelaron que los genes normalizadores con mejores resultados de estabilidad fueron *rpoB* y *atpD* de acuerdo con el algoritmo de NormFinder. Respecto a los genes de virulencia, se encontró que los niveles de expresión génica de *avxA* fueron más bajos que los niveles del normalizador, representando aproximadamente el 10% de los genes de virulencia analizados. Por consiguiente, el restante 90% de los genes de virulencia mostraron incrementos de expresión relativa en alguna de las condiciones estudiadas. Asimismo, se observó que la suplementación con hierro incrementa la expresión de los genes de virulencia en un 65%, la reducción de hierro los incrementa en 56%, mientras que la suplementación con sulfato de condroitina incrementa el 36%. En este trabajo se muestra la presencia funcional de los genes investigados, incluyendo el gen *fhaB*, en el genoma de *A. paragallinarum*, el cual codifica para una hemaglutinina filamentosa, como potencial factor de virulencia. Este trabajo también es el primer reporte del estudio transcripcional mediante RT-qPCR que incluye los principales genes de virulencia reportados, junto con *chl1* y *chl2* en *A. paragallinarum* sometidos a la suplementación *in vitro* con sulfato de condroitina, con Fe(III) o depleción de éste.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Coriza infecciosa

La coriza infecciosa (CI) es una enfermedad respiratoria aguda, que afecta a pollos de engorda y aves de postura. Esta enfermedad fue llamada coriza infecciosa debido a que es producida por la infección con la bacteria *Avibacterium paragallinarum* y no por algún virus; ésta afecta especialmente los senos nasales y produce una inflamación aguda de la mucosa. Los signos clínicos más comunes son exudados nasales serosos o mucosos, estornudos, hinchazón de los senos infraorbitarios, edema facial y conjuntivitis. La enfermedad está asociada a una reducción en la producción de huevo, así como retraso en el crecimiento debido a la disminución de consumo de alimentos y de agua. (Blackall y Soriano-Vargas, 2020).

1.1.1. Importancia Económica

La coriza infecciosa clásica se caracteriza por alta morbilidad y baja mortalidad. Los brotes de CI en países en desarrollo son de naturaleza compleja, en los que participan otros agentes patógenos o condiciones de estrés como factores de complicación importantes (Blackall, 1999). Por ejemplo, agentes bacterianos tales como *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, y patógenos virales como el Virus de la Bronquitis Infecciosa (IBV), Virus de la Laringotraqueitis Infecciosa (ILT) y Virus de la Viruela Aviar (FPV) se reportan como patógenos asociados a la CI (Ayanur, *et al.*, 2013). Existe considerable evidencia de que los brotes de coriza infecciosa pueden tener mayor impacto en los países en desarrollo que en los países desarrollados (Blackall y Soriano-Vargas, 2020).

Las mayores pérdidas económicas asociadas a coriza infecciosa se deben a una baja tasa de crecimiento en pollo de engorda y una marcada reducción en la producción de huevos en aves de postura (10–40%) (Bland, *et al.*, 2002). Sin embargo, la enfermedad puede tener un impacto mayor cuando hay otras infecciones asociadas, por ejemplo, con *Mycoplasma synoviae* se producen mayores pérdidas debido a la complicación con saculitis aérea (Droual, *et al.*, 1990) alcanzando pérdidas cercanas al 70% (Hoerr, *et al.*, 1994; Blackall y Soriano-Vargas, 2020).

1.2. *Avibacterium paragallinarum*

1.2.1. Clasificación

El agente causal de la enfermedad “Coriza Infecciosa” es la bacteria *Avibacterium paragallinarum*, conocida anteriormente con el nombre de *Haemophilus paragallinarum* y reclasificada taxonómicamente en 2005 por Blackall, *et al.* Actualmente *A. paragallinarum* se clasifica como: Subreino, Procaryotae; Orden: Gamma Proteobacteria; Familia: *Pasteurellaceae*; Género: *Avibacterium*; Especie: *A. paragallinarum*. (Blackall, *et al.*, 2005). Existen dos diferentes esquemas de serotipificación de *A. paragallinarum*: el esquema de Page, que ha subtipificado a los serogrupos A, B y C, utilizando la prueba de aglutinación en placa y el esquema de Kume, donde se han reconocido los serogrupos I, II y III, empleando la prueba

de inhibición de la hemoaglutinación (García,2017; Kume, 1983). En el esquema de Page inicialmente se reconocían siete serovares (A1-3, B1 y C1-3) incluídos los tres serogrupos antes mencionados (A, B y C de Page) que en el esquema de Kume corresponden a I, III y II respectivamente. Sin embargo, en 1989, Eaves, *et al.* identificaron el serovar HA8 que actualmente es conocido como A4 y en 1990, Blackall, *et al.*, identificaron el serovar HA9 actualmente conocido como C4. Los serogrupos del esquema de Page han servido para elaborar las vacunas que se utilizan para prevenir las infecciones de CI; sin embargo, se ha observado que las vacunas inactivadas proporcionan protección sólo contra los serovares presentes en la vacuna, por lo que éstas están en constante actualización con base en la frecuencia epidemiológica (Yen-Chiang, 2012; García,2017).

1.2.2. Propiedades celulares, bioquímicas y fisiológicas

La bacteria *A. paragallinarum* es Gram negativa, pleomórfica, que con mayor frecuencia tiene morfología celular de cocobacilo, con tendencia a la formación de cadenas cortas y de algunos filamentos, mide de 1 a 3 µm de longitud y 0.4-0.8 µm de ancho (Qin Zhao, *et al.*, 2010). Bajo ciertas condiciones de cultivo es una bacteria móvil, lo cual fue demostrado con pruebas bioquímicas, y de microscopía electrónica (Negrete, *et al.*, 2002; Serrano, *et al.*, 2005, citados en Veterinaria México, 2004). Las colonias de *A. paragallinarum* en gelosa sangre crecen en forma de pequeñas gotas de rocío sin hemólisis, son circulares, convexas de superficie lisa, sin pigmento y crecen mejor en forma adyacente a una colonia nodriza de *Staphylococcus. sp.* que les proporciona el NADH, en sentido oblicuo transmiten luz, las colonias mucoides son iridiscentes mientras que las colonias rugosas no lo son (Blackall y Soriano, 2008). *A. paragallinarum* es un microorganismo de difícil cultivo. Requiere condiciones microaerobias y la adición de NAD y suero al medio para su cultivo. El tiempo de incubación es de 16 a 24 h, a 37°C (Guerrero, 2018). *A. paragallinarum* y otros miembros de la familia *Pasteurellaceae* requieren el factor de crecimiento Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD), también conocido como factor V (Soriano y Terzolo, 2004). Este factor de crecimiento (NAD) es esencial, debido a que *A. paragallinarum* no lo puede sintetizar. Existen algunas variantes inusuales de crecimiento que son independientes de NAD aisladas de México y el sur de África (Bragg, R, 2002; Gerlach y Reidl, 2006; Blackall, *et al.*, 2011).

1.3 Sulfato de condroitina

Los proteoglicanos (PGs) son glicoconjugados que consisten en proteína y glucosaminoglicanos (GAGs). Los PGs generalmente se encuentran en la superficie de las células, matriz extracelular y membranas basales de tejidos animales y están involucrados en varias funciones biológicas que incluyen migración celular, proliferación, reconocimiento microbiano, adhesión, patogénesis, etc. Los GAGs son las cadenas laterales de los PGs y en muchos casos, sirven como receptores de varios virus y patógenos, por consiguiente, están involucrados en procesos de patogénesis. Conforme a la configuración estructural, los GAGs han sido categorizados en 4 tipos principales: Hialuronato, Condroitina/Dermatán Sulfato (CS/DS), Heparán Sulfato y Queratán Sulfato (Figura 1). Entre las cuatro categorías de GAGs, el sulfato de condroitina (CS) consiste en una cadena polimérica no

ramificada de unidades de disacáridos repetidos de N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) y ácido glucurónico (GlcA) unidas mediante enlace GlcA(β 1 \rightarrow 3) GalNAc(β 1-4) (Shaya, *et al.*, 2008.) CS está O-sulfatada en la posición 4 o 6 de GalNAc, lo que da lugar a dos isómeros, condroitina 4-sulfato (CS-A) y condroitina 6-sulfato (CS-C), respectivamente (Jin, *et al.*, 2010). Dermatan sulfato o condroitín sulfato B (CS-B) se compone de unidades repetidas de Ácido Idurónico (IdoA), la forma epimérica del ácido glucurónico y N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) la sulfatación ocurre en la posición 4 o 6 de la GalNAc o en la posición 2 del IdoA (Halldórsdóttir, *et al.*, 2006). Estudios existentes reportan que CS/DS interactúan con varios factores de crecimiento y moléculas de adhesión y juegan un papel crucial en la proliferación celular, diferenciación, migración, desarrollo de sistema nervioso, infección, reparación de heridas, entre otros importantes procesos fisiológicos. Los condroitín sulfato se encuentran generalmente unidos a un residuo de serina que se encuentra en la proteína central, unidas a través de una región de enlace del tetrasacárido (xilosa-galactosa-galactosa-ácido glucurónico) formando así un proteoglicano (PG).

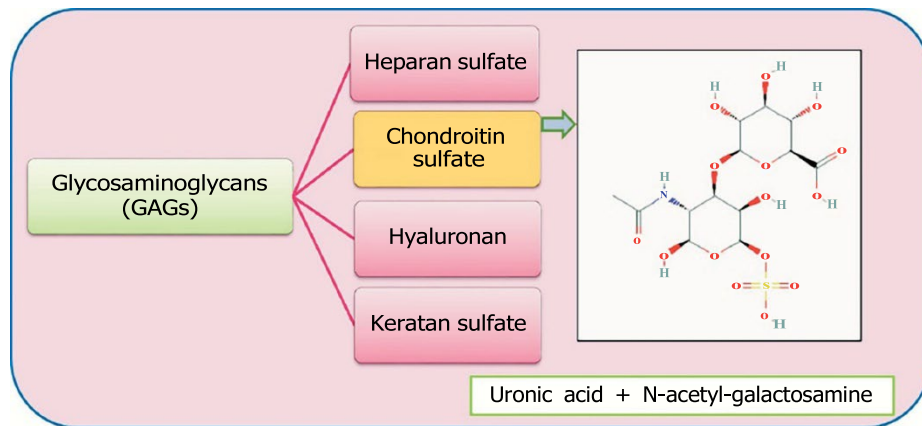


Figura 1. Tipos de GAG's y la estructura química del sulfato de condroitina (Rani, *et al.*, 2018).

1.4. Condroitina liasas

1.4.1. Clasificación

Las enzimas que degradan CS son llamadas condroitina sulfato liasas, condroitina liasas o condroitinasas. Las condroitín sulfato liasas (CS liasas) se han clasificado en las familias 6, 8 y 23 de polisacáridos-liasas en la base de datos CaZy. CS liasa degrada CS mediante un mecanismo de β -eliminación y genera un residuo de ácido hexenurónico insaturado y un nuevo extremo reductor (Cantarel, *et al.*, 2009). Estas enzimas se han estudiado para comprender la estructura de los GAGs mediante la manipulación de la señalización, diferenciación, migración y adhesión celular (Iozzo, 1998). En muchos casos, las cadenas de GAGs sirven como receptores de varios virus y patógenos, por lo que participan en la patogénesis (Yamada y Sugahara, 2008). Un número de diferentes microorganismos tales como *Proteus vulgaris*, *Arthrobacter aurescens* y *Bacteroides stercoris* elaboran algunas enzimas para degradar GAGs con el objetivo de invadir los tejidos del huésped para obtener

nutrientes. Con base en la especificidad del sustrato, las condroitinas liasas están categorizadas en 3 tipos: condroitina liasa ABC, AC y B (Figura 2). Condroitina liasa AC degrada tanto CS-A, CS-C y en menor medida Hialuronano, no puede degradar el DS, ya que es incapaz de romper el enlace glucosídico entre hexosamina y residuos de ácido idurónico (Linhardt, 2006). La heparina y DS actúan potencialmente como inhibidores de estas enzimas. La condroitina B liasa degrada específicamente sólo el DS como único sustrato. No pueden actuar sobre CS-A, CS-C y hialuronano. La condroitina ABC liasa es una enzima de amplia especificidad y es capaz de despolimerizar CS-A, CS-C, DS y también hialuronano hasta cierto punto. Asimismo, se ha informado de una condroitinasa a partir de la proteína 66 del virus derivado de la oclusión de baculovirus (ODV-E66) de *Autographa californica*. Esta enzima degrada la condroitina 6-sulfato y hialuronano, pero no hidroliza a condroitina 4-sulfato, DS y heparina (Sugiura, *et al.*, 2011). Las condroitinasas ODV-E66 se han incluido como nuevos miembros con especificidad de sustrato única en la familia 23 en liasas de polisacáridos (<http://www.cazy.org/PL23.html>). Algunos microorganismos específicos expresan las enzimas degradativas de GAGs y utilizan los productos liberados del polímero GAG como fuente de carbono (Rani, *et al.*, 2018).

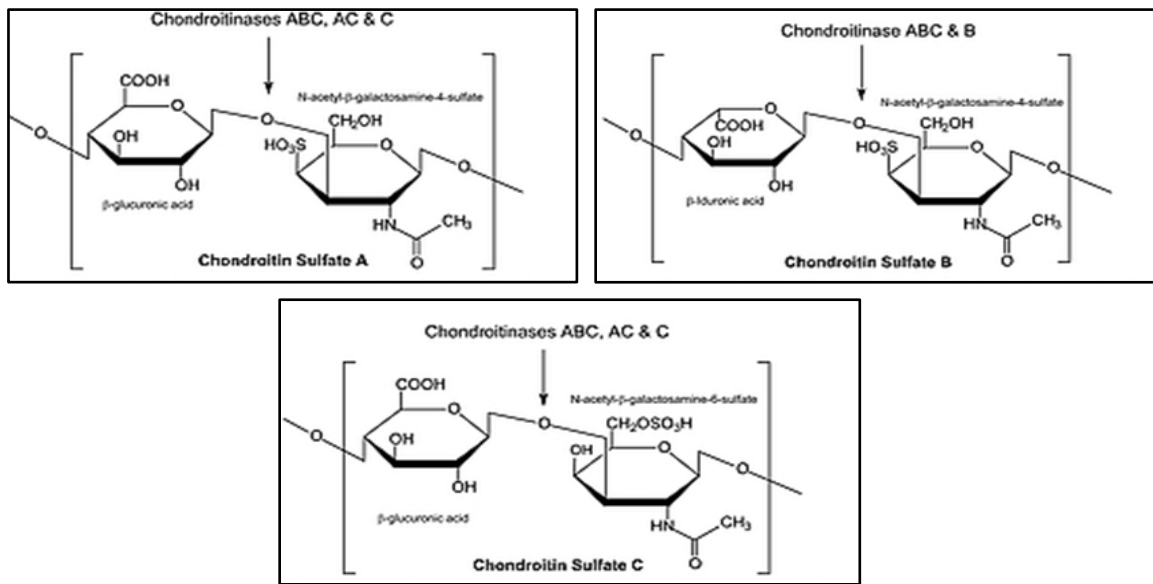


Figura 2. Especificidades de las condroitinas liasas (Tomado de <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sigma/c8058>).

1.5. Factores de virulencia en *A. paragallinarum*

Los factores de virulencia se definen como componentes de un organismo patógeno que le dan la capacidad de generar enfermedad, y así determinar la capacidad patogénica de los mismos, pero pueden ser o no prescindibles para su viabilidad. Los factores de virulencia están implicados en muchos aspectos de la interfaz hospedero-patógeno, incluida la colonización, la adquisición de nutrientes y la inmunosupresión (Persson, 2015). Hasta el momento, se han identificado varios factores de virulencia en *A. paragallinarum*, incluyendo el antígeno de

hemaglutinina, cápsula, proteína de adquisición de hierro, lipopolisacárido, metaloproteasa y toxinas AvxA y CDT (Yen-Chiang, 2012).

1.5.1. Metaloproteasas

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos en proteínas o péptidos. Estas enzimas parecen catalizar muchas funciones esenciales de las bacterias patógenas. Algunas metaloproteasas que son importantes para la virulencia incluyen las de colonización, adquisición de nutrientes, evasión inmunitaria e invasión bacteriana a la circulación sistémica. La modulación de la respuesta inmune del huésped puede facilitarse, actuando sobre componentes del suero, como inmunoglobulinas y proteínas del sistema del complemento (Miyoshi y Shinoda, 2000). *A. paragallinarum* posee metaloproteasas, las cuales se ha demostrado que poseen actividad proteolítica *in vitro* y capacidad de degradar parcialmente IgG de pollo (Rivero, 2005) por lo que podrían estar relacionadas con la patogenicidad de esta bacteria. El papel de las metaloproteasas secretadas por *A. paragallinarum* en la patogénesis de la CI todavía no se ha elucidado (Rivero, *et al.*, 2005).

1.5.2. Toxina citoletal distendente (CDT)

La toxina citoletal distendente (CDT) es un factor de virulencia producido por varias bacterias patógenas Gram negativas y las toxinas que producen difieren en secuencia y estructura. CDT es una toxina tripartita compuesta por tres subunidades, CdtA, CdtB y CdtC, en las que las dos subunidades CdtA y CdtC, son responsables del transporte de la subunidad activa (CdtB), que lleva la actividad catalítica (Lara-Tejero y Galán, 2000). CdtA es el principal responsable del reconocimiento de la célula huésped, al unirse a la membrana plasmática (Li, *et al.*, 2013) Esta unión involucra balsas lipídicas ricas en colesterol, la proteína esfingomielin sintasa 1 (SGMS1) y receptores celulares glicoproteicos o glicolipídicos que difieren entre las Cdt de distintas bacterias (Eshraghi, *et al.*, 2010). Después de la adhesión a la membrana plasmática de la célula del hospedero, CdtA permanece en la membrana plasmática mientras CdtB y CdtC son internalizados mediante transporte retrógrado al Retículo Endoplásmico y la red trans-Golgi. Al parecer, CdtC tiene el rol de llevar a CdtB al ER. CdtB entra al núcleo donde genera daño al ADN que conduce a la detención del ciclo celular, un fenotipo celular distendido y apoptosis o senescencia de una manera dependiente del tipo celular (Blazkova, *et al.*, 2010; Cortés-Bratti, *et al.*, 1999). Varios estudios han demostrado que Cdt es importante para la patogenicidad bacteriana y la inflamación en modelos de ratones o ratas (Fox, *et al.*, 2004; Jain, *et al.*, 2008). Dos factores podrían explicar la patogenicidad de la Cdt y es que, en primer lugar, Cdt parece dirigirse principalmente al sistema inmunitario. Los linfocitos son extremadamente sensibles a la detención y muerte del ciclo celular mediada por Cdt (Cortés-Bratti, *et al.*, 2021) y los macrófagos muestran una capacidad de fagocitosis disminuida y son más propensos a la autofagia después del tratamiento con Cdt (Ando-Sugimoto, *et al.*, 2014). En segundo lugar, la capacidad de Cdt para inducir la muerte celular conduce a la permeabilización de la barrera epitelial, como en el caso de la aplicación de la toxina CDT de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en tejido gingival *ex vivo* donde se ha demostrado que induce la disolución de la unión

celular, el desprendimiento de la capa externa queratinizada y la remodelación de la unión de adherencia (Damek-Poprawa, et al., 2013). Por lo anterior y en conjunto, las CDTs generan la alteración de la barrera epitelial y la sensibilidad del sistema inmunitario pudiendo ayudar así a las bacterias a colonizar mejor los tejidos del huésped mientras se protegen del sistema inmunitario. Además, la intoxicación por CDT conduce a la detención del ciclo celular en G2M y en G1S en ciertas líneas celulares (Cortes-Bratti, et al., 2001). Las CDTs pueden inducir lesiones en el ADN caracterizadas inicialmente como roturas de doble hebra (Double-Strain Break: DSB). Sin embargo, las DSB se observaron principalmente después de la exposición a altas concentraciones de CDT, mientras que roturas monocatenarias (Single-Strand Breaks: SSB) fueron observadas a dosis moderadas, que posteriormente terminaron en DSB tras la replicación (Fedor, et al., 2013). Por lo anterior, se deduce que las bacterias productoras de CDT pueden colonizar mejor los tejidos del huésped mientras se protegen del sistema inmunológico (Pons, et al., 2019). El análisis de secuenciación del genoma completo mostró que *A. paragallinarum* contiene genes *cdtABC* y como ya se mencionó, estos pueden estar implicados en la patogénesis de la enfermedad causada por esta bacteria (Chen, et al., 2014).

1.5.3. Toxinas RTX

RTX (Repeats in the structural ToXin) son proteínas formadoras de poros, toxinas producidas por una amplia gama de bacterias Gram negativas patógenas. El operón RTX a menudo se organiza en un modelo CABD, en el que C codifica la proteína de activación, A codifica la toxina estructural y los genes B y D codifican proteínas involucradas en el sistema de secreción tipo I (Yen-Chiang, et al., 2012). Un estudio realizado con la toxina serina-proteasa-RTX bivalente denominada *Avibacterium* RTX toxin A (AvxA), indica que esta toxina confiere a *A. paragallinarum* su fuerte actividad citotóxica contra el macrófago aviar, usando la línea celular HD11, y se postula que AvxA ejerce un papel clave específico en la patogenia de la coriza aviar (CI). (Küng y Frey, 2013).

1.5.4. Adhesinas Autotransportadoras Triméricas (HMTp210)

Las adhesinas autotransportadoras Triméricas (TAA) son un grupo de proteínas de la membrana externa bacteriana que forman un trímero estable en la superficie de muchas bacterias patógenas. Las TAA median la adherencia de las bacterias a las células eucariotas y se consideran importantes factores de virulencia. Las proteínas de la familia TAA tienen una estructura general que consta de los dominios de cabeza, cuello, tallo y ancla. El dominio de la cabeza media la adhesión a las células eucariotas, el dominio del cuello conecta la cabeza con el tallo, el dominio del tallo proyecta la cabeza desde la bacteria y el dominio de ancla forma un poro que permite la translocación de TAA a través de la membrana externa bacteriana. Se han reportado dos proteínas diferentes como potenciales proteínas de hemaglutinina (HA) de *Av. paragallinarum*: una proteína de 39 kDa denominada HagA y otra de 210 kDa denominada HMTp210. En 2014, Wang, et al., demostraron que las células de *Av. paragallinarum* carentes de la proteína HMTp210 perdieron actividad HA, lo que sugiere que HMTp210 es el principal antígeno HA de *Av. paragallinarum*. Las mutantes deficientes en HMTp210 mostraron una capacidad

reducida para adherirse a las células HeLa y formar biopelículas en superficies abióticas. Asimismo, se demostró por primera vez que *Av. paragallinarum* forma biopelículas y HMTp210 juega un papel importante en la formación de estas, sin embargo, se requiere conocer los resultados de los estudios *in vivo*.

1.5.5. OMP

Las bacterias Gram negativas están rodeadas por una membrana interna (inner membrane: MI) y una externa (outer membrane: OM). La OM es única en su composición y posee una distribución asimétrica de lípidos, la capa interior que contiene fosfolípidos, mientras que la capa exterior está compuesta de lipopolisacárido (LPS). Esta membrana alberga lipoproteínas y proteínas de membrana integrales llamadas proteínas de membrana externa (OMP). Las OMPs son proteínas integrales de membrana que adoptan una estructura de β barril con bucles cortos entre hebras en el lado periplásmico y bucles grandes y extendidos en el lado extracelular. Casi todas las estructuras de este tipo de proteínas muestran un número par de cadenas β dispuestas en un patrón antiparalelo (Fairman, *et al.*, 2011). Esta característica estructural contribuye a su alta estabilidad, ayudándoles a resistir el entorno variable y hostil. Las OMPs están expuestas al exterior de la célula bacteriana y son la primera línea de contacto entre la bacteria y su entorno. Dada su ubicación, las OMPs tienen muchas funciones diversas, actuando como factores de adhesión en la virulencia, canales para la absorción de nutrientes, receptores de sideróforos y enzimas como proteasas y lipasas (Rollauer, *et al.*, 2015). En 2009, se identificaron tres proteínas de membrana externa de 60, 68 y 93 kDa cuya expresión aumentaba cuando *Av. paragallinarum* se cultivó en medio restringido en hierro, las cuales están regulados por la proteína Fur (Abascal, *et al.*, 2009).

1.5.6. Hemaglutinina filamentosa FHA

En la actualidad, existen nueve sistemas de secreción en bacterias Gram negativas, designadas del I al IX, así como los sistemas chaperona-usher pili. Los T5SSs (type V secretion system; T5SS) son los sistemas de secreción más simples y extendidos entre las bacterias Gram negativas (Drobnak, *et al.*, 2015). Están compuestos por una o dos proteínas centrales. Las proteínas efectoras (dominios pasajeros) son transportados por el poro de secreción (dominio de translocación) a través de la membrana externa a la superficie celular (Fan, *et al.*, 2016), y a menudo son denominados autotransportadores, debido a que constituyen sistemas de secreción autónomos (Leo, *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha demostrado que los T5SS dependen de varios factores bacterianos como el translocón Sec, las chaperonas periplásmicas y el sistema de ensamblaje del β barril en la membrana externa (Bernstein, 2019). Actualmente hay cinco subclases reconocidas en los T5SS, en donde los subtipos Vb, son también conocidos como sistemas de secreción de dos componentes (two partner secretion; TPS). Los sistemas TPS se componen fundamentalmente de dos proteínas, una que funciona como translocador, TpsB, y otra como pasajero, TpsA. La hemaglutinina filamentosa de *Bordetella pertussis* (FHA) sirve como modelo para TPS. La FHA (definida como una proteína de ~ 250 kDa que se libera de la superficie bacteriana) se traduce inicialmente como una preproteína llamada FhaB (~ 370 kDa), que contiene un péptido señal N-terminal y

un C-terminal grande que se eliminan durante el proceso de secreción. Se ha asumido que la molécula "madura" (~ 250-kDa FHA) es la forma funcional de la proteína. De acuerdo con el modelo actual de secreción de FHA (Noël, *et al.*, 2012), el péptido señal dirige FhaB a través de la membrana interna a través de la maquinaria de translocación Sec (Chevalier, *et al.*, 2004) y luego es eliminado por la peptidasa líder. La región de ~ 250 aminoácidos (aa) de FhaB inmediatamente C terminal al péptido señal, que se conoce como dominio TPS y que está altamente conservado entre las proteínas TpsA, está unida por chaperonas que mantienen la proteína en un estado no plegado a medida que transita por el periplasma (Hodak, *et al.*, 2008). Luego, FhaB transita a través de FhaC en una dirección N- a C-terminal, con el extremo N que permanece anclado a FhaC en la membrana celular (Noël, *et al.*, 2012). El dominio TPS inicia el plegamiento de FhaB en una hélice- β rígida en la superficie de la bacteria (Kajava, *et al.*, 2001), y el plegamiento progresivo da como resultado la formación de un eje de ~ 50 nm de largo. El extremo C terminal al eje helicoidal comienza a plegarse en el extremo distal de la molécula, lo que media la adherencia de las bacterias al hospedador en células *in vitro* y al epitelio respiratorio *in vivo* (Noël, *et al.*, 2012). En distintos patógenos Gram negativos, tales como *Bordetella bronchiseptica*, *B. pertussis* y *Acinetobacter baumannii*, se ha demostrado el papel de la proteína hemaglutinina filamentosa (FHA) como factor de virulencia relacionados con la adherencia al tejido del huésped (Pérez, *et al.*, 2017), la adquisición de hierro (Fournier, *et al.*, 2011), la inhibición de la fagocitosis (Dodd, *et al.*, 2014), la fagocitosis, citotoxicidad y evasión inmune mediante la inhibición de la fagocitosis contribuyendo así a la colonización y persistencia bacteriana. También se ha demostrado un papel relevante en la competencia bacteriana a través de la inhibición de crecimiento por contacto directo (Aoki SK, *et al.*, 2005) y en la virulencia en modelos animales (Pérez, *et al.*, 2017). Sin embargo, en el genoma de *A. paragallinarum* se ha encontrado la presencia de la proteína FhaB relacionada con los sistemas TPS, pero su contribución a la virulencia de este patógeno, así como su funcionamiento, no está claro.

1.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la técnica empleada para la síntesis de ADN *in vitro* por medio de una polimerasa termoresistente con alta especificidad, en una región particular (secuencia-blanco) determinada por un par de oligonucleótidos relativamente cercanos, que corresponden a un diseño de esta reacción. La tecnología de qPCR (quantitative-PCR) está basada en la detección de una señal fluorescente producida proporcionalmente durante la amplificación del ADN blanco. SYBR GREEN es un compuesto orgánico que forma parte del grupo de las cianinas asimétricas (fluoróforos 4S) y es utilizado en biología molecular ya que se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN y se acopla energéticamente a los ácidos nucleicos de éste, de manera que se incrementa notablemente su tasa de emisión fluorescente. Este fenómeno se conoce como transferencia de energía mediante resonancia de fluorescencia (FRET, por sus siglas en inglés). El complejo resultante ADN-SYBR Green presenta el pico de absorción en $\lambda = 498$ nm y el de emisión en $\lambda = 522$ nm. Las pruebas de qPCR, determinan el punto en el tiempo durante el proceso, en ciclos, cuando se detecta

por primera vez la amplificación de un producto de PCR. Este se determina identificando el número del ciclo en el cual la intensidad de la emisión del reportero marcado se levanta sobre el ruido de fondo de la mezcla de reacción. Este número del ciclo está referido como el ciclo umbral o “threshold cycle” (Ct). El Ct se determina en el inicio de la fase exponencial de la reacción de PCR y es inversamente proporcional al número de copias del blanco. Por lo tanto, cuanto más alto es el número de copias iniciales de los ácidos nucleicos a amplificar, más pronto se observa un aumento significativo en la fluorescencia, y son más bajos los valores de Ct (Rodríguez y Rodríguez,2006).

1.7. Análisis de expresión genética mediante el uso de RT-qPCR

Una ventaja de la técnica de PCR en tiempo real es la cuantificación de ARN. Esto es posible gracias al uso de las transcriptasas reversas o retrotranscriptasas, enzimas que generan ADN complementario (cDNA) a partir de un molde de ARN. Bajo condiciones apropiadas, la cantidad de cDNA generado por transcripción reversa es proporcional al número de moléculas de ARN presente en una muestra dada. Entonces el cDNA puede ser el molde para una reacción de PCR en tiempo real, utilizando su sensibilidad y precisión para determinar cambios en la expresión de los genes. Esta técnica es conocida como RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) y se ha convertido en el método más popular para la cuantificación de los niveles de ARN mensajero (Rodríguez y Rodríguez,2006).

Los estudios de expresión génica pueden proporcionar información sobre las diferencias en la expresión génica entre muestras, proporcionando información sobre los canales de regulación entre hospederos y patógenos. La cuantificación absoluta y la cuantificación relativa son dos métodos de la RT-qPCR utilizados en la investigación. En la cuantificación relativa, la expresión de un gen objetivo se determina comparándolo con un gen de referencia estándar, y es el método más apropiado y común utilizado para el análisis de cambios relativos en la expresión de ARNm de un gen (Kałużna, 2017).

II. ANTECEDENTES

De acuerdo a las observaciones hechas sobre el genoma de *A. paragallinarum* en el laboratorio de Microbiología Molecular y Celular del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM), se dedujeron varios genes probables para metabolizar carbohidratos complejos presentes en células animales, y por evaluaciones experimentales se ha observado un mejor desarrollo de varias cepas de *A. paragallinarum* cuando el medio de cultivo es enriquecido con condroitín sulfato; estas evidencias sugieren la asimilación de este polisacárido. Como hipótesis de trabajo en el CICM-MIMOCE se está evaluando si, esto puede ser por medio de la utilización de condroitina como fuente de carbono y energía o bien como evasión de la respuesta inmune al destruir el polisacárido para incorporarlo directamente a cubiertas extracelulares. Adicionalmente, a estas hipótesis, es importante determinar la temporalidad de expresión de las probables enzimas condroitina liasas. Parte de esto es lo que se abordará en este proyecto.

Al considerar a *A. paragallinarum* como patógeno de aves, se han hecho varias investigaciones con este microorganismo, las más recientes de tipo genómico. De forma sucinta, los resultados muestran que se conoce a la mayoría de los factores de virulencia deducidos por funcionalidad o identidad con factores de virulencia de otros patógenos que afectan a los humanos. En algunos casos, la deducción ha llevado a la evaluación funcional de genes de enzimas, de toxinas y de componentes estructurales que tiene la probable función de factores de virulencia. Aunque, inicialmente se prepararon bacterinas (vacunas) sin saber los componentes moleculares que contenían estas, hoy se puede visualizar un nuevo escenario para tratar a la CI. Considerando algunas características de las moléculas descritas para los factores de virulencia propuestos, se han preparado nuevas bacterinas y también algunas proteínas recombinantes para incluirlas en las vacunas. Sin embargo, todos estos componentes por separado o juntos generan una protección a la enfermedad de forma parcial o temporal; esto sugiere la modificación del comportamiento de *A. paragallinarum* en el hospedero o la existencia de otros factores de virulencia desconocidos, que pudieran aprovecharse para mejorar el tratamiento inmunológico. Esta última hipótesis ha sido abordada en algunos trabajos genómicos, por ejemplo, el de Horta-Valerdi, 2017, Guerrero González, 2018 y Cobos Justo (comunicación personal), en los que se hicieron búsquedas *in silico* por medio de la estrategia de genómica comparada en dos genomas secuenciados de *novus*, las cepas CL y AVPG5; sin embargo, los genomas no lograron ser circularizados en aquel momento, por lo que los resultados no fueron totalmente concluyentes. Con base en esto, Cobos Justo (comunicación personal) y Barcenás Villalobos, 2020 usando un mayor número de cepas y de genomas de la familia *Pasteurellaceae* han abordado la caracterización funcional de genes relacionados con la destrucción de la matriz extracelular de condroitín sulfato de las células del hospedero, no obstante, en dichos trabajos no se ha llegado a comprender la temporalidad de expresión de las enzimas degradadoras, que pueden catalogarse como potenciales factores de virulencia debido a su capacidad de dañar la integridad del tejido animal colonizado por *A. paragallinarum*. Lo

anterior, nos motiva a hacer el planteamiento de investigar la temporalidad de expresión de estos genes en diferentes condiciones de laboratorio.

La bacteria *A. paragallinarum* comúnmente es cultivada en medio BHI, el cual contiene glucosa. Sin embargo, se ha observado que la adición de condroitina al medio BHI tiene un efecto promotor y/o potenciador del crecimiento de esta bacteria, incluso con la presencia de glucosa en el medio, observándose un mejor crecimiento bacteriano. Esta evidencia obliga a hacer valoraciones puntuales sobre los mecanismos de incorporación de estos dos carbohidratos en *A. paragallinarum* para lo cual es necesario realizar evaluaciones bajo distintos contenidos de nutrientes carbonados. A la par del escrutinio molecular modificado por los carbohidratos se propone un escenario que permita examinar la expresión transcripcional bajo otras condiciones del cultivo, como lo es el cambio en la concentración de Fe(III) o su depleción. Bajo estas condiciones, la bacteria pudiera prender o apagar los genes que intervienen en el ajuste del proceso metabólico afectado, y quizás reordenar el patrón de expresión de genes de virulencia o de genes asociados a la nutrición bacteriana, imitando las condiciones *in vivo* dentro del hospedero.

La experimentación anterior motiva, en primera instancia, a conocer los genes involucrados directamente con el metabolismo de diferentes carbohidratos tales como la glucosa y condroitina, y en segundo lugar conocer los detalles de otros genes involucrados en la virulencia, por ejemplo, los relacionados con dos tipos de metabolismos, a) los mecanismos de obtención de hierro y b) los que en otros microorganismos controlan la virulencia. Por último, una vez observada la activación de estos genes bajo diferentes condiciones metabólicas se analizarán las diferencias de expresión que llevan a producir el daño celular en el hospedero a causa de la necesidad de obtención de dichos nutrientes.

III. JUSTIFICACIÓN

Dentro de los avances del conocimiento genético de *A. paragallinarum* y a raíz del conocimiento de su genoma, se sugiere la existencia de genes de virulencia poco conocidos. Derivado de la evidencia de que *A. paragallinarum* crece mejor en medios de cultivo enriquecidos con condroitina se abre la interrogante sobre qué genes se activan o se silencian en presencia de ésta y con base en esto, se conjetura la existencia de grupos de genes controladores y otros grupos de genes que responden a esos controladores genéticos por lo que se requiere saber si la condroitina juega un papel importante en la activación de genes de virulencia y si los genes del metabolismo de condroitina *per se* son factores de virulencia. Una aproximación a lo anterior se puede lograr mediante la cuantificación de transcritos de genes de *A. paragallinarum*.

IV. OBJETIVOS

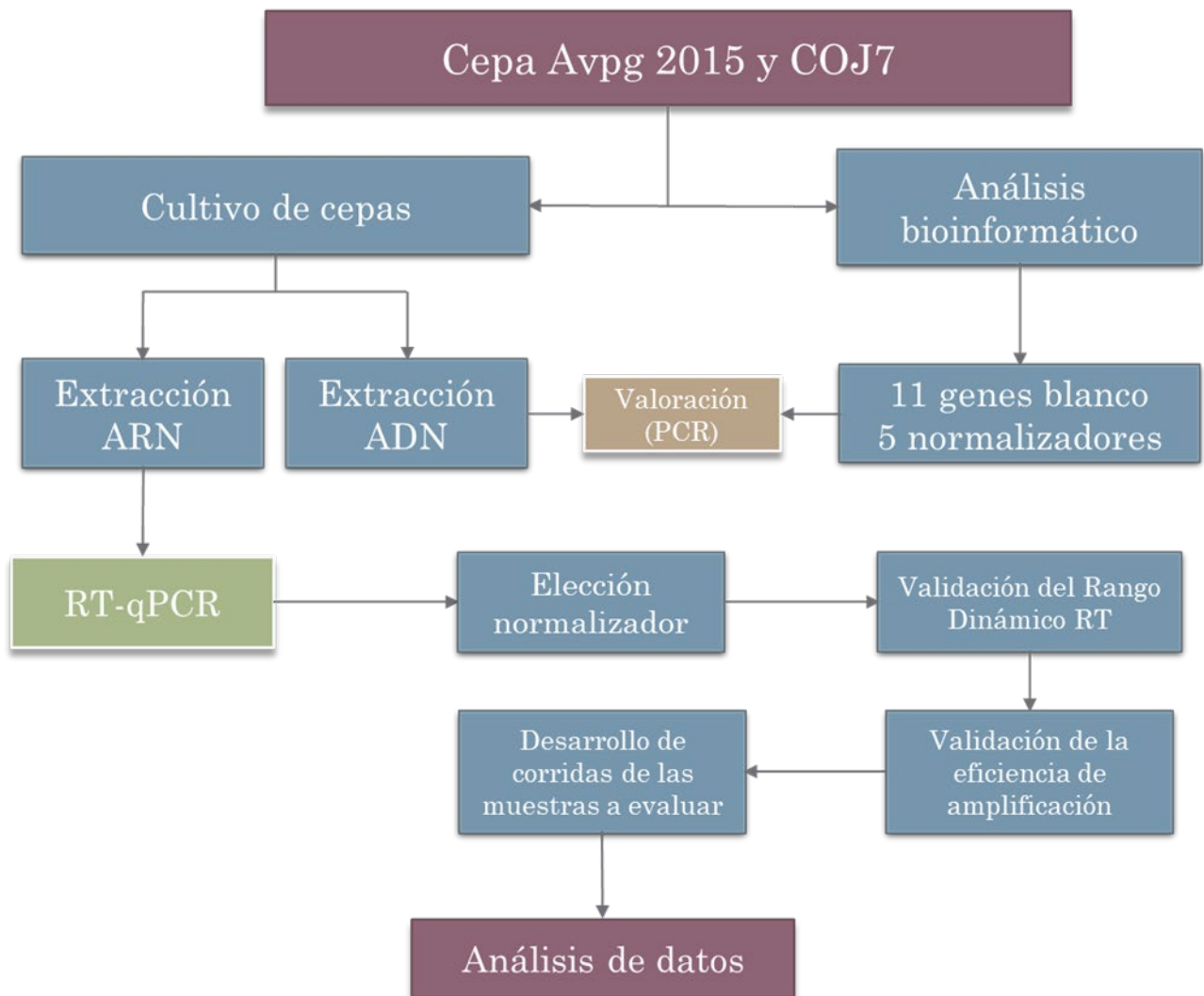
4.1. General

Determinar los niveles de expresión transcripcional de genes de condroitina liasa, algunos de virulencia y domésticos de *Avibacterium paragallinarum* en diferentes condiciones de cultivo en el laboratorio.

4.2. Particulares

- Analizar las secuencias de los genes *chl1*, *chl2*, *fur*, *avxA*, *cdtABC*, *pepN*, *ompA*, *hmtp210* y *phaB* de *A. paragallinarum* para diseñar y sintetizar los iniciadores con la finalidad de evaluar su eficiencia de amplificación para experimentos de PCR y RT-qPCR.
- Obtener RNA total a partir de los cultivos de las cepas AVPG2015 y COJ7 de *A. paragallinarum*, crecidas en diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación.
- Desarrollar las reacciones de RT-qPCR para los genes propuestos.
- Hacer el análisis estadístico de los niveles de expresión transcripcional para establecer diferencias en los niveles de expresión de los factores de virulencia seleccionados.

V. ESQUEMA DE TRABAJO



VI. METODOLOGÍA

El trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Celular (MIMOCE) del Centro de investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla en la Ciudad de Puebla, Puebla, México, el Laboratorio de Secuenciación Genómica, CENAPA, SADER-SENASICA de Jiutepec, Morelos, México y el Laboratorio de Genética UMF, FES Iztacala en Tlalnepantla, Estado de México, México.

6.1. Cultivo de cepas y extracción de ADN

Las cepas con las que se trabajaron en el presente estudio fueron AVPG2015 y COJ7, ambas pertenecientes al cepario del Laboratorio MIMOCE, BUAP. Los cultivos se iniciaron a partir de stocks conservados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se reactivaron en gelosa sangre. En primera instancia, se realizó el cultivo en base agar gelosa sangre con una estría de *Staphylococcus* sp. como nodriza, incubadas a 37°C por 48 horas en condiciones de microaerobiosis. Una vez obtenido el crecimiento se sembró una azada en 3 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) suplementado con suero de caballo al 5% y $10\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de nicotina adenina dinucleótido (NAD) durante 24 horas a 37°C , en condiciones de microaerobiosis y agitación. A partir de los precultivos, se cultivaron las cepas utilizando caldo BHI con suero de caballo al 5%, y $10\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de NAD, en condiciones de microaerobiosis y agitación a 37°C por un período de 16-32 horas. De estos cultivos, se procedió a realizar el almacenamiento de los cultivos mediante la congelación de las células con glicerol al 50% a -70°C , previa verificación de la ausencia de contaminación y posteriormente se realizó la extracción de ADN de ambas cepas bajo la técnica de fenol-cloroformo con tratamiento de RNasas (Sambrook y Russel, 2001). Posterior a ello, la cuantificación del ADN obtenido se realizó mediante espectrofotometría utilizado un equipo NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) y se analizó la integridad del material genético obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio a una concentración de $5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$.

6.2. Análisis bioinformático, diseño y selección de oligonucleótidos

Se procedió a realizar el análisis bioinformático con el objetivo de sintetizar los oligonucleótidos de los genes de estudio seleccionados (Ver Tabla 1). Para el diseño de los oligonucleótidos, se trabajó con la cepa de referencia AVPG2015 cuya secuencia fue otorgada por el Laboratorio MIMOCE, realizando alineamientos con las secuencias de otras cepas, obtenidas tanto de la plataforma de NCBI GenBank National (*Center for Biotechnology Information*) como de RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) en búsqueda de segmentos conservados. Los alineamientos fueron realizados en la plataforma Genetix 6.0 (Anexo 1). Para la obtención de los oligonucleótidos se trabajó con la plataforma Primer-BLAST (NCBI) donde se eligieron dos diseños por cada gen; ambos ubicados en la región central del mismo, con la finalidad de evitar la acción de las RNasas. (Anexo 2). Asimismo,

todos los juegos de oligonucleótidos sintetizados se diseñaron con aproximadamente el mismo valor de T_m (Temperatura Melting) entre 59°C y 61°C.

Tabla 1. *Genes normalizadores^a y de virulencia seleccionados.*

Gene	Producto	Tipo
<i>gyrA</i>	Subunidad A de ADN girasa	N
<i>atpD</i>	Subunidad β de ATP sintasa	N
<i>rpoB</i>	Subunidad β de RNA polimerasa	N
<i>recN</i>	Familia SMC ^b y reparación de ADN	N
<i>16S</i>	RNA ribosomal	N
<i>avxA</i>	Toxina estructural avxCABD	V
<i>cdtA</i>	Subunidad A de CDT	V
<i>cdtB</i>	Subunidad B de CDT	V
<i>cdtC</i>	Subunidad C de CDT	V
<i>fur</i>	Represor transcripcional	V
<i>pepN</i>	Metaloproteasa	V
<i>chl1</i>	Condroitina liasa 1	V
<i>chl2</i>	Condroitina liasa 2	V
<i>ompA</i>	Precursor de la proteína A de la membrana externa	V
<i>hntp210</i>	Adhesina de autotransporte	V
<i>fhaB</i>	Hemaglutinina filamentosa	V

Nota: ^a Selección de normalizadores (Wen, *et al.*, 2016).
^b Proteínas de mantenimiento estructural de cromosomas (SMC por sus siglas en inglés).
N: Normalizador / V: virulencia

6.3. Valoración del desempeño de los oligonucleótidos

La especificidad y desempeño de todos los oligonucleótidos sintetizados fue verificado en ambas cepas (AVPG2015 y COJ7) mediante la estandarización en PCR punto final utilizando el ADN obtenido anteriormente. Se comprobó la especificidad de la prueba mediante la presencia de una sola banda de amplificación, a distintas temperaturas y concentraciones, en la que se obtuvo la concentración de oligonucleótidos específica con la que se eliminaron los dímeros de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos fueron sometidos a distintos gradientes de temperatura en un rango de 54-62°C y una concentración variable (0.8, 0.4 y 0.2 μM Vol. final reacción) quedando en las concentraciones y condiciones indicadas en las Tablas 2 y 3. Se trabajó con PCR MasterMix (Promega) según las especificaciones

del fabricante. Las electroforesis se realizaron en gel de agarosa al 2% teñidos con SYBR GREEN y visualizados en el equipo ChemiDoc (Bio-Rad). Se utilizó marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). Todos los juegos de oligonucleótidos fueron usados a la misma concentración y condiciones.

Tabla 2. *Concentraciones estandarizadas de la PCR convencional.*

Reactivo	Volumen (μ l)	Conc. final
Master Mix, 2X	12.5 μ l	1X
Oligonucleótido Fw, 10 μ M	0.5 μ l	0.2 μ M
Oligonucleótido Rv, 10 μ M	0.5 μ l	0.2 μ M
ADN	1 μ l	50 ng
Agua	10.5 μ l	N.A.
Vol final rx	25 μ l	-----

Tabla 3. *Condiciones estandarizadas de la PCR convencional.*

Ciclo	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	95	2 min
	95	30s
Amplificación (x35)	60	30s
	72	30s
Extensión	72	5 min
Enfriamiento	4	∞

6.4. Cultivo de cepas, extracción de RNA y tratamiento con DNasas

Para el cultivo de las cepas se determinaron cuatro variables a las que serían sometidas (Tabla 4). Las cepas fueron precultivadas y cultivadas en las condiciones mencionadas en el punto 6.1, y una vez alcanzadas las densidades ópticas (D.O.) de las fases exponencial y estacionaria (0.4 y 0.6 respectivamente), fueron transferidas por triplicado a los medios de cultivo conteniendo: 0.250 mM de 2,2'-dipyridyl con el objetivo de crear un medio de cultivo deficiente de hierro, 0.120 mM de cloruro férrico para generar un medio de cultivo enriquecido con hierro y 0.5 mg/mL de sulfato de condroitina como medio de cultivo adicionado con condroitina, además del control, el cual fue caldo BHI bajo condiciones normales de crecimiento. Los triplicados se incubaron, durante 3 horas a 37°C en condiciones de microaerobiosis y agitación. Una vez transcurrido ese tiempo, se procedió a realizar la extracción de RNA de inmediato mediante el kit RNeasy mini kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó un duplicado de cada triplicado con la finalidad de obtener mayor cantidad de material genético para el desarrollo de los experimentos. Asimismo, se procedió a realizar la cuantificación del RNA obtenido mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) y se analizó la integridad del material genético obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR GREEN. Posterior a la extracción y evaluación del RNA obtenido, las muestras iguales (con el mismo ID) se juntaron y se realizó el tratamiento de DNasas a todas las muestras obtenidas con el kit DNase I, RNase-free (Thermo Scientific) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. De igual forma, se realizó la cuantificación del RNA obtenido después del tratamiento con DNasas mediante el equipo NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific).

Tabla 4. *Diseño de cultivo de cepas.*

Cepas	Variables	Concentración	Extracción RNA
AVPG2015, COJ7	BHI	-----	Fase exponencial y estacionaria
	BHI + 2,2'- dipyridyl	0.250 mM	
	BHI + hierro	FeCl ₃ 0.120 mM	
	BHI + condroitina	0.5 mg/mL	

6.5. Estandarización de RT-qPCR

El RNA se procesó en una plataforma one-step, con la cual no es necesario elaborar por separado el cDNA. Para el proceso de estandarización de la RT-qPCR, se utilizaron 16 juegos de oligonucleótidos previamente seleccionados. Se utilizó el kit iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step Kit (Bio-Rad) conforme las instrucciones

del fabricante, adecuando las concentraciones tanto de oligonucleótidos como de RNA. Todas las pruebas fueron realizadas en un termociclador 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems™).

6.6. Elección del normalizador

Primeramente, se realizó la evaluación del comportamiento de los cinco genes HK seleccionados en los cuatro grupos de muestras: AVPG2015 Fase exponencial (EX15) y estacionaria (ES15) y COJ7 Fase exponencial (EX7) y estacionaria (ES7) para observar si existía la modificación de su expresión como consecuencia de los distintos tratamientos. Las muestras se ensayaron por triplicado y resultados obtenidos fueron analizados mediante NormFinder (Andersen, *et al.*, 2004) con la finalidad de encontrar el (los) mejor(es) candidato(s) a normalizadores para realizar el análisis de los datos. El algoritmo de NormFinder se basa en un modelo matemático de expresión génica y análisis estadístico sólido para estimar la estabilidad de la expresión génica considerando variaciones intragrupo e intergrupo (Andersen, *et al.*, 2004). NormFinder_0953.xls es un complemento de Excel que introduce la función NormFinder en el paquete de software de Microsoft Excel (<http://moma.dk/normfinder-software>). Para ingresar los datos de expresión para el análisis NormFinder, los valores de Ct se transformaron en cantidades usando la fórmula $2^{\Delta Ct}$. Los genes más estables dentro y entre grupos son los genes con los valores de estabilidad (Stability Value) más bajos. El software NormFinder también identifica la mejor combinación de dos genes de referencia en diferentes condiciones experimentales.

6.7. Validación del Rango Dinámico

Con el objeto de asegurar que una reacción dada no agote los reactivos proporcionados por el kit de RT-qPCR, (en este caso se trataba de una plataforma one-step) se determinó el rango dinámico ya que, además, las muestras, así como los genes en estudio, juegan un papel fundamental en la determinación de la cantidad de ARN que se puede agregar de forma segura. Todo lo anterior con el fin de evitar dar lugar a resultados erróneos que probablemente no sean detectables. Por lo tanto, se realizó un pool de un grupo de muestras (ES7) que fueron trabajadas exactamente de la misma forma que las demás y que fueran representativas. Partiendo de un pool de ARN sin diluir, se realizaron diluciones 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16. Las muestras se procesaron conforme las condiciones previamente establecidas, utilizando el mismo volumen en todas las reacciones, y fueron analizadas como curvas estándar junto con el gen normalizador *rpoB* (gen elegido por NormFinder).

6.8. Validación de la eficiencia de amplificación

Se realizó una curva estándar para verificar los valores de Slope, Y-intercept, R^2 obteniendo el porcentaje de eficiencias de un gen normalizador (*gyrA*) y un target (*cdtA*). La concentración de RNA stock utilizado fue de 100 ng/ μ L abarcando así el rango esperado de concentración en las muestras en el experimento, el cual era de 50 ng/ μ L.

6.9. Desarrollo de las corridas de las muestras a evaluar

Se realizó el análisis por la técnica de RT-qPCR de la totalidad de las 48 muestras obtenidas, por triplicado tanto en réplicas técnicas (el triplicado de muestras de RNA

colocado en la placa de RT-qPCR) como réplicas biológicas (triplicado de tubos con crecimientos de *A. paragallinarum* que se sometieron a distintas condiciones de cultivo) en cada corrida, y para cada uno de los genes target como normalizadores, con excepción del gen 16S el cual presentó valores de amplificación fuera de rango. Todas las corridas se trabajaron bajo las concentraciones y condiciones previamente estandarizadas utilizando el kit iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step Kit (Bio-Rad) con la plataforma 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems™) en formato de placa de 96 pozos. La nomenclatura utilizada para la identificación de las muestras se muestra en el Anexo 3.

6.10. Análisis de datos

El análisis estadístico de los datos se realizó conforme al método de 2^{-ddCT} (Livak, & Schmittgen, 2001).

VII. RESULTADOS

7.1. Cultivo primario de cepas y extracción de ADN

Este estudio se centró en dos cepas, AVPG2015 y COJ7, la primera cuenta con un genoma secuenciado y de libre consulta y la segunda se encuentra en procesos de secuenciación, ambas cepas, en un crecimiento de medio líquido muestran diferencias en el máximo de D.O. estudiado con frecuencia por lo cual se decidió estudiar la transcripción de genes de virulencia en estas dos cepas. Las cepas AVPG2015 y COJ7 fueron resembradas y almacenadas en el Laboratorio de MIMOCE, BUAP. De manera rutinaria las cepas fueron cultivadas en gelosa sangre para preparar cultivos líquidos y se conservaron en stock para su almacenamiento a -80°C . A partir de cultivos en líquido se hizo la extracción de ADN de acuerdo con la metodología descrita. EL ADN obtenido tuvo una pureza en el rango de 1.8-2.0 (Tabla 5) sugiriendo una pureza óptima para los experimentos de PCR en punto final para evaluar la eficiencia de los oligonucleótidos.

Tabla 5. *Cuantificación del ADN de las cepas AVPG2015 y COJ7.*

Cepa	Concentración (ng/ μL)	Pureza (A260/280)
COJ7	576.8	1.91
AVPG2015	625.9	1.91

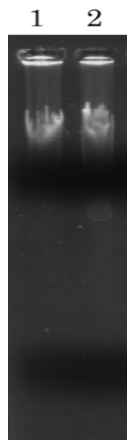


Figura 3. Evaluación de la integridad del ADN extraído de *A. paragallinarum*. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%: carriles 1-AVPG2015, 2-COJ7.

7.2. Análisis bioinformático, diseño y selección de oligonucleótidos

Para estimar los niveles de expresión a nivel de RNAm por RT-qPCR de los genes de virulencia y domésticos (Tabla 1) se realizó un análisis bioinformático con el software Genetix 6.0 obteniéndose 28 pares de oligonucleótidos, un par para los genes *fur*, *16S*, *recN* y *rpoB* y dos juegos para los 12 genes restantes (Tabla 6). Las características de los oligonucleótidos sintetizados corresponden a lo descrito en la metodología (Ver apartado 6.2). En la Figura 4 se observa un gráfico que muestra el promedio de los valores de T_m (Temperatura melting) que fueron obtenidos de todos los oligonucleótidos diseños sintetizados con el objetivo de eficientar el trabajo de laboratorio y realizar corridas con más de un gen por placa.

Tabla 6. *Listado de oligonucleótidos sintetizados.*

No.	Descripción de secuencia	No. Bases	Secuencia	Producto (Pares de bases)
1	avxA-Fw1	20	CATTGACGGCAAGAGGGGAT	147 pb
2	avxA-Rv1	20	AGTTCTCGGCTAAACGCACA	
3	avxA-Fw2	20	AAGTGCGGTGGATTTAGGGG	131 pb
4	avxA-Rv2	20	CATCCCATCACCCGCATAA	
5	cdtA-Fw1	21	ATTCATTCTGCGTGCAATCGT	166 pb
6	cdtA-Rv1	21	CCGTAGGGCATTTTACGAACG	
7	cdtA-Fw2	21	AGTATGGGCTCTTGACCAAAA	151 pb
8	cdtA-Rv2	22	TGCCGCCATACAAGTCTTAGTT	
9	cdtB-Fw1	20	TGATGTGGGAGCCAATCGAG	173 pb
10	cdtB-Rv1	20	CAGTGGAATCTGCTCCTCGG	
11	cdtB-Fw2	20	CAAGCCGAGGAGCAGATTCC	166 pb
12	cdtB-Rv2	20	TGTCTTGCCACACCAGTTTC	
13	cdtC-Fw1	20	GTGCCAGCGTCTGAAACAAC	135 pb
14	cdtC-Rv1	20	AAGAGACCCCGCATCTTTTCG	
15	cdtC-Fw2	19	TGATCCGAAAGATGCGGGG	102 pb
16	cdtC-Rv2	20	CTGCCCGCACTTAAACAGGT	
17	fur-Fw	20	TCGGTTTTTGAAGTGGCCCC	131 pb
18	fur-Rv	21	TTGATGCCGTGTTCTTCGCTA	
19	pepN-Fw1	20	AAGCCACAGCGGTGGATTTA	130 pb
20	pepN-Rv1	20	GGGGTGTGTTTGCAGAACCTG	
21	pepN-Fw2	20	AAGCTTGGCATTTCGAGCG	110 pb
22	pepN-Rv2	20	CGGTTTCTTTTCGGCAAGGTG	
23	16S-Fw	20	CCCTTGGAAGCTACTGACG	100 pb
24	16S-Rv	20	AATCCCAAATCGACAGCGT	
25	atpD-Fw1	20	AAGGCCAATTGGTGCAGAA	175 pb
26	atpD-Rv1	20	GTTTTACCTACACCCGCACC	
27	atpD-Fw2	22	TTGCAAAGGGGGTAAAGTTGG	152 pb
28	atpD-Rv2	21	GAAGTCGTTACCTTCACGGGT	
29	rpoB-Fw	20	GAACACGATGATGCGAACCG	187 pb
30	rpoB-Rv	21	CAACGATACGCGAAGCATCAA	
31	recN-Fw	20	CGAATTTAGGGCAATCCGCC	149 pb
32	recN-Rv	20	ACCGCTGATCCCAACATCAA	
33	gyrA-Fw1	20	GTGAGCGTAACGGCAAAGTG	159 pb
34	gyrA-Rv1	20	CTTCGGCGGTGCGAATTAAG	
35	gyrA-Fw2	20	CTCTAGCCGCGGACGTTTAT	123 pb
36	gyrA-Rv2	20	ATGGCGGTGATACGTTTCGTT	
37	chl2-Fw1	21	TTAGCTGATCCAGCGGGTAAC	154 pb
38	chl2-Rv1	20	CTTTTGGTGCTTTGCCGTGT	
39	chl2-Fw2	20	GCAATGGCACAGCAGGGTAA	147 pb
40	chl2-Rv2	20	TGGGGATTTACGCCAAGAGC	
41	chl1-Fw1	20	ATATACGGGGATCGCGTTGG	170 pb
42	chl1-Rv1	20	TCACCGCACTTTGTTTTGCG	
43	chl1-Fw2	20	TGGTGGGGCATTTGGTATCC	147 pb
44	chl1-Rv2	20	TGCGAAAGAATTTGTGCCGA	
45	ompA-Fw1	21	TACACCAAGCATCGTTCTGT	167 pb
46	ompA-Rv1	25	CGTCTAATACATTTTGTGCTTCTGG	
47	ompA-Fw2	21	TCGGTTCTGTAAGTCTGGTT	157 pb
48	ompA-Rv2	25	CCGTCTAATACATTTTGTGCTTCTG	
49	hntp210-Fw1	20	CACCTTAGCCCAAGATGCGA	157 pb
50	hntp210-Rv1	20	TTAGCCCGCTATCAACCC	
51	hntp210-Fw2	20	GGTGCAGAAAATGCAGAACA	119 pb
52	hntp210-Rv2	20	TTCCCGCAAGAGTAATCGC	
53	fhaB-Fw1	20	TTGCAGCTACCCAACGCTTA	144 pb
54	fhaB-Rv1	20	TGGCATCAAGGGTTTTCCCA	
55	fhaB-Fw2	20	GATACGGCGGCTGAAATCCT	168 pb
56	fhaB-Rv2	20	TAAGCGTTGGGTAGCTGCAA	

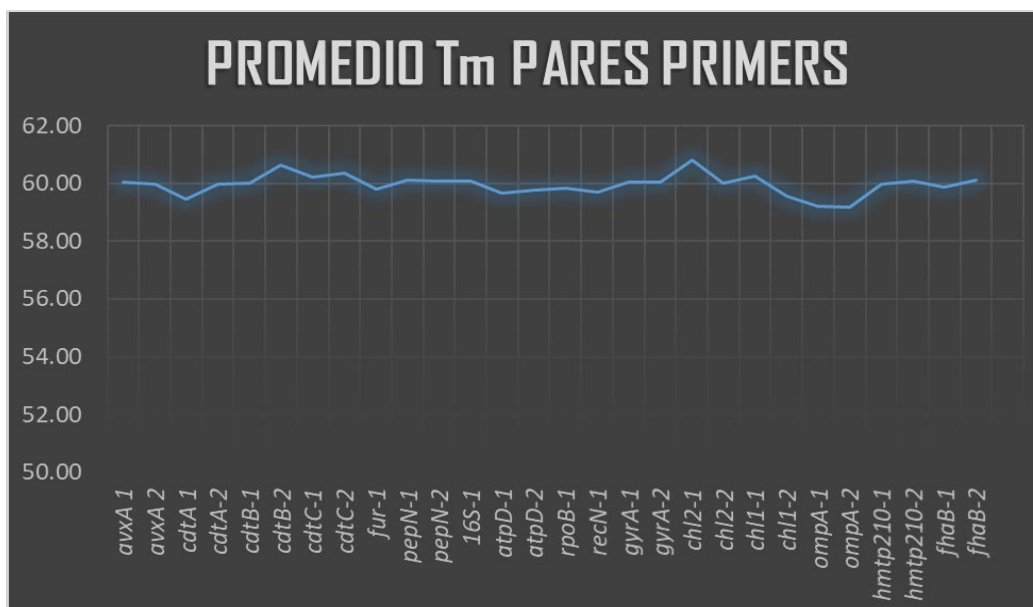


Figura 4. T_m de los pares de oligonucleótidos.

7.3. Valoración del desempeño de los oligonucleótidos

Para evaluar si los oligonucleótidos diseñados producían un solo producto de amplificación en la PCR, se corrieron en experimentos de PCR en punto final usando concentraciones de oligonucleótidos desde 0.8 μM hasta 0.1 μM . La totalidad de los oligonucleótidos enlistados en la Tabla 6 fueron evaluados y el 100% de ellos presentaron amplificaciones específicas (una sola banda) independientemente de la temperatura de alineamiento a la que fueron sometidos (ejemplo Figura 5). De todos los oligonucleótidos diseñados, 24 pares mostraron ausencia de formación de dímeros a la concentración de 0.2 μM (Anexo 4), como se ve en el ejemplo de la Figura 6, a excepción de 4 pares que corresponden a los diseños *16S*, *cdtC2*, *cdtA1* y *ompA1* que se trabajaron a una concentración de 0.1 μM para eliminar la presencia de dímeros (Anexo 5). A partir de este proceso se realizó la selección de diseños de oligonucleótidos, ejemplificado en la Figura 7. El listado final de los oligonucleótidos diseñados que serían utilizados en el presente estudio se encuentra en la Tabla 7.

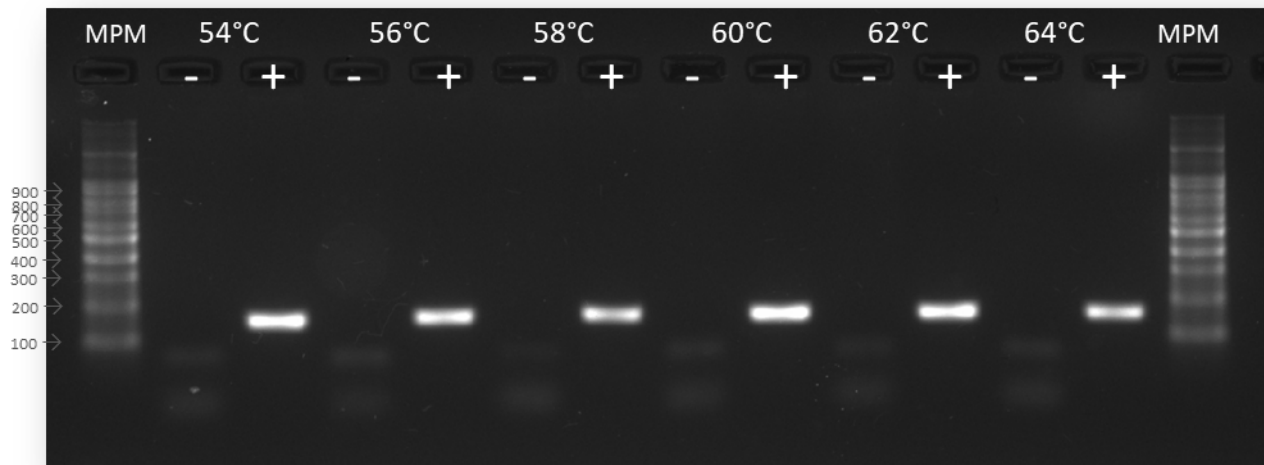


Figura 5. Evaluación de gradiente de temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos de *gyrA* (diseño 1) que amplifica un producto de 159 pb a una concentración de 0.8 μ M. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR GREEN, usando el marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). El signo - se refiere a los carriles que contienen la mezcla de reacción sin ADN en la que se observan los dímeros de oligonucleótidos y el signo + se refieren a los carriles que contienen la reacción completa.

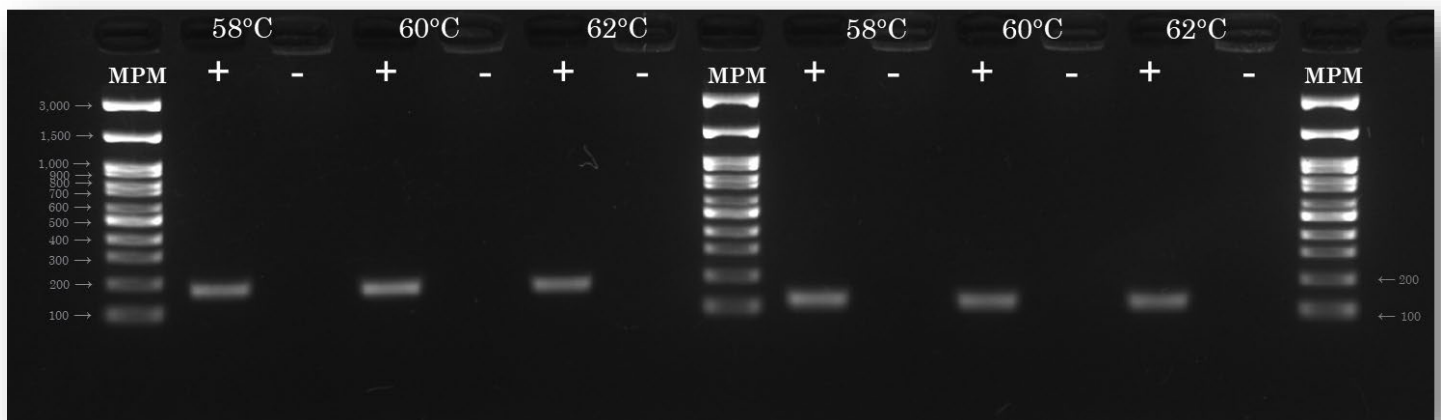


Figura 6. Evaluación de gradiente de temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos *rpoB* y *gyrA* utilizando una concentración de 0.2 μ M. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR GREEN, usando el marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). A la izquierda el gen *rpoB* (diseño único) amplifica un producto de 187 pb. y a la derecha el gen *gyrA* (diseño 2) amplifica un producto de 123 pb. El signo - se refiere a los carriles que contienen la mezcla de reacción sin ADN en la que se observan los dímeros de oligonucleótidos y el signo + se refieren a los carriles que contienen la reacción completa. Para la amplificación de ambos genes se observa la presencia de una sola banda de amplificación y no se observa la presencia de dímeros.

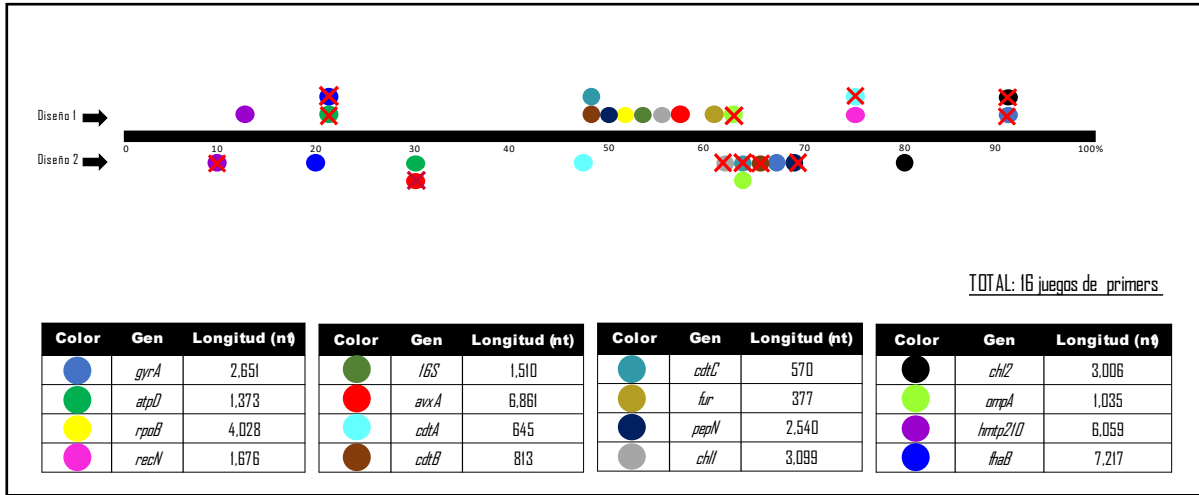


Figura 7. Ubicación de todos los juegos de oligonucleótidos diseñados en el proyecto. La línea negra representa la longitud del gen, los genes estudiados tuvieron un rango de longitud de 377 a 7,217, por lo que la línea representa de 0-100% la longitud del gen. Los puntos de color representan los pares de oligonucleótidos, Los colores representan los genes de los que solo se realizó un diseño (*fur*, *16S*, *rpoB* y *recN*) mientras que de los restantes 12 se hicieron dos. Los taches significan los diseños que se desecharon, de los genes que tenían dos diseños, con base en su ubicación como se explica en el punto 6.2. La tabla contiene la referencia de los colores de los juegos de oligonucleótidos seleccionados para la RT-qPCR (Ver más detalles en la Tabla 7), adicionalmente se indica la longitud de cada gen.

Tabla 7. *Listado de oligonucleótidos seleccionados para el estudio.*

No.	Descripción de secuencia	No. Bases	Secuencia	Producto (pares de bases)
1	<i>avxA-Fw1</i>	20	CATTGACGGCAAGAGGGGAT	147 pb
2	<i>avxA-Rv1</i>	20	AGTTCTCGGCTAAACGCACA	
3	<i>cdtA-Fw2</i>	21	AGTATGGGCTCTTGACCCAAA	151 pb
4	<i>cdtA-Rv2</i>	22	TGCCGCCATACAAGTCTTAGTT	
5	<i>cdtB-Fw1</i>	20	TGATGTGGGAGCCAATCGAG	173 pb
6	<i>cdtB-Rv1</i>	20	CAGTGGAAATCTGCTCCTCGG	
7	<i>cdtC-Fw1</i>	20	GTGCCAGCGTCTGAAACAAC	135 pb
8	<i>cdtC-Rv1</i>	20	AAGAGACCCCGCATCTTTTCG	
9	<i>fur-Fw</i>	20	TCGGTTTTTGAACCTTGCCCC	131 pb
10	<i>fur-Rv</i>	21	TTGATGCCGTGTTCTTCGCTA	
11	<i>pepN-Fw1</i>	20	AAGCCACAGGCGTGGATTTA	130 pb
12	<i>pepN-Rv1</i>	20	GGGGTGTGTTTGCGAAACCTG	
13	<i>16S-Fw</i>	20	CCCTTGGGAAGCTACTGACG	100 pb
14	<i>16S-Rv</i>	20	AATCCCCAAATCGACAGCGT	
15	<i>atpD-Fw2</i>	22	TTGCAAAAGGGGGTAAAGTTGG	152 pb
16	<i>atpD-Rv2</i>	21	GAAGTCGTTACCTTCACGGGT	
17	<i>rpoB-Fw</i>	20	GAACACGATGATGCGAACCG	187 pb
18	<i>rpoB-Rv</i>	21	CAACGATACGCGAAGCATCAA	
19	<i>recN-Fw</i>	20	CGAATTTAGGGCAATCCGCC	149 pb
20	<i>recN-Rv</i>	20	ACCGCTGATCCCAACATCAA	
21	<i>gyrA-Fw2</i>	20	CTCTAGCCGCGGACGTTTAT	123 pb
22	<i>gyrA-Rv2</i>	20	ATGGCGGTGATACGTTTCGTT	
23	<i>chl2-Fw2</i>	20	GCAATGGCACAGCAGGGTAA	147 pb
24	<i>chl2-Rv2</i>	20	TGGGGATTTACGCCAAGAGC	
25	<i>chl1-Fw1</i>	20	ATATACGGGGATCGCGTTGG	170 pb
26	<i>chl1-Rv1</i>	20	TCACCGCACTTTGTTTTGCG	
27	<i>ompA-Fw2</i>	21	TCGGTTCTGTAAGTCTGGTT	157 pb
28	<i>ompA-Rv2</i>	25	CCGTCTAATACATTTTGTGCTTCTG	
29	<i>hmt210-Fw1</i>	20	CACCTTAGCCCAAGATGCGA	157 pb
30	<i>hmt210-Rv1</i>	20	TTTAGCCCCGCTATCAACCC	
31	<i>fhaB-Fw2</i>	20	GATACGGCGGCTGAAATCCT	168 pb
32	<i>fhaB-Rv2</i>	20	TAAGCGTTGGGTAGCTGCAA	

7.4. Extracción de RNA y tratamiento con DNasas

Para poder realizar la cuantificación de RNAm de los genes de virulencia en experimentos de RT-qPCR, se crecieron las cepas COJ7 y AVPG2015 de *A. paragallinarum* de las cuales se extrajo el RNA a los que se realizó una cuantificación mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) (Tablas 8 y 9) donde se obtuvieron los rangos de concentración entre 12.20 - 463.30 ng/ μ L y los valores de la relación de absorbancias A260/280 entre 2.10-2.26 por lo que los consideramos suficientes para continuar con el trabajo. Adicionalmente, se revisó la presencia e integridad del material genético obtenido mediante electroforesis no desnaturizante en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR GREEN (Ver los detalles en el apartado 6.4 de Metodología) (Figuras 8, 9 y 10 y 11) dado que la electroforesis es no desnaturizante en algunos casos se llega a observar más la presencia de las posibles bandas de los RNAr 16S y 23S, pero en los casos en los que no se observan no es indicativo de degradación. En las figuras referidas 8-11, se puede observar en la parte de arriba presencia de ADN por lo que se eliminó ese material genético con DNasas. Los resultados de este tratamiento se muestran en las Tablas 10 y 11 en las que se observa una reducción de hasta 5 veces los valores de concentración comparado con lo mostrado en las Tablas 8 y 9. Para evitar degradación del material genético ya no se realizó visualización electroforética del RNA posteriormente al tratamiento con DNasas. Las muestras se guardaron a -70°C hasta su uso en la RT-qPCR. Con la finalidad de validar que las muestras hayan quedado libres de DNA, se realizó una corrida de RT-qPCR donde se seleccionó una muestra de cada tratamiento y de ambas cepas (total 16 muestras), éstas se sometieron a análisis mediante una mezcla *con* retrotranscriptasa inversa y otra *sin* retrotranscriptasa inversa. El resultado fue satisfactorio ya que las muestras que no contenían retrotranscriptasa inversa no amplificaron, comprobando así la inexistencia de DNA en las muestras analizadas (Anexo 11).

Tabla 8. Resultados de la cuantificación del RNA obtenido¹ del cultivo de la cepa COJ7 en diferentes estados de desarrollo y condiciones nutricionales.

Fase Exponencial			Fase Estacionaria		
ID	[ng/uL]	A260/280	ID	[ng/uL]	A260/280
1EX7	434.70	2.20	1ES7	300.40	2.18
1EX7	399.20	2.20	1ES7	371.20	2.19
2EX7	424.90	2.19	2ES7	419.70	2.20
2EX7	331.90	2.19	2ES7	292.60	2.19
3EX7	322.50	2.18	3ES7	275.50	2.18
3EX7	64.10	2.12	3ES7	310.10	2.19
H1EX7	12.20	2.26	H1ES7	429.80	2.10
H1EX7	187.90	2.13	H1ES7	386.60	2.19
H2EX7	189.60	2.14	H2ES7	300.40	2.19
H2EX7	264.40	2.15	H2ES7	279.80	2.16
H3EX7	330.60	2.18	H3ES7	360.10	2.19
H3EX7	285.00	2.16	H3ES7	340.40	2.18
D1EX7	312.10	2.18	D1ES7	348.90	2.18
D1EX7	360.80	2.19	D1ES7	346.90	2.19
D2EX7	91.90	2.18	D2ES7	350.20	2.19
D2EX7	330.10	2.19	D2ES7	349.90	2.18
D3EX7	323.50	2.18	D3ES7	370.90	2.18
D3EX7	277.20	2.19	D3ES7	366.60	2.19
C1EX7	347.40	2.19	C1ES7	295.70	2.19
C1EX7	278.60	2.18	C1ES7	258.50	2.15
C2EX7	324.50	2.18	C2ES7	218.30	2.19
C2EX7	338.90	2.20	C2ES7	266.00	2.16
C3EX7	191.00	2.16	C3ES7	242.30	2.13
C3EX7	406.30	2.19	C3ES7	463.30	2.19

NOTA: 1-3 BHI, H1-H3: Suplementado con FeCl₃, D1-D3: Deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, C1-C3: Suplementado con sulfato de condroitina. EX: Exponencial, ES: Estacionaria, 7: Cepa COJ7.
¹Se procesaron duplicados de los triplicados de RNA obtenido (ver punto 6.4).

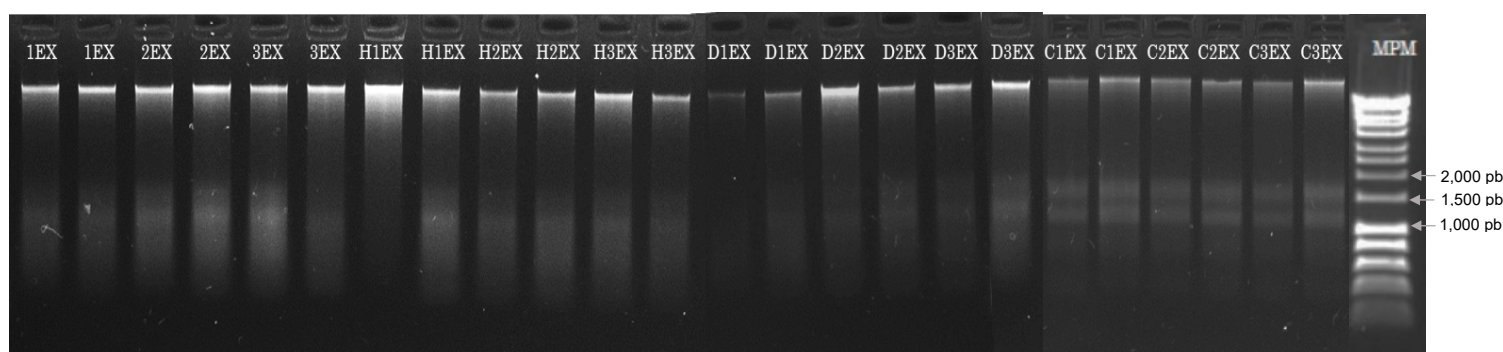


Figura 8. Imagen de electroforesis del RNA obtenido del cultivo de la cepa COJ7 en fase exponencial. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR GREEN, usando el marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen). La nomenclatura de los carriles está basada en estas combinaciones:1-3: BHI; H1-3: Suplementado con FeCl₃; C1-3: Suplementado con sulfato de condroitina; D1-3: Deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl; EX: Fase Exponencial.



Figura 9. Imagen de electroforesis del RNA obtenido del cultivo de la cepa COJ7 en fase estacionaria. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR GREEN, usando el marcador de peso molecular de 1 kb pb (Invitrogen). La nomenclatura de los carriles está basada en estas combinaciones: 1-3: BHI; H1-3: Suplementado con FeCl₃; C1-3: Suplementado con sulfato de condroitina; D1-3: Deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl; ES: Fase Estacionaria.

Tabla 9. Resultados de la cuantificación del RNA obtenido del cultivo de la cepa AVPG2015 en diferentes estados de desarrollo y condiciones nutricionales.

Fase Exponencial			Fase Estacionaria		
ID	[ng/uL]	A260/280	ID	[ng/uL]	A260/280
1EX15	434.70	2.20	1ES15	300.40	2.18
1EX15	399.20	2.20	1ES15	371.20	2.19
2EX15	424.90	2.19	2ES15	419.70	2.20
2EX15	331.90	2.19	2ES15	292.60	2.19
3EX15	322.50	2.18	3ES15	275.50	2.18
3EX15	64.10	2.12	3ES15	310.10	2.19
H1EX15	12.20	2.26	H1ES15	429.80	2.10
H1EX15	187.90	2.13	H1ES15	386.60	2.19
H2EX15	189.60	2.14	H2ES15	300.40	2.19
H2EX15	264.40	2.15	H2ES15	279.80	2.16
H3EX15	330.60	2.18	H3ES15	360.10	2.19
H3EX15	285.00	2.16	H3ES15	340.40	2.18
D1EX15	312.10	2.18	D1ES15	348.90	2.18
D1EX15	360.80	2.19	D1ES15	346.90	2.19
D2EX15	91.90	2.18	D2ES15	350.20	2.19
D2EX15	330.10	2.19	D2ES15	349.90	2.18
D3EX15	323.50	2.18	D3ES15	370.90	2.18
D3EX15	277.20	2.19	D3ES15	366.60	2.19
C1EX15	347.40	2.19	C1ES15	295.70	2.19
C1EX15	278.60	2.18	C1ES15	258.50	2.15
C2EX15	324.50	2.18	C2ES15	218.30	2.19
C2EX15	338.90	2.20	C2ES15	266.00	2.16
C3EX15	191.00	2.16	C3ES15	242.30	2.13
C3EX15	406.30	2.19	C3ES15	463.30	2.19

NOTA: 1-3 BHI, H1-H3: Suplementado con FeCl₃, D1-D3: Deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, C1-C3: Suplementado con sulfato de condroitina. EX: Exponencial, ES: Estacionaria, 15: Cepa AVPG2015.

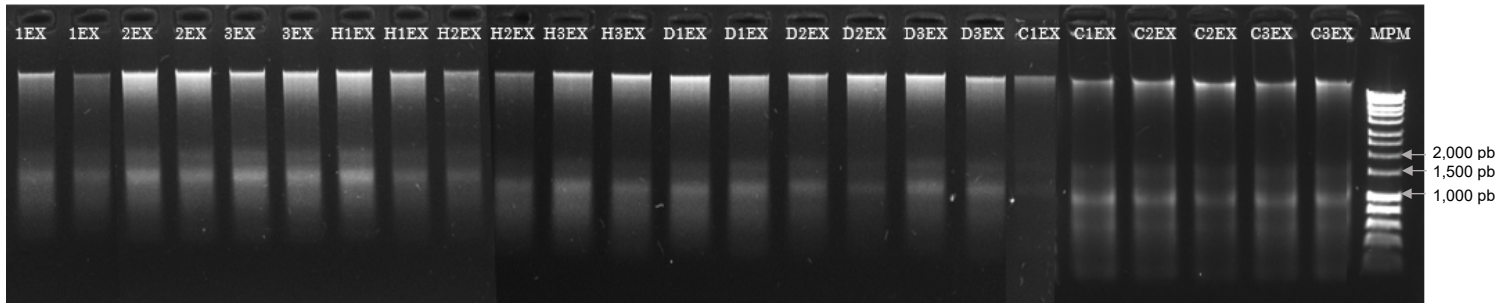


Figura 10. Imagen de electroforesis del RNA obtenido del cultivo de la cepa 2015 en fase exponencial. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR GREEN, usando el marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen). La nomenclatura de los carriles está basada en estas combinaciones:1-3: BHI; H1-3: Suplementado con FeCl_3 ; C1-3: Suplementado con sulfato de condroitina; D1-3: Deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl; EX: Fase Exponencial.

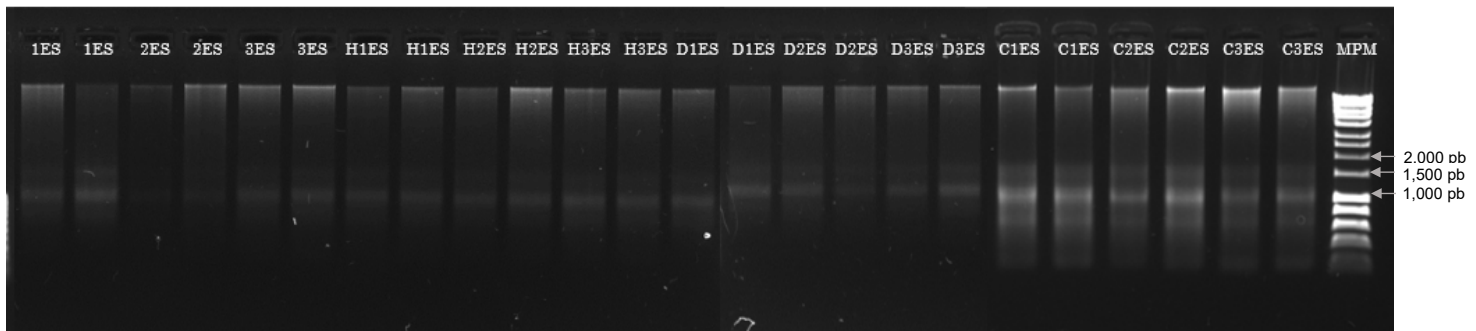


Figura 11. Imagen de electroforesis del RNA obtenido del cultivo de la cepa 2015 en fase exponencial. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR GREEN, usando el marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen). La nomenclatura de los carriles está basada en estas combinaciones:1-3: BHI; H1-3: Suplementado con FeCl_3 ; C1-3: Suplementado con sulfato de condroitina; D1-3: Deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl; EX: Fase Exponencial.

Tabla 10. Resultados de la cuantificación del RNA obtenido después del tratamiento con DNasas del cultivo de la cepa COJ7.

Fase Exponencial			Fase Estacionaria		
ID	[ng/uL]	A260/280	ID	[ng/uL]	A260/280
1EX7	80.00	2.103	1ES7	84.00	1.909
2EX7	80.00	2.105	2ES7	74.00	2.056
3EX7	90.00	2.050	3ES7	78.00	2.053
H1EX7	54.00	2.077	H1ES7	76.00	2.000
H2EX7	90.00	2.046	H2ES7	76.00	2.000
H3EX7	82.00	2.050	H3ES7	74.00	1.947
D1EX7	76.00	2.111	D1ES7	80.00	2.105
D2EX7	88.00	2.095	D2ES7	82.00	2.158
D3EX7	82.00	2.050	D3ES7	88.00	2.095
C1EX7	84.00	2.100	C1ES7	84.00	2.211
C2EX7	72.00	2.118	C2ES7	86.00	2.048
C3EX7	84.00	2.100	C3ES7	80.00	2.105

NOTA: 1-3 BHI, H1-H3: Suplementado con FeCl₃, D1-D3: Deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, C1-C3: Suplementado con sulfato de condroitina. EX: Exponencial, ES: Estacionaria, 7: Cepa COJ7.

Tabla 11. Resultados de la cuantificación del RNA obtenido después del tratamiento con DNasas del cultivo de la cepa AVPG2015.

Fase Exponencial			Fase Estacionaria		
ID	[ng/uL]	A260/280	ID	[ng/uL]	A260/280
1EX15	80.00	2.103	1ES15	84.00	1.909
2EX15	80.00	2.105	2ES15	74.00	2.056
3EX15	90.00	2.050	3ES15	78.00	2.053
H1EX15	54.00	2.077	H1ES15	76.00	2.000
H2EX15	90.00	2.046	H2ES15	76.00	2.000
H3EX15	82.00	2.050	H3ES15	74.00	1.947
D1EX15	76.00	2.111	D1ES15	80.00	2.105
D2EX15	88.00	2.095	D2ES15	82.00	2.158
D3EX15	82.00	2.050	D3ES15	88.00	2.095
C1EX15	84.00	2.100	C1ES15	84.00	2.211
C2EX15	72.00	2.118	C2ES15	86.00	2.048
C3EX15	84.00	2.100	C3ES15	80.00	2.105

NOTA: 1-3 BHI, H1-H3: Suplementado con FeCl₃, D1-D3: Deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, C1-C3: Suplementado con sulfato de condroitina. EX: Exponencial, ES: Estacionaria, 15: Cepa AVPG2015.

7.5. Estandarización de RT-qPCR

Para el proceso de estandarización de la RT-PCR en tiempo real, los oligonucleótidos amplificaron correctamente a las concentraciones de 100, 200 y 300 nM que fueron las concentraciones evaluadas. Se determinó trabajar en una concentración de 100 nM para garantizar una mayor sensibilidad de la prueba con el mínimo de concentración de oligonucleótidos Figura 12 Conforme a lo anteriormente observado en la estandarización de la PCR convencional, todos los diseños de oligonucleótidos amplificaron correctamente a la temperatura de alineamiento de 60°C en la plataforma en tiempo real y no se observó formación de dímeros a las concentraciones evaluadas, según lo observado en el análisis de la curva de disociación (Melting) arrojada por el equipo de todas las corridas (Ejemplo: Figura 13). Las concentraciones y condiciones quedaron de la manera en que se describe en las Tablas 12 y 13.

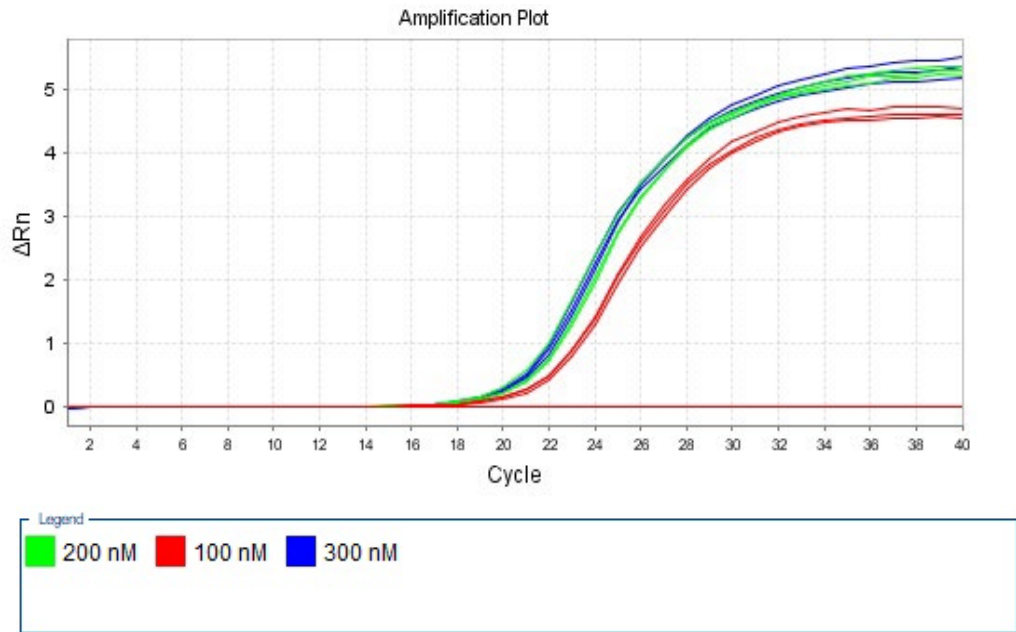


Figura 12. Prueba de concentración de oligonucleótidos. El gen utilizado fue *gyrA* y el RNA utilizado fue 1EX7. El control negativo es la línea roja sin amplificación (paralela al eje de las x).

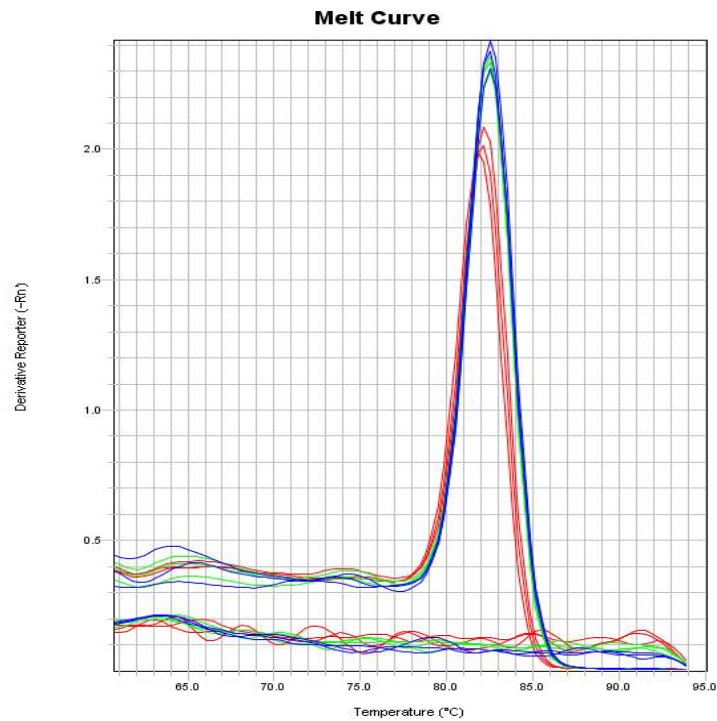


Figura 13. Análisis de Curva de disociación (Melting). El gen utilizado fue *gyrA* a distintas concentraciones. Todas las pruebas fueron realizadas a una temperatura de alineamiento de 60°C.

Tabla 12. Concentraciones estandarizadas de la RT-qPCR.

REACTIVOS	Vol/rx (µL)	Conc. Final
iTaq universal SYBR® Green reaction mix (2x)	5 µL	1x
iScript reverse transcriptase	0.125 µL	1x
Oligonucleótido Fw	0.1	100 nM
Oligonucleótido Rv	0.1	100 nM
RNA	1	50 ng
Nuclease-free H2O	3.675	-----
Total reaction mix volume	10 µL	-----

Tabla 13. Condiciones estandarizadas de la RT-qPCR.

CICLO	T (°C)	TIEMPO
Retrotranscripción	50	10 min
Activación polimerasa y Desnaturalización cDNA	95	1 min
Desnaturalización	95	15s
Amplificación/ Extensión (x40)	60	30s
Melt-curve analysis		

7.6. Elección del normalizador

Los resultados de las pruebas de PCR de los genes *rpoB*, *gyrA*, *recN*, y *atpD*, amplificaron en todos los tratamientos (BHI, H, D y C) en las fases exponencial como estacionaria de ambas cepas. El gen 16S demostró valores fuera de rango (Figura 14) por lo que se decidió eliminarlo de la evaluación. En la Figura 15 podemos observar un ejemplo de las curvas de amplificación obtenidas, el resto de las curvas de amplificación se encuentran en el Anexo 6. Los valores de CT de los grupos de muestras (EX7, ES7, EX15 y ES15) fueron analizados mediante NormFinder encontrando los resultados en la Tabla 14. En el grupo de muestras EX7 se obtuvo que el gen con el menor valor de estabilidad (SV) fue *gyrA*, considerando el valor obtenido a partir de la mejor combinación de genes, sin embargo, el valor del conjunto de dos genes es mayor al valor demostrado con la presencia de un solo gen. Para el caso del grupo de muestras ES7, el mejor resultado se obtuvo con la combinación de los genes *atpD* – *recN* observándose un SV más bajo comparado con *recN* de forma individual. Para el caso de EX15 el menor valor de SV fue para el gen *rpoB* de forma individual. Por último, el grupo de muestras ES15 demostró exactamente el mismo resultado ya sea con el gen *gyrA* de forma individual, así como con la combinación de dos genes *atpD* y *gyrA* por lo que el uso de cualquiera de los dos resultados podría haber sido utilizado.

Derivado de un análisis observacional de los valores de CT obtenidos del grupo de genes *rpoB*, *gyrA*, *recN*, y *atpD*, se encontró que los valores de CT del gen *recN* se presentaron mayormente después del ciclo 35 de amplificación, lo cual podría

derivar en un análisis de expresión sesgado. Por lo anterior, se realizó nuevamente el análisis con NormFinder, excluyendo el gen *recN*, obteniendo los resultados descritos en la [Tabla 15](#). Los valores de SV fueron menores en todos los casos, comparados con los obtenidos con el gen *recN* involucrado, y en el caso del grupo de muestras ES7 la combinación de dos genes presentó un valor de SV más alto que con la presencia de un solo gen (*atpD*), siendo el SV obtenido (0.516) aún más bajo que el obtenido con la inclusión del gen *recN* en el análisis anterior (*recN* - 0.773). Se graficaron los resultados de la variación intergrupo e intragrupo de los resultados obtenidos en ambos análisis realizados, en el Anexo 7 se pueden observar los gráficos obtenidos. Para el análisis de los resultados por medio de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ se utilizaron los resultados obtenidos en la Tabla 15, donde, para el grupo de muestras de la Fase Exponencial de la cepa COJ7 se utilizó el gen *rpoB*, para la Fase Estacionaria de la cepa COJ7 se utilizó el gen *atpD* y para la Fase Exponencial y Estacionaria de la cepa 2015 se utilizó también el gen *atpD* como normalizadores.

Tabla 14. Resultados de evaluación por NormFinder para la selección de normalizadores.

Grupo de muestras	Gene	SV*	Combinación de 2 genes	SV
EX7	<i>gyrA</i>	0.217	<i>gyrA</i> - <i>rpoB</i>	0.346
ES7	<i>recN</i>	0.773	<i>atpD</i> - <i>recN</i>	0.452
EX15	<i>rpoB</i>	0.177	<i>rpoB</i> - <i>atpD</i>	0.285
ES15	<i>gyrA</i>	0.299	<i>atpD</i> - <i>gyrA</i>	0.299

*Stability value.

Tabla 15. Resultados de evaluación por NormFinder para la selección de normalizadores excluyendo *recN*.

Grupo de muestras	Gene	SV*	Combinación de 2 genes	SV
EX7	<i>rpoB</i>	0.169	<i>gyrA</i> - <i>atpD</i>	0.116
ES7	<i>atpD</i>	0.516	<i>atpD</i> - <i>rpoB</i>	0.709
EX15	<i>atpD</i>	0.199	<i>atpD</i> - <i>rpoB</i>	0.158
ES15	<i>atpD</i>	0.359	<i>atpD</i> - <i>rpoB</i>	0.309

*Stability value.

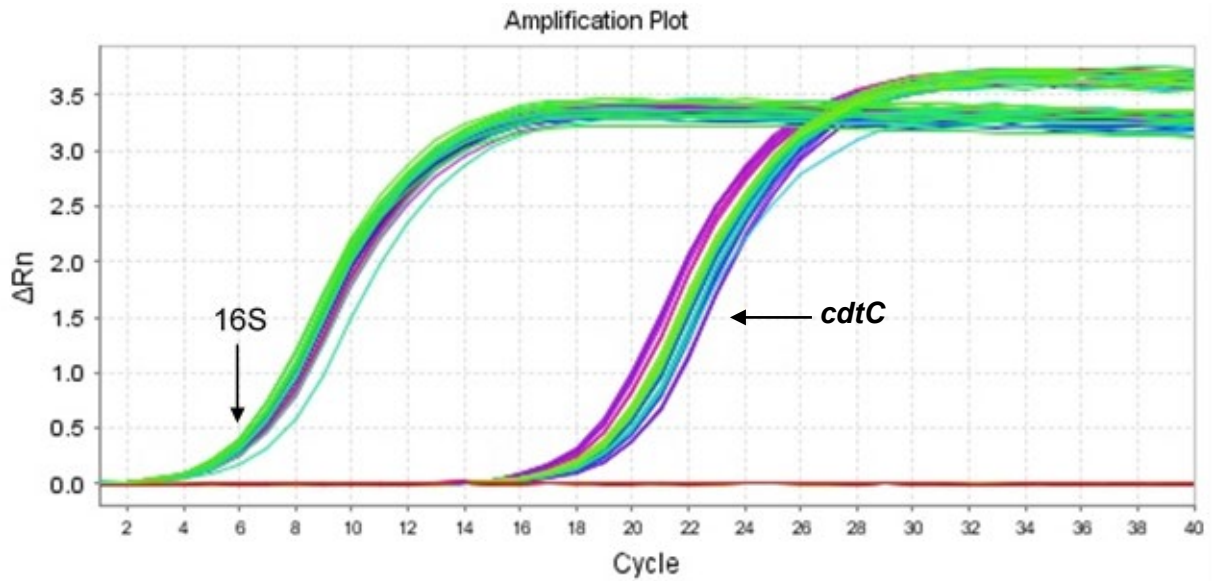


Figura 14. Evaluación del gen *16S* como normalizador. Los valores de CT arrojados fueron en total de 6.73 lo que determina valores fuera de rango para un gen normalizador.

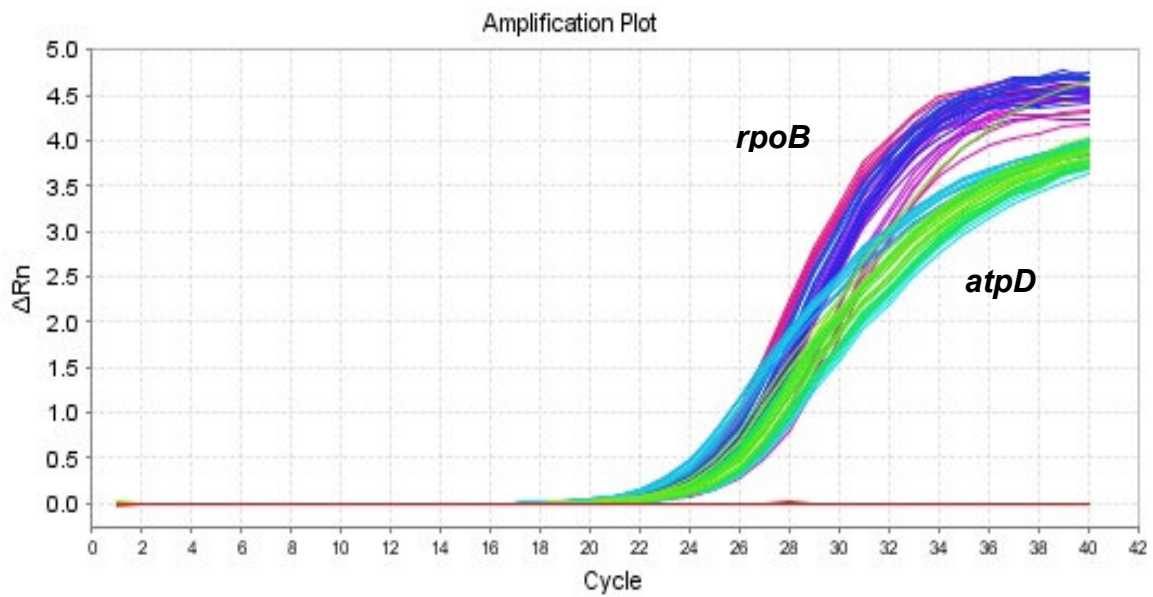


Figura 15. Curva de amplificación de los genes *rpoB* y *atpD* para el grupo de muestras EX7 en los cuatro tratamientos. El CT promedio para *rpoB* fue de 26.23 ± 0.71 y de *atpD* 25.51 ± 0.88 .

7.7. Validación del Rango dinámico

El resultado de la Validación del Rango Dinámico fue satisfactorio ya que demuestra que el comportamiento de ambas curvas es muy parecido con lo que se interpreta que la eficiencia de la RT es constante en todas las concentraciones iniciales de ARN (138 hasta 8.625 ng/uL). Sabemos esto porque todos los puntos de dilución caen en línea recta, como lo indica el coeficiente de correlación ($R^2 = 0,99$ en este caso). Por lo tanto, se presume que podría usarse cualquier cantidad inicial de ARN en la RT dentro del rango probado (Figura 16).

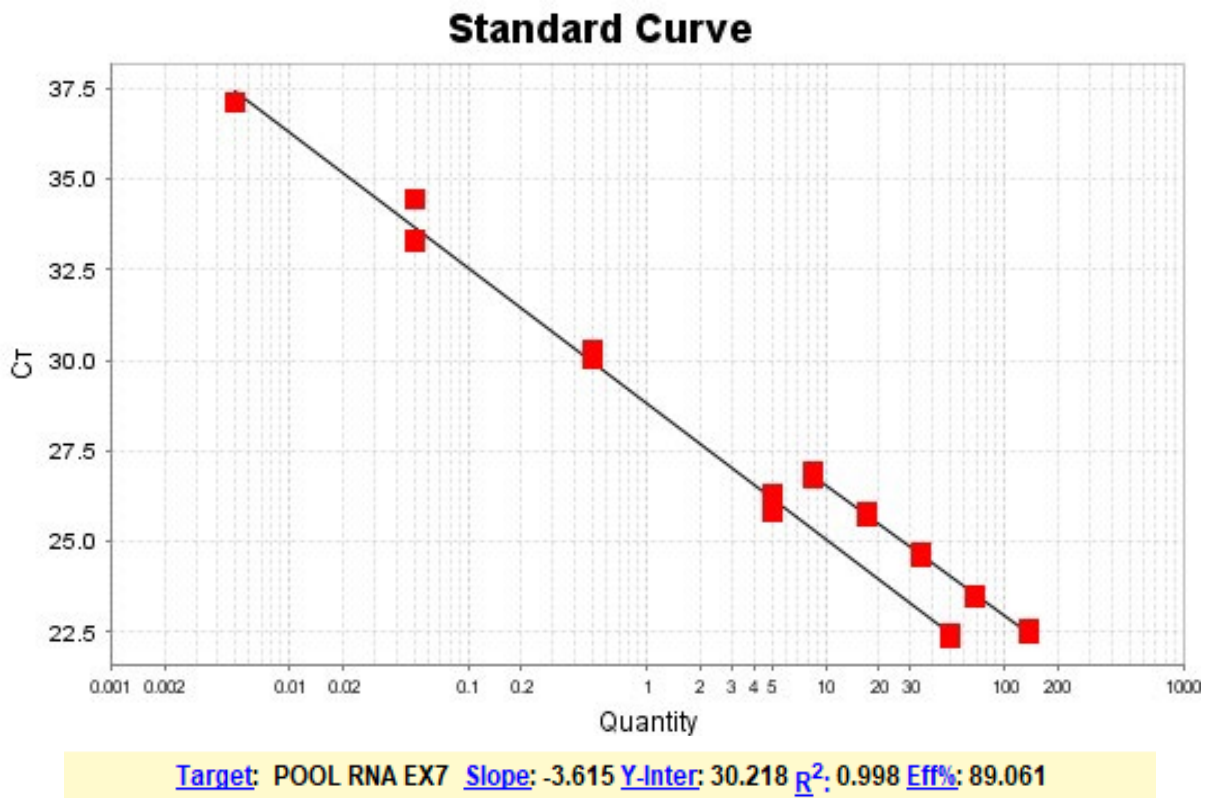


Figura 16. Curva estándar de evaluación del Rango Dinámico de la RT. La línea larga pertenece a la curva estándar del normalizador utilizado (*rpoB*) y la línea corta pertenece a la curva estándar del pool de RNA de EX7 sin diluir, conteniendo una concentración inicial de 138 ng/uL.

7.8. Validación de la eficiencia de amplificación

La pendiente (slope) de una curva estándar se usa comúnmente para estimar la eficiencia de amplificación por PCR de una reacción de PCR en tiempo real. Una eficiencia de PCR del 100% corresponde a una pendiente de -3.32 , determinada por la siguiente ecuación: $\text{Eficiencia} = 10^{(-1 / \text{slope})} - 1$. Una buena reacción debe tener una eficiencia entre el 90% y el 110%, lo que corresponde a una pendiente de

entre -3.58 y -3.10 . El valor de Coeficiente de correlación (R^2) refleja la linealidad de la curva estándar, donde idealmente, $R^2 = 1$, aunque generalmente, $0,999$ es el valor máximo. Y-intercept corresponde al límite teórico de detección de la reacción, o el valor de Ct esperado si el número más bajo de copias de moléculas diana indicadas en el eje x da lugar a una amplificación estadísticamente significativa por lo que denota el valor o medida de sensibilidad de la prueba. Para que el método de Ct comparativo de cuantificación relativa sea válido, la eficiencia de la amplificación del objetivo y la eficiencia de la amplificación de normalizadores deben ser aproximadamente iguales. Las eficiencias deficientes de la PCR pueden dar como resultado una precisión de réplica de muestra deficiente (réplicas técnicas y réplicas biológicas) y, como consecuencia, puede dar como resultado una cuantificación deficiente. Los valores obtenidos de la curva estándar realizada utilizando el gen *gyrA* fue de slope de -3.204 , con un porcentaje de eficiencia de 105.187% , una y-intercept de 29.746 y un R^2 de 0.977 (Figura 17). Estos valores se consideran resultados satisfactorios de la evaluación de la eficiencia de la amplificación. Por razones de tiempo y de material genético limitado, ya no se realizaron las curvas estándar de los demás juegos de oligonucleótidos seleccionados, sin embargo, considerando que todos los juegos de oligonucleótidos fueron muy similares en diseño, los valores del performance en la PCR obtenidos en la curva estándar desarrollada pudieran considerarse como representativos.

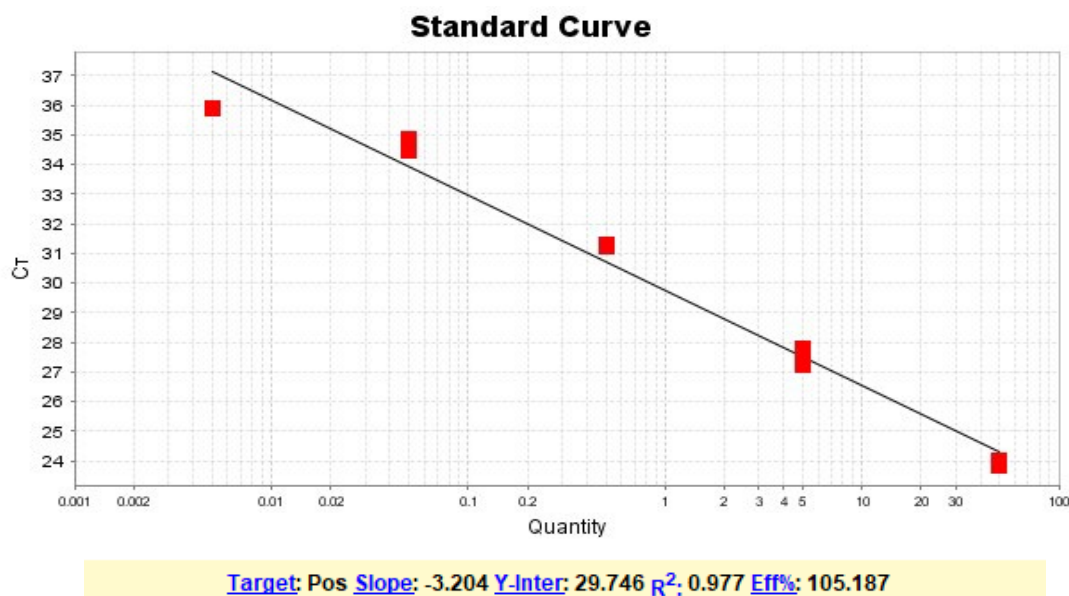


Figura 17. Curva estándar de validación de la eficiencia de amplificación. El gen utilizado fue *gyrA*. La concentración inicial del estándar fue de 50 ng/uL .

7.9. Resultado de las corridas de los genes target

La totalidad de las muestras amplificaron satisfactoriamente, tanto sus réplicas técnicas como biológicas. Se procesaron dos juegos de oligonucleótidos por cada corrida y todos los pares de oligonucleótidos amplificaron sin la presencia de dímeros en el 100% de las corridas. Asimismo, en cada una de las corridas se procesaron los controles: Negativo de amplificación (CNA), Negativo de Tratamiento de DNAsas (CNTx) y Negativo de extracción de RNA (CNE) para cada juego de oligonucleótidos analizado, resultando satisfactorio en todos los casos. El manejo de RNA bacteriano exige condiciones de trabajo controladas donde el RNA sea debidamente preservado, trabajando de la manera más rápida y precisa posible, condición que se cumplió en todo momento. Todas las muestras preparadas fueron descongeladas una sola ocasión directamente para su procesamiento. Se seleccionaron 26 corridas en las cuales se evaluaron la totalidad de las muestras para los 11 genes de virulencia seleccionados. En total, exclusivamente para la evaluación de los genes objetivo, se procesaron un total de 2,496 reacciones de RT-qPCR. Los resultados obtenidos por el software fueron en valores de CT. En la Figura 18 se observa un ejemplo de los resultados obtenidos en la interfaz del software. Otros ejemplos se encuentran en el Anexo 8.

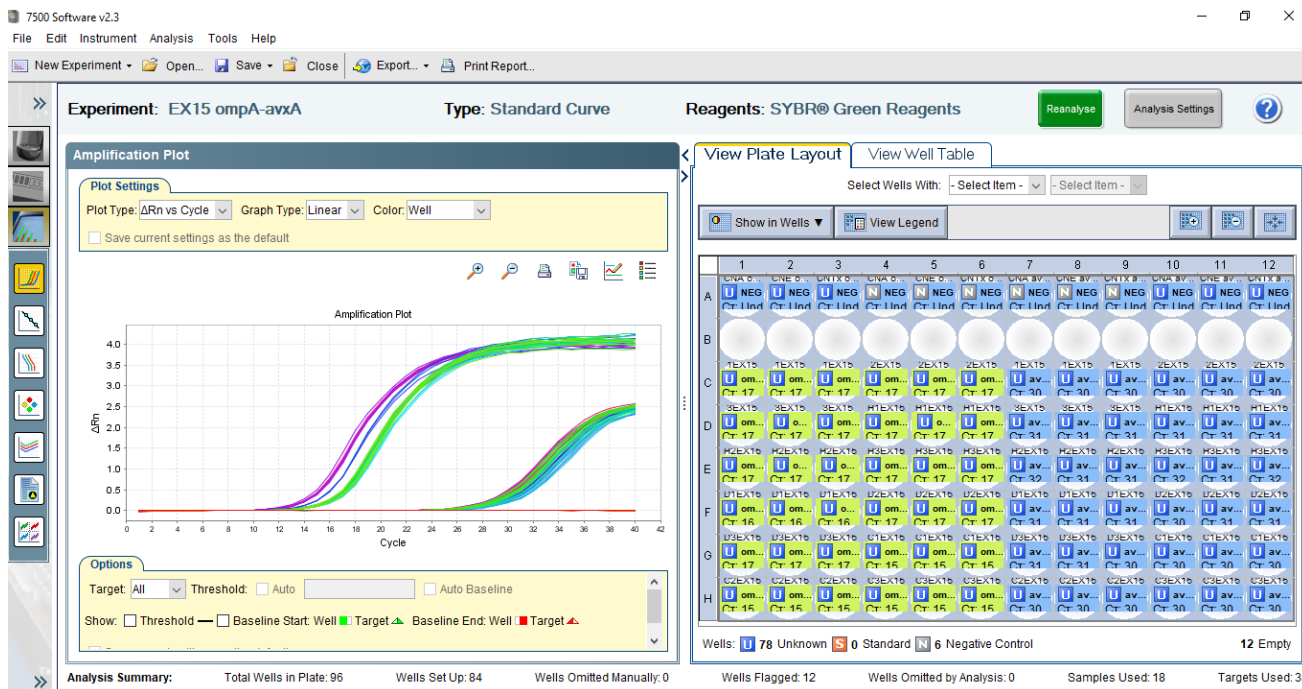


Figura 18. Ejemplo de resultados obtenidos de las corridas. En este caso, se presenta el resultado de las muestras EX15, genes analizados: *ompA* y *avxA*. El primer grupo de muestras que amplifican pertenecen a *ompA* mientras que el segundo grupo de muestras son las muestras que amplifican para el gen *avxA*. Las líneas rojas basales representan los controles negativos los cuales no presentan amplificación y por lo tanto se considera una corrida válida. La disposición de las muestras dentro de la placa se encuentra en la región derecha de la imagen.

7.10. Análisis de resultados mediante $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Los resultados del análisis de los datos mediante $2^{-\Delta\Delta Ct}$ se realizaron mediante la comparación de cada gen contra el gen normalizador previamente seleccionado por cada grupo de muestras presentado en la Tabla 15 utilizando un solo gen normalizador. Los resultados se presentan en niveles de veces de cambio de expresión genética (fold change expression) comparado contra las cuatro distintas condiciones en cada gen, a saber, el cultivo control realizado con caldo BHI, H: condición suplementada con $FeCl_3$, D: condición deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, y SC: condición suplementada con sulfato de condroitina. Las barras de error representan los valores de desviación estándar (SD).

7.10.1. Expresión de los genes en fase exponencial y estacionaria de la cepa COJ7 de *A. paragallinarum*

Dentro de los resultados obtenidos de los genes evaluados de la fase exponencial y estacionaria de la cepa COJ7 se observó que, el gen *avxA* en fase exponencial, se expresó de manera similar al control en los tratamientos con condición suplementada con $FeCl_3$ y condición deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, pero en presencia de la condición con sulfato de condroitina adicionado la expresión fue menor que el control y los demás tratamientos. Por otra parte, en la fase estacionaria, la expresión de *avxA* fue menor en todos los tratamientos con respecto al control (Figura 19).

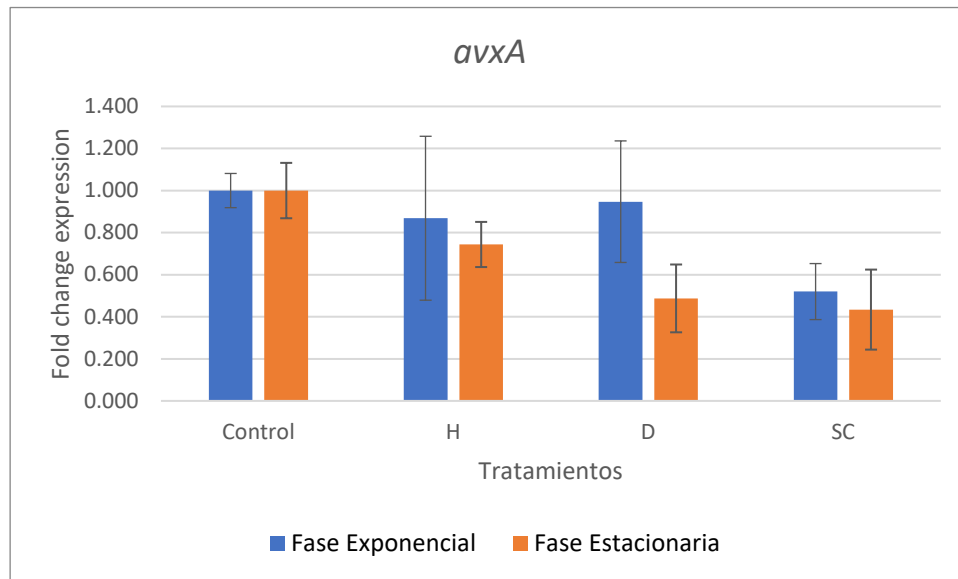


Figura 19. Cambios en la expresión del gen *avxA* en *A. paragallinarum* cepa COJ7 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con $FeCl_3$, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

Para el caso de ***cdtA*** el mayor nivel de expresión comparado con el control se presentó en la fase estacionaria en presencia de la condición deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl (Figura 20). Para el gen ***cdtB***, el nivel de expresión fue más alto en el tratamiento con la condición deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl y la expresión fue muy similar en ambas fases de crecimiento bacteriano. Por otra parte, se observó una disminución de la expresión con la condición suplementada con sulfato de condroitina en ambas fases de crecimiento (Figura 21). Finalmente, para el gen ***cdtC*** los mayores niveles de expresión se presentaron en la fase exponencial con la condición deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl y en la condición suplementada con sulfato de condroitina en la fase estacionaria se observó una disminución en la expresión con respecto al control (Figura 22). Todo lo anterior puede observarse con mayor facilidad en la Figura 23, donde en general, la expresión más alta fue con la condición deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl incluyendo los tres genes que conforman el operón y en las dos fases de crecimiento. Por el contrario, la menor expresión con respecto al control se observó en la condición suplementada con sulfato de condroitina tanto en los tres genes como en los tres tratamientos sometidos.

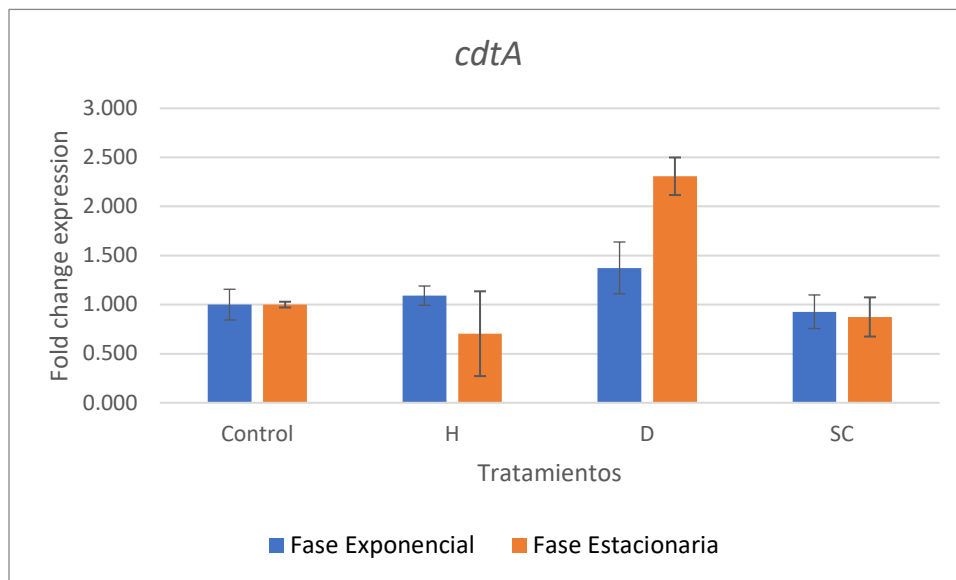


Figura 20. Cambios en la expresión del gen *cdtA* en *A. paragallinarum* cepa COJ7 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

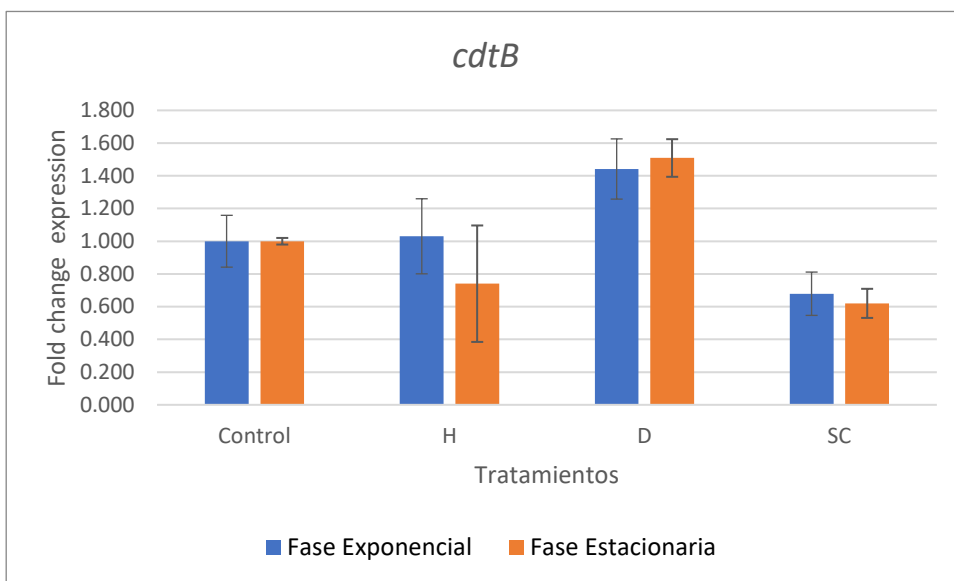


Figura 21. Cambios en la expresión del gen *cdtB* en *A. paragallinarum* cepa COJ7 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

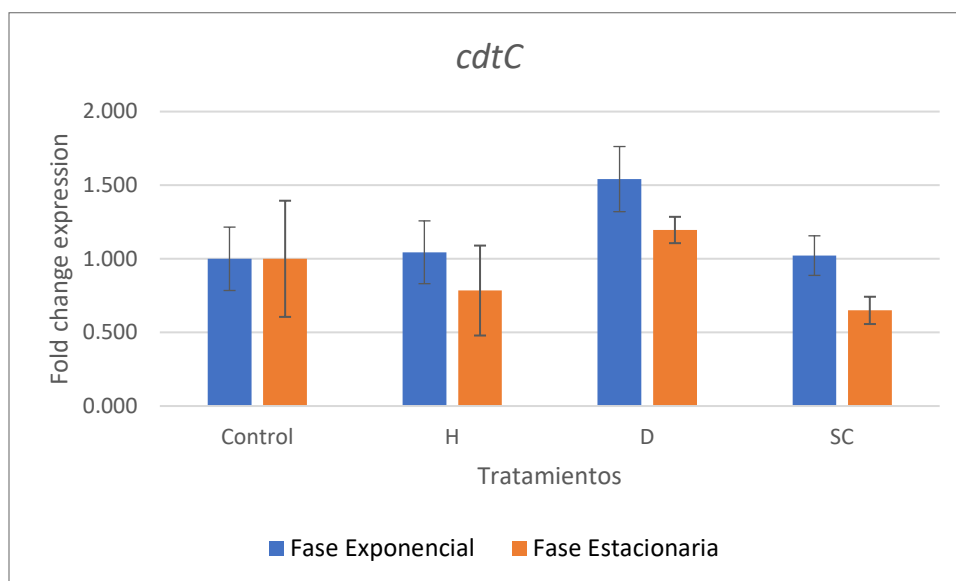


Figura 22. Cambios en la expresión del gen *cdtC* en *A. paragallinarum* cepa COJ7 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

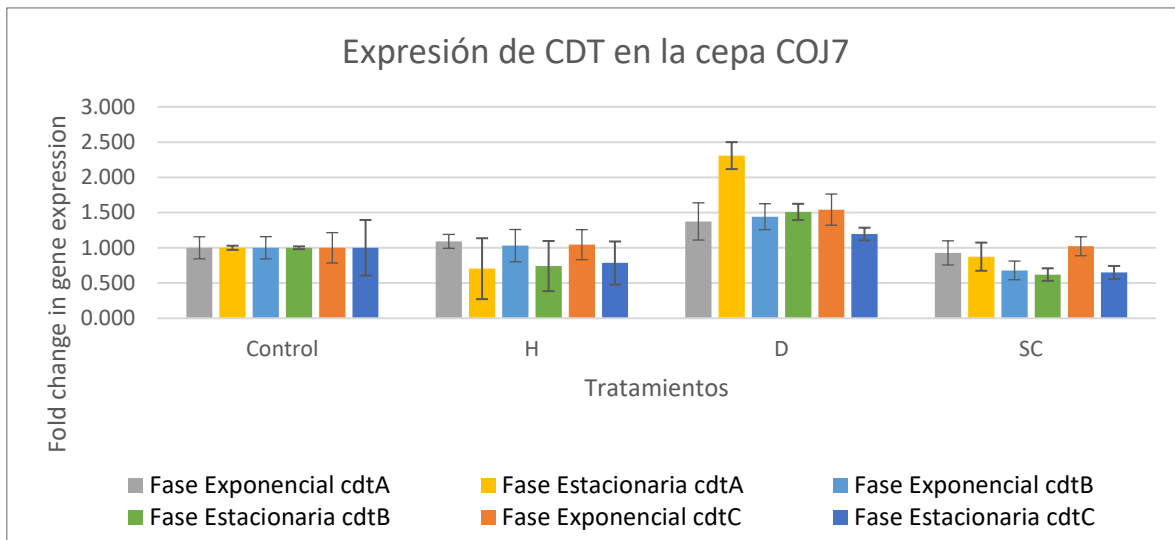


Figura 23. Cambios en la expresión de la Toxina Citoletal Distendente (CDT por sus siglas en inglés) en *A. paragallinarum* cepa COJ7 en las dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

Con relación al gen *fur*, la expresión en el tratamiento con la condición deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl en la fase estacionaria fue significativamente mayor con respecto al control, asimismo, se observó un nivel de expresión relativamente alto con respecto al control en el tratamiento suplementado con sulfato de condroitina en la misma fase de crecimiento (Figura 23).

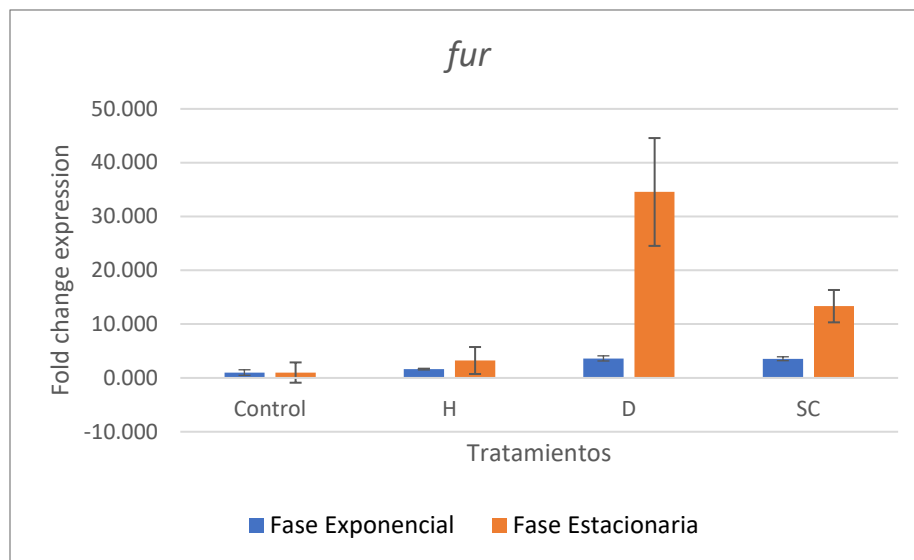


Figura 24. Cambios en la expresión del gen *fur* en *A. paragallinarum* cepa COJ7 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

En cuanto al gen *pepN*, en la fase exponencial, se observó un nivel de expresión alto en el tratamiento suplementado con sulfato de condroitina con respecto al control, sin embargo, para la fase estacionaria la expresión de este gen fue sostenida más no mayor con respecto al control (Figura 24).

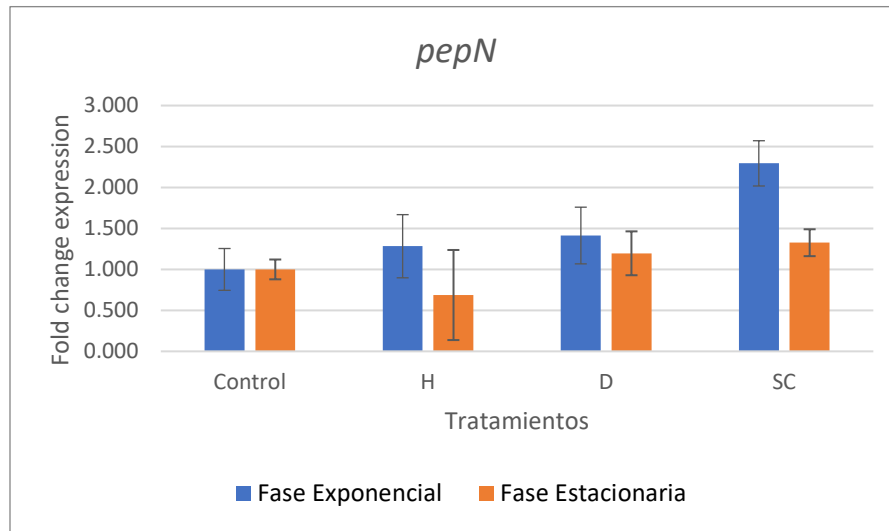


Figura 25. Cambios en la expresión del gen *pepN* en *A. paragallinarum* cepa COJ7 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl_3 , D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

Con relación al gen *chl1*, los niveles de expresión fueron menores en los 3 tratamientos comparados con el control en la fase estacionaria y exponencial, exceptuando al tratamiento con FeCl_3 suplementado, donde se presentó un nivel de expresión similar al control, pero con una desviación estándar alta (Figura 25).

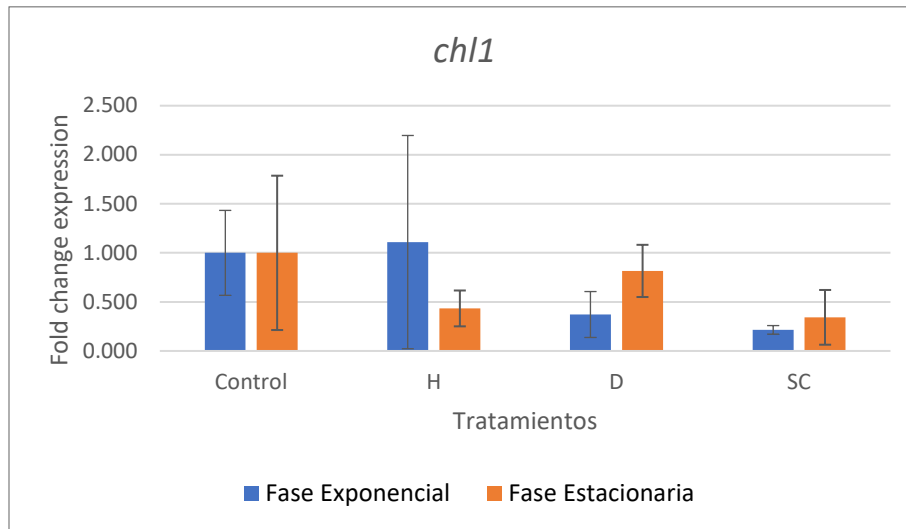


Figura 26. Cambios en la expresión del gen *chl1* en *A. paragallinarum* cepa COJ7 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

Por otra parte, se observó un aumento de la expresión del gen *chl2* con respecto al control en la condición deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl en la fase estacionaria, sin embargo, no se considera significativo. Adicionalmente, se observó una disminución de la expresión en el tratamiento suplementado con sulfato de condroitina en la fase estacionaria. En el resto de los tratamientos la expresión se observó de forma sostenida sin presentarse un aumento con respecto al control (Figura 26). De forma global, en ambos genes se observó una disminución en la expresión con respecto al control en el tratamiento suplementado con sulfato de condroitina, como se observa en la Figura 28.

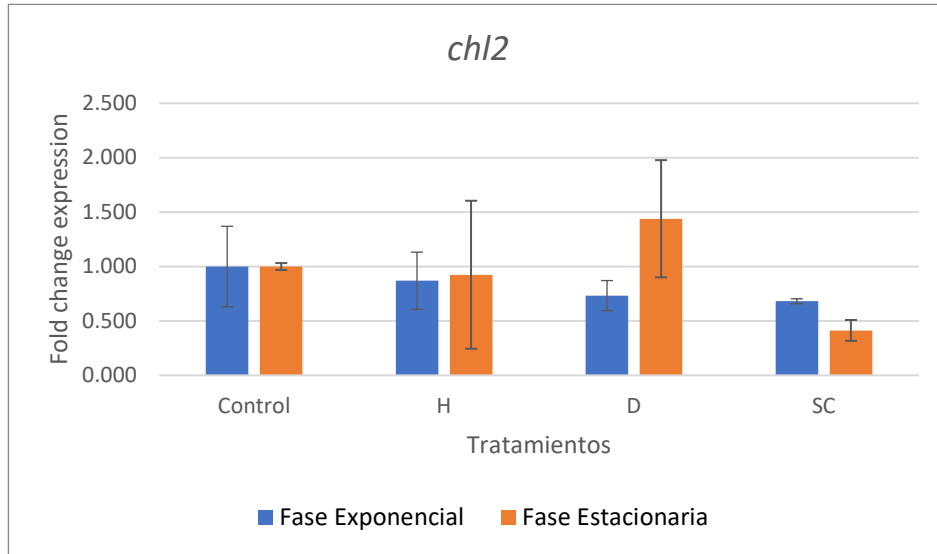


Figura 27. Cambios en la expresión del gen *chl2* en *A. paragallinarum* cepa COJ7 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

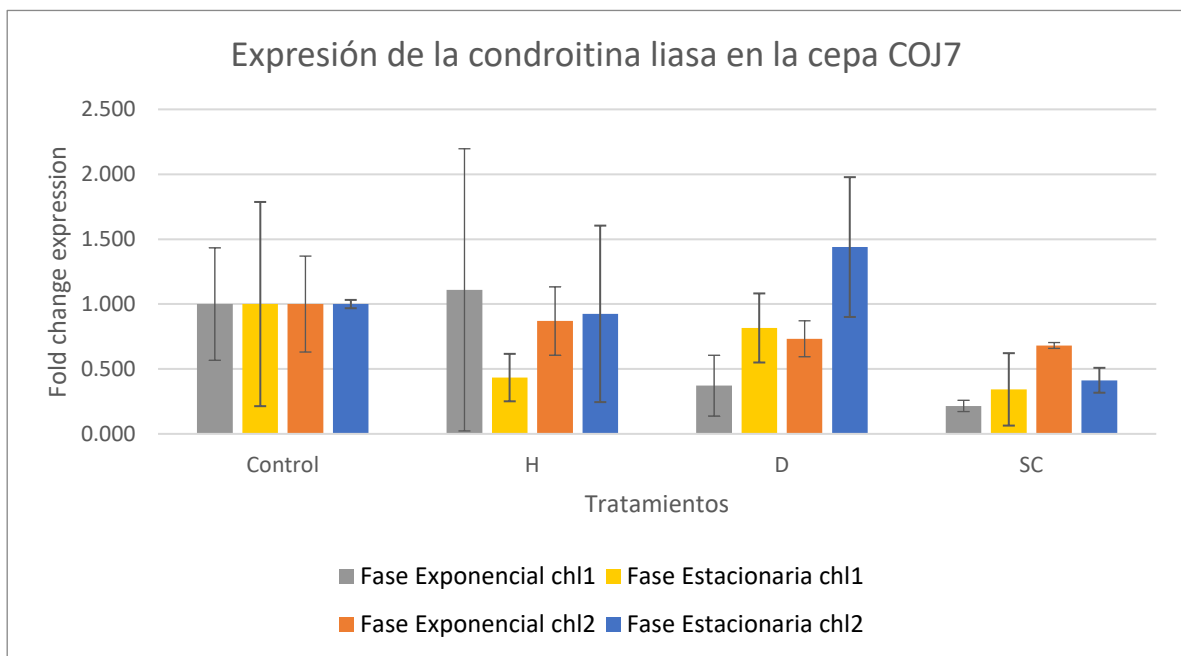


Figura 28. Cambios en la expresión de la condroitina liasa en *A. paragallinarum* cepa COJ7 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

Para el caso del gen *ompA*, la expresión fue significativamente alta con referencia al control, en la fase estacionaria en la condición deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl y para el caso de la fase exponencial los niveles de expresión se mantuvieron cercanos al del control (Figura 27).

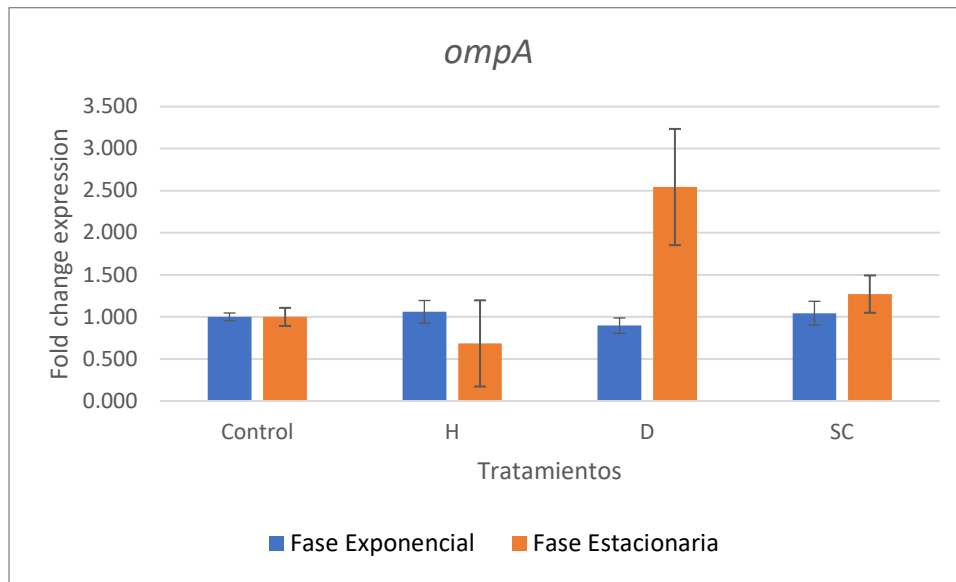


Figura 29. Cambios en la expresión del gen *ompA* en *A. paragallinarum* cepa COJ7 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

Con relación al gen *hntp210*, los niveles de expresión más altos comparados con el control, fueron en la condición deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl para la fase estacionaria y para el tratamiento suplementado con sulfato de condroitina en la fase exponencial (Figura 28). En el resto de los tratamientos el nivel de expresión fue similar al control en las dos fases de crecimiento bacteriano.

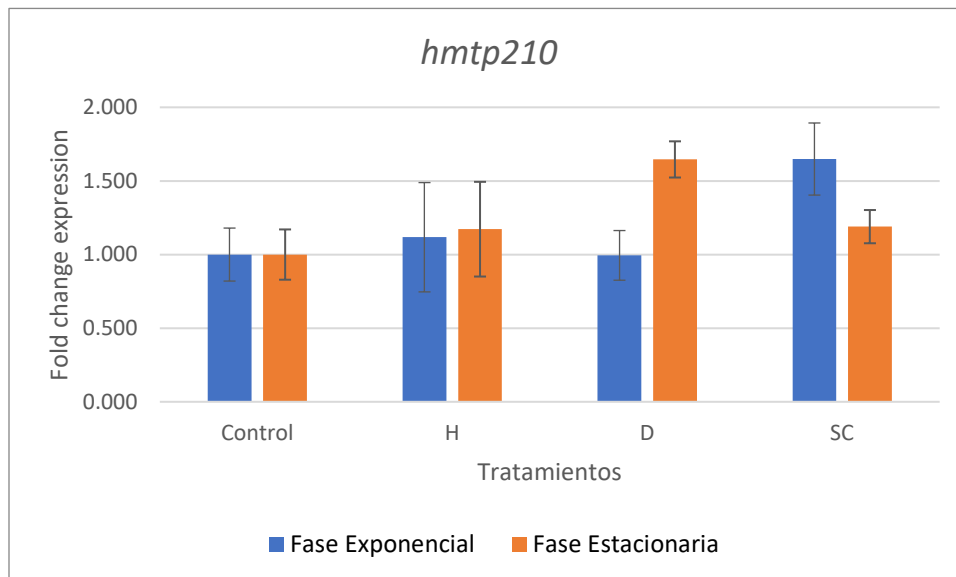


Figura 30. Cambios en la expresión del gen *hntp210* en *A. paragallinarum* cepa COJ7 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

Por último, en el caso del gen *fhaB*, el mayor nivel de expresión comparado con el control se presentó en el tratamiento suplementado con sulfato de condroitina en la fase exponencial. En el resto de los tratamientos y fases de crecimiento bacteriano no se presentaron cambios significativos de expresión génica comparados con el control (Figura 29).

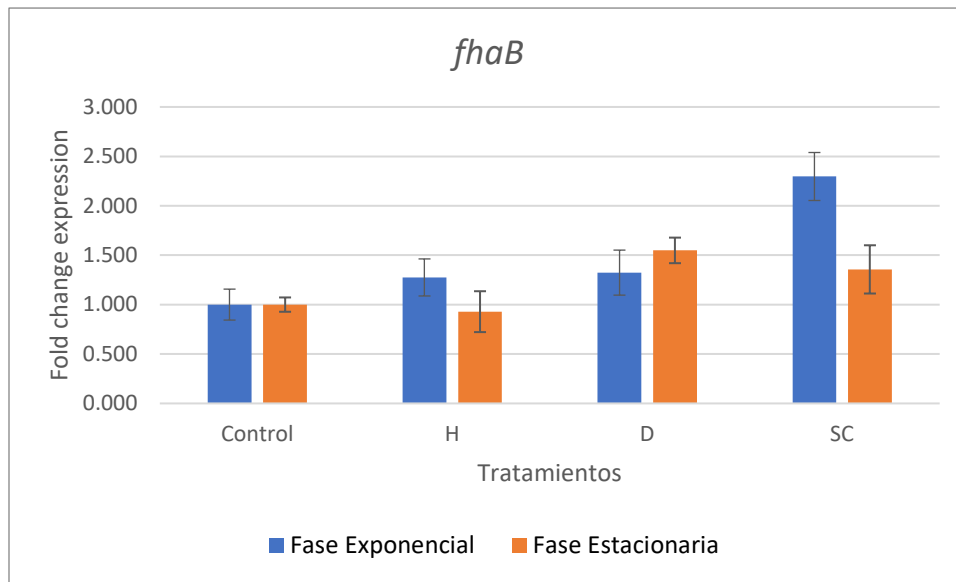


Figura 31. Cambios en la expresión del gen *fhaB* en *A. paragallinarum* cepa COJ7 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

7.10.2. Expresión de los genes en fase exponencial y estacionaria de la cepa AVPG2015 de *A. paragallinarum*

Los resultados del análisis de los datos obtenidos de la cepa 2015 de *A. paragallinarum* fueron procesados de la misma manera que para la cepa COJ7. Primeramente, para el gen *avxA* no se observó un aumento o disminución significativa de la expresión génica comparado con el control y en el caso del tratamiento suplementado con sulfato de condroitina en la fase estacionaria los valores de SD se observan elevados, por lo tanto, estadísticamente no pueden ser considerados (Figura 30).

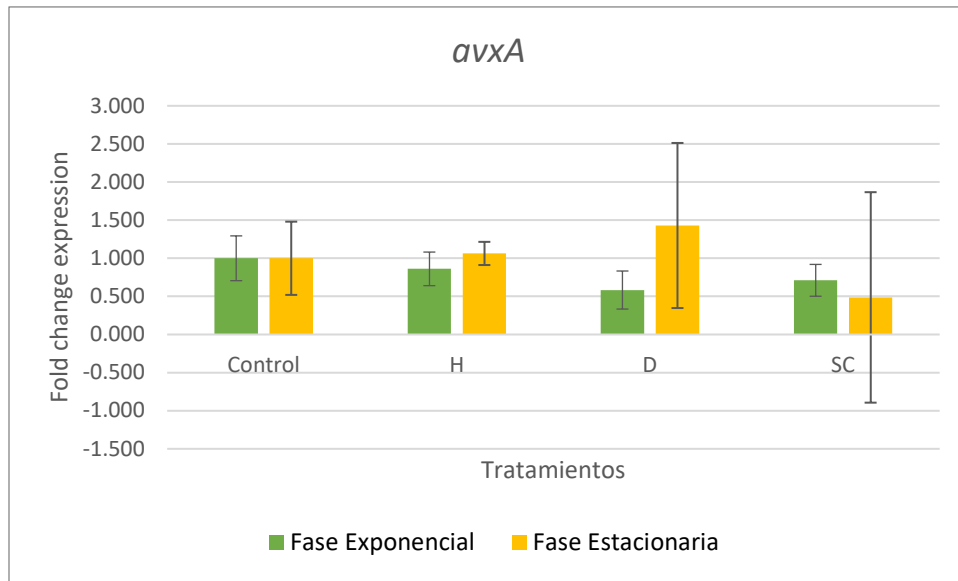


Figura 32. Cambios en la expresión del gen *avxA* en *A. paragallinarum* cepa 2015 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl_3 , D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

En cuanto al gen *cdtA*, se observó un aumento en la expresión con respecto al control en los tratamientos con suplementación con FeCl_3 y sulfato de condroitina de la fase exponencial y en la fase estacionaria el mayor nivel de expresión fue el del tratamiento con suplementación con FeCl_3 contrastando con la marcada disminución de la expresión en el tratamiento adicionado con sulfato de condroitina comparado con el control (Figura 31).

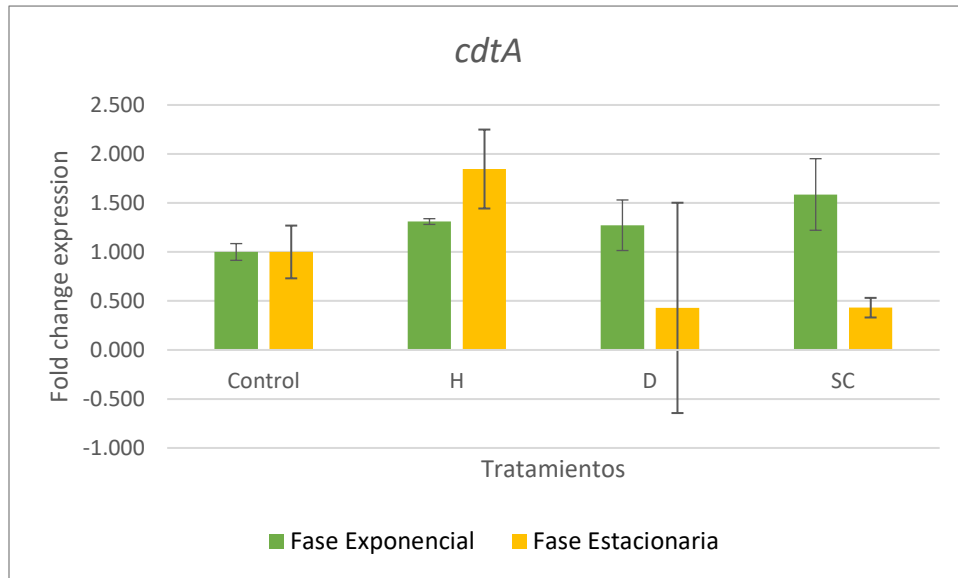


Figura 33. Cambios en la expresión del gen *cdtA* en *A. paragallinarum* cepa 2015 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

Con respecto al gen ***CdtB***, en la fase exponencial, no se observaron cambios significativos de expresión con respecto al control. Por otra parte, se observó un mayor nivel de expresión en el tratamiento con suplementación con FeCl₃ en la fase estacionaria, así como una marcada disminución de la expresión comparado con el control en el tratamiento suplementado con sulfato de condroitina (Figura 32).

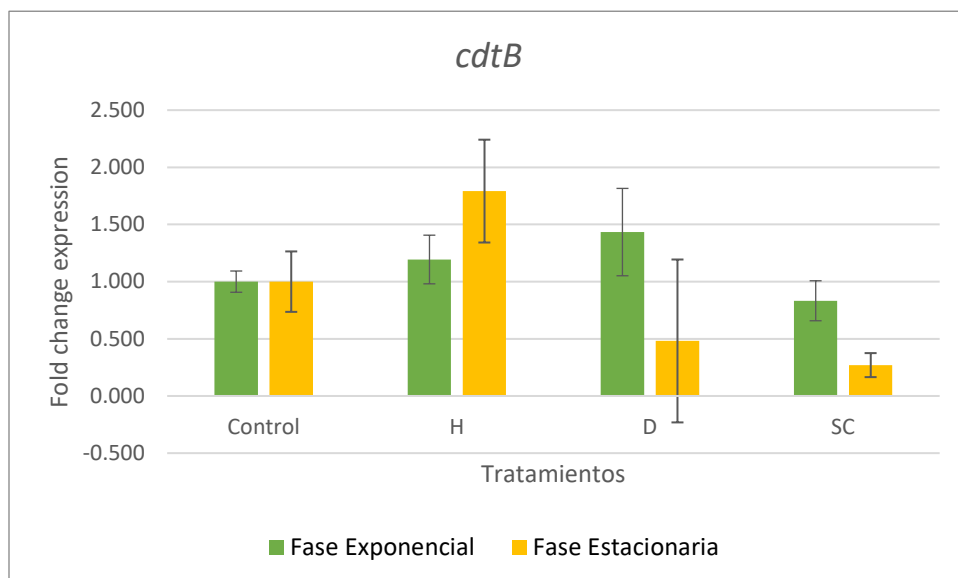


Figura 34. Cambios en la expresión del gen *cdtB* en *A. paragallinarum* cepa 2015 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

Dentro de lo observado para el gen *cdtC*, se presentó un mayor nivel de expresión con respecto al control para los tratamientos con suplementación con FeCl₃ y la condición deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl en la fase estacionaria y exponencial respectivamente. En contraste se presentó un menor nivel de expresión en el tratamiento suplementado con sulfato de condroitina en la fase estacionaria (Figura 33). En los tres genes *cdtA*, *CdtB* y *CdtC*, los valores de SD observados en la condición deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl de la fase estacionaria se consideran elevados por lo que estadísticamente no pueden ser considerados. De manera global, los tres genes presentaron una mayor expresión con respecto al control en la fase estacionaria del tratamiento con suplementación con FeCl₃, y en contraste, la menor expresión con referencia al control fue en el tratamiento suplementado con sulfato de condroitina en la fase estacionaria en los tres genes que conforman este operón (Figura 36). Por otra parte, el gen *fur* presentó un el mayor nivel de expresión en la condición deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl de la fase exponencial y en los otros tratamientos y fases los niveles de expresión observados no son significativamente diferentes con respecto al control. El valor de SD de la condición deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl en la fase estacionaria es elevado por lo que estadísticamente no pueden ser considerado (Figura 34).

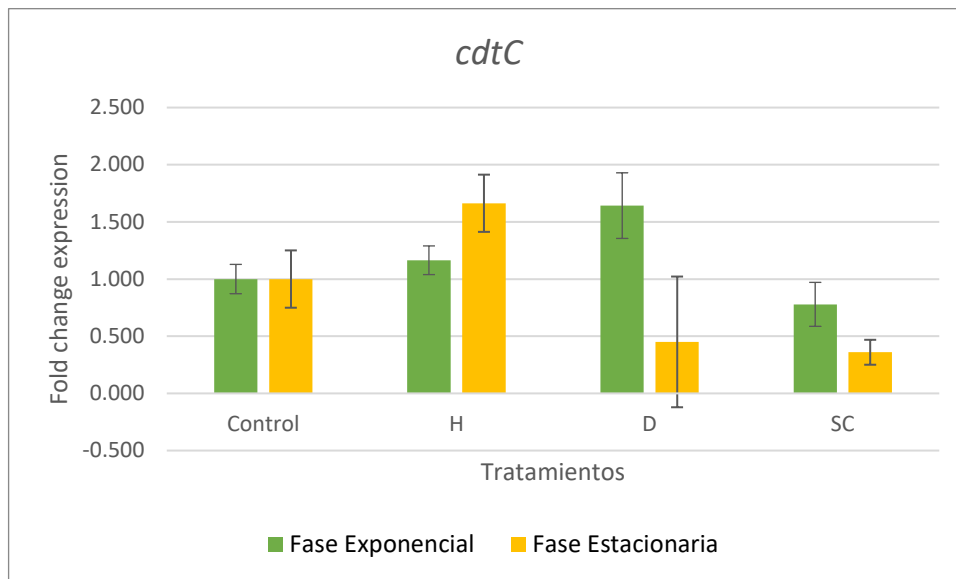


Figura 35. Cambios en la expresión del gen *cdtC* en *A. paragallinarum* cepa 2015 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

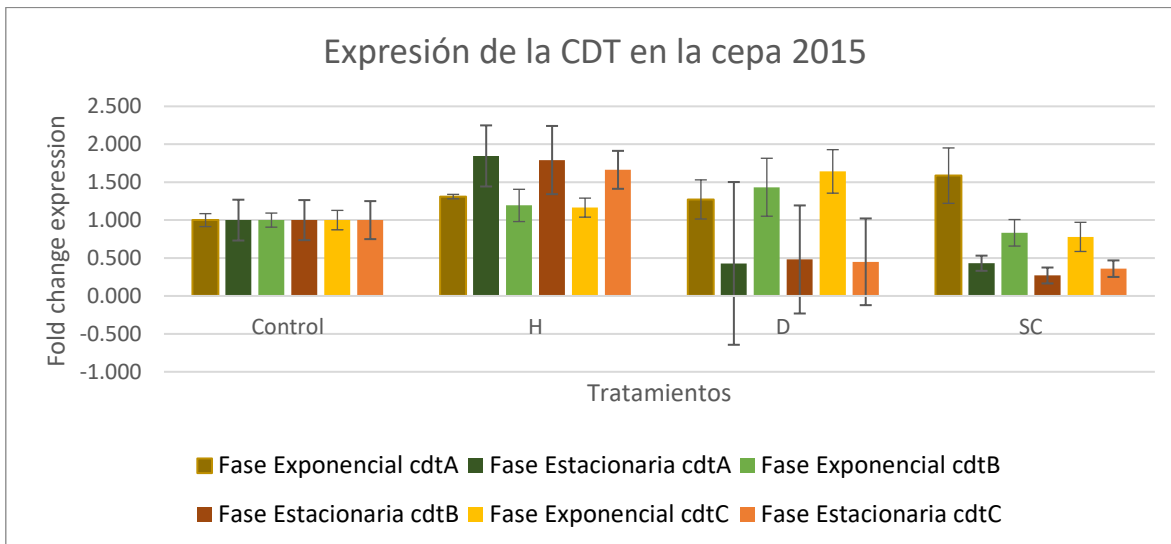


Figura 36. Cambios en la expresión de la Toxina Citoletal Distendente (CDT por sus siglas en inglés) en *A. paragallinarum* cepa 2015 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina

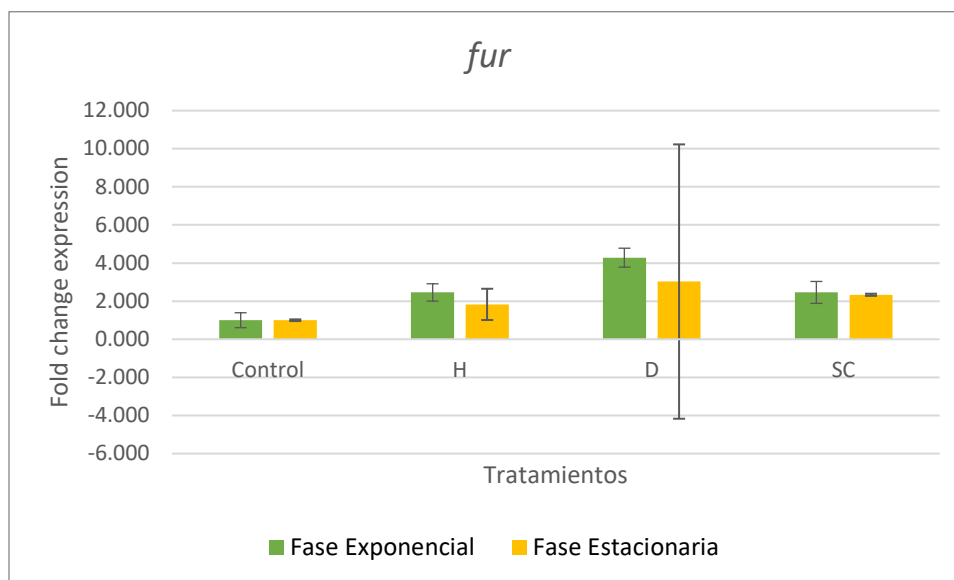


Figura 37. Cambios en la expresión del gen *fur* en *A. paragallinarum* cepa 2015 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

Con referencia al gen *pepN*, el mayor nivel de expresión fue en el tratamiento suplementado con sulfato de condroitina de la fase exponencial, mientras que el menor nivel de expresión observado con respecto al control fue en la fase estacionaria con la condición deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl. EL valor de SD del tratamiento suplementado con sulfato de condroitina de la fase estacionaria es elevado por lo que no pueden ser analizado (Figura 35).

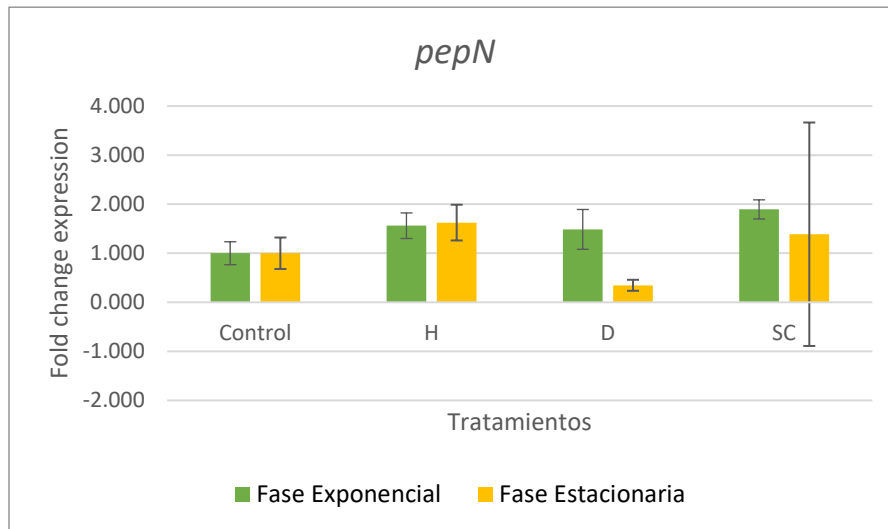


Figura 38. Cambios en la expresión del gen *pepN* en *A. paragallinarum* cepa 2015 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

Para el gen *chl1*, se obtuvo un valor de SD elevado en el control de la fase estacionaria, por lo que el análisis de la fase, en su totalidad, no puede ser considerado. La gráfica puede ser consultada en el Anexo 9. Por otra parte, los resultados del análisis del gen *chl1* en la fase exponencial presentaron un nivel de expresión similares con respecto al control en todos los tratamientos sin observarse cambios significativos (Figura 40). Para el gen *chl2* se observó el mayor nivel de expresión en la condición deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl en la fase estacionaria y en segundo lugar en el tratamiento suplementado con sulfato de condroitina de la fase exponencial. En contraste, el menor nivel de expresión observado comparado con el control fue en el tratamiento suplementado con sulfato de condroitina de la fase estacionaria (Figura 36). Los resultados en conjunto pueden observarse en la Figura 41.

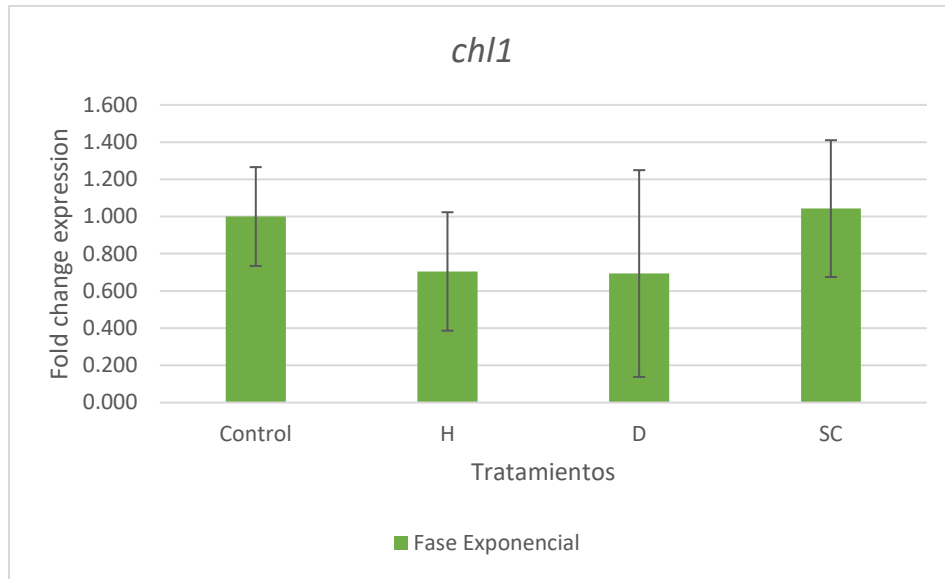


Figura 39. Cambios en la expresión del gen *ch1* en *A. paragallinarum* cepa 2015 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

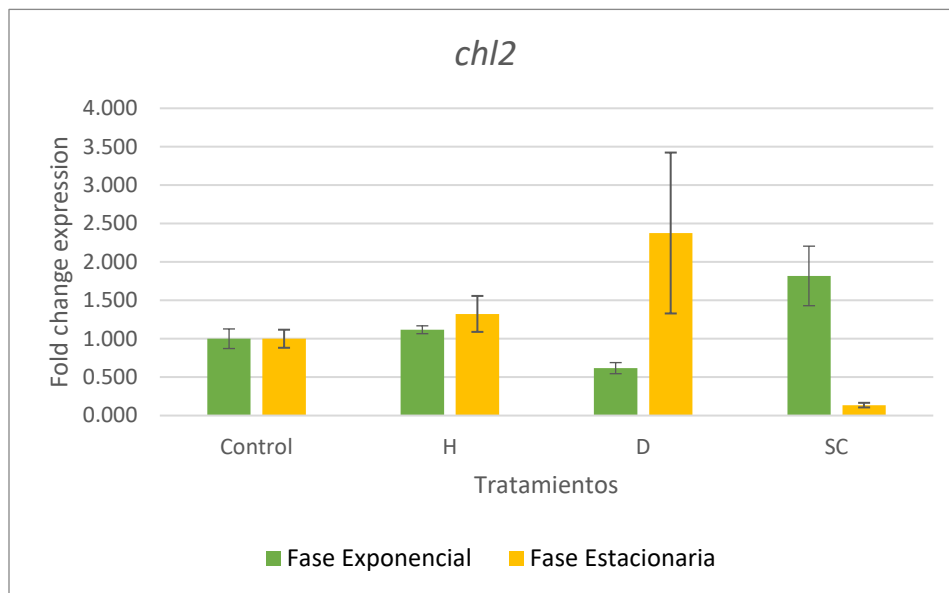


Figura 40. Cambios en la expresión del gen *ch2* en *A. paragallinarum* en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

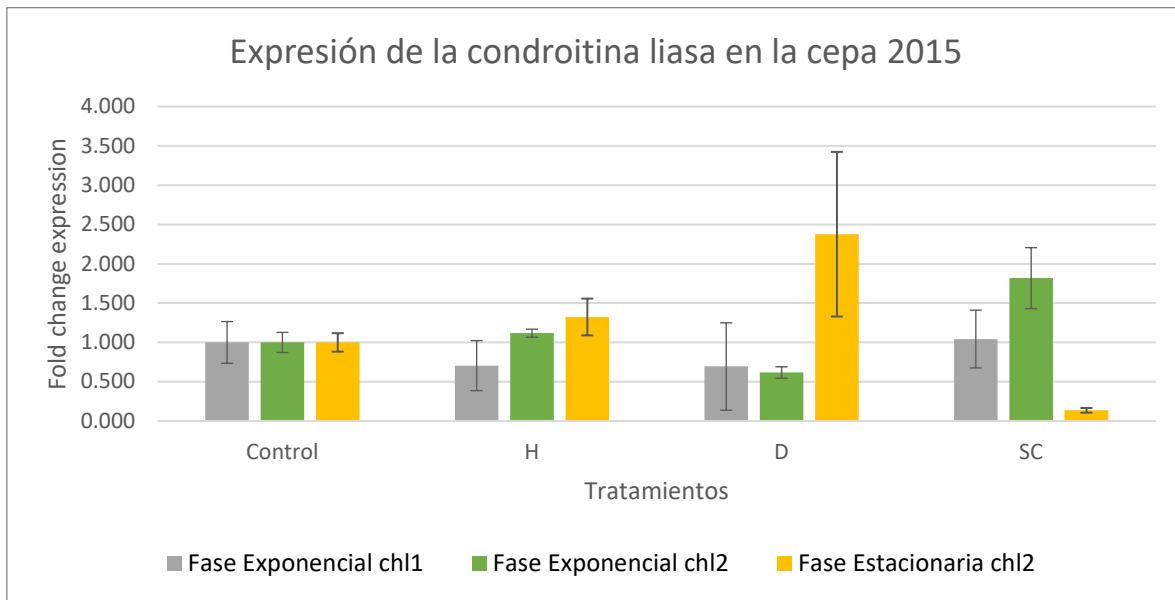


Figura 41. Cambios en la expresión de la condroitina liasa en *A. paragallinarum* cepa 2015 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl_3 , D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

En el caso del gen *ompA*, los niveles de expresión fueron más altos que el control en los tratamientos con suplementación con FeCl_3 y sulfato de condroitina de la fase exponencial y en la fase estacionaria se puede observar el mayor nivel de expresión en el tratamiento con suplementación con FeCl_3 . También se observó un nivel de expresión más bajo en el tratamiento suplementado con sulfato de condroitina en la fase estacionaria (Figura 37). Nuevamente, el valor de SD en la condición deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl en la fase estacionaria no permite que el resultado sea considerado.

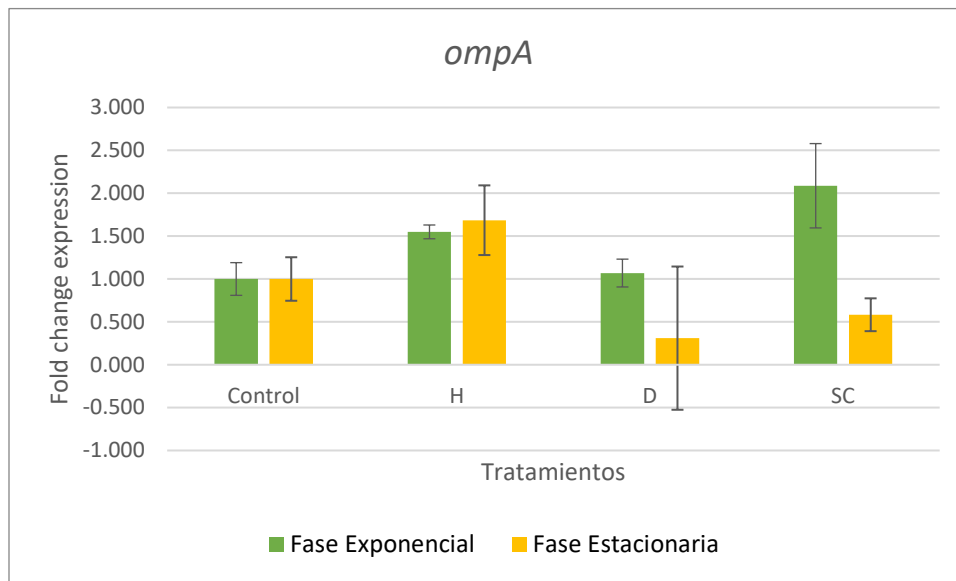


Figura 42. Cambios en la expresión del gen *ompA* en *A. paragallinarum* cepa 2015 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

Dentro de los resultados obtenidos para el gen *hntp210* se observó un mayor nivel de expresión con respecto del control en el tratamiento suplementado con sulfato de condroitina de la fase exponencial, seguido del tratamiento con suplementación con FeCl₃ de la fase estacionaria. En contraparte, el menor nivel de expresión observado fue en la condición deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl de la fase exponencial (Figura 38). Ahora bien, con respecto al gen *fhaB*, los niveles de expresión no fueron significativamente diferentes al control en todos los tratamientos de las dos fases de crecimiento bacteriano. El valor de SD de la condición deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl de la fase estacionaria fue elevado porque no se considera para el análisis de los resultados (Figura 39).

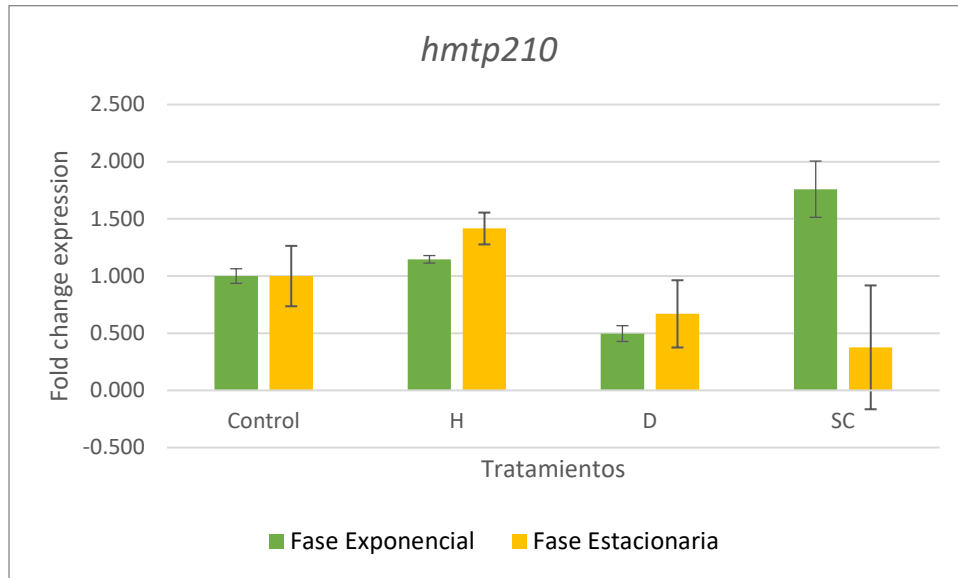


Figura 43. Cambios en la expresión del gen *hntp210* en *A. paragallinarum* cepa 2015 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl_3 , D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

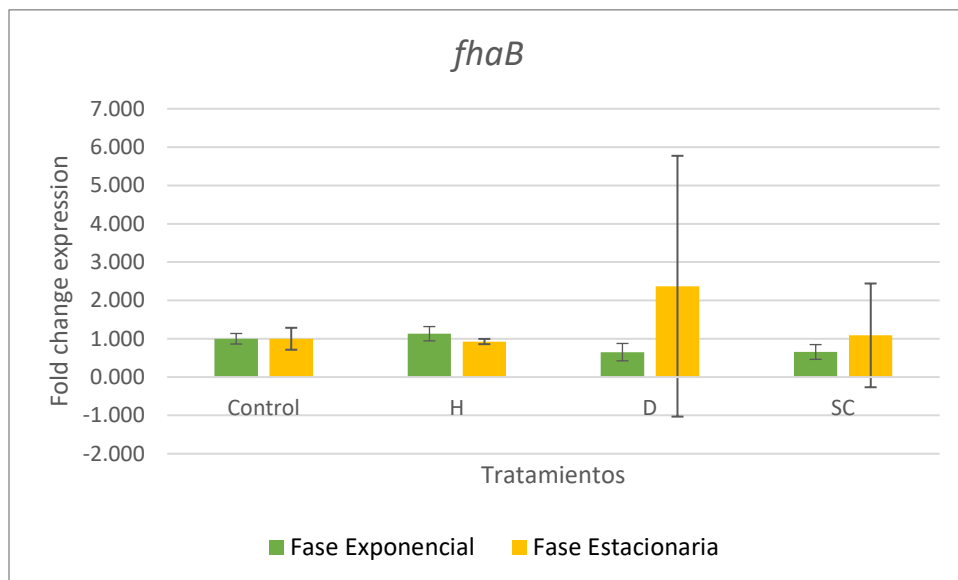


Figura 44. Cambios en la expresión del gen *fhaB* en *A. paragallinarum* cepa 2015 en dos fases de crecimiento. Control: sin adiciones, H: suplementado con FeCl_3 , D: deficiente de hierro utilizando 2,2'-dipyridyl, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

El resumen de los datos obtenidos en los cuatro tratamientos y las dos cepas de *A. paragallinarum* se encuentran en la Tabla 16 y en la Figura 45.

Tabla 16. Niveles de expresión de genes de *A. paragallinarum*.

COJ7 Exponencial		COJ7 Estacionaria		2015 Exponencial		2015 Estacionaria	
Tratamiento	VCE ^{c,d}	Tratamiento	VCE	Tratamiento	VCE	Tratamiento	VCE
avxA							
Control	1.000 ±0.081	Control	1.000 ±0.132	Control	1.000 ±0.294	Control	1.000 ±0.480
Hierro	0.868 ±0.390	Hierro	0.744 ±0.107	Hierro	0.861 ±0.220	Hierro	1.063 ±0.152
Dipyridyl	0.947 ±0.289	Dipyridyl	0.487 ±0.161	Dipyridyl	0.583 ±0.250	Dipyridyl	1.430 ±1.083
Condroitina	0.520 ±0.133	Condroitina	0.434 ±0.190	Condroitina	0.711 ±0.209	Condroitina	0.486 ±1.381
cdtA							
Control	1.000 ±0.156	Control	1.000 ±0.030	Control	1.000 ±0.085	Control	1.000 ±0.269
Hierro	1.092 ±0.098	Hierro	0.704 ±0.432	Hierro	1.310 ±0.029	Hierro	1.846 ±0.403
Dipyridyl	1.374 ±0.264	Dipyridyl	2.308 ±0.191	Dipyridyl	1.273 ±0.258	Dipyridyl	0.429 ±1.073
Condroitina	0.972 ±0.171	Condroitina	0.874 ±0.200	Condroitina	1.587 ±0.365	Condroitina	0.431 ±0.100
cdtB							
Control	1.000 ±0.158	Control	1.000 ±0.020	Control	1.000 ±0.093	Control	1.000 ±0.264
Hierro	1.030 ±0.229	Hierro	0.740 ±0.356	Hierro	1.194 ±0.213	Hierro	1.792 ±0.450
Dipyridyl	1.442 ±0.184	Dipyridyl	1.509 ±0.115	Dipyridyl	1.433 ±0.382	Dipyridyl	0.481 ±0.712
Condroitina	0.679 ±0.132	Condroitina	0.620 ±0.089	Condroitina	0.833 ±0.175	Condroitina	0.270 ±0.105
cdtC							
Control	1.000 ±0.215	Control	1.000 ±0.395	Control	1.000 ±0.128	Control	1.000 ±0.251
Hierro	1.044 ±0.213	Hierro	0.784 ±0.305	Hierro	1.165 ±0.125	Hierro	1.663 ±0.250
Dipyridyl	1.541 ±0.221	Dipyridyl	1.196 ±0.089	Dipyridyl	1.642 ±0.287	Dipyridyl	0.450 ±0.572
Condroitina	1.022 ±0.134	Condroitina	0.650 ±0.093	Condroitina	0.779 ±0.192	Condroitina	0.360 ±0.109
fur							
Control	1.000 ±0.520	Control	1.000 ±1.885	Control	1.000 ±0.392	Control	1.000 ±0.044
Hierro	1.637 ±0.148	Hierro	3.240 ±2.506	Hierro	2.457 ±0.455	Hierro	1.831 ±0.820
Dipyridyl	3.631 ±0.478	Dipyridyl	34.560 ±10.019	Dipyridyl	4.282 ±0.497	Dipyridyl	3.029 ±7.199
Condroitina	3.571 ±0.362	Condroitina	13.338 ±3.008	Condroitina	2.459 ±0.575	Condroitina	2.334 ±0.057
pepN							
Control	1.000 ±0.255	Control	1.000 ±0.121	Control	1.000 ±0.234	Control	1.000 ±0.321
Hierro	1.283 ±0.386	Hierro	0.687 ±0.550	Hierro	1.561 ±0.261	Hierro	1.625 ±0.364
Dipyridyl	1.414 ±0.346	Dipyridyl	1.197 ±0.268	Dipyridyl	1.486 ±0.406	Dipyridyl	0.347 ±0.112
Condroitina	2.294 ±0.276	Condroitina	1.326 ±0.164	Condroitina	1.894 ±0.195	Condroitina	1.388 ±2.278
chl1							
Control	1.000 ±0.433	Control	1.000 ±0.787	Control	1.000 ±0.266	Control	1.000 ±3.997
Hierro	1.110 ±1.087	Hierro	0.434 ±0.183	Hierro	0.705 ±0.318	Hierro	0.743 ±0.388
Dipyridyl	0.372 ±0.234	Dipyridyl	0.816 ±0.266	Dipyridyl	0.694 ±0.556	Dipyridyl	8.925 ±19.183
Condroitina	0.215 ±0.043	Condroitina	0.343 ±0.279	Condroitina	1.043 ±0.368	Condroitina	0.052 ±0.035
chl2							
Control	1.000 ±0.370	Control	1.000 ±0.032	Control	1.000 ±0.128	Control	1.000 ±0.118
Hierro	0.869 ±0.263	Hierro	0.925 ±0.680	Hierro	1.117 ±0.051	Hierro	1.323 ±0.234
Dipyridyl	0.733 ±0.139	Dipyridyl	1.439 ±0.539	Dipyridyl	0.617 ±0.072	Dipyridyl	2.376 ±1.047
Condroitina	0.681 ±0.023	Condroitina	0.413 ±0.096	Condroitina	1.818 ±0.388	Condroitina	0.136 ±0.030
ompA							
Control	1.000 ±0.047	Control	1.000 ±0.107	Control	1.000 ±0.191	Control	1.000 ±0.254
Hierro	1.061 ±0.134	Hierro	0.685 ±0.512	Hierro	1.550 ±0.080	Hierro	1.686 ±0.406
Dipyridyl	0.896 ±0.091	Dipyridyl	2.544 ±0.690	Dipyridyl	1.069 ±0.162	Dipyridyl	0.310 ±0.835
Condroitina	1.044 ±0.142	Condroitina	1.271 ±0.222	Condroitina	2.087 ±0.492	Condroitina	0.583 ±0.191
hntp210							
Control	1.000 ±0.180	Control	1.000 ±0.171	Control	1.000 ±0.064	Control	1.000 ±0.264
Hierro	1.118 ±0.371	Hierro	1.172 ±0.322	Hierro	1.146 ±0.033	Hierro	1.416 ±0.139
Dipyridyl	0.994 ±0.169	Dipyridyl	1.676 ±0.123	Dipyridyl	0.497 ±0.069	Dipyridyl	0.669 ±0.294
Condroitina	1.649 ±0.245	Condroitina	1.190 ±0.113	Condroitina	1.760 ±0.246	Condroitina	0.377 ±0.541
fhaB							
Control	1.000 ±0.157	Control	1.000 ±0.072	Control	1.000 ±0.138	Control	1.000 ±0.286
Hierro	1.275 ±0.187	Hierro	0.929 ±0.207	Hierro	1.132 ±0.186	Hierro	0.927 ±0.068
Dipyridyl	1.324 ±0.228	Dipyridyl	1.548 ±0.129	Dipyridyl	0.651 ±0.227	Dipyridyl	2.371 ±3.402
Condroitina	2.296 ±0.243	Condroitina	1.356 ±0.244	Condroitina	0.655 ±0.193	Condroitina	1.088 ±1.353

^cVCE: veces cambio en la expresión.

^d Valoración respecto a la amplificación de los normalizadores.

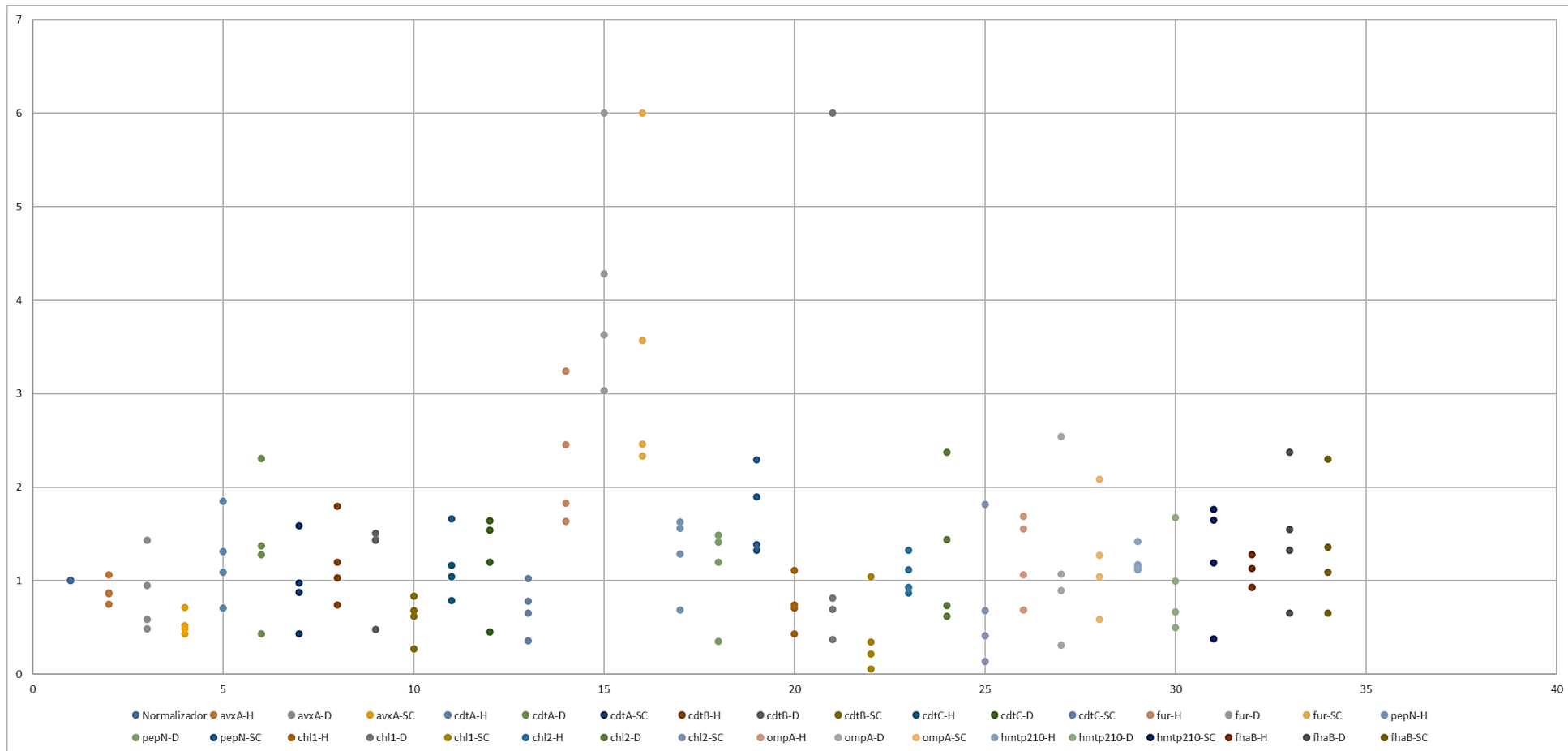


Figura 45. Cambios en la expresión de los genes de virulencia en las cepas COJ7 y 2015 de *A. paragallinarum*-fase exponencial y estacionaria. Los cambios de expresión se grafican en las ordenadas y el tiempo en las abscisas. El desarrollo exponencial abarca de 6-12 horas y la estacionaria de 12 a 16 horas. Normalizador: Control sin adiciones, H: suplementado con FeCl₃, D: deficiente en hierro, SC: suplementado con sulfato de condroitina.

VIII. DISCUSIÓN

Los estudios previos de virulencia y patogenicidad de *A. paragallinarum*, como causante de la “coriza infecciosa” llevaron a determinar la secuencia completa de su genoma y a consolidar trabajos de genómica comparativa con los genomas disponibles en GenBank, observando en estos genomas la presencia de muchos genes anotados como posibles genes de virulencia. Su correcta anotación está asociada con su valoración transcripcional, traduccional y de funcionalidad biológica. En este trabajo se planteó la estrategia de investigación transcripcional de 11 genes potencialmente relacionados con virulencia en *A. paragallinarum*. Para ello se consideró que los análisis de niveles de expresión transcripcional mediante el uso de la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real requieren el uso de genes que se expresen de forma estable en diferentes condiciones experimentales o tratamientos. Los genes son conocidos como genes de referencia, codifican proteínas que son esenciales para mantener las actividades celulares en diferentes tejidos y órganos en organismos eucariontes (Gutiérrez, *et al.*, 2008). Sin embargo, los niveles de expresión de los genes de referencia son solo condicionalmente estables ya que varían dependiendo de las diferentes condiciones de crecimiento, fases de crecimiento, especies o estimulaciones químicas o físicas. Por lo tanto, cada condición experimental particular, tiene sus genes de referencia de expresión estable adecuados y ninguno de los genes de referencia comúnmente utilizados es considerado universal (Radonić, *et al.*, 2004). En consecuencia, la elección de un gen de referencia adecuado para la investigación de expresión génica basada en condiciones experimentales es fundamental para la validación de los resultados. En el análisis de validación de genes de referencia en *A. paragallinarum* realizado por Wen, *et al.*, en 2017, se determinó que los genes con el comportamiento más estable en la fase de crecimiento exponencial y estacionaria fueron *atpD* y *recN* respectivamente, esto considerando un serogrupo B. Para el presente estudio, se utilizó la cepa 2015, la cual pertenece al serogrupo B, además de la cepa COJ7, de la cual, se desconoce el serogrupo al que pertenece. Con estas cepas los resultados de búsqueda de genes normalizadores en el presente estudio fueron parcialmente diferentes a los de Wen, *et al.*, 2017, ya que tanto para la fase exponencial como estacionaria de la cepa 2015, el gen con mejor estabilidad deducida por el algoritmo de NormFinder fue *atpD* mientras que para la cepa COJ7 los genes seleccionados fueron *rpoB* y *atpD* para la fase exponencial y estacionaria respectivamente. Lo anterior puede deberse a diversos factores, entre ellos, las condiciones de crecimiento, que en nuestro estudio fueron ocho, cuatro en cada fase de crecimiento: quizás la condición más extrema fue llevar a las células a un estado de cultivo con bajas concentraciones de hierro. Las otras dos variaciones de cultivo también fueron condicionantes de ajustes en la expresión genética, medio enriquecido con hierro con posibilidad de aparición de reacciones de femton y cambio de fuente de carbono glucosa y sulfato de condroitina, en tanto Wen sólo usó una condición estándar en medio de caldo soya tripticaseína. Otro factor quizás sea que nuestro análisis sólo fue hecho con el algoritmo de NormFinder, mientras que Wen incluyó tres distintos algoritmos. Contrario a lo obtenido en el estudio de

Wen, el gen *recN* no resultó ser un gen de referencia estable para las distintas condiciones de cultivo en nuestro estudio, quizás porque *recN*, un gen relacionado con reparación de daño en el ADN tiene una menor tasa de expresión o porque no hubo condiciones de requerimiento de este gen en nuestros cultivos, razón por la que fue descartado del análisis de elección de genes normalizadores. Asimismo, el gen 16S rRNA, un gen de referencia ampliamente utilizado para la clasificación de especies, tuvo alta abundancia en la transcripción de ARNm, quizás por el alto número de copias por genoma y que estos genes cuentan con promotores muy fuertes. Este gen en sentido opuesto a *recN* en expresión no se consideró un buen candidato de gen de referencia, lo que coincide con los resultados de Wen y otros estudios como el de Jacob, *et al.*, 2011, donde se muestra que la cantidad de rRNA presente en células es aproximadamente 85-90% del RNA total y que la regulación de la síntesis del rRNA es independiente del mRNA (Ye, *et al.*, 2010) y ello podría aumentar la probabilidad del error experimental en la RT-qPCR (Nicot, *et al.* 2005). Finalmente, el gen *atpD* seleccionado como normalizador, se ha identificado como un gen altamente conservado en la familia *Pasteurellaceae*, se usa comúnmente como biomarcador molecular para la categorización bacteriana (Christensen, *et al.*, 2004) y la elaboración del árbol filogenético de la familia *Pasteurellaceae* (Petersen, *et al.*, 2001), en este trabajo se consideró como una herramienta apropiada para la investigación.

Como se mencionó anteriormente, Cdt es una genotoxina heterotrimérica codificada por los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* en una disposición de operón, en el que las subunidades CdtA y CdtC, son responsables del transporte de la subunidad activa CdtB, que lleva la actividad catalítica (Lara-Tejero y Galán, 2000). Hasta el momento, no se conoce algún estudio de expresión génica similar al que presentamos para la toxina Cdt en *A. paragallinarum*, sin embargo, lo conocido hasta hoy sí relaciona la funcionalidad de las toxinas Cdt con la necesidad de expresión. En este estudio, los niveles de expresión que podemos observar para los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* son notorios y más altos que para los genes normalizadores en ambas cepas en presencia o ausencia hierro, como se muestra en la tabla resumen de $\Delta\Delta CT$ en el rango de 1.03 a 1.642 veces respecto al normalizador en fase exponencial. Mientras que la expresión de Cdt en COJ7 se mantuvo alta en niveles bajos de hierro. Cabe mencionar que la expresión más alta fue la de CdtA de la cepa COJ7 en el tratamiento deficiente de hierro, en la fase estacionaria. En tanto que la cepa 2015 mostró una baja expresión de los tres genes en la fase estacionaria con tratamiento de dipiridyl o condroitina. En general, el tratamiento con sulfato de condroitina adicionado presentó los valores más bajos de expresión génica entre fases de crecimiento y cepas. Lo anterior probablemente debido a que la célula no se encuentra en un estado de alto estrés metabólico y no requiere tanto de Cdt para la invasión de tejidos, caso contrario a lo observado con el tratamiento con Dipiridyl, donde en general se observaron los niveles más altos de expresión en los tres genes, entre fases de crecimiento y cepas, exceptuando la fase estacionaria de la cepa 2015 donde los valores $\Delta\Delta CT$ de expresión más altos fueron con hierro adicionado.

El regulador de la captación de hierro, Fur, fue descrito originalmente como un represor de la transcripción de genes involucrados en la importación de hierro (Ernst, *et al.*, 1978). En condiciones de alto contenido de hierro, Fur, junto con el correpresor Fe(II), se une a una secuencia conservada de ADN (caja Fur) río arriba de un gen regulado e inhibe la unión de la RNA polimerasa para evitar su transcripción. Al disminuir los niveles de hierro, Fe(II) se libera de Fur, Fur se disocia de la región promotora, y se inicia la transcripción (Carpenter, *et al.*, 2009). Sin embargo, existen múltiples ejemplos de falta de correlación entre la regulación de la expresión génica dependiente de Fur y la presencia de una caja consenso Fur (Mey, *et al.*, 2005; Isabella, *et al.*, 2008; Yu y Genco, 2012). Además, la regulación positiva dependiente de Fur de la expresión génica puede ocurrir indirectamente a través de small RNA (sRNA). Un estudio reciente demostró la presencia de varios sRNAs en *A. paragallinarum* que tienen un potencial rol regulatorio en el mantenimiento de la homeostasis del hierro (Huo, *et al.*, 2021). Por otra parte, aunque principalmente se ha descrito que Fur funciona en la homeostasis del hierro, la regulación génica dependiente de Fur se extiende más allá de la represión transcripcional de genes implicados en la importación de hierro. Fur aumenta la transcripción de genes implicados en funciones biológicas más diversas, como la resistencia al estrés oxidativo, homeostasis del pH, quórum sensing, secreción tipo III y quimiotaxis (Carpenter, *et al.*, 2009; Ellermeier y Slauch, 2008; Yu y Genco, 2012). Además, no todos los genes de utilización de hierro están regulados por Fur, lo que sugiere que aún no se han descubierto los mecanismos adicionales de regulación de la utilización de hierro. En nuestro estudio y conforme a lo esperado, Fur mostró un incremento significativo de expresión en bajos niveles de hierro en ambas cepas, aunque, en la cepa COJ7 los niveles de expresión fueron más pronunciados, alcanzando los valores más altos observados de $\Delta\Delta CT$ en este estudio, 34.560 con dipiridyl en la fase estacionaria. Por otra parte, en el tratamiento con sulfato de condroitina los niveles de expresión fueron de hasta 13.338 veces siendo la segunda condición en la que se observó una sobreexpresión alta. Esto probablemente se deba a que el tratamiento con sulfato de condroitina genere un ambiente donde la captación de hierro se vea afectada. Es importante notar que, en contraste, el comportamiento de los niveles de expresión fue diferente entre cepas ya que en la cepa 2015, se observó un nivel de expresión por encima del control en el tratamiento con D para la fase exponencial y en el tratamiento con D para la fase estacionaria se observó una SD fuera de lo estadísticamente aceptable por lo que no podemos deducir un resultado concluyente. Este tipo de SD surgen como resultado de la variabilidad entre las réplicas biológicas, las cuales posiblemente se deban a factores como: a) errores metodológicos, como la poca homogenización de las muestras al momento de realizar las réplicas biológicas o b) la variabilidad inherente al comportamiento que presenta cada cepa de *A. paragallinarum* y que se ha podido constatar a lo largo de los años de estudio de este microorganismo en el MIMOCE. Finalmente, cabe mencionar que las condiciones en las que se desarrolló la totalidad de los experimentos fueron especiales debido a la pandemia por COVID-19 por la que se estaba atravesando y por esta razón el experimento fue realizado en colaboración entre varias instituciones e instalaciones, circunstancia que pudo derivar en el aumento de la variabilidad entre réplicas biológicas observada.

Las bacterias patógenas producen muchas moléculas relacionadas con la virulencia que participan en la adherencia, formación de biofilm, citotoxicidad e invasión. Entre estos factores de virulencia la hemaglutinina filamentosa Fha es de particular importancia para el proceso de patogénesis en modelos bacterianos tales como *Acinetobacter baumannii* y *Bordetella* sp. causantes de enfermedades respiratorias graves tanto en humanos como animales. La hemaglutinina Fha es una importante adhesina que es requerida para la colonización traqueal en modelos animales. Esta proteína puede tener un tamaño de 367 kDa sintetizada como precursor, la cual es posteriormente procesada en una proteína madura de 220 kDa (Link, *et al.*, 2007). Fha se secreta a la superficie celular a través de un mecanismo de sistema de secreción de dos partes (TPS), en la cual la secreción de FhaB a través de la membrana externa se hace por medio de la proteína FhaC y FhaB adquiere su conformación madura final en la superficie de la célula. (Clantin, *et al.*, 2004). La proteína FhaB tiene distintos dominios de unión involucrados en la adhesión celular. El dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) de FhaB probablemente permite la adherencia a las células epiteliales respiratorias ciliadas y a los macrófagos (Liu, *et al.*, 1997), aunque, también muestra una actividad similar a lectina para unirse a heparina y el sulfato de dextrano, pudiendo posiblemente interactuar con las células epiteliales no ciliadas, (Menozzi, *et al.*, 1994). Sin embargo, las proteínas Fha de las especies "clásicas" del género de *Bordetella* que están muy relacionadas, no son completamente intercambiables desde el punto de vista funcional. A nivel transcripcional se sabe que la expresión de *fhaB* está controlada por el sistema de dos componentes BvgAS que responde a estímulos ambientales como la temperatura o compuestos como $MgSO_4$ o ácido nicotínico (Beier y Gross, 2006). Para el ser humano Fha es un antígeno protector y está incluido en las vacunas contra la tosferina (Mattoo y Cherry, 2005), la investigación de expresión de este factor de virulencia en *A. paragallinarum* resulta ser muy novedoso e interesante. En el presente estudio se observó que la transcripción del gen *fhaB* se ve más influenciado por la presencia del Sulfato de condroitina en la cepa COJ7, $\Delta\Delta CT=2.3$, esto probablemente se deba a que FhaB responda a la presencia de algunos carbohidratos especiales a causa del dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) que posee, lo cual tendría relación a nivel transcripcional, pero esta hipótesis deberá ser explorada en futuras investigaciones; sin embargo, en la cepa 2015 esta aseveración no podría ser concluyente debido al alto valor de la SD obtenida en el análisis y que, como se mencionó anteriormente, estos valores están asociados a la alta variabilidad de las réplicas biológicas. El gen *fhaB* mostró más cambios en la cepa 2015, en ausencia de hierro $\Delta\Delta CT=2.37$, en la fase estacionaria, aunque se puede argumentar poco al respecto, debido a la presencia de una alta SD y que, además, poco es conocido acerca de las propiedades de virulencia de *A. paragallinarum* a través de FhaB hasta este momento. En este trabajo se reporta por primera vez la presencia del gen *fhaB* (Uniprot Blastx e-value 0.0, ver imagen de búsqueda en Anexo 10) y su posible participación como factor de virulencia en *A. paragallinarum*.

Con relación a los genes de condroitina liasa, en primer lugar, cabe mencionar que no hay en la literatura un estudio de transcripción de *chl1* y *chl2* realizado bajo este tratamiento, en *A. paragallinarum*, razón por la cual no existe un precedente de

comparación de los resultados obtenidos. En nuestro estudio, *chl1* y *chl2* mostraron baja expresión transcripcional en COJ7 al cultivarse en medio suplementado con sulfato de condroitina. Este hecho no coincide con lo esperado, ya que, a mayor cantidad de sustrato suministrado se esperaría observar una mayor expresión del transcrito que codifica esta enzima, si hubiera una respuesta inductiva de transcripción, en contraste, la mayor expresión observada fue en condiciones de deficiencia de hierro, lo que pudiera inferirse como inducción de expresión que responde a estímulos de expresión cruzados. En el caso de la cepa 2015, se observó una expresión un poco más alta en el tratamiento con Sulfato de condroitina en fase exponencial ($\Delta\Delta CT=1.8$) pero en el tratamiento con niveles de hierro disminuido en fase estacionaria se observó la mayor expresión de esta enzima ($\Delta\Delta CT=8.9$). Derivado de lo anterior, se sugiere la probable existencia de procesos de regulación aún no claros que inducen que estos dos genes se estén expresando no a mayor cantidad de sustrato (sulfato de condroitina) sino a condiciones que estresan a la bacteria lo que significa que pudiera corresponder con genes relacionados con la virulencia de la bacteria, ya que se inducen en un medio con poco hierro, por consiguiente, estos genes se expresan para obtener recursos de la célula hospedera. Estudios de actividad enzimática serían necesarios para descartar otras condiciones que podrían estar influyendo en los resultados de expresión transcripcional aquí observados. Finalmente, falta mucho por saber acerca del metabolismo del sulfato de condroitina en *A. paragallinarum*, por ejemplo, la vía o ruta metabólica por la que se cataboliza este carbohidrato complejo o si algún residuo del glucosaminoglicano es incorporado a las cubiertas de la bacteria.

Con base en las condiciones experimentales utilizadas en la presente investigación, cabe resaltar que la adición de dipiridyl y más aún la adición de Fe(III) inducen la transcripción de muchos genes de virulencia de *A. paragallinarum* aquí investigados. En relación a la pureza de los reactivos, se sabe que varias fuentes de carbono naturales, como son los carbohidratos de origen vegetal o animal, pueden tener bajos porcentajes de pureza y que ello puede dificultar su valoración metabólica precisa, tal es el caso de los glucosaminoglicanos de origen animal como el ácido hialurónico, los derivados de ácido siálico, sulfatos de condroitina y fucosa (https://gnc.com.mx/catalog/product/view/_ignore_category/1/id/2862/s/gnc-flextrin-glucosamina-y-condroitina/ y <https://lambertsusa.com/producto/glucosamina-y-condroitina/>). Además, la disponibilidad comercial de estos productos depende de la demanda y su adquisición se vuelve incierta, por lo que su uso generalizado en la investigación se ve incierta (<https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sigma/c4384>; <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sigma/c6737>). Ante tales circunstancias y habiendo observado, que la adición de hierro lleva a cabo una función reguladora parcialmente semejante a la que se puede observar con el sulfato de condroitina, se podría considerar la sustitución de este ya que el tratamiento con un ión puede generar un patrón de expresión similar al de la fuente de carbono de difícil adquisición como el sulfato de condroitina. Adicionalmente, en *A. paragallinarum* varios experimentos hechos en el CICM han mostrado que esta bacteria es de difícil cultivo y que las expresiones heterólogas de genes de fimbrias en el modelo *E. coli* han resultado relativamente limitadas (Romero y Pérez, 2018), porque la expresión

de los genes de *A. paragallinarum* han dado poco rendimiento para su valoración como inmunógenos individuales. Hoy con la posibilidad de sobre expresar genes de virulencia de *A. paragallinarum* de forma homóloga con Fe(III), se puede observar un futuro más prometedor para usar cultivos de *A. paragallinarum* con mejores contenidos de proteínas de virulencia que puedan ser mejores bacterinas. Considerando la sencillez del procedimiento de inducción de genes de virulencia como blancos para su valoración inmunológica, esperamos ver pronto algunas opciones de bacterinas más eficientes que coadyuven a controlar de mejor forma la Coriza Infecciosa respecto a escenario actual.

IX. CONCLUSIONES

Se logró hacer cultivos para la comparación de perfiles de expresión de genes de virulencia entre las cepas AVPG2015 y COJ7 de *A. paragallinarum*. Las condiciones de cultivo específicas fueron, BHI solo como control, reducido en hierro, suplementado con hierro o sulfato de condroitina.

Se diseñaron 56 juegos de oligonucleótidos de los cuales fueron seleccionados 32 para hacer la amplificación por RT-qPCR de 5 genes domésticos y 11 genes relacionados con virulencia. El 100% de los juegos de oligonucleótidos diseñados amplificaron, generando un solo amplicón.

Se obtuvo RNA total de todas las muestras analizadas con sus triplicados. La media de concentración obtenida después del tratamiento con DNAsas fue de 80.16 ± 7.44 ng/ μ L con una media de pureza de 2.07 ± 0.06 en una A260/280.

Se estandarizó y desarrollaron las RT-qPCR en todos los genes propuestos.

Se realizó el análisis estadístico conforme al método de 2^{-ddCT} .

Los factores de virulencia que se expresaron de forma significativa en la totalidad del estudio fueron: Fur, ChI1, OmpA, ChI2 y FhaB.

Los mejores genes domésticos normalizadores para el estudio fueron *rpoB* y *atpD* de acuerdo con el análisis estadístico realizado mediante el algoritmo de NormFinder.

En los genes *avxA* de las dos cepas estudiadas se observó un rango de expresión de 0.947 - 0.434 veces respecto al normalizador, lo que equivale al 10% del total de genes de virulencia estudiados en este trabajo.

Aproximadamente el 90% (diez de once) de los genes de virulencia de *A. paragallinarum* mostraron incrementos de expresión relativa en alguna de las condiciones estudiadas.

El estudio de RT-qPCR mostró que los genes de virulencia analizados siempre se expresan, aunque, el nivel de expresión varía en cada gen en función de las sustancias suplementadas en el medio de cultivo.

Se observan importantes variaciones de expresión entre fase exponencial y fase estacionaria de los genes de virulencia analizados en *A. paragallinarum*, en función de la cepa y de la condición de cultivo, por lo que es importante cuidar la curva de crecimiento en los estudios de expresión en una misma cepa o de comparaciones entre cepas.

La suplementación con hierro afecta en el 65% de las condiciones probadas, el 56% se afecta por el uso de 2-2' dipirydyl, y 36% se afecta por la suplementación con sulfato de condroitina. Debido al costo de uso del sulfato de condroitina y a su dificultad de adquisición se considera conveniente utilizar hierro para la sobreexpresión de factores de virulencia en cultivos vacunales.

X. PERSPECTIVAS

Hacer estudios de RT-qPCR en *A. paragallinarum* centrados en la suplementación y depleción de hierro asociados a cultivos en experimentos moleculares comparativos y de elaboración de bacterinas.

Hacer estudios de RT-qPCR en *A. paragallinarum* centrados en la suplementación de otras fuentes de carbono para análisis de virulencia más amplios.

Investigar a nivel de regulación transcripcional la activación de Fur en ausencia y presencia de hierro además de los genes de *avxA*, *chl1* y *chl2*.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayanur, Anjaneya & SD, Singh & Dhama, Kuldeep & V, Gowthaman & Chawak, Mm., (2013). Pathogenicity study of field isolates of *Avibacterium paragallinarum* in experimentally infected birds. *Indian Journal of Veterinary Pathology*, 37(1): 13-17.
- Abascal, E. N., Guerra, A. C., Vázquez, A. S., Tenorio, V. R., Cruz, C. V., Zenteno, E., Contreras, G. P., & Pacheco, S. V. (2009). Identification of iron-acquisition proteins of *Avibacterium paragallinarum*. *Avian pathology: journal of the W.V.P.A.*, 38(3), 209–213. <https://doi.org/10.1080/03079450902912143>.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.*; 64: 5245-5250.
- Ando-Sugimoto, E. S., da Silva, M. P., Kawamoto, D., Chen, C., DiRienzo, J. M., & Mayer, M. P. (2014). The cytolethal distending toxin of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* inhibits macrophage phagocytosis and subverts cytokine production. *Cytokine*, 66(1), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.12.014>
- Aoki SK, Pamma R, Hernday AD, Bickham JE, Braaten BA, Low DA. (2005) Microbiology: Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science* (80-). Aug 19;309(5738):1245–8.
- Beier, D., & Gross, R. (2006). Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Current opinion in microbiology*, 9(2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.01.00513-14>.
- Bernstein HD. (2019). Type V Secretion in Gram-Negative Bacteria. *EcoSal Plus*. Feb 6;8(2).
- Blackall P. J., Christensen H., Bisgaard. (2011). Unusual growth variants of *Avibacterium paragallinarum*. *Australian Veterinary Journal*. 89: 273-275. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2011. 00714.x
- Blackall P. J., Soriano E. (2020). Infectious Coryza and Related Bacterial Infectious Diseases of poultry 14th editorial Iowa State University Press, Ames, Iowa Section II, Capitulo 20. 890- 906.
- Blackall, P.J., Christensen, H., Beckenham, T., Blackall, 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 volantium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 353-362, doi: 10.1099/ijs.0.63357-0.
- Blackall, P., (1999). Infectious Coryza: Overview of the Disease and New Diagnostic Options. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 627–632.
- Bland, M. P., A. A. Bickford, B. R. Charlton, G. C. Cooper, F. Sommer, and G. Cutler. (2002). Case Report: A severe infectious coryza infection in a multi-age layer complex in central California. *Proc 51st Western Poultry Disease Conference/XXVII Convencion Anual ANECA*, 56–57.

- Blazkova, H., Krejčíková, K., Moudry, P., Frisan, T., Hodny, Z., & Bartek, J. (2010). Bacterial intoxication evokes cellular senescence with persistent ADN damage and cytokine signalling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14, 357–367
- Bragg R. (2002). Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 2: Naturally occurring NAD⁺ independent field isolates. *Journal Veterinary Research* 69:171-175.
- Cantarel, B.L.; Coutinho, P.M.; Rancurel, C.; Bernard, T.; Lombard, V.; Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.*, 37(suppl 1), D233-D238.
- Carpenter BM, Whitmire JM, Merrell DS. 2009. This is not your mother's repressor: the complex role of Fur in pathogenesis. *Infect. Immun.* 77:2590 –2601.
- Clantin B, Hodak H, Willery E, Loch C, Jacob-Dubuisson F, Villeret V, (2004) The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:6194-6199
- Cortes-Bratti, X., Chaves-Olarte, E., Lagergård, T., & Thelestam, M. (1999). The cytolethal distending toxin from the chancroid bacterium *Haemophilus ducreyi* induces cell-cycle arrest in the G2 phase. *The Journal of Clinical Investigation*, 103, 107–115
- Cortes-Bratti, X., Karlsson, C., Lagergård, T., Thelestam, M., & Frisan, T. (2001). The *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin induces cell cycle arrest and apoptosis via the ADN damage checkpoint pathways. *The Journal of biological chemistry*, 276(7), 5296–5302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008527200>
- Chen, Y.C., Tan, D.H., Shien, J.H., Hsieh, M.K., Yen, T.Y., Chang, P.C., (2014). Identification and functional analysis of the cytolethal distending toxin gene from *Avibacterium paragallinarum*, *Avian Pathology*, 43(1): 43-50. doi: 10.1080/03079457.2013.861895. <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2013.861895>
- Chevalier N, Moser M, Koch HG, Schimz KL, Willery E, Loch C, Jacob-Dubuisson F, Müller M. (2004). Membrane targeting of a bacterial virulence factor harbouring an extended signal peptide. *J Mol Microbiol Biotechnol* 8:7–18. <http://dx.doi.org/10.1159/000082076>.
- Christensen, H., Kuhnert, P., Olsen, J. E., & Bisgaard, M. (2004). Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(Pt 5), 1601–1609. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.03018-0>
- Damek-Poprawa, M., Korostoff, J., Gill, R., & DiRienzo, J. M. (2013). Cell Junction Remodeling in Gingival Tissue Exposed to a Microbial Toxin. *Journal of Dental Research*, 92(6), 518–523. <https://doi.org/10.1177/0022034513486807>.
- Dodd DA, Worth RG, Rosen MK, Grinstein S, van Oers NSC, Hansen EJ. (2014). The *haemophilus ducreyi* Ispa1 protein inhibits phagocytosis by using a new mechanism involving Activation of C-terminal src kinase. *MBio*. May 20;5(3).

- Drobnak I, Braselmann E, Chaney JL, Leyton DL, Bernstein HD, Lithgow T, et al. (2015). Of linkers and autochaperones: An unambiguous nomenclature to identify common and uncommon themes for autotransporter secretion. Vol. 95, *Molecular Microbiology*. Blackwell Publishing Ltd; p. 1–16.
- Droual, R., A. A. Bickford, B. R. Charlton, G. L. Cooper, and S. E. Channing. (1990). Infectious coryza in meat chickens in the San Joaquin Valley of California. *Avian Dis* 34:1009–10016.
- Ellermeier JR, Slauch JM. (2008). Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through HilD. *J. Bacteriol.* 190:476–486.
- Ernst JF, Bennett RL, Rothfield LI. (1978). Constitutive expression of the iron-enterochelin and ferrichrome uptake systems in a mutant strain of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 135:928–934.
- Eshraghi, A., Maldonado-Arocho, F. J., Gargi, A., Cardwell, M. M., Prouty, M. G., Blanke, S. R., & Bradley, K. A. (2010). Cytolethal distending toxin family members are differentially affected by alterations in host glycans and membrane cholesterol. *The Journal of biological chemistry*, 285(24), 18199–18207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.112912>.
- Fairman JW, Noinaj N, Buchanan SK. (2011). The structural biology of β -barrel membrane proteins: a summary of recent reports. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21, 523–531. (doi: 10.1016/j.sbi.2011.05.005).
- Fan E, Chauhan N, Udatha DBRKG, Leo JC, Linke D. (2016). Type V Secretion Systems in Bacteria. *Microbiol Spectr.* Jan 29;4(1).
- Fedor, Y., Vignard, J., Nicolau-Travers, M. L., Boutet-Robinet, E., Watrin, C., Salles, B., & Mirey, G. (2013). From single-strand breaks to double-strand breaks during S-phase: a new mode of action of the *Escherichia coli* Cytolethal Distending Toxin. *Cellular microbiology*, 15(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/cmi.12028>
- Fournier C, Smith A, Delepelaire P. (2011). Haem release from haemopexin by HxuA allows *Haemophilus influenzae* to escape host nutritional immunity. *Mol Microbiol.* Apr;80(1):133–48.
- Fox, J. G., Rogers, A. B., Whary, M. T., Ge, Z., Taylor, N. S., Xu, S., Horwitz, B. H., & Erdman, S. E. (2004). Gastroenteritis in NF-kappaB-deficient mice is produced with wild-type *Campylobacter jejuni* but not with C. jejuni lacking cytolethal distending toxin despite persistent colonization with both strains. *Infection and immunity*, 72(2), 1116–1125. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.1116-1125.2004>.
- Gerlach G., Reidl J. (2006). NAD⁺ Utilization in *Pasteurellaceae*: Simplification of a Complex Pathway. *Journal of Bacteriology.* 188: 6719-6727. doi: 10.1128/JB.00432-06.
- Guerrero, Z. (2018). Anotación del genoma de *Avibacterium paragallinarum* cepa 5. (Tesis de Maestría). Centro De Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. Puebla, Puebla, México.
- Gutierrez, L., Mauriat, M., Guénin, S., Pelloux, J., Lefebvre, J. F., Louvet, R., Rusterucci, C., Moritz, T., Guerineau, F., Bellini, C., & Van Wuytswinkel, O. (2008). The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

- analysis in plants. *Plant biotechnology journal*, 6(6), 609–618. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00346.x>
- Hodak H, Wohlkönig A, Smet-Nocca C, Drobecq H, Wieruszkeski JM, Sénéchal M, Landrieu I, Loch C, Jamin M, Jacob-Dubuisson F. (2008). The peptidyl-prolyl isomerase and chaperone Par27 of *Bordetella pertussis* as the prototype for a new group of parvulins. *J Mol Biol* 376:414–426. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2007.10.088>.
- Hoerr, F. J., M. Putnam, S. Rowe-Rossmanith, W. Cowart, and J. Martin. 1994. Case report: Infectious coryza in broiler chickens in Alabama. *Proc 43rd Western Poultry Disease Conference*, 42.
- Horta-Valerdi G, Sanchez-Alonso MP, Perez-Marquez VM, Negrete-Abascal E, Vaca-Pacheco S, Hernandez-Gonzalez I, Gomez-Lunar Z, Olmedo-Álvarez G, Vazquez-Cruz C. (2017). The genome sequence of *Avibacterium paragallinarum* strain CL has a large repertoire of insertion sequence elements. *Genome Announc* 5:e00152-17. doi: 10.1128/genomeA.00152-17.
- Huo C, Zeng X, Xu F, Li F, Li D, Li G, Hu Z, Hu Y, Lin J and Sun H (2021) The Transcriptomic and Bioinformatic Characterizations of Iron Acquisition and Heme Utilization in *Avibacterium paragallinarum* in Response to Iron-Starvation. *Front. Microbiol.* 12:610196. doi: 10.3389/fmicb.2021.610196.
- Isabella V, Wright LF, Barth K, Spence JM, Grogan S, Genco CA, Clark VL. (2008). cis- and trans-acting elements involved in regulation of norB (norZ), the gene encoding nitric oxide reductase in *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbiology* 154:226–239.
- Iozzo, R.V. (1998). Matrix proteoglycans: From molecular design to cellular function. *Ann. Rev. Biochem.*, 67(1), 609-652.
- Jacob, T. R., Laia, M. L., Ferro, J. A., & Ferro, M. I. (2011). Selection and validation of reference genes for gene expression studies by reverse transcription quantitative PCR in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* during infection of *Citrus sinensis*. *Biotechnology letters*, 33(6), 1177–1184. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0552-5>
- Jain, D.; Prasad, K.N.; Sinha, S.; Husain, N. (2008). Differences in virulence attributes between cytolethal distending toxin positive and negative *Campylobacter jejuni* strains. *J. Med Microbiol.*, 57, 267–272.
- Jin, M.; Iwamoto, T.; Yamada, K.; Satsu, H.; Totsuka, M. (2010). Shimizu, M. Disaccharide derived from chondroitin sulfate A suppressed CpG-induced IL-6 secretion in macrophage-like J774. 1 cells. *Cytokine*, 51(1), 53-59.
- Kajava AV, Cheng N, Cleaver R, Kessel M, Simon MN, Willery E, Jacob-Dubuisson F, Loch C, Steven AC. (2001). Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins. *Mol Microbiol* 42:279–292. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02598.x>.
- Kałużna M, Kuras A, Puławska J. (2017). Validation of reference genes for the normalization of the RT-qPCR gene expression of virulence genes of *Erwinia amylovora* in apple shoots. *Sci Rep*;7(1):2034. doi: 10.1038/s41598-017-02078-4.

- Küng, Eliane; Frey, Joachim (2013). AvxA, a composite serine-protease-RTX toxin of *Avibacterium paragallinarum*. *Veterinary Microbiology*, 163(3-4), 290–298. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.12.029
- Lara-Tejero, M., Galán, E., (2002). Cytolethal distending toxin: limited damage as a strategy to modulate cellular functions, In *Trends in Microbiology*, 10(3): 147-152. DOI: 10.1016/s0966-842x(02)02316-8.
- Lara-Tejero, M., & Galán, J. E. (2000). A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5490), 354–357. <https://doi.org/10.1126/science.290.5490.354>
- Leo JC, Grin I, Linke D. (2012). Type V secretion: Mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. Vol. 367, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Royal Society; p. 1088–101.
- Li L, Ding C, Duan J-I, Yang M-f, Sun Y, Wang X-q, et al. (2013). A New Functional Site W115 in CdtA Is Critical for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Cytolethal Distending Toxin. *PLoS ONE* 8(6): e65729. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065729>.
- Link, S., Schmitt, K., Beier, D., & Gross, R. (2007). Identification and regulation of expression of a gene encoding a filamentous hemagglutinin-related protein in *Bordetella holmesii*. *BMC microbiology*, 7, 100. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-100>.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Liu, D. F., Phillips, E., Wizemann, T. M., Siegel, M. M., Tabei, K., Cowell, J. L., & Tuomanen, E. (1997). Characterization of a recombinant fragment that contains a carbohydrate recognition domain of the filamentous hemagglutinin. *Infection and immunity*, 65(8), 3465–3468. <https://doi.org/10.1128/iai.65.8.3465-3468.1997>
- Mao, X., & DiRienzo, J. M. (2002). Functional studies of the recombinant subunits of a cytolethal distending holotoxin. *Cellular Microbiology*, 4, 245–255
- Mattoo, S., & Cherry, J. D. (2005). Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clinical microbiology reviews*, 18(2), 326–382. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.326-382.2005>.
- Menzio, F. D., Mutombo, R., Renauld, G., Gantiez, C., Hannah, J. H., Leininger, E., Brennan, M. J., & Locht, C. (1994). Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infection and immunity*, 62(3), 769–778. <https://doi.org/10.1128/iai.62.3.769-778>.
- Mey, A. R., Wyckoff, E. E., Kanukurthy, V., Fisher, C. R., & Payne, S. M. (2005). Iron and fur regulation in *Vibrio cholerae* and the role of fur in virulence. *Infection and immunity*, 73(12), 8167–8178. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.8167-8178.2005>
- Miyoshi S, Shinoda S (2000) Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect* 2:91–98 doi:10.1016/s1286-4579(00)00280-x
- Negrete E., Vaca S., García O., Tavares F., Andrade A., García R. (2002). Isolation of a putative fliC sequence in *H. paragallinarum* and *P. multocida*. *Proceeding*

- of the International *Pasteurellaceae* Society Conference May 5. Banff (Alberta) Canada (Guelph): International *Pasteurellaceae* Society. 2002:37.
- Nicot, N., Hausman, J. F., Hoffmann, L., & Evers, D. (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of experimental botany*, 56(421), 2907–2914. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri285>
- Noël CR, Mazar J, Melvin JA, Sexton JA, Cotter PA. (2012). The prodomain of the *Bordetella* two-partner secretion pathway protein FhaB remains intracellular yet affects the conformation of the mature C-terminal domain. *Mol Microbiol* 86:988–1006. <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.12036>
- Pérez A, Merino M, Rumbo-Feal S, Álvarez-Fraga L, Vallejo JA, Beceiro A, et al. (2017). The FhaB/FhaC two-partner secretion system is involved in adhesion of *Acinetobacter baumannii* AbH12O-A2 strain. *Virulence* [Internet]. 8(6):959–74. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27858524>
- Persson, G., Bojesen, A.M., (2015). Bacterial determinants of importance in the virulence of *Gallibacterium anatis* in poultry. *Veterinary Research*, 46(1): 57. doi: 10.1186/s13567-015-0206-z
- Petersen, K. D., Christensen, H., Bisgaard, M., & Olsen, J. E. (2001). Genetic diversity of *Pasteurella multocida* fowl cholera isolates as demonstrated by ribotyping and 16S rRNA and partial *atpD* sequence comparisons. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 10), 2739–2748. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-10-2739>
- Pons, B.J.; Vignard, J.; Mirey, G. (2019) Cytolethal Distending Toxin Subunit B: A Review of Structure–Function Relationship. *Toxins*, 11, 595. <https://doi.org/10.3390/toxins11100595>
- Qin Zhao, Ya-ni S., Xing-xiao Z., Yi-bo K., Zhi-jing X., Yan-li Z., En-min Z., Shi-Jin J. (2010). Evaluation of two experimental infection models for *Avibacterium paragallinarum*. *Veterinary Microbiology*. 141:68-72. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.07.034
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W., & Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and biophysical research communications*, 313(4), 856–862. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.177>
- Rani, A.; Patel, S.; Goyal, A. (2018). Chondroitin Sulfate (CS) Lyases: Structure, Function and Application in Therapeutics. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 19, 22-33. DOI: 10.2174/1389203718666170102112805.
- Rivero-García, P. C., Cruz, C. V., Alonso, P. S., Vaca, S., & Negrete-Abascal, E. (2005). *Haemophilus paragallinarum* secretes metalloproteases. *Canadian journal of microbiology*, 51(10), 893–896. <https://doi.org/10.1139/w05-067>
- Rivero, G., Vázquez, C., Sánchez, A.P., Vaca, S., Negrete Abascal, E., (2005). *Haemophilus paragallinarum* secretes metalloproteases. *Can. J. Microbiol* 51:893-896. DOI: 10.1139/w05-067.
- Romero Hernández Brenda y Pérez Cortes Fernando. (2018). Clonación de genes que codifican proteínas fimbriales en *Avibacterium paragallinarum* para la generación de proteínas recombinantes. Tesis de licenciatura en Biotecnología BUAP.

- Rodríguez G.M., Rodríguez L.W. (2006) PCR en tiempo real. IBT-UNAM. 6-8. http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/realtime_pcr.pdf
- Rollauer SE, Soorshjani MA, Noinaj N, Buchanan SK. (2015) Outer membrane protein biogenesis in Gram-negative bacteria. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370: 20150023. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2015.0023>.
- Sambrook J, Russell D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbour Laboratory Press: Cold Spring Harbour, NY.
- Serrano A., García R., Vaca S., Negrete E. (2005). Motilidad *in Vitro* de *Haemophilus paragallinarum*. *Avances de la Biotecnología Agropecuaria y Forestal*, A.C. (Eds: Héctor González Rosas y Carmen Jacinto Hernández) 229-239.
- Shaya, D.; Hahn, B.S.; Park, N.Y.; Sim, J.S.; Kim, Y.S. (2008); Cygler, M. Characterization of chondroitin sulfate lyase ABC from *Bacteroides thetaiotaomicron* WAL2926. *Biochemistry*, 47, 6650-6661.
- Soriano E., Terzolo H. (2004). *Haemophilus paragallinarum* Etiología de la coriza infecciosa. *Veterinaria México*. 35: 245-259.
- Svensson, L. A., Tarkowski, A., Thelestam, M., & Lagergård, T. (2001). The impact of *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin on cells involved in immune response. *Microbial pathogenesis*, 30(3), 157–166. <https://doi.org/10.1006/mpat.2000.0422>.
- Yamada, S.; Sugahara, K. (2008) Potential therapeutic application of chondroitin sulfate/dermatan sulfate. *Curr. Drug Discov. Technol.*, 5, 289-301.
- Ye, X., Zhang, L., Dong, H., Tian, Y., Lao, H., Bai, J., & Yu, L. (2010). Validation of reference genes of grass carp *Ctenopharyngodon idellus* for the normalization of quantitative real-time PCR. *Biotechnology letters*, 32(8), 1031–1038. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0258-0>
- Yen-Chiang Pan, Duen-Huey Tan, Jui-Hung Shien, Chun-Chi Liu, Yi-Siang He, Pin-Chun Shen and Poa-Chun Chang. (2012). Identification and Characterization of an RTX Toxin–Like Gene and Its Operon from *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Diseases* Vol. 56, No. 3, pp. 537-544. <https://doi.org/10.1637/10047-122211-Reg.1>.
- Yu C, Genco CA. (2012). Fur-mediated activation of gene transcription in the human pathogen *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* 194:1730 –1742.
- Wang, Yi-Ping; Hsieh, Ming-Kun; Tan, Duen-Huey; Shien, Jui-Hung; Ou, Shan-Chia; Chen, Chih-Feng; Chang, Poa-Chun (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. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.10.013
- Wen S, Chen X, Xu F, Sun H (2016) Validation of Reference Genes for Real-Time Quantitative PCR (qPCR) Analysis of *Avibacterium paragallinarum*. *PLOS ONE* 11(12): e0167736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167736>.
- Whelan R, McVicker G, Leo JC. (2020). Staying out or going in? The interplay between type 3 and type 5 secretion systems in adhesion and invasion of enterobacterial pathogens. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; p. 1–33.
- Wu JR, Wu YR, Shien JH, Hsu YM, Chen CF, Shieh HK, Chang PC. (2011). Recombinant proteins containing the hypervariable region of the

haemagglutinin protect chickens against challenge with *Avibacterium paragallinarum*. Vaccine. 29:660–667;

XII. ANEXOS

Anexo 1. Alineamientos realizados para los 28 juegos de oligonucleótidos diseñados y sintetizados. En cuadro rojo Fw, cuadro azul Rv1 (correspondientes al diseño 1) y en cuadro verde Fw2, cuadro turquesa Rv2 (correspondientes al diseño 2).

atpD MODESTO	208	ACCCTAGGACGTATTAT-GAACGTACTGGGTGAACCAATTGACGAACAGGCCCAATTGG	266	atpD MODESTO	326	GCACAGAATTGCTTGAACAGGGAT-AAAAGTTATCGACTTAATCTGCCCAATTGCAAAAG	385
atpD 0222	208	ACCCTAGGACGTATTAT-GAACGTACTGGGTGAACCAATTGACGAACAGGCCCAATTGG	266	atpD 0222	326	GCACAGAATTGCTTGAACAGGGAT-AAAAGTTATCGACTTAATCTGCCCAATTGCAAAAG	385
atpD AVPG 72	241	ACCCTAGGACGTATTAT-GAACGTACTGGGTGAACCAATTGACGAACAGGCCCAATTGG	299	atpD AVPG 72	359	GCACAGAATTGCTTGAACAGGGAT-AAAAGTTATCGACTTAATCTGCCCAATTGCAAAAG	418
atpD AVPG2015	241	ACCCTAGGACGTATTAT-GAACGTACTGGGTGAACCAATTGACGAACAGGCCCAATTGG	299	atpD AVPG2015	359	GCACAGAATTGCTTGAACAGGGAT-AAAAGTTATCGACTTAATCTGCCCAATTGCAAAAG	418
atpD AVPG221 comp.prj	241	ACCCTAGGACGTATTAT-GAACGTACTGGGTGAACCAATTGACGAACAGGCCCAATTGG	299	atpD AVPG221 comp.prj	359	GCACAGAATTGCTTGAACAGGGAT-AAAAGTTATCGACTTAATCTGCCCAATTGCAAAAG	418
atpD CL	241	ACCCTAGGACGTATTAT-GAACGTACTGGGTGAACCAATTGACGAACAGGCCCAATTGG	299	atpD CL	359	GCACAGAATTGCTTGAACAGGGAT-AAAAGTTATCGACTTAATCTGCCCAATTGCAAAAG	418
atpD FARPER174 comp.prj	241	ACCCTAGGACGTATTAT-GAACGTACTGGGTGAACCAATTGACGAACAGGCCCAATTGG	299	atpD FARPER174 comp.prj	359	GCACAGAATTGCTTGAACAGGGAT-AAAAGTTATCGACTTAATCTGCCCAATTGCAAAAG	418
atpD JF4211	241	ACCCTAGGACGTATTAT-GAACGTACTGGGTGAACCAATTGACGAACAGGCCCAATTGG	299	atpD JF4211	359	GCACAGAATTGCTTGAACAGGGAT-AAAAGTTATCGACTTAATCTGCCCAATTGCAAAAG	418
atpD MODESTO (2)	241	ACCCTAGGACGTATTAT-GAACGTACTGGGTGAACCAATTGACGAACAGGCCCAATTGG	299	atpD MODESTO (2)	359	GCACAGAATTGCTTGAACAGGGAT-AAAAGTTATCGACTTAATCTGCCCAATTGCAAAAG	418
atpD MODESTO	267	TGCAGAA-AAAATTGGTCAATTCACCGACCAGCACCAGCTATGAAGATCAAGCAAACA	325	atpD MODESTO	386	GGGGTAAAGTTGGTTATTTCGGTGGTGGGGTGTAGGTAAAACCGTAAATATGATGGAAT	445
atpD 0222	267	TGCAGAA-AAAATTGGTCAATTCACCGACCAGCACCAGCTATGAAGATCAAGCAAACA	325	atpD 0222	386	GGGGTAAAGTTGGTTATTTCGGTGGTGGGGTGTAGGTAAAACCGTAAATATGATGGAAT	445
atpD AVPG 72	300	TGCAGAA-AAAATTGGTCAATTCACCGACCAGCACCAGCTATGAAGATCAAGCAAACA	358	atpD AVPG 72	419	GGGGTAAAGTTGGTTATTTCGGTGGTGGGGTGTAGGTAAAACCGTAAATATGATGGAAT	478
atpD AVPG2015	300	TGCAGAA-AAAATTGGTCAATTCACCGACCAGCACCAGCTATGAAGATCAAGCAAACA	358	atpD AVPG2015	419	GGGGTAAAGTTGGTTATTTCGGTGGTGGGGTGTAGGTAAAACCGTAAATATGATGGAAT	478
atpD AVPG221 comp.prj	300	TGCAGAA-AAAATTGGTCAATTCACCGACCAGCACCAGCTATGAAGATCAAGCAAACA	358	atpD AVPG221 comp.prj	419	GGGGTAAAGTTGGTTATTTCGGTGGTGGGGTGTAGGTAAAACCGTAAATATGATGGAAT	478
atpD CL	300	TGCAGAA-AAAATTGGTCAATTCACCGACCAGCACCAGCTATGAAGATCAAGCAAACA	358	atpD CL	419	GGGGTAAAGTTGGTTATTTCGGTGGTGGGGTGTAGGTAAAACCGTAAATATGATGGAAT	478
atpD FARPER174 comp.prj	300	TGCAGAA-AAAATTGGTCAATTCACCGACCAGCACCAGCTATGAAGATCAAGCAAACA	358	atpD FARPER174 comp.prj	419	GGGGTAAAGTTGGTTATTTCGGTGGTGGGGTGTAGGTAAAACCGTAAATATGATGGAAT	478
atpD JF4211	300	TGCAGAA-AAAATTGGTCAATTCACCGACCAGCACCAGCTATGAAGATCAAGCAAACA	358	atpD JF4211	419	GGGGTAAAGTTGGTTATTTCGGTGGTGGGGTGTAGGTAAAACCGTAAATATGATGGAAT	478
atpD MODESTO (2)	300	TGCAGAA-AAAATTGGTCAATTCACCGACCAGCACCAGCTATGAAGATCAAGCAAACA	358	atpD MODESTO (2)	419	GGGGTAAAGTTGGTTATTTCGGTGGTGGGGTGTAGGTAAAACCGTAAATATGATGGAAT	478
atpD MODESTO	326	GCACAGAATTGCTTGAACAGGGAT-AAAAGTTATCGACTTAATCTGCCCAATTGCAAAAG	385	atpD MODESTO	446	TAAATCCGTAAATTTGCGATCGAACACTCAGGTTACTCTGTATTTCGGTGGTGGTGAAC	505
atpD 0222	326	GCACAGAATTGCTTGAACAGGGAT-AAAAGTTATCGACTTAATCTGCCCAATTGCAAAAG	385	atpD 0222	446	TAAATCCGTAAATTTGCGATCGAACACTCAGGTTACTCTGTATTTCGGTGGTGGTGAAC	505
atpD AVPG 72	359	GCACAGAATTGCTTGAACAGGGAT-AAAAGTTATCGACTTAATCTGCCCAATTGCAAAAG	418	atpD AVPG 72	479	TAAATCCGTAAATTTGCGATCGAACACTCAGGTTACTCTGTATTTCGGTGGTGGTGAAC	538
atpD AVPG2015	359	GCACAGAATTGCTTGAACAGGGAT-AAAAGTTATCGACTTAATCTGCCCAATTGCAAAAG	418	atpD AVPG2015	479	TAAATCCGTAAATTTGCGATCGAACACTCAGGTTACTCTGTATTTCGGTGGTGGTGAAC	538
atpD AVPG221 comp.prj	359	GCACAGAATTGCTTGAACAGGGAT-AAAAGTTATCGACTTAATCTGCCCAATTGCAAAAG	418	atpD AVPG221 comp.prj	479	TAAATCCGTAAATTTGCGATCGAACACTCAGGTTACTCTGTATTTCGGTGGTGGTGAAC	538
atpD CL	359	GCACAGAATTGCTTGAACAGGGAT-AAAAGTTATCGACTTAATCTGCCCAATTGCAAAAG	418	atpD CL	479	TAAATCCGTAAATTTGCGATCGAACACTCAGGTTACTCTGTATTTCGGTGGTGGTGAAC	538
atpD FARPER174 comp.prj	359	GCACAGAATTGCTTGAACAGGGAT-AAAAGTTATCGACTTAATCTGCCCAATTGCAAAAG	418	atpD FARPER174 comp.prj	479	TAAATCCGTAAATTTGCGATCGAACACTCAGGTTACTCTGTATTTCGGTGGTGGTGAAC	538
atpD JF4211	359	GCACAGAATTGCTTGAACAGGGAT-AAAAGTTATCGACTTAATCTGCCCAATTGCAAAAG	418	atpD JF4211	479	TAAATCCGTAAATTTGCGATCGAACACTCAGGTTACTCTGTATTTCGGTGGTGGTGAAC	538
atpD MODESTO (2)	359	GCACAGAATTGCTTGAACAGGGAT-AAAAGTTATCGACTTAATCTGCCCAATTGCAAAAG	418	atpD MODESTO (2)	479	TAAATCCGTAAATTTGCGATCGAACACTCAGGTTACTCTGTATTTCGGTGGTGGTGAAC	538
atpD MODESTO	386	GGGGTAAAGTTGGTTATTTCGGTGGTGGGGTGTAGGTAAAACCGTAAATATGATGGAAT	445	atpD MODESTO	506	GATCCCGTGAAGGTAACGACTTC-ACCACGAAATGACGSAATCTAACGATTAGACAAG	565
atpD 0222	386	GGGGTAAAGTTGGTTATTTCGGTGGTGGGGTGTAGGTAAAACCGTAAATATGATGGAAT	445	atpD 0222	506	GATCCCGTGAAGGTAACGACTTC-ACCACGAAATGACGSAATCTAACGATTAGACAAG	565
atpD AVPG 72	419	GGGGTAAAGTTGGTTATTTCGGTGGTGGGGTGTAGGTAAAACCGTAAATATGATGGAAT	478	atpD AVPG 72	539	GATCCCGTGAAGGTAACGACTTC-ACCACGAAATGACGSAATCTAACGATTAGACAAG	598
atpD AVPG2015	419	GGGGTAAAGTTGGTTATTTCGGTGGTGGGGTGTAGGTAAAACCGTAAATATGATGGAAT	478	atpD AVPG2015	539	GATCCCGTGAAGGTAACGACTTC-ACCACGAAATGACGSAATCTAACGATTAGACAAG	598
atpD AVPG221 comp.prj	419	GGGGTAAAGTTGGTTATTTCGGTGGTGGGGTGTAGGTAAAACCGTAAATATGATGGAAT	478	atpD AVPG221 comp.prj	539	GATCCCGTGAAGGTAACGACTTC-ACCACGAAATGACGSAATCTAACGATTAGACAAG	598
atpD CL	419	GGGGTAAAGTTGGTTATTTCGGTGGTGGGGTGTAGGTAAAACCGTAAATATGATGGAAT	478	atpD CL	539	GATCCCGTGAAGGTAACGACTTC-ACCACGAAATGACGSAATCTAACGATTAGACAAG	598
atpD FARPER174 comp.prj	419	GGGGTAAAGTTGGTTATTTCGGTGGTGGGGTGTAGGTAAAACCGTAAATATGATGGAAT	478	atpD FARPER174 comp.prj	539	GATCCCGTGAAGGTAACGACTTC-ACCACGAAATGACGSAATCTAACGATTAGACAAG	598
atpD JF4211	419	GGGGTAAAGTTGGTTATTTCGGTGGTGGGGTGTAGGTAAAACCGTAAATATGATGGAAT	478	atpD JF4211	539	GATCCCGTGAAGGTAACGACTTC-ACCACGAAATGACGSAATCTAACGATTAGACAAG	598
atpD MODESTO (2)	419	GGGGTAAAGTTGGTTATTTCGGTGGTGGGGTGTAGGTAAAACCGTAAATATGATGGAAT	478	atpD MODESTO (2)	539	GATCCCGTGAAGGTAACGACTTC-ACCACGAAATGACGSAATCTAACGATTAGACAAG	598

rpoB AVPG 221	1967	TATCGACCAA-AAAATCGTTTCGTGGCAG-SCAGCGCTTA-TC	2024
rpoB AVPG 72	1967	TATCGACCAA-AAAATCGTTTCGTGGCAG-SCAGCGCTTA-TC	2024
rpoB AVPG CL complement.prj	1967	TATCGACCAA-AAAATCGTTTCGTGGCAG-SCAGCGCTTA-TC	2024
rpoB AVPG FARPER174 complement.prj	1967	TATCGACCAA-AAAATCGTTTCGTGGCAG-SCAGCGCTTA-TC	2024
rpoB AVPG JF4211	1967	TATCGACCAA-AAAATCGTTTCGTGGCAG-SCAGCGCTTA-TC	2024
rpoB AVPG MODESTO 2 complement.prj	1967	TATCGACCAA-AAAATCGTTTCGTGGCAG-SCAGCGCTTA-TC	2024
rpoB AVPG MODESTO complement.prj	1967	TATCGACCAA-AAAATCGTTTCGTGGCAG-SCAGCGCTTA-TC	2024
rpoB AVPG2015 complement.prj	1967	TATCGACCAA-AAAATCGTTTCGTGGCAG-SCAGCGCTTA-TC	2024
rpoB AVPG 221	2025	TGATGCGAACCG-SCCITGATGGG-SCGAAACATGCAACGCCAAGC-SC	2084
rpoB AVPG 72	2025	TGATGCGAACCG-SCCITGATGGG-SCGAAACATGCAACGCCAAGC-SC	2084
rpoB AVPG CL complement.prj	2025	TGATGCGAACCG-SCCITGATGGG-SCGAAACATGCAACGCCAAGC-SC	2084
rpoB AVPG FARPER174 complement.prj	2025	TGATGCGAACCG-SCCITGATGGG-SCGAAACATGCAACGCCAAGC-SC	2084
rpoB AVPG JF4211	2025	TGATGCGAACCG-SCCITGATGGG-SCGAAACATGCAACGCCAAGC-SC	2084
rpoB AVPG MODESTO 2 complement.prj	2025	TGATGCGAACCG-SCCITGATGGG-SCGAAACATGCAACGCCAAGC-SC	2084
rpoB AVPG MODESTO complement.prj	2025	TGATGCGAACCG-SCCITGATGGG-SCGAAACATGCAACGCCAAGC-SC	2084
rpoB AVPG2015 complement.prj	2025	TGATGCGAACCG-SCCITGATGGG-SCGAAACATGCAACGCCAAGC-SC	2084
rpoB AVPG 221	2085	TGCGGATAAACCAATTAGTCGGTACAGGTATGGAAAAACCGGTGGCGTTAGAC-TC	2143
rpoB AVPG 72	2085	TGCGGATAAACCAATTAGTCGGTACAGGTATGGAAAAACCGGTGGCGTTAGAC-TC	2143
rpoB AVPG CL complement.prj	2085	TGCGGATAAACCAATTAGTCGGTACAGGTATGGAAAAACCGGTGGCGTTAGAC-TC	2143
rpoB AVPG FARPER174 complement.prj	2085	TGCGGATAAACCAATTAGTCGGTACAGGTATGGAAAAACCGGTGGCGTTAGAC-TC	2143
rpoB AVPG JF4211	2085	TGCGGATAAACCAATTAGTCGGTACAGGTATGGAAAAACCGGTGGCGTTAGAC-TC	2143
rpoB AVPG MODESTO 2 complement.prj	2085	TGCGGATAAACCAATTAGTCGGTACAGGTATGGAAAAACCGGTGGCGTTAGAC-TC	2143
rpoB AVPG MODESTO complement.prj	2085	TGCGGATAAACCAATTAGTCGGTACAGGTATGGAAAAACCGGTGGCGTTAGAC-TC	2143
rpoB AVPG2015 complement.prj	2085	TGCGGATAAACCAATTAGTCGGTACAGGTATGGAAAAACCGGTGGCGTTAGAC-TC	2143
rpoB AVPG 221	2144	TTCGCGTTGTAGCAAAACGTGGTGGAAACAATCCAATA-TC	2203
rpoB AVPG 72	2144	TTCGCGTTGTAGCAAAACGTGGTGGAAACAATCCAATA-TC	2203
rpoB AVPG CL complement.prj	2144	TTCGCGTTGTAGCAAAACGTGGTGGAAACAATCCAATA-TC	2203
rpoB AVPG FARPER174 complement.prj	2144	TTCGCGTTGTAGCAAAACGTGGTGGAAACAATCCAATA-TC	2203
rpoB AVPG JF4211	2144	TTCGCGTTGTAGCAAAACGTGGTGGAAACAATCCAATA-TC	2203
rpoB AVPG MODESTO 2 complement.prj	2144	TTCGCGTTGTAGCAAAACGTGGTGGAAACAATCCAATA-TC	2203
rpoB AVPG MODESTO complement.prj	2144	TTCGCGTTGTAGCAAAACGTGGTGGAAACAATCCAATA-TC	2203
rpoB AVPG2015 complement.prj	2144	TTCGCGTTGTAGCAAAACGTGGTGGAAACAATCCAATA-TC	2203

chl1 221	1609	GCTGCCATCAAAAATTTGAAAAAGCGTTAGTTTCGCTTGGATCTATAGTAATC-ATAT	1668
chl1 2671 complement	1609	GCTGCCATCAAAAATTTGAAAAAGCGTTAGTTTCGCTTGGATCTATAGTAATC-ATAT	1668
chl1 AVPG2015	1573	GCTGCCATCAAAAATTTGAAAAAGCGTTAGTTTCGCTTGGATCTATAGTAATC-ATAT	1632
chl1 CCUG12835	1609	GCTGCCATCAAAAATTTGAAAAAGCGTTAGTTTCGCTTGGATCTATAGTAATC-ATAT	1668
chl1 fasta	1621	GCTGCCATCAAAAATTTGAAAAAGCGTTAGTTTCGCTTGGATCTATAGTAATC-ATAT	1680
chl1 CL	1573	GCTGCCATCAAAAATTTGAAAAAGCGTTAGTTTCGCTTGGATCTATAGTAATC-ATAT	1632
chl1 FARPER174	1609	GCTGCCATCAAAAATTTGAAAAAGCGTTAGTTTCGCTTGGATCTATAGTAATC-ATAT	1668
chl1 Hp8 complement	1609	GCTGCCATCAAAAATTTGAAAAAGCGTTAGTTTCGCTTGGATCTATAGTAATC-ATAT	1668
chl1 MODESTO 2	1609	GCTGCCATCAAAAATTTGAAAAAGCGTTAGTTTCGCTTGGATCTATAGTAATC-ATAT	1668
chl1 Modesto	955	GCTGCCATCAAAAATTTGAAAAAGCGTTAGTTTCGCTTGGATCTATAGTAATC-ATAT	1014
chl1 SA-3 complement	1609	GCTGCCATCAAAAATTTGAAAAAGCGTTAGTTTCGCTTGGATCTATAGTAATC-ATAT	1668
chl1 SCPM-O-B-8406	1609	GCTGCCATCAAAAATTTGAAAAAGCGTTAGTTTCGCTTGGATCTATAGTAATC-ATAT	1668
chl1 SCPM-O-B-8407	1609	GCTGCCATCAAAAATTTGAAAAAGCGTTAGTTTCGCTTGGATCTATAGTAATC-ATAT	1668
chl1 221	1669	ACGGGGATCGCGTTGG-CGGACGTACCCCTTTTAAAAAGGAATCGCTTTTATCAATCGTT	1728
chl1 2671 complement	1669	ACGGGGATCGCGTTGG-CGGACGTACCCCTTTTAAAAAGGAATCGCTTTTATCAATCGTT	1728
chl1 AVPG2015	1633	ACGGGGATCGCGTTGG-CGGACGTACCCCTTTTAAAAAGGAATCGCTTTTATCAATCGTT	1692
chl1 CCUG12835	1669	ACGGGGATCGCGTTGG-CGGACGTACCCCTTTTAAAAAGGAATCGCTTTTATCAATCGTT	1728
chl1 fasta	1681	ACGGGGATCGCGTTGG-CGGACGTACCCCTTTTAAAAAGGAATCGCTTTTATCAATCGTT	1740
chl1 CL	1633	ACGGGGATCGCGTTGG-CGGACGTACCCCTTTTAAAAAGGAATCGCTTTTATCAATCGTT	1692
chl1 FARPER174	1669	ACGGGGATCGCGTTGG-CGGACGTACCCCTTTTAAAAAGGAATCGCTTTTATCAATCGTT	1728
chl1 Hp8 complement	1669	ACGGGGATCGCGTTGG-CGGACGTACCCCTTTTAAAAAGGAATCGCTTTTATCAATCGTT	1728
chl1 MODESTO 2	1669	ACGGGGATCGCGTTGG-CGGACGTACCCCTTTTAAAAAGGAATCGCTTTTATCAATCGTT	1728
chl1 Modesto	1015	ACGGGGATCGCGTTGG-CGGACGTACCCCTTTTAAAAAGGAATCGCTTTTATCAATCGTT	1074
chl1 SA-3 complement	1669	ACGGGGATCGCGTTGG-CGGACGTACCCCTTTTAAAAAGGAATCGCTTTTATCAATCGTT	1728
chl1 SCPM-O-B-8406	1669	ACGGGGATCGCGTTGG-CGGACGTACCCCTTTTAAAAAGGAATCGCTTTTATCAATCGTT	1728
chl1 SCPM-O-B-8407	1669	ACGGGGATCGCGTTGG-CGGACGTACCCCTTTTAAAAAGGAATCGCTTTTATCAATCGTT	1728
chl1 221	1789	ATTTATTTGACGATTAGTGGGAAAA-CGCAAAACAAGTGC GGTTG-TTTTAATCAAGAA	1848
chl1 2671 complement	1789	ATTTATTTGACGATTAGTGGGAAAA-CGCAAAACAAGTGC GGTTG-TTTTAATCAAGAA	1848
chl1 AVPG2015	1753	ATTTATTTGACGATTAGTGGGAAAA-CGCAAAACAAGTGC GGTTG-TTTTAATCAAGAA	1812
chl1 CCUG12835	1789	ATTTATTTGACGATTAGTGGGAAAA-CGCAAAACAAGTGC GGTTG-TTTTAATCAAGAA	1848
chl1 fasta	1801	ATTTATTTGACGATTAGTGGGAAAA-CGCAAAACAAGTGC GGTTG-TTTTAATCAAGAA	1860
chl1 CL	1753	ATTTATTTGACGATTAGTGGGAAAA-CGCAAAACAAGTGC GGTTG-TTTTAATCAAGAA	1812
chl1 FARPER174	1789	ATTTATTTGACGATTAGTGGGAAAA-CGCAAAACAAGTGC GGTTG-TTTTAATCAAGAA	1848
chl1 Hp8 complement	1789	ATTTATTTGACGATTAGTGGGAAAA-CGCAAAACAAGTGC GGTTG-TTTTAATCAAGAA	1848
chl1 MODESTO 2	1789	ATTTATTTGACGATTAGTGGGAAAA-CGCAAAACAAGTGC GGTTG-TTTTAATCAAGAA	1848
chl1 Modesto	1135	ATTTATTTGACGATTAGTGGGAAAA-CGCAAAACAAGTGC GGTTG-TTTTAATCAAGAA	1194
chl1 SA-3 complement	1789	ATTTATTTGACGATTAGTGGGAAAA-CGCAAAACAAGTGC GGTTG-TTTTAATCAAGAA	1848
chl1 SCPM-O-B-8406	1789	ATTTATTTGACGATTAGTGGGAAAA-CGCAAAACAAGTGC GGTTG-TTTTAATCAAGAA	1848
chl1 SCPM-O-B-8407	1789	ATTTATTTGACGATTAGTGGGAAAA-CGCAAAACAAGTGC GGTTG-TTTTAATCAAGAA	1848

chll 221 1849 ATTTTACC CGTAAATTGCCCAAGGCTTTTGGGCATTTA TGGTGGGGCATTGGTATC 1908
 chll 2671 complement 1849 ATTTTACC CGTAAATTGCCCAAGGCTTTTGGGCATTTA TGGTGGGGCATTGGTATC 1908
 chll AVPG2015 1813 ATTTTACC CGTAAATTGCCCAAGGCTTTTGGGCATTTA TGGTGGGGCATTGGTATC 1872
 chll CCUG12835 1849 ATTTTACC CGTAAATTGCCCAAGGCTTTTGGGCATTTA TGGTGGGGCATTGGTATC 1908
 chll fasta 1861 ATTTTACC CGTAAATTGCCCAAGGCTTTTGGGCATTTA TGGTGGGGCATTGGTATC 1920
 chll CL 1813 ATTTTACC CGTAAATTGCCCAAGGCTTTTGGGCATTTA TGGTGGGGCATTGGTATC 1872
 chll FARPER174 1849 ATTTTACC CGTAAATTGCCCAAGGCTTTTGGGCATTTA TGGTGGGGCATTGGTATC 1908
 chll Hp8 complement 1849 ATTTTACC CGTAAATTGCCCAAGGCTTTTGGGCATTTA TGGTGGGGCATTGGTATC 1908
 chll MODESTO 2 1849 ATTTTACC CGTAAATTGCCCAAGGCTTTTGGGCATTTA TGGTGGGGCATTGGTATC 1908
 chll Modesto 1195 ATTTTACC CGTAAATTGCCCAAGGCTTTTGGGCATTTA TGGTGGGGCATTGGTATC 1254
 chll SA-3 complement 1849 ATTTTACC CGTAAATTGCCCAAGGCTTTTGGGCATTTA TGGTGGGGCATTGGTATC 1908
 chll SCPM-O-B-8406 1849 ATTTTACC CGTAAATTGCCCAAGGCTTTTGGGCATTTA TGGTGGGGCATTGGTATC 1908
 chll SCPM-O-B-8407 1849 ATTTTACC CGTAAATTGCCCAAGGCTTTTGGGCATTTA TGGTGGGGCATTGGTATC 1908

 chll 221 1909 C TCGCTTTAA GACAAAATGGTTACACTGAAAACTATAACAGTAATGTATGGTCATCA 1968
 chll 2671 complement 1909 C TCGCTTTAA GACAAAATGGTTACACTGAAAACTATAACAGTAATGTATGGTCATCA 1968
 chll AVPG2015 1873 C TCGCTTTAA GACAAAATGGTTACACTGAAAACTATAACAGTAATGTATGGTCATCA 1932
 chll CCUG12835 1909 C TCGCTTTAA GACAAAATGGTTACACTGAAAACTATAACAGTAATGTATGGTCATCA 1968
 chll fasta 1921 C TCGCTTTAA GACAAAATGGTTACACTGAAAACTATAACAGTAATGTATGGTCATCA 1980
 chll CL 1873 C TCGCTTTAA GACAAAATGGTTACACTGAAAACTATAACAGTAATGTATGGTCATCA 1932
 chll FARPER174 1909 C TCGCTTTAA GACAAAATGGTTACACTGAAAACTATAACAGTAATGTATGGTCATCA 1968
 chll Hp8 complement 1909 C TCGCTTTAA GACAAAATGGTTACACTGAAAACTATAACAGTAATGTATGGTCATCA 1968
 chll MODESTO 2 1909 C TCGCTTTAA GACAAAATGGTTACACTGAAAACTATAACAGTAATGTATGGTCATCA 1968
 chll Modesto 1255 C TCGCTTTAA GACAAAATGGTTACACTGAAAACTATAACAGTAATGTATGGTCATCA 1314
 chll SA-3 complement 1909 C TCGCTTTAA GACAAAATGGTTACACTGAAAACTATAACAGTAATGTATGGTCATCA 1968
 chll SCPM-O-B-8406 1909 C TCGCTTTAA GACAAAATGGTTACACTGAAAACTATAACAGTAATGTATGGTCATCA 1968
 chll SCPM-O-B-8407 1909 C TCGCTTTAA GACAAAATGGTTACACTGAAAACTATAACAGTAATGTATGGTCATCA 1968

 chll 221 1969 GAAATCTATTTTGAAGAAAATCGTTATGG CGTTATCAAAGTAATGG TCGGCACAAAT 2028
 chll 2671 complement 1969 GAAATCTATTTTGAAGAAAATCGTTATGG CGTTATCAAAGTAATGG TCGGCACAAAT 2028
 chll AVPG2015 1933 GAAATCTATTTTGAAGAAAATCGTTATGG CGTTATCAAAGTAATGG TCGGCACAAAT 1992
 chll CCUG12835 1969 GAAATCTATTTTGAAGAAAATCGTTATGG CGTTATCAAAGTAATGG TCGGCACAAAT 2028
 chll fasta 1981 GAAATCTATTTTGAAGAAAATCGTTATGG CGTTATCAAAGTAATGG TCGGCACAAAT 2040
 chll CL 1933 GAAATCTATTTTGAAGAAAATCGTTATGG CGTTATCAAAGTAATGG TCGGCACAAAT 1992
 chll FARPER174 1969 GAAATCTATTTTGAAGAAAATCGTTATGG CGTTATCAAAGTAATGG TCGGCACAAAT 2028
 chll Hp8 complement 1969 GAAATCTATTTTGAAGAAAATCGTTATGG CGTTATCAAAGTAATGG TCGGCACAAAT 2028
 chll MODESTO 2 1969 GAAATCTATTTTGAAGAAAATCGTTATGG CGTTATCAAAGTAATGG TCGGCACAAAT 2028
 chll Modesto 1315 GAAATCTATTTTGAAGAAAATCGTTATGG CGTTATCAAAGTAATGG TCGGCACAAAT 1374
 chll SA-3 complement 1969 GAAATCTATTTTGAAGAAAATCGTTATGG CGTTATCAAAGTAATGG TCGGCACAAAT 2028
 chll SCPM-O-B-8406 1969 GAAATCTATTTTGAAGAAAATCGTTATGG CGTTATCAAAGTAATGG TCGGCACAAAT 2028
 chll SCPM-O-B-8407 1969 GAAATCTATTTTGAAGAAAATCGTTATGG CGTTATCAAAGTAATGG TCGGCACAAAT 2028

 chll 221 2029 CTTTCGCA AAAAAACCTGATGAA CAAGGCTTTATCGAAAAATGGTTGGGATTGGAAATAGA 2088
 chll 2671 complement 2029 CTTTCGCA AAAAAACCTGATGAA CAAGGCTTTATCGAAAAATGGTTGGGATTGGAAATAGA 2088
 chll AVPG2015 1993 CTTTCGCA AAAAAACCTGATGAA CAAGGCTTTATCGAAAAATGGTTGGGATTGGAAATAGA 2052
 chll CCUG12835 2029 CTTTCGCA AAAAAACCTGATGAA CAAGGCTTTATCGAAAAATGGTTGGGATTGGAAATAGA 2088
 chll fasta 2041 CTTTCGCA AAAAAACCTGATGAA CAAGGCTTTATCGAAAAATGGTTGGGATTGGAAATAGA 2100
 chll CL 1993 CTTTCGCA AAAAAACCTGATGAA CAAGGCTTTATCGAAAAATGGTTGGGATTGGAAATAGA 2052
 chll FARPER174 2029 CTTTCGCA AAAAAACCTGATGAA CAAGGCTTTATCGAAAAATGGTTGGGATTGGAAATAGA 2088
 chll Hp8 complement 2029 CTTTCGCA AAAAAACCTGATGAA CAAGGCTTTATCGAAAAATGGTTGGGATTGGAAATAGA 2088
 chll MODESTO 2 2029 CTTTCGCA AAAAAACCTGATGAA CAAGGCTTTATCGAAAAATGGTTGGGATTGGAAATAGA 2088
 chll Modesto 1375 CTTTCGCA AAAAAACCTGATGAA CAAGGCTTTATCGAAAAATGGTTGGGATTGGAAATAGA 1434
 chll SA-3 complement 2029 CTTTCGCA AAAAAACCTGATGAA CAAGGCTTTATCGAAAAATGGTTGGGATTGGAAATAGA 2088
 chll SCPM-O-B-8406 2029 CTTTCGCA AAAAAACCTGATGAA CAAGGCTTTATCGAAAAATGGTTGGGATTGGAAATAGA 2088
 chll SCPM-O-B-8407 2029 CTTTCGCA AAAAAACCTGATGAA CAAGGCTTTATCGAAAAATGGTTGGGATTGGAAATAGA 2088

ch2 fasta 2340 CCAAAGCCCTGTAAC TTAGCTGATCCAGCGGGTAAC GCTATTATGTTCTGGAAGGACA 2399
 ch2 AVPG2015 complement 2307 CCAAAGCCCTGTAAC TTAGCTGATCCAGCGGGTAAC GCTATTATGTTCTGGAAGGACA 2366
 ch2 221 2o complement 2340 CCAAAGCCCTGTAAC TTAGCTGATCCAGCGGGTAAC GCTATTATGTTCTGGAAGGACA 2399
 ch2 2671 complement 2340 CCAAAGCCCTGTAAC TTAGCTGATCCAGCGGGTAAC GCTATTATGTTCTGGAAGGACA 2399
 ch2 CCUG 12835 2277 CCAAAGCCCTGTAAC TTAGCTGATCCAGCGGGTAAC GCTATTATGTTCTGGAAGGACA 2336
 ch2 CL 2o complement 2307 CCAAAGCCCTGTAAC TTAGCTGATCCAGCGGGTAAC GCTATTATGTTCTGGAAGGACA 2366
 ch2 JF4211 2292 CCAAAGCCCTGTAAC TTAGCTGATCCAGCGGGTAAC GCTATTATGTTCTGGAAGGACA 2351
 ch2 MODESTO complement 2340 CCAAAGCCCTGTAAC TTAGCTGATCCAGCGGGTAAC GCTATTATGTTCTGGAAGGACA 2399
 ch2 SA-3 2340 CCAAAGCCCTGTAAC TTAGCTGATCCAGCGGGTAAC GCTATTATGTTCTGGAAGGACA 2399
 ch2 SCPM-O-B-8406 complement 2340 CCAAAGCCCTGTAAC TTAGCTGATCCAGCGGGTAAC GCTATTATGTTCTGGAAGGACA 2399
 ch2 SCPM-O-B-8407 2340 CCAAAGCCCTGTAAC TTAGCTGATCCAGCGGGTAAC GCTATTATGTTCTGGAAGGACA 2399

 ch2 fasta 2400 GACGCTGACATTGTATTATCAAATCAAGAACTGTTGATGAACGTAATGATAAGCCAAC 2459
 ch2 AVPG2015 complement 2367 GACGCTGACATTGTATTATCAAATCAAGAACTGTTGATGAACGTAATGATAAGCCAAC 2426
 ch2 221 2o complement 2400 GACGCTGACATTGTATTATCAAATCAAGAACTGTTGATGAACGTAATGATAAGCCAAC 2459
 ch2 2671 complement 2400 GACGCTGACATTGTATTATCAAATCAAGAACTGTTGATGAACGTAATGATAAGCCAAC 2459
 ch2 CCUG 12835 2337 GACGCTGACATTGTATTATCAAATCAAGAACTGTTGATGAACGTAATGATAAGCCAAC 2396
 ch2 CL 2o complement 2367 GACGCTGACATTGTATTATCAAATCAAGAACTGTTGATGAACGTAATGATAAGCCAAC 2426
 ch2 JF4211 2352 GACGCTGACATTGTATTATCAAATCAAGAACTGTTGATGAACGTAATGATAAGCCAAC 2411
 ch2 MODESTO complement 2400 GACGCTGACATTGTATTATCAAATCAAGAACTGTTGATGAACGTAATGATAAGCCAAC 2459
 ch2 SA-3 2400 GACGCTGACATTGTATTATCAAATCAAGAACTGTTGATGAACGTAATGATAAGCCAAC 2459
 ch2 SCPM-O-B-8406 complement 2400 GACGCTGACATTGTATTATCAAATCAAGAACTGTTGATGAACGTAATGATAAGCCAAC 2459
 ch2 SCPM-O-B-8407 2400 GACGCTGACATTGTATTATCAAATCAAGAACTGTTGATGAACGTAATGATAAGCCAAC 2459

 ch2 fasta 2460 TAAAGGAAAATTTGCGACAGCTGTA CTGG ACACGGCAAAGCACC AAAAG TGGAAAATA 2519
 ch2 AVPG2015 complement 2427 TAAAGGAAAATTTGCGACAGCTGTA CTGG ACACGGCAAAGCACC AAAAG TGGAAAATA 2486
 ch2 221 2o complement 2460 TAAAGGAAAATTTGCGACAGCTGTA CTGG ACACGGCAAAGCACC AAAAG TGGAAAATA 2519
 ch2 2671 complement 2460 TAAAGGAAAATTTGCGACAGCTGTA CTGG ACACGGCAAAGCACC AAAAG TGGAAAATA 2519
 ch2 CCUG 12835 2397 TAAAGGAAAATTTGCGACAGCTGTA CTGG ACACGGCAAAGCACC AAAAG TGGAAAATA 2456
 ch2 CL 2o complement 2427 TAAAGGAAAATTTGCGACAGCTGTA CTGG ACACGGCAAAGCACC AAAAG TGGAAAATA 2486
 ch2 JF4211 2412 TAAAGGAAAATTTGCGACAGCTGTA CTGG ACACGGCAAAGCACC AAAAG TGGAAAATA 2471
 ch2 MODESTO complement 2460 TAAAGGAAAATTTGCGACAGCTGTA CTGG ACACGGCAAAGCACC AAAAG TGGAAAATA 2519
 ch2 SA-3 2460 TAAAGGAAAATTTGCGACAGCTGTA CTGG ACACGGCAAAGCACC AAAAG TGGAAAATA 2519
 ch2 SCPM-O-B-8406 complement 2460 TAAAGGAAAATTTGCGACAGCTGTA CTGG ACACGGCAAAGCACC AAAAG TGGAAAATA 2519
 ch2 SCPM-O-B-8407 2460 TAAAGGAAAATTTGCGACAGCTGTA CTGG ACACGGCAAAGCACC AAAAG TGGAAAATA 2519

recN AVPG2015	1249	TTCATTTTACAGCGAAATTTAGGGCAATCCGCCAGCCACTCGCCAAAGTGGCATCAGGT	1308
recN AVPG221	1249	TTCATTTTACAGCGAAATTTAGGGCAATCCGCCAGCCACTCGCCAAAGTGGCATCAGGT	1308
recN Cepa 72	1249	TTCATTTTACAGCGAAATTTAGGGCAATCCGCCAGCCACTCGCCAAAGTGGCATCAGGT	1308
recN CL	1249	TTCATTTTACAGCGAAATTTAGGGCAATCCGCCAGCCACTCGCCAAAGTGGCATCAGGT	1308
recN FARPER-174 comp.prj	1249	TTCATTTTACAGCGAAATTTAGGGCAATCCGCCAGCCACTCGCCAAAGTGGCATCAGGT	1308
recN JF4211	1249	TTCATTTTACAGCGAAATTTAGGGCAATCCGCCAGCCACTCGCCAAAGTGGCATCAGGT	1308
recN MODESTO comp.prj	1249	TTCATTTTACAGCGAAATTTAGGGCAATCCGCCAGCCACTCGCCAAAGTGGCATCAGGT	1308
recN AVPG2015	1309	GGGGAACTTTCTCGTATCACTTT--AGTTCTGCAGGTGCTGACTTCAGACAAATCCGCAA	1366
recN AVPG221	1309	GGGGAACTTTCTCGTATCACTTT--AGTTCTGCAGGTGCTGACTTCAGACAAATCCGCAA	1366
recN Cepa 72	1309	GGGGAACTTTCTCGTATCACTTT--AGTTCTGCAGGTGCTGACTTCAGACAAATCCGCAA	1366
recN CL	1309	GGGGAACTTTCTCGTATCACTTT--AGTTCTGCAGGTGCTGACTTCAGACAAATCCGCAA	1366
recN FARPER-174 comp.prj	1309	GGGGAACTTTCTCGTATCACTTT--AGTTCTGCAGGTGCTGACTTCAGACAAATCCGCAA	1366
recN JF4211	1309	GGGGAACTTTCTCGTATCACTTT--AGTTCTGCAGGTGCTGACTTCAGACAAATCCGCAA	1366
recN MODESTO comp.prj	1309	GGGGAACTTTCTCGTATCACTTT--AGTTCTGCAGGTGCTGACTTCAGACAAATCCGCAA	1366
recN AVPG2015	1367	TCCCAACCCCTAATTTTTGATGAA TTGATGTTGGGATCAGCGGT CAACAGCAAGTGTG	1426
recN AVPG221	1367	TCCCAACCCCTAATTTTTGATGAA TTGATGTTGGGATCAGCGGT CAACAGCAAGTGTG	1426
recN Cepa 72	1367	TCCCAACCCCTAATTTTTGATGAA TTGATGTTGGGATCAGCGGT CAACAGCAAGTGTG	1426
recN CL	1367	TCCCAACCCCTAATTTTTGATGAA TTGATGTTGGGATCAGCGGT CAACAGCAAGTGTG	1426
recN FARPER-174 comp.prj	1367	TCCCAACCCCTAATTTTTGATGAA TTGATGTTGGGATCAGCGGT CAACAGCAAGTGTG	1426
recN JF4211	1367	TCCCAACCCCTAATTTTTGATGAA TTGATGTTGGGATCAGCGGT CAACAGCAAGTGTG	1426
recN MODESTO comp.prj	1367	TCCCAACCCCTAATTTTTGATGAA TTGATGTTGGGATCAGCGGT CAACAGCAAGTGTG	1426

16S de SV135 PacBio complement	710	AGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAAGGCGAAGGCAG CCCTTGGGAAG	769
16s 221	663	AGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAAGGCGAAGGCAG CCCTTGGGAAG	722
16S AVPG2015	710	AGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAAGGCGAAGGCAG CCCTTGGGAAG	769
16S JF4211	685	AGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAAGGCGAAGGCAG CCCTTGGGAAG	744
16S MODESTO	661	AGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAAGGCGAAGGCAG CCCTTGGGAAG	720
16S FARPER174	178	AGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGAAGGCGAAGGCAG CCCTTGGGAAG	237
16S de SV135 PacBio complement	770	CTACTGACGTCATGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCC	829
16s 221	723	CTACTGACGTCATGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCC	782
16S AVPG2015	770	CTACTGACGTCATGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCC	829
16S JF4211	745	CTACTGACGTCATGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCC	804
16S MODESTO	721	CTACTGACGTCATGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCC	780
16S FARPER174	238	CTACTGACGTCATGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCC	297
16S de SV135 PacBio complement	830	ACGCTGTAAACGCTGTGCAATTTGGGGATT GGCTTTAAGCTTGGTGCCCGTAGCTAACGT	889
16s 221	783	ACGCTGTAAACGCTGTGCAATTTGGGGATT GGCTTTAAGCTTGGTGCCCGTAGCTAACGT	842
16S AVPG2015	830	ACGCTGTAAACGCTGTGCAATTTGGGGATT GGCTTTAAGCTTGGTGCCCGTAGCTAACGT	889
16S JF4211	805	ACGCTGTAAACGCTGTGCAATTTGGGGATT GGCTTTAAGCTTGGTGCCCGTAGCTAACGT	864
16S MODESTO	781	ACGCTGTAAACGCTGTGCAATTTGGGGATT GGCTTTAAGCTTGGTGCCCGTAGCTAACGT	840
16S FARPER174	298	ACGCTGTAAACGCTGTGCAATTTGGGGATT GGCTTTAAGCTTGGTGCCCGTAGCTAACGT	357

avx AVPG2015	3901	CTGATGTTGGAAGCTAACCCAAAATTAGGCTATCGTGATATACAAGAGATACTT	CATTG	3960
avx JF4211	3112	TTGATGTTGGAAGCTAACCCAAAATTAGGCTATCGTGATATACAAGAGATACTT	CATTG	3171
avxA AVPG JF4211	3625	TTGATGTTGGAAGCTAACCCAAAATTAGGCTATCGTGATATACAAGAGATACTT	CATTG	3684
avx AVPG2015	3961	ACGGCAAGAGGGGATAGTCTGTTGGGAACAGTTGGCAATGGAATGGTGATAAAAACTGG		4020
avx JF4211	3172	ACGGCAAGAGGGGATAGTCTGTTGGGAACAGTTGGCAATGGAATGGTGATAAAAACTGG		3231
avxA AVPG JF4211	3685	ACGGCAAGAGGGGATAGTCTGTTGGGAACAGTTGGCAATGGAATGGTGATAAAAACTGG		3744
avx AVPG2015	4021	AATGGGGGCGGTTCGGCATGTAAGTCATGACTATGGTTATGGCGTGGTGGATGCTCAAGCG		4080
avx JF4211	3232	AATGGGGGAGGTTCGGCATGTAAGTCATGACTATGGTTATGGCGTGGTGGATGCTCAAGCG		3291
avxA AVPG JF4211	3745	AATGGGGGAGGTTCGGCATGTAAGTCATGACTATGGTTATGGCGTGGTGGATGCTCAAGCG		3804
avx AVPG2015	4081	G TGTGCGTTTAGCCGAGAACTGCATAAGCAAGAAACCTATAAGAATGAAGTGCGGTTA		4140
avx JF4211	3292	G TGTGCGTTTAGCCGAGAACTGCATAACCAAGAAACCTATAAGAATGAAGTGCGGTTA		3351
avxA AVPG JF4211	3805	G TGTGCGTTTAGCCGAGAACTGCATAACCAAGAAACCTATAAGAATGAAGTGCGGTTA		3864
avx AVPG2015	1921	ATGAAGGTTGAAACCCAACGTGATGGGCGTATTGCGGCCAACATCAGCCTTTACTTCCACC		1980
avx JF4211	1132	ATGAAGGTTGAAACCCAACGTGATGGGCGTATTGCGGCCAACATCAGCCTTTACTTCCACC		1191
avxA AVPG JF4211	1645	ATGAAGGTTGAAACCCAACGTGATGGGCGTATTGCGGCCAACATCAGCCTTTACTTCCACC		1704
avx AVPG2015	1981	GTGACAACAGGAGAAAACATAAGTGCGGTGGATTTAGGGG	GCAAAATATTGCAGCAGGC	2040
avx JF4211	1192	GTGACAACAGGAGAAAACATAAGTGCGGTGGATTTAGGGG	GCAAAATATTGCAGCAGGC	1251
avxA AVPG JF4211	1705	GTGACAACAGGAGAAAACATAAGTGCGGTGGATTTAGGGG	GCAAAATATTGCAGCAGGC	1764
avx AVPG2015	2041	ACGGGCGATGATGTGTTATATGGCGATGGGCAGAATAACTGGTTGGCGGGTAATCTTGGT		2100
avx JF4211	1252	ACGGGCGATGATGTGTTATATGGCGATGGGCAGAATAACTGGTTGGCGGGTAATCTTGGT		1311
avxA AVPG JF4211	1765	ACGGGCGATGATGTGTTATATGGCGATGGGCAGAATAACTGGTTGGCGGGTAATCTTGGT		1824
avx AVPG2015	2101	AGTGATACCTTTATGCGGGTGGATGGGGATGTGTTTTAATTATTGATGGGGATGATAAC		2160
avx JF4211	1312	AGTGATACCTTTATGCGGGTGGATGGGGATGTGTTTTAATTATTGATGGGGATGATAAC		1371
avxA AVPG JF4211	1825	AGTGATACCTTTATGCGGGTGGATGGGGATGTGTTTTAATTATTGATGGGGATGATAAC		1884

cdtA 221	181	TCTTCTAAGGGAATACCTATGGTAAGCATTATGAATCACTCTTCAGGTGTAATTA	AGTA	240		
cdtA AVPG2015	181	TCTTCTAAGGGAATACCTATGGTAAGCATTATGAATCACTCTTCAGGTGTAATTA	AGTA	240		
cdtA FARPER174	181	TCTTCTAAGGGAATACCTATGGTAAGCATTATGAATCACTCTTCAGGTGTAATTA	AGTA	240		
cdtA 221	241	TGGGCTCTTGACCCAAA	AACTGGTTATGGGGATATTCACCATTTGATTCAAAAATCTTTT	300		
cdtA AVPG2015	241	TGGGCTCTTGACCCAAA	AACTGGTTATGGGGATATTCACCATTTGATTCAAAAATCTTTT	300		
cdtA FARPER174	241	TGGGCTCTTGACCCAAA	AACTGGTTATGGGGATATTCACCATTTGATTCAAAAATCTTTT	300		
cdtA 221	301	GGACAATTGCGTAATTGGTATGTTTTAAAAAATGCGAATGGTTCAGTGTCAATCCGTAAT		360		
cdtA AVPG2015	301	GGACAATTGCGTAATTGGTATGTTTTAAAAAATGCGAATGGTTCAGTGTCAATCCGTAAT		360		
cdtA FARPER174	301	GGACAATTGCGTAATTGGTATGTTTTAAAAAATGCGAATGGTTCAGTGTCAATCCGTAAT		360		
cdtA 221	361	GTAA	AACTAAGACTTGTATGGCGGCA	ATAAAAATGGAAT	ATTCAATTCGCGTGCAAT	420
cdtA AVPG2015	361	GTAA	AACTAAGACTTGTATGGCGGCA	ATAAAAATGGAAT	ATTCAATTCGCGTGCAAT	420
cdtA FARPER174	361	GTAA	AACTAAGACTTGTATGGCGGCA	ATAAAAATGGAAT	ATTCAATTCGCGTGCAAT	420
cdtA 221	421	CGT	ATAAATTGAGTCAGCAGTTTGATTTATTATCATTAAACCAATGGTGCITAGCTCTA		480	
cdtA AVPG2015	421	CGT	ATAAATTGAGTCAGCAGTTTGATTTATTATCATTAAACCAATGGTGCITAGCTCTA		480	
cdtA FARPER174	421	CGT	ATAAATTGAGTCAGCAGTTTGATTTATTATCATTAAACCAATGGTGCITAGCTCTA		480	
cdtA 221	481	AAAAATGCAGGTAATCAAAAAATGTTTGGTATACCTGAAAGACGTTTCGACAGTATATATG		540		
cdtA AVPG2015	481	AAAAATGCAGGTAATCAAAAAATGTTTGGTATACCTGAAAGACGTTTCGACAGTATATATG		540		
cdtA FARPER174	481	AAAAATGCAGGTAATCAAAAAATGTTTGGTATACCTGAAAGACGTTTCGACAGTATATATG		540		
cdtA 221	541	CCAATT	CGTTGTAATAATGCCCTACGG	AGATCAATTTACTGTTGATCAGCAATGGTTT	600	
cdtA AVPG2015	541	CCAATT	CGTTGTAATAATGCCCTACGG	AGATCAATTTACTGTTGATCAGCAATGGTTT	600	
cdtA FARPER174	541	CCAATT	CGTTGTAATAATGCCCTACGG	AGATCAATTTACTGTTGATCAGCAATGGTTT	600	
cdtB 221	241	CCTGTAGGCGTTGGCATTCCCTATT	CATGAATATACTTGGAAATTTAGGCACATCGTCGCGT	300		
cdtB AVPG2015 complement.prj	226	CCTGTAGGCGTTGGCATTCCCTATT	CATGAATATACTTGGAAATTTAGGCACATCGTCGCGT	285		
cdtB CL complement.prj	226	CCTGTAGGCGTTGGCATTCCCTATT	CATGAATATACTTGGAAATTTAGGCACATCGTCGCGT	285		
cdtB 221	301	CCTGACAAATGATTTTATTACTATTCTCGTG	TGATGTGGGAGCCAATCGAG	TAATCTT	360	
cdtB AVPG2015 complement.prj	286	CCTGACAAATGATTTTATTACTATTCTCGTG	TGATGTGGGAGCCAATCGAG	TAATCTT	345	
cdtB CL complement.prj	286	CCTGACAAATGATTTTATTACTATTCTCGTG	TGATGTGGGAGCCAATCGAG	TAATCTT	345	
cdtB 221	361	SCAATTGTGAGTAGAATCCGTGCGGATGAAGTCATTGTTATTCCACCTCCCACAGTTATT		420		
cdtB AVPG2015 complement.prj	346	SCAATTGTGAGTAGAATCCGTGCGGATGAAGTCATTGTTATTCCACCTCCCACAGTTATT		405		
cdtB CL complement.prj	346	SCAATTGTGAGTAGAATCCGTGCGGATGAAGTCATTGTTATTCCACCTCCCACAGTTATT		405		
cdtB 221	421	TCTAGACCAATTATAGGTATTGATCGGCAATGATGCATTTTTTTTCTATTCTATGCTTTA		480		
cdtB AVPG2015 complement.prj	406	TCTAGACCAATTATAGGTATTGATCGGCAATGATGCATTTTTTTTCTATTCTATGCTTTA		465		
cdtB CL complement.prj	406	TCTAGACCAATTATAGGTATTGATCGGCAATGATGCATTTTTTTTCTATTCTATGCTTTA		465		
cdtB 221	481	CAA	CCGAGGAGCAGATTCC	CTG	AATCGTCCGTGCTGTTTTTGATTATTTTAATACT	540
cdtB AVPG2015 complement.prj	466	CAA	CCGAGGAGCAGATTCC	CTG	AATCGTCCGTGCTGTTTTTGATTATTTTAATACT	525
cdtB CL complement.prj	466	CAA	CCGAGGAGCAGATTCC	CTG	AATCGTCCGTGCTGTTTTTGATTATTTTAATACT	525
cdtB 221	541	CGTCCAGAACGCGTAATACCAATTGGATGATTGTCGGTGATTTCAATCGCGTGCCCTCT		600		
cdtB AVPG2015 complement.prj	526	CGTCCAGAACGCGTAATACCAATTGGATGATTGTCGGTGATTTCAATCGCGTGCCCTCT		585		
cdtB CL complement.prj	526	CGTCCAGAACGCGTAATACCAATTGGATGATTGTCGGTGATTTCAATCGCGTGCCCTCT		585		
cdtB 221	601	AATTTACAACGCTCTTTAGAAACTTC	GAACCTGGTGTGGCAAGACA	ATTATATCATT	660	
cdtB AVPG2015 complement.prj	586	AATTTACAACGCTCTTTAGAAACTTC	GAACCTGGTGTGGCAAGACA	ATTATATCATT	645	
cdtB CL complement.prj	586	AATTTACAACGCTCTTTAGAAACTTC	GAACCTGGTGTGGCAAGACA	ATTATATCATT	645	

```

cdtC 221      121  CCATTGATTTCACTGCGTAGTTTGAAGAACGGGAGTTCTCTTATTAATGGGCAATATAAA 180
cdtC AVPG2015 121  CCATTGATTTCACTGCGTAGTTTGAAGAACGGGAGTTCTCTTATTAATGGGCAATATAAA 180
cdtC FARPER-174 121  CCATTGATTTCACTGCGTAGTTTGAAGAACGGGAGTTCTCTTATTAATGGGCAATATAAA 180

cdtC 221      181  GATCAACGTAATTTTCAATGGATTATTAGTGAATGTCGCCAGCGTCTGAAACAACCTTTAAA 240
cdtC AVPG2015 181  GATCAACGTAATTTTCAATGGATTATTAGTGAATGTCGCCAGCGTCTGAAACAACCTTTAAA 240
cdtC FARPER-174 181  GATCAACGTAATTTTCAATGGATTATTAGTGAATGTCGCCAGCGTCTGAAACAACCTTTAAA 240

cdtC 221      241  AAAGCTGGACTTACTCAGTTTGTAGAGTACCAGGTTTGAACGCTGCCCTTATACTATCCAA 300
cdtC AVPG2015 241  AAAGCTGGACTTACTCAGTTTGTAGAGTACCAGGTTTGAACGCTGCCCTTATACTATCCAA 300
cdtC FARPER-174 241  AAAGCTGGACTTACTCAGTTTGTAGAGTACCAGGTTTGAACGCTGCCCTTATACTATCCAA 300

cdtC 221      301  AATAGGTTAATCTCTGAGAGTTTGATCGAAAGATGCGGGGCTCTTTGGGTTATTATT 360
cdtC AVPG2015 301  AATAGGTTAATCTCTGAGAGTTTGATCGAAAGATGCGGGGCTCTTTGGGTTATTATT 360
cdtC FARPER-174 301  AATAGGTTAATCTCTGAGAGTTTGATCGAAAGATGCGGGGCTCTTTGGGTTATTATT 360

cdtC 221      361  CCAACAGTTTTAGGAGGCGTTGAAATAAAATCAATGAGAACAAAACCTGTTTAAAGTGCG 420
cdtC AVPG2015 361  CCAACAGTTTTAGGAGGCGTTGAAATAAAATCAATGAGAACAAAACCTGTTTAAAGTGCG 420
cdtC FARPER-174 361  CCAACAGTTTTAGGAGGCGTTGAAATAAAATCAATGAGAACAAAACCTGTTTAAAGTGCG 420

cdtC 221      421  GGCAGAAAGTATAATGATTATAGATTGGCTCCCTGTCAGGAAAATGAAAAGATTACCGTT 480
cdtC AVPG2015 421  GGCAGAAAGTATAATGATTATAGATTGGCTCCCTGTCAGGAAAATGAAAAGATTACCGTT 480
cdtC FARPER-174 421  GGCAGAAAGTATAATGATTATAGATTGGCTCCCTGTCAGGAAAATGAAAAGATTACCGTT 480

```

```

fur AVPG2015      181  AACCAATTTGACGAAGCCAACATTTCTGACTCGTCATAACTTTGAAGGCAACAAATCGGTT 240
fur CL complement 181  AACCAATTTGACGAAGCCAACATTTCTGACTCGTCATAACTTTGAAGGCAACAAATCGGTT 240
fur JF4211        181  AACCAATTTGACGAAGCCAACATTTCTGACTCGTCATAACTTTGAAGGCAACAAATCGGTT 240
fur MODESTO complement 181  AACCAATTTGACGAAGCCAACATTTCTGACTCGTCATAACTTTGAAGGCAACAAATCGGTT 240

fur AVPG2015      241  TTTGAACTTGCCCCACAGAGCATCACGACCACATTATTTGCGTAGATTGTGGCAAAGTA 300
fur CL complement 241  TTTGAACTTGCCCCACAGAGCATCACGACCACATTATTTGCGTAGATTGTGGCAAAGTA 300
fur JF4211        241  TTTGAACTTGCCCCACAGAGCATCACGACCACATTATTTGCGTAGATTGTGGCAAAGTA 300
fur MODESTO complement 241  TTTGAACTTGCCCCACAGAGCATCACGACCACATTATTTGCGTAGATTGTGGCAAAGTA 300

fur AVPG2015      301  TTTGAATTTAATGATGAAATCATCGAACAGCGACAAAAACAAAATAGCGAAGAACACGGC 360
fur CL complement 301  TTTGAATTTAATGATGAAATCATCGAACAGCGACAAAAACAAAATAGCGAAGAACACGGC 360
fur JF4211        301  TTTGAATTTAATGATGAAATCATCGAACAGCGACAAAAACAAAATAGCGAAGAACACGGC 360
fur MODESTO complement 301  TTTGAATTTAATGATGAAATCATCGAACAGCGACAAAAACAAAATAGCGAAGAACACGGC 360

fur AVPG2015      361  ATCAAATTAATAACTCACAGCCTTTACCTCTACGGAAAATGTAGCGATATTGATTAACGT 420
fur CL complement 361  ATCAAATTAATAACTCACAGCCTTTACCTCTACGGAAAATGTAGCGATATTGATTAACGT 420
fur JF4211        361  ATCAAATTAATAACTCACAGCCTTTACCTCTACGGAAAATGTAGCGATATTGATTAACGT 420
fur MODESTO complement 361  ATCAAATTAATAACTCACAGCCTTTACCTCTACGGAAAATGTAGCGATATTGATTAACGT 420

```

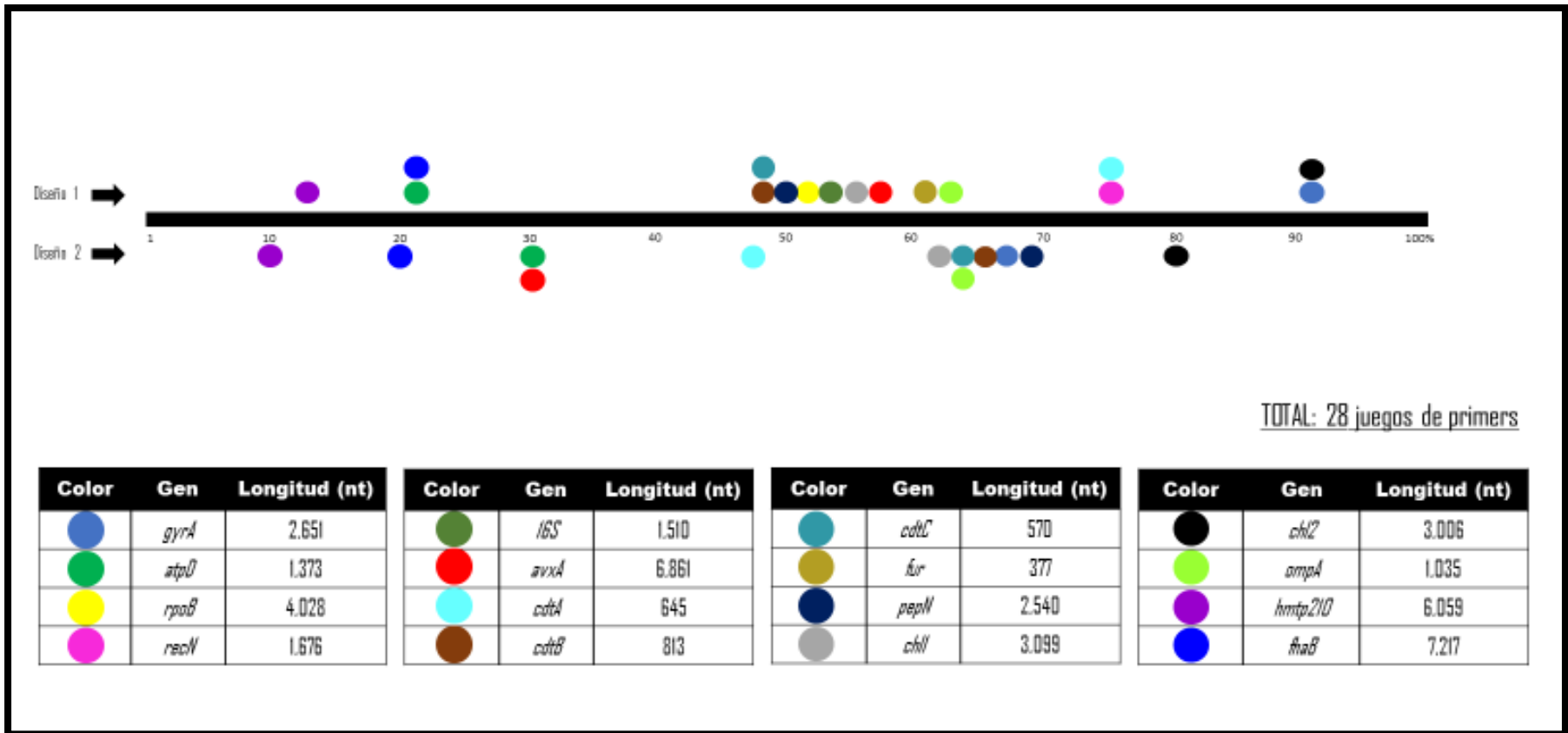
pepN AVPG 221	1250	CTACTTGTGAAGATTTTATTCTTGCAATGGAA	AAGCCACAGGCGTGGATTTA	CCCAAT	1309
pepN AVPG2015	1250	CTACTTGTGAAGATTTTATTCTTGCAATGGAA	AAGCCACAGGCGTGGATTTA	CCCAAT	1309
pepN CL	1250	CTACTTGTGAAGATTTTATTCTTGCAATGGAA	AAGCCACAGGCGTGGATTTA	CCCAAT	1309
pepN JF4211 complement.prj	1250	CTACTTGTGAAGATTTTATTCTTGCAATGGAA	AAGCCACAGGCGTGGATTTA	CCCAAT	1309
pepN MODESTO 2	1250	CTACTTGTGAAGATTTTATTCTTGCAATGGAA	AAGCCACAGGCGTGGATTTA	CCCAAT	1309
pepN MODESTO complement.prj	1250	CTACTTGTGAAGATTTTATTCTTGCAATGGAA	AAGCCACAGGCGTGGATTTA	CCCAAT	1309
pepN AVPG 221	1310	TCCGCCGTTGGTATAGCCAATCAGGTACGCC	TGAATTAACCATCAGCGACAGCTATGATG		1369
pepN AVPG2015	1310	TCCGCCGTTGGTATAGCCAATCAGGTACGCC	TGAATTAACCATCAGCGACAGCTATGATG		1369
pepN CL	1310	TCCGCCGTTGGTATAGCCAATCAGGTACGCC	TGAATTAACCATCAGCGACAGCTATGATG		1369
pepN JF4211 complement.prj	1310	TCCGCCGTTGGTATAGCCAATCAGGTACGCC	TGAATTAACCATCAGCGACAGCTATGATG		1369
pepN MODESTO 2	1310	TCCGCCGTTGGTATAGCCAATCAGGTACGCC	TGAATTAACCATCAGCGACAGCTATGATG		1369
pepN MODESTO complement.prj	1310	TCCGCCGTTGGTATAGCCAATCAGGTACGCC	TGAATTAACCATCAGCGACAGCTATGATG		1369
pepN AVPG 221	1370	AACGCAATCACATTTACCGTTT	CAGGTTTCGCAAAACACCCCT	GCGACGGCAGATCAAA	1429
pepN AVPG2015	1370	AACGCAATCACATTTACCGTTT	CAGGTTTCGCAAAACACCCCT	GCGACGGCAGATCAAA	1429
pepN CL	1370	AACGCAATCACATTTACCGTTT	CAGGTTTCGCAAAACACCCCT	GCGACGGCAGATCAAA	1429
pepN JF4211 complement.prj	1370	AACGCAATCACATTTACCGTTT	CAGGTTTCGCAAAACACCCCT	GCGACGGCAGATCAAA	1429
pepN MODESTO 2	1370	AACGCAATCACATTTACCGTTT	CAGGTTTCGCAAAACACCCCT	GCGACGGCAGATCAAA	1429
pepN MODESTO complement.prj	1370	AACGCAATCACATTTACCGTTT	CAGGTTTCGCAAAACACCCCT	GCGACGGCAGATCAAA	1429
pepN AVPG 221	1730	TACGTCGTAAC TTATCCAATTATCAGCAAGGGC	AAGCTTGGC ATTTTCGAGCG	AATTT	1789
pepN AVPG2015	1730	TACGTCGTAAC TTATCCAATTATCAGCAAGGGC	AAGCTTGGC ATTTTCGAGCG	AATTT	1789
pepN CL	1730	TACGTCGTAAC TTATCCAATTATCAGCAAGGGC	AAGCTTGGC ATTTTCGAGCG	AATTT	1789
pepN JF4211 complement.prj	1730	TACGTCGTAAC TTATCCAATTATCAGCAAGGGC	AAGCTTGGC ATTTTCGAGCG	AATTT	1789
pepN MODESTO 2	1730	TACGTCGTAAC TTATCCAATTATCAGCAAGGGC	AAGCTTGGC ATTTTCGAGCG	AATTT	1789
pepN MODESTO complement.prj	1730	TACGTCGTAAC TTATCCAATTATCAGCAAGGGC	AAGCTTGGC ATTTTCGAGCG	AATTT	1789
pepN AVPG 221	1790	TGACCGCACTT CATCAAGTGCTG	GAAAAATTATCA	CAAGATCCTGAGT	TAAC CACCTT
pepN AVPG2015	1790	TGACCGCACTT CATCAAGTGCTG	GAAAAATTATCA	CAAGATCCTGAGT	TAAC CACCTT
pepN CL	1790	TGACCGCACTT CATCAAGTGCTG	GAAAAATTATCA	CAAGATCCTGAGT	TAAC CACCTT
pepN JF4211 complement.prj	1790	TGACCGCACTT CATCAAGTGCTG	GAAAAATTATCA	CAAGATCCTGAGT	TAAC CACCTT
pepN MODESTO 2	1790	TGACCGCACTT CATCAAGTGCTG	GAAAAATTATCA	CAAGATCCTGAGT	TAAC CACCTT
pepN MODESTO complement.prj	1790	TGACCGCACTT CATCAAGTGCTG	GAAAAATTATCA	CAAGATCCTGAGT	TAAC CACCTT
pepN AVPG 221	1848	AATTC	CACCTTGCCGAAAGAAACCG	ATTTGCCG	AGCTGTTTAAAA
pepN AVPG2015	1848	AATTC	CACCTTGCCGAAAGAAACCG	ATTTGCCG	AGCTGTTTAAAA
pepN CL	1848	AATTC	CACCTTGCCGAAAGAAACCG	ATTTGCCG	AGCTGTTTAAAA
pepN JF4211 complement.prj	1848	AATTC	CACCTTGCCGAAAGAAACCG	ATTTGCCG	AGCTGTTTAAAA
pepN MODESTO 2	1848	AATTC	CACCTTGCCGAAAGAAACCG	ATTTGCCG	AGCTGTTTAAAA
pepN MODESTO complement.prj	1848	AATTC	CACCTTGCCGAAAGAAACCG	ATTTGCCG	AGCTGTTTAAAA

ompA AVPG2015-Doctor	538	GTAGGGCGTTGGGAAAAAGATGGTAGCCGTGTAGATT	TACACCAAGCA	TCGGTTCGT	597
ompA AVPG2015-2 complement	538	GTAGGGCGTTGGGAAAAAGATGGTAGCCGTGTAGATT	TACACCAAGCA	TCGGTTCGT	597
ompA 221	538	GTAGGACGTCSTGGAAAAAGATGGTAGCCGTGTAGATT	TACACCAAGCA	TCGGTTCGT	597
ompA 2671 complement	538	GTAGGGCGTTGGGAAAAAGATGGTAGCCGTGTAGATT	TACACCAAGCA	TCGGTTCGT	597
ompA CCUG 12835	538	GTAGGACGTCSTGGAAAAAGATGGTAGCCGTGTAGATT	TACACCAAGCA	TCGGTTCGT	597
ompA CL	538	GTAGGGCGTTGGGAAAAAGATGGTAGCCGTGTAGATT	TACACCAAGCA	TCGGTTCGT	597
ompA FARPER174	538	GTAGGGCGTTGGGAAAAAGATGGTAGCCGTGTAGATT	TACACCAAGCA	TCGGTTCGT	597
ompA Hp8 complement	538	GTAGGGCGTTGGGAAAAAGATGGTAGCCGTGTAGATT	TACACCAAGCA	TCGGTTCGT	597
ompA JF4211	538	GTAGGACGTCSTGGAAAAAGATGGTAGCCGTGTAGATT	TACACCAAGCA	TCGGTTCGT	597
ompA MODESTO complement	538	GTAGGACGTCGATGCT-----AGCCGTGTAGATT	TACACCAAGCA	TCGGTTCGT	588
ompA SA-3 complement	538	GTAGGGCGTTGGGAAAAAGATGGTAGCCGTGTAGATT	TACACCAAGCA	TCGGTTCGT	597
ompA SCPM-O-B-8406 complement	541	GTAGGACGTCSTGGAAAAAGATGGTAGCCGTGTAGATT	TACACCAAGCA	TCGGTTCGT	600
ompA SCPM-O-B-8407	541	GTAGGACGTCSTGGAAAAAGATGGTAGCCGTGTAGATT	TACACCAAGCA	TCGGTTCGT	600
ompA AVPG2015-Doctor	598	ACTGCTGGTTCATCTTACCGTTTTGGTCAAAGTGCACCAGTTGTTGAACCTAAGGTTGTT			657
ompA AVPG2015-2 complement	598	ACTGCTGGTTCATCTTACCGTTTTGGTCAAAGTGCACCAGTTGTTGAACCTAAGGTTGTT			657
ompA 221	598	ACTGCTGGTTCATCTTACCGTTTTGGTCAAAGTGCACCAGTTGTTGAACCTAAGGTTGTT			657
ompA 2671 complement	598	ACTGCTGGTTCATCTTACCGTTTTGGTCAAAGTGCACCAGTTGTTGAACCTAAGGTTGTT			657
ompA CCUG 12835	598	ACTGCTGGTTCATCTTACCGTTTTGGTCAAAGTGCACCAGTTGTTGAACCTAAGGTTGTT			657
ompA CL	598	ACTGCTGGTTCATCTTACCGTTTTGGTCAAAGTGCACCAGTTGTTGAACCTAAGGTTGTT			657
ompA FARPER174	598	ACTGCTGGTTCATCTTACCGTTTTGGTCAAAGTGCACCAGTTGTTGAACCTAAGGTTGTT			657
ompA Hp8 complement	598	ACTGCTGGTTCATCTTACCGTTTTGGTCAAAGTGCACCAGTTGTTGAACCTAAGGTTGTT			657
ompA JF4211	598	ACTGCTGGTTCATCTTACCGTTTTGGTCAAAGTGCACCAGTTGTTGAACCTAAGGTTGTT			657
ompA MODESTO complement	589	ACTGCTGGTTCATCTTACCGTTTTGGTCAAAGTGCACCAGTTGTTGAACCTAAGGTTGTT			648
ompA SA-3 complement	598	ACTGCTGGTTCATCTTACCGTTTTGGTCAAAGTGCACCAGTTGTTGAACCTAAGGTTGTT			657
ompA SCPM-O-B-8406 complement	601	ACTGCTGGTTCATCTTACCGTTTTGGTCAAAGTGCACCAGTTGTTGAACCTAAGGTTGTT			660
ompA SCPM-O-B-8407	601	ACTGCTGGTTCATCTTACCGTTTTGGTCAAAGTGCACCAGTTGTTGAACCTAAGGTTGTT			660
ompA AVPG2015-Doctor	718	CCAGAAGCACAAAAATGTATTAGACG	ATTTATGGTGAAAT	TCACAGTTAAAAATCAGTA	777
ompA AVPG2015-2 complement	718	CCAGAAGCACAAAAATGTATTAGACG	ATTTATGGTGAAAT	TCACAGTTAAAAATCAGTA	777
ompA 221	718	CCAGAAGCACAAAAATGTATTAGACG	ATTTATGGTGAAAT	TCACAGTTAAAAATCAGTA	777
ompA 2671 complement	718	CCAGAAGCACAAAAATGTATTAGACG	ATTTATGGTGAAAT	TCACAGTTAAAAATCAGTA	777
ompA CCUG 12835	718	CCAGAAGCACAAAAATGTATTAGACG	ATTTATGGTGAAAT	TCACAGTTAAAAATCAGTA	777
ompA CL	718	CCAGAAGCACAAAAATGTATTAGACG	ATTTATGGTGAAAT	TCACAGTTAAAAATCAGTA	777
ompA FARPER174	718	CCAGAAGCACAAAAATGTATTAGACG	ATTTATGGTGAAAT	TCACAGTTAAAAATCAGTA	777
ompA Hp8 complement	718	CCAGAAGCACAAAAATGTATTAGACG	ATTTATGGTGAAAT	TCACAGTTAAAAATCAGTA	777
ompA JF4211	718	CCAGAAGCACAAAAATGTATTAGACG	ATTTATGGTGAAAT	TCACAGTTAAAAATCAGTA	777
ompA MODESTO complement	709	CCAGAAGCACAAAAATGTATTAGACG	ATTTATGGTGAAAT	TCACAGTTAAAAATCAGTA	768
ompA SA-3 complement	718	CCAGAAGCACAAAAATGTATTAGACG	ATTTATGGTGAAAT	TCACAGTTAAAAATCAGTA	777
ompA SCPM-O-B-8406 complement	721	CCAGAAGCACAAAAATGTATTAGACG	ATTTATGGTGAAAT	TCACAGTTAAAAATCAGTA	780
ompA SCPM-O-B-8407	721	CCAGAAGCACAAAAATGTATTAGACG	ATTTATGGTGAAAT	TCACAGTTAAAAATCAGTA	780

Autotransporter adhesin 222	531	ATTAGCC	CGACAAAATTATCTAT	GGTGCGGAAAATGCAGAACA	GTTGAAGTAACTAA	590
Autotransporter adhesin 2671	531	ATTAGCC	CGACAAAATTATCTAT	GGTGCGGAAAATGCAGAACA	GTTGAAGTAACTAA	590
Autotransporter adhesin AVPG2015 Doctor corta	541	ATTAGCC	CGACAAAATTATCTAT	GGTGCGGAAAATGCAGAACA	GTTGAAGTAACTAA	600
Autotransporter adhesin FARPER 174 corta	541	ATTAGCC	CGACAAAATTATCTAT	GGTGCGGAAAATGCAGAACA	GTTGAAGTAACTAA	600
Autotransporter adhesin Modesto	531	ATTAGCC	CGACAAAATTATCTAT	GGTGCGGAAAATGCAGAACA	GTTGAAGTAACTAA	590
Autotransporter adhesin SA-3 corta	541	ATTAGCC	CGACAAAATTATCTAT	GGTGCGGAAAATGCAGAACA	GTTGAAGTAACTAA	600
Autotransporter adhesin 222	591	ATCGGGCATAGCCTTAAAAGCGGATAACACCTCCGATAAAATCTCGCA			CACCTTAGGCCA	650
Autotransporter adhesin 2671	591	ATCGGGCATAGCCTTAAAAGCGGATAACACCTCCGATAAAATCTCGCA			CACCTTAGGCCA	650
Autotransporter adhesin AVPG2015 Doctor corta	601	ATCGGGCATAGCCTTAAAAGCGGATAACACCTCCGATAAAATCTCGCA			CACCTTAGGCCA	660
Autotransporter adhesin FARPER 174 corta	601	ATCGGGCATAGCCTTAAAAGCGGATAACACCTCCGATAAAATCTCGCA			CACCTTAGGCCA	660
Autotransporter adhesin Modesto	591	ATCGGGCATAGCCTTAAAAGCGGATAACACCTCCGATAAAATCTCGCA			CACCTTAGGCCA	650
Autotransporter adhesin SA-3 corta	601	ATCGGGCATAGCCTTAAAAGCGGATAACACCTCCGATAAAATCTCGCA			CACCTTAGGCCA	660
Autotransporter adhesin 222	651	AGA'GCGA'	TACTCTTGCGGGGAA	GCAACCGGAAACGGCGATTAAATTGACTGGTGTTC		710
Autotransporter adhesin 2671	651	AGA'GCGA'	TACTCTTGCGGGGAA	GCAACCGGAAACGGCGATTAAATTGACTGGTGTTC		710
Autotransporter adhesin AVPG2015 Doctor corta	661	AGA'GCGA'	TACTCTTGCGGGGAA	GCAACCGGAAACGGCGATTAAATTGACTGGTGTTC		720
Autotransporter adhesin FARPER 174 corta	661	AGA'GCGA'	TACTCTTGCGGGGAA	GCAACCGGAAACGGCGATTAAATTGACTGGTGTTC		720
Autotransporter adhesin Modesto	651	AGA'GCGA'	TACTCTTGCGGGGAA	GCAACCGGAAACGGCGATTAAATTGACTGGTGTTC		710
Autotransporter adhesin SA-3 corta	661	AGA'GCGA'	TACTCTTGCGGGGAA	GCAACCGGAAACGGCGATTAAATTGACTGGTGTTC		720
Autotransporter adhesin 222	711	AGATGGCAACATTACGGCAAATTCAAAAGATGCGGTAAATGGGGGGCAGTTGCGTACGTT				770
Autotransporter adhesin 2671	711	AGATGGCAACATTACGGCAAATTCAAAAGATGCGGTAAATGGGGGGCAGTTGCGTACGTT				770
Autotransporter adhesin AVPG2015 Doctor corta	721	AGATGGCAACATTACGGCAAATTCAAAAGATGCGGTAAATGGGGGGCAGTTGCGTACGTT				780
Autotransporter adhesin FARPER 174 corta	721	AGATGGCAACATTACGGCAAATTCAAAAGATGCGGTAAATGGGGGGCAGTTGCGTACGTT				780
Autotransporter adhesin Modesto	711	AGATGGCAACATTACGGCAAATTCAAAAGATGCGGTAAATGGGGGGCAGTTGCGTACGTT				770
Autotransporter adhesin SA-3 corta	721	AGATGGCAACATTACGGCAAATTCAAAAGATGCGGTAAATGGGGGGCAGTTGCGTACGTT				780
Autotransporter adhesin 222	771	ATT'GGGGTTGATAGCGGGCTAAAATTTGGCGGTACTGAGAAAAACAACGATCAGTGAAGC				830
Autotransporter adhesin 2671	771	ATT'GGGGTTGATAGCGGGCTAAAATTTGGCGGTACTGAGAAAAACAACGATCAGTGAAGC				830
Autotransporter adhesin AVPG2015 Doctor corta	781	ATT'GGGGTTGATAGCGGGCTAAAATTTGGCGGTACTGAGAAAAACAACGATCAGTGAAGC				840
Autotransporter adhesin FARPER 174 corta	781	ATT'GGGGTTGATAGCGGGCTAAAATTTGGCGGTACTGAGAAAAACAACGATCAGTGAAGC				840
Autotransporter adhesin Modesto	771	ATT'GGGGTTGATAGCGGGCTAAAATTTGGCGGTACTGAGAAAAACAACGATCAGTGAAGC				830
Autotransporter adhesin SA-3 corta	781	ATT'GGGGTTGATAGCGGGCTAAAATTTGGCGGTACTGAGAAAAACAACGATCAGTGAAGC				840

Exoprotein 221	1321	GTGAGTGAACACCTTGTCAATAGAGGATTAATTAATGGACTAAGCACCCGG	GATACGGCG	1380
Exoprotein 2671	1318	GTGAGTGAACACCTTGTCAATAGAGGATTAATTAATGGACTAAGCACCCGG	GATACGGCG	1377
Exoprotein 72	1318	GTGAGTGAACACCTTGTCAATAGAGGATTAATTAATGGACTAAGCACCCGG	GATACGGCG	1377
Exoprotein AVPG 2015 Doctor	1318	GTGAGTGAACACCTTGTCAATAGAGGATTAATTAATGGACTAAGCACCCGG	GATACGGCG	1377
Exoprotein AVPG 2015	1318	GTGAGTGAACACCTTGTCAATAGAGGATTAATTAATGGACTAAGCACCCGG	GATACGGCG	1377
Exoprotein FARPER 174	1318	GTGAGTGAACACCTTGTCAATAGAGGATTAATTAATGGACTAAGCACCCGG	GATACGGCG	1377
Exoprotein SA-3	1318	GTGAGTGAACACCTTGTCAATAGAGGATTAATTAATGGACTAAGCACCCGG	GATACGGCG	1377
Exoprotein Hp8 Complementario	1318	GTGAGTGAACACCTTGTCAATAGAGGATTAATTAATGGACTAAGCACCCGG	GATACGGCG	1377
Exoprotein Modesto Complementario	535	GTGAGTGAACACCTTGTCAATAGAGGATTAATTAATGGACTAAGCACCCGG	GATACGGCG	594
Exoprotein JF4211	535	GTGAGTGAACACCTTGTCAATAGAGGATTAATTAATGGACTAAGCACCCGG	GATACGGCG	594
Exoprotein NCTC11296	460	GTGAGTGAACACCTTGTCAATAGAGGATTAATTAATGGACTAAGCACCCGG	GATACGGCG	519
Exoprotein 221	1381	GCTGAAATCCTATTAAAGCAGGCACAATCACGAATGTTGGAACAGGACGTATTTATGGC		1440
Exoprotein 2671	1378	GCTGAAATCCTATTAAAGCAGGCACAATCACGAATGTTGGAACAGGACGTATTTATGGC		1437
Exoprotein 72	1378	GCTGAAATCCTATTAAAGCAGGCACAATCACGAATGTTGGAACAGGACGTATTTATGGC		1437
Exoprotein AVPG 2015 Doctor	1378	GCTGAAATCCTATTAAAGCAGGCACAATCACGAATGTTGGAACAGGACGTATTTATGGC		1437
Exoprotein AVPG 2015	1378	GCTGAAATCCTATTAAAGCAGGCACAATCACGAATGTTGGAACAGGACGTATTTATGGC		1437
Exoprotein FARPER 174	1378	GCTGAAATCCTATTAAAGCAGGCACAATCACGAATGTTGGAACAGGACGTATTTATGGC		1437
Exoprotein SA-3	1378	GCTGAAATCCTATTAAAGCAGGCACAATCACGAATGTTGGAACAGGACGTATTTATGGC		1437
Exoprotein Hp8 Complementario	1378	GCTGAAATCCTATTAAAGCAGGCACAATCACGAATGTTGGAACAGGACGTATTTATGGC		1437
Exoprotein Modesto Complementario	595	GCTGAAATCCTATTAAAGCAGGCACAATCACGAATGTTGGAACAGGACGTATTTATGGC		654
Exoprotein JF4211	595	GCTGAAATCCTATTAAAGCAGGCACAATCACGAATGTTGGAACAGGACGTATTTATGGC		654
Exoprotein NCTC11296	520	GCTGAAATCCTATTAAAGCAGGCACAATCACGAATGTTGGAACAGGACGTATTTATGGC		579
Exoprotein 221	1501	ACAATAAATTACGGCGTGTTCAGCTACCCAACGCTTAATATTGCAGCCCTCAGATT		1560
Exoprotein 2671	1498	ACAATAAATTACGGCGTGTTCAGCTACCCAACGCTTAATATTGCAGCCCTCAGATT		1557
Exoprotein 72	1498	ACAATAAATTACGGCGTGTTCAGCTACCCAACGCTTAATATTGCAGCCCTCAGATT		1557
Exoprotein AVPG 2015 Doctor	1498	ACAATAAATTACGGCGTGTTCAGCTACCCAACGCTTAATATTGCAGCCCTCAGATT		1557
Exoprotein AVPG 2015	1498	ACAATAAATTACGGCGTGTTCAGCTACCCAACGCTTAATATTGCAGCCCTCAGATT		1557
Exoprotein FARPER 174	1498	ACAATAAATTACGGCGTGTTCAGCTACCCAACGCTTAATATTGCAGCCCTCAGATT		1557
Exoprotein SA-3	1498	ACAATAAATTACGGCGTGTTCAGCTACCCAACGCTTAATATTGCAGCCCTCAGATT		1557
Exoprotein Hp8 Complementario	1498	ACAATAAATTACGGCGTGTTCAGCTACCCAACGCTTAATATTGCAGCCCTCAGATT		1557
Exoprotein Modesto Complementario	715	ACAATAAATTACGGCGTGTTCAGCTACCCAACGCTTAATATTGCAGCCCTCAGATT		774
Exoprotein JF4211	715	ACAATAAATTACGGCGTGTTCAGCTACCCAACGCTTAATATTGCAGCCCTCAGATT		774
Exoprotein NCTC11296	640	ACAATAAATTACGGCGTGTTCAGCTACCCAACGCTTAATATTGCAGCCCTCAGATT		699
Exoprotein 221	1621	GCATCTGAGGGAAAAATTGCTTGGGAAAAACCCITGATGCCAATCATCAGGCTCAAGGA		1680
Exoprotein 2671	1618	GCATCTGAGGGAAAAATTGCTTGGGAAAAACCCITGATGCCAATCATCAGGCTCAAGGA		1677
Exoprotein 72	1618	GCATCTGAGGGAAAAATTGCTTGGGAAAAACCCITGATGCCAATCATCAGGCTCAAGGA		1677
Exoprotein AVPG 2015 Doctor	1618	GCATCTGAGGGAAAAATTGCTTGGGAAAAACCCITGATGCCAATCATCAGGCTCAAGGA		1677
Exoprotein AVPG 2015	1618	GCATCTGAGGGAAAAATTGCTTGGGAAAAACCCITGATGCCAATCATCAGGCTCAAGGA		1677
Exoprotein FARPER 174	1618	GCATCTGAGGGAAAAATTGCTTGGGAAAAACCCITGATGCCAATCATCAGGCTCAAGGA		1677
Exoprotein SA-3	1618	GCATCTGAGGGAAAAATTGCTTGGGAAAAACCCITGATGCCAATCATCAGGCTCAAGGA		1677
Exoprotein Hp8 Complementario	1618	GCATCTGAGGGAAAAATTGCTTGGGAAAAACCCITGATGCCAATCATCAGGCTCAAGGA		1677
Exoprotein Modesto Complementario	835	GCATCTGAGGGAAAAATTGCTTGGGAAAAACCCITGATGCCAATCATCAGGCTCAAGGA		894
Exoprotein JF4211	835	GCATCTGAGGGAAAAATTGCTTGGGAAAAACCCITGATGCCAATCATCAGGCTCAAGGA		894
Exoprotein NCTC11296	760	GCATCTGAGGGAAAAATTGCTTGGGAAAAACCCITGATGCCAATCATCAGGCTCAAGGA		819

Anexo 2. Distribución a escala porcentual de la ubicación de los juegos de oligonucleótidos diseñados.



Anexo 3. Nomenclatura utilizada para la identificación de las muestras de los distintos tratamientos de los experimentos

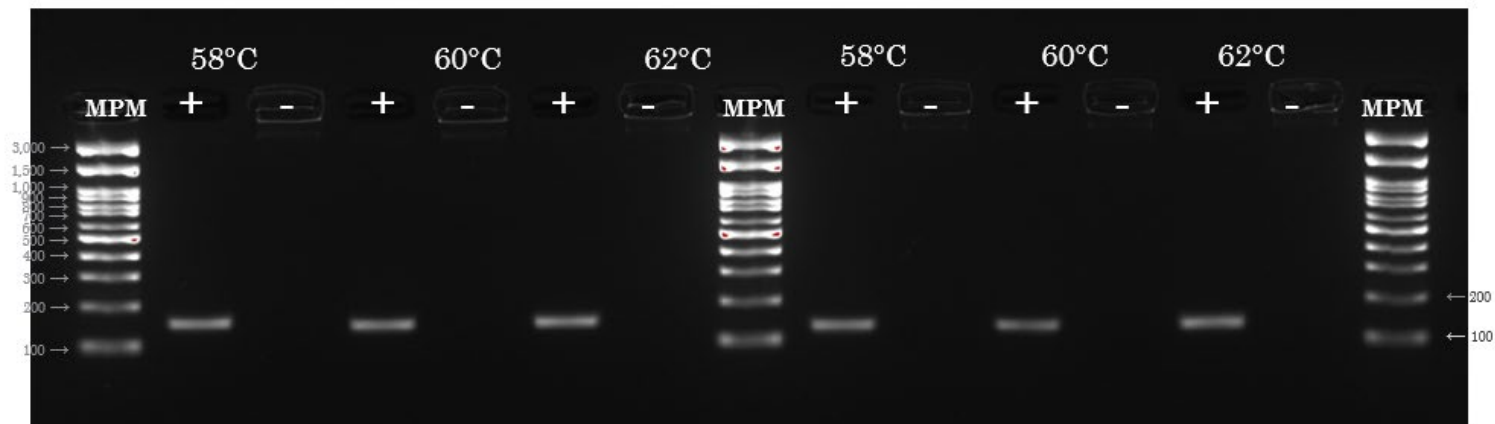
CEPA	Etapa de crecimiento	Tratamiento	ID
COJ7	Fase exponencial	Control BHI	1EX7
			2EX7
			3EX7
		BHI+Cloruro férrico	H1EX7
			H2EX7
			H3EX7
		BHI + 2,2'-dipyridyl	D1EX7
			D2EX7
			D3EX7
	Sulfato de Condroitina	C1EX7	
		C2EX7	
		C3EX7	
	Fase estacionaria	Control BHI	1ES7
			2ES7
			3ES7
		BHI+Cloruro férrico	H1ES7
			H2ES7
			H3ES7
BHI + 2,2'-dipyridyl		D1ES7	
		D2ES7	
		D3ES7	
Sulfato de Condroitina	C1ES7		
	C2ES7		
	C3ES7		

CEPA	Etapa de crecimiento	Tratamiento	ID
AVPG 2015	Fase exponencial	Control BHI	1EX15
			2EX15
			3EX15
		BHI+Cloruro férrico	H1EX15
			H2EX15
			H3EX15
		BHI + 2,2'-dipyridyl	D1EX15
			D2EX15
			D3EX15
	Sulfato de Condroitina	C1EX15	
		C2EX15	
		C3EX15	
	Fase estacionaria	Control BHI	1ES15
			2ES15
			3ES15
		BHI+Cloruro férrico	H1ES15
			H2ES15
			H3ES15
BHI + 2,2'-dipyridyl		D1ES15	
		D2ES15	
		D3ES15	
Sulfato de Condroitina	C1EX15		
	C2EX15		
	C3EX15		

Anexo 4. Resultados de las estandarizaciones de los oligonucleótidos *atpD1*, *recN* (diseño único), *hntp210-1* y 2, *chl1-1* y 2, *chl2-1* y 2, *avxA1* y 2, *cdtB1* y 2, *pepN1* y 2, *fhaB1* y 2, *ompA1* y 2, *cdtA1* y 2, *cdtC1* y 2, *gyrA1*, *atpD2*, y *fur* (diseño único) con la concentración de oligonucleótidos a 0.2 μ M. Geles de agarosa teñidos con SYBR GREEN, marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

atpD
Diseño 1

recN

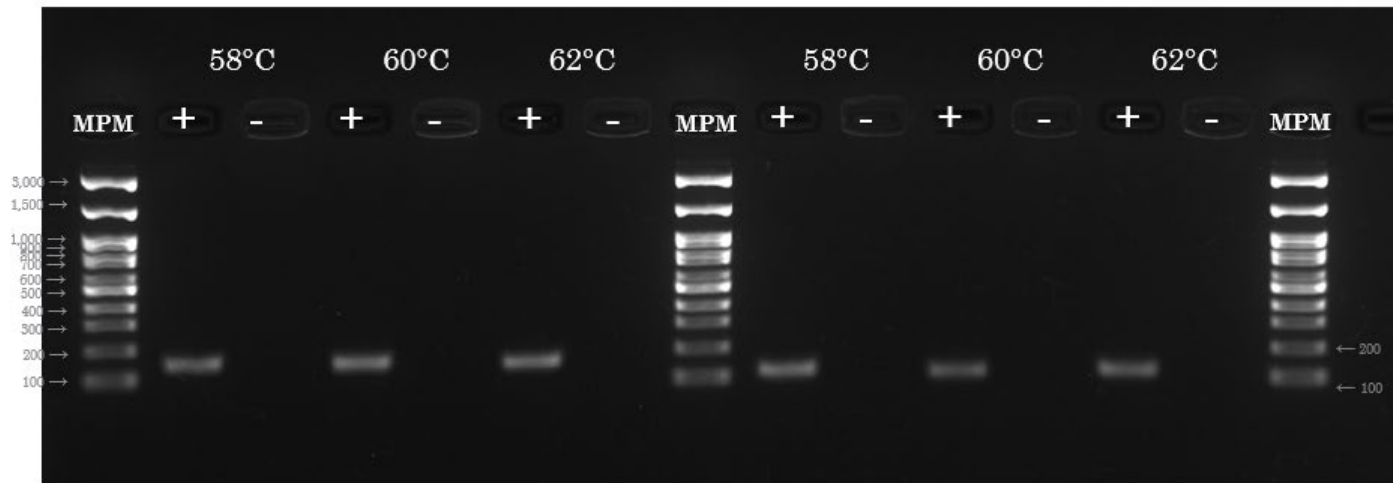


Tamaño del fragmento: 175 pb

Tamaño del fragmento: 149 pb

hmtp210
Diseño 1

hmtp210
Diseño 2

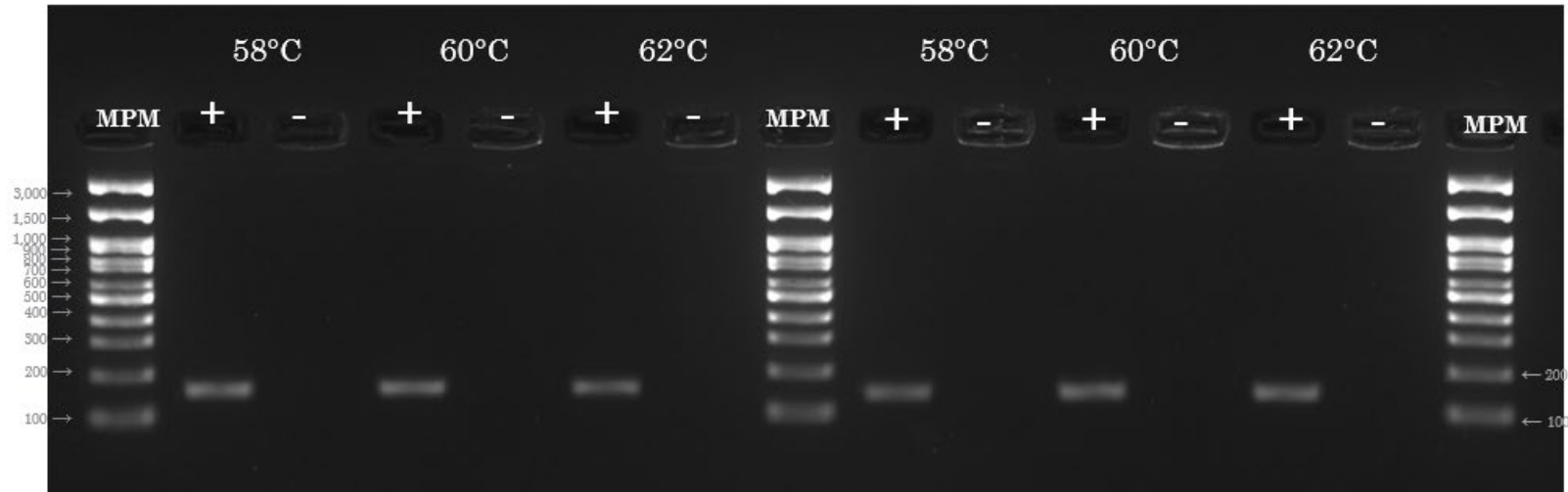


Tamaño del fragmento: 157 pb

Tamaño del fragmento: 119 pb

chl1
Diseño 1

chl1
Diseño 2

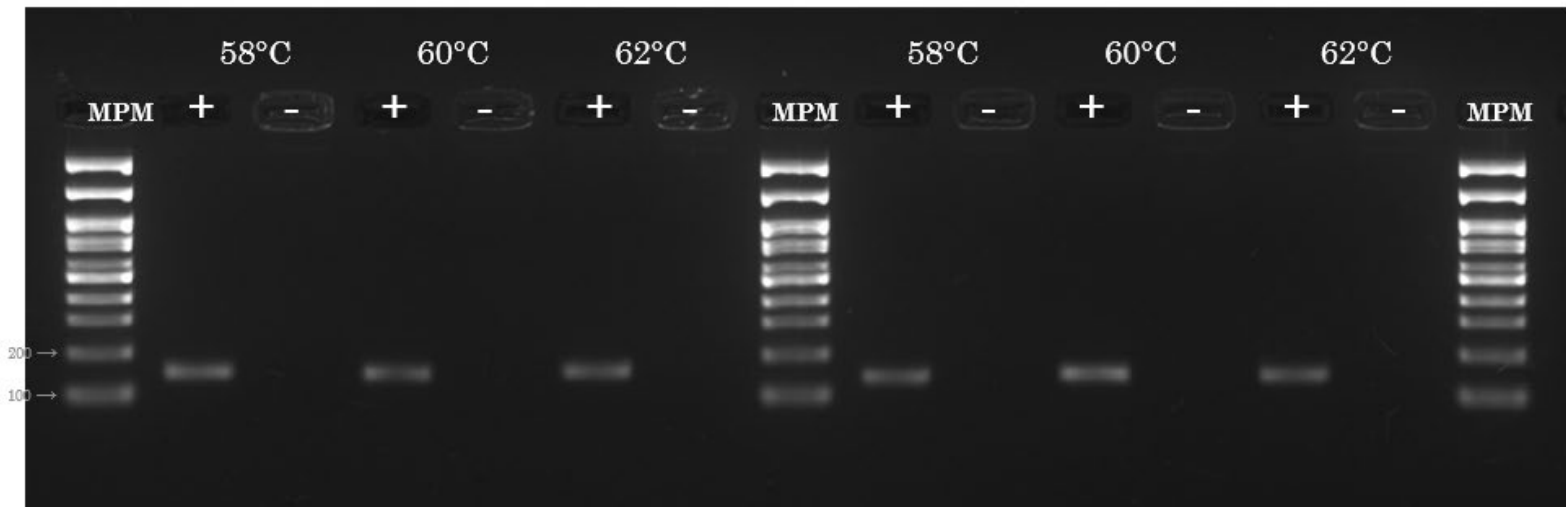


Tamaño del fragmento: 170 pb

Tamaño del fragmento: 147 pb

chl2
Diseño 1

chl2
Diseño 2

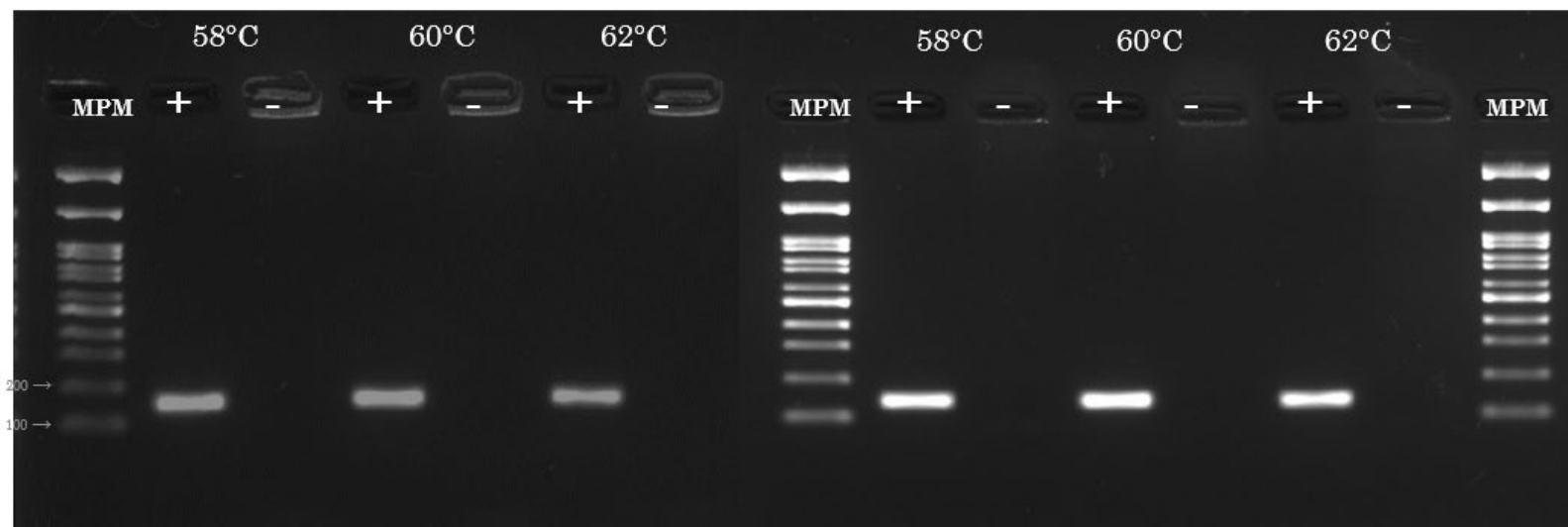


Tamaño del fragmento: 154
pb

Tamaño del fragmento: 147
pb

auxA
Diseño 1

auxA
Diseño 2

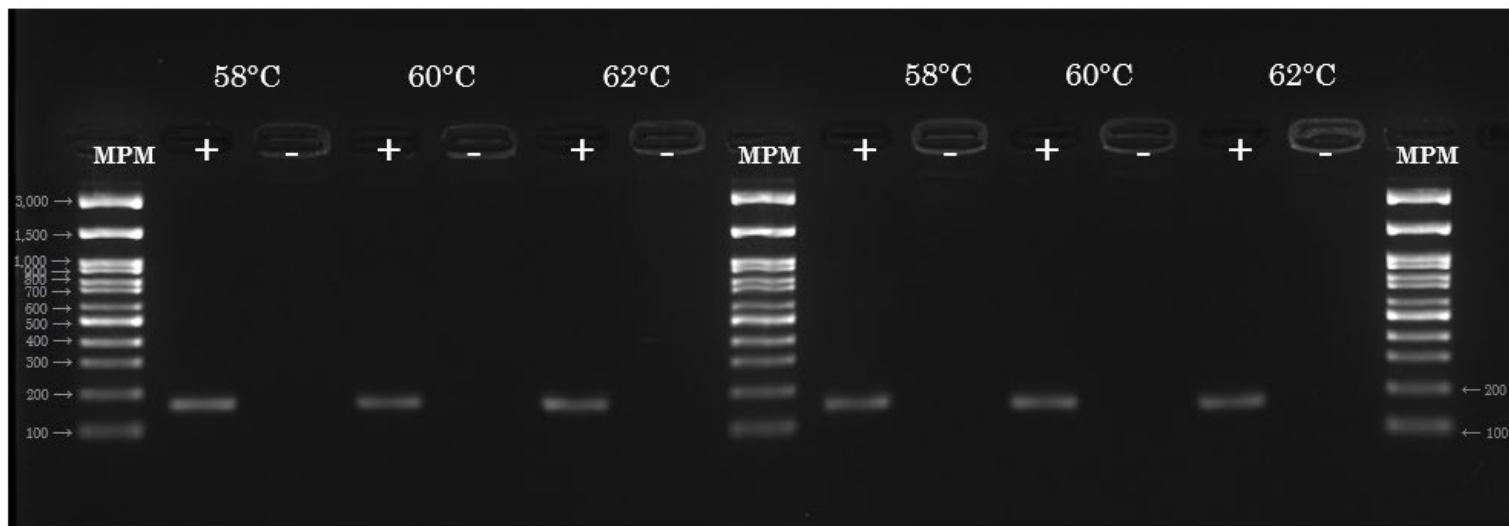


Tamaño del fragmento: 147 pb

Tamaño del fragmento: 131 pb

cdtB
Diseño 1

cdtB
Diseño 2

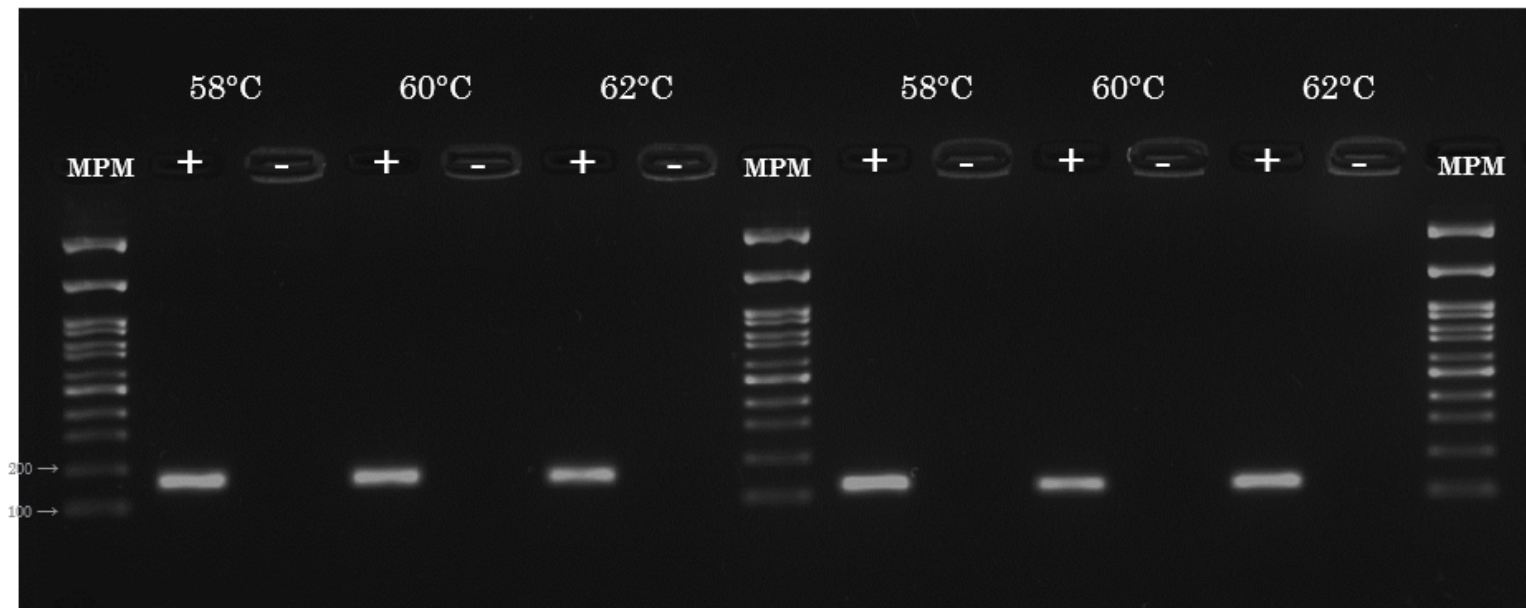


Tamaño del fragmento: 154 pb

Tamaño del fragmento: 147 pb

pepN
Diseño 1

pepN
Diseño 2

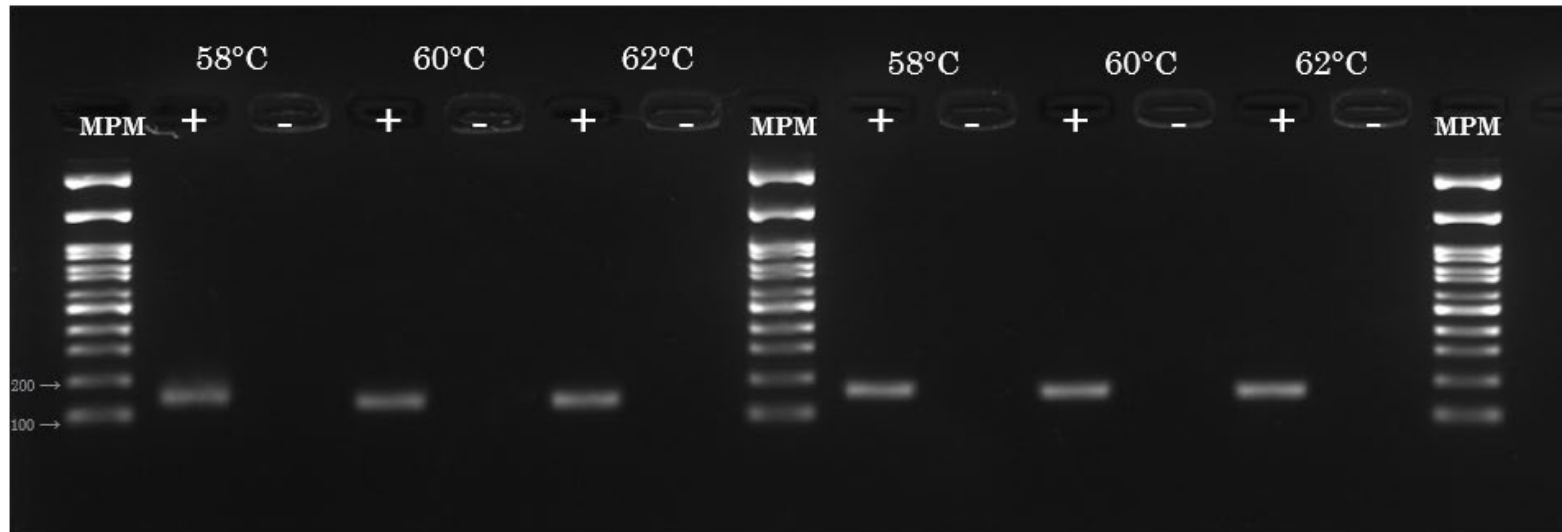


Tamaño del fragmento: 130 pb

Tamaño del fragmento: 110 pb

fhaB
Diseño 1

fhaB
Diseño 2

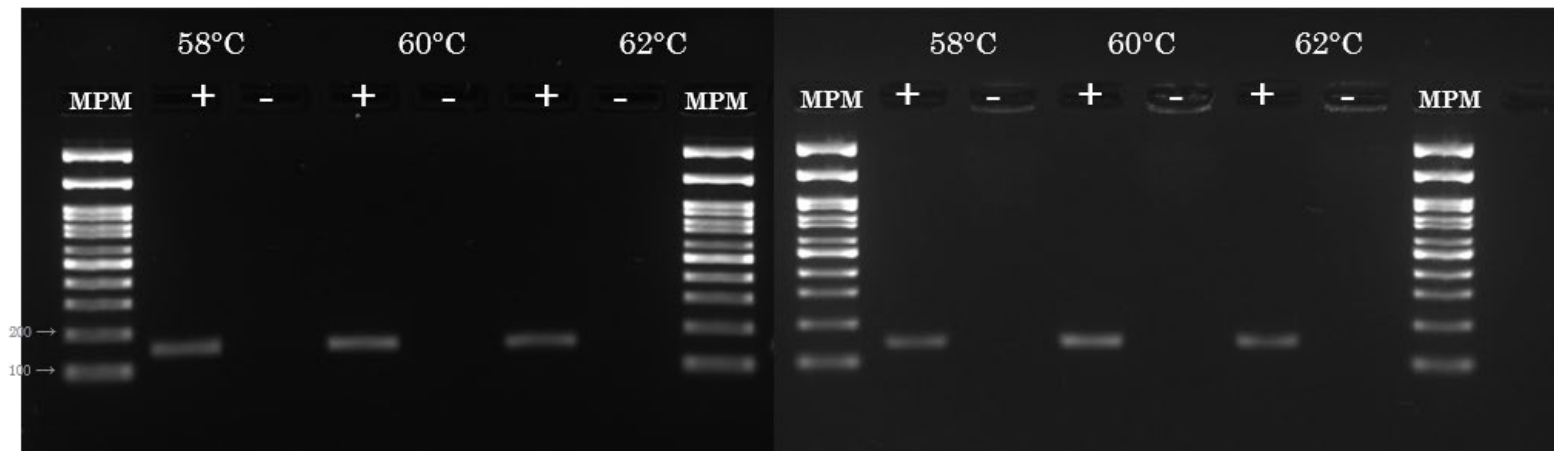


Tamaño del fragmento: 144 pb

Tamaño del fragmento: 168 pb

*ompA**
Diseño 1

ompA
Diseño 2



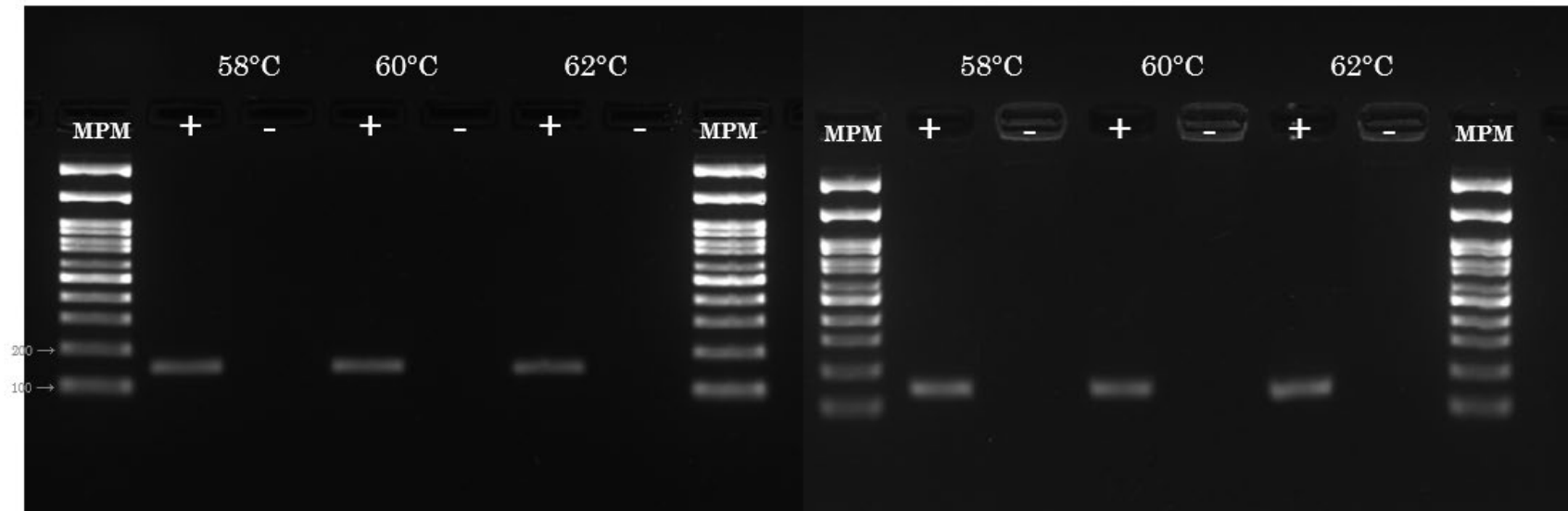
Tamaño del fragmento: 167 pb

Tamaño del fragmento: 157 pb

*Se trabajó a una concentración de 0.1 μ M de primers y 25 ng de DNA.

*cdtA**
Diseño 1

cdtA
Diseño 2



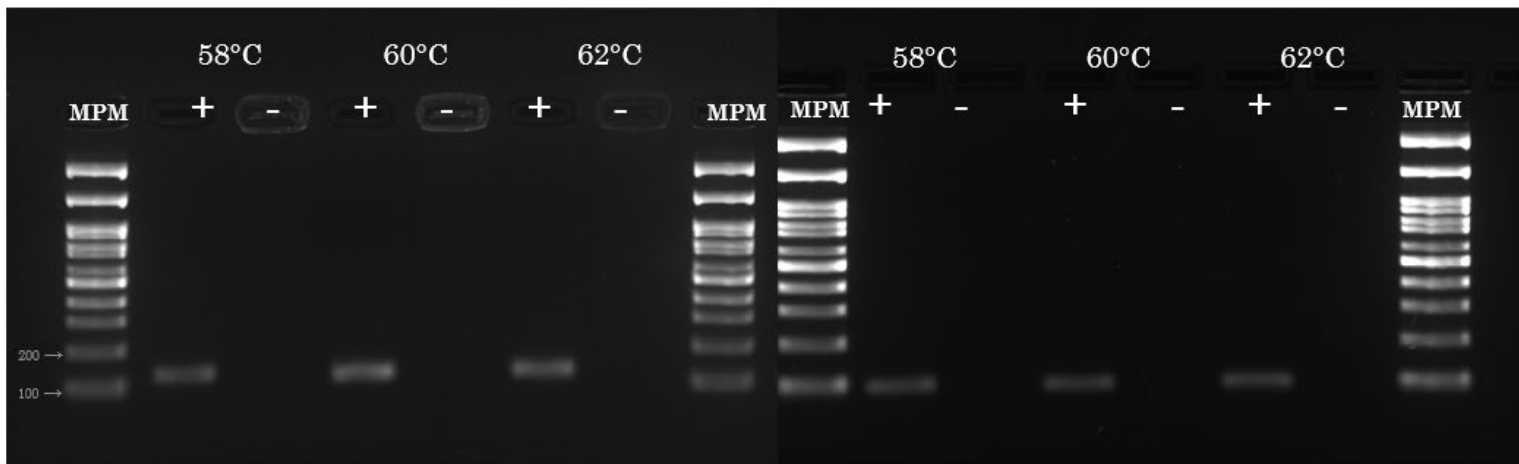
Tamaño del fragmento: 166 pb

Tamaño del fragmento: 151 pb

*Se trabajó a una concentración de 0.1 μ M de primers y 25 ng de DNA.

cdtC
Diseño 1

*cdtC**
Diseño 2



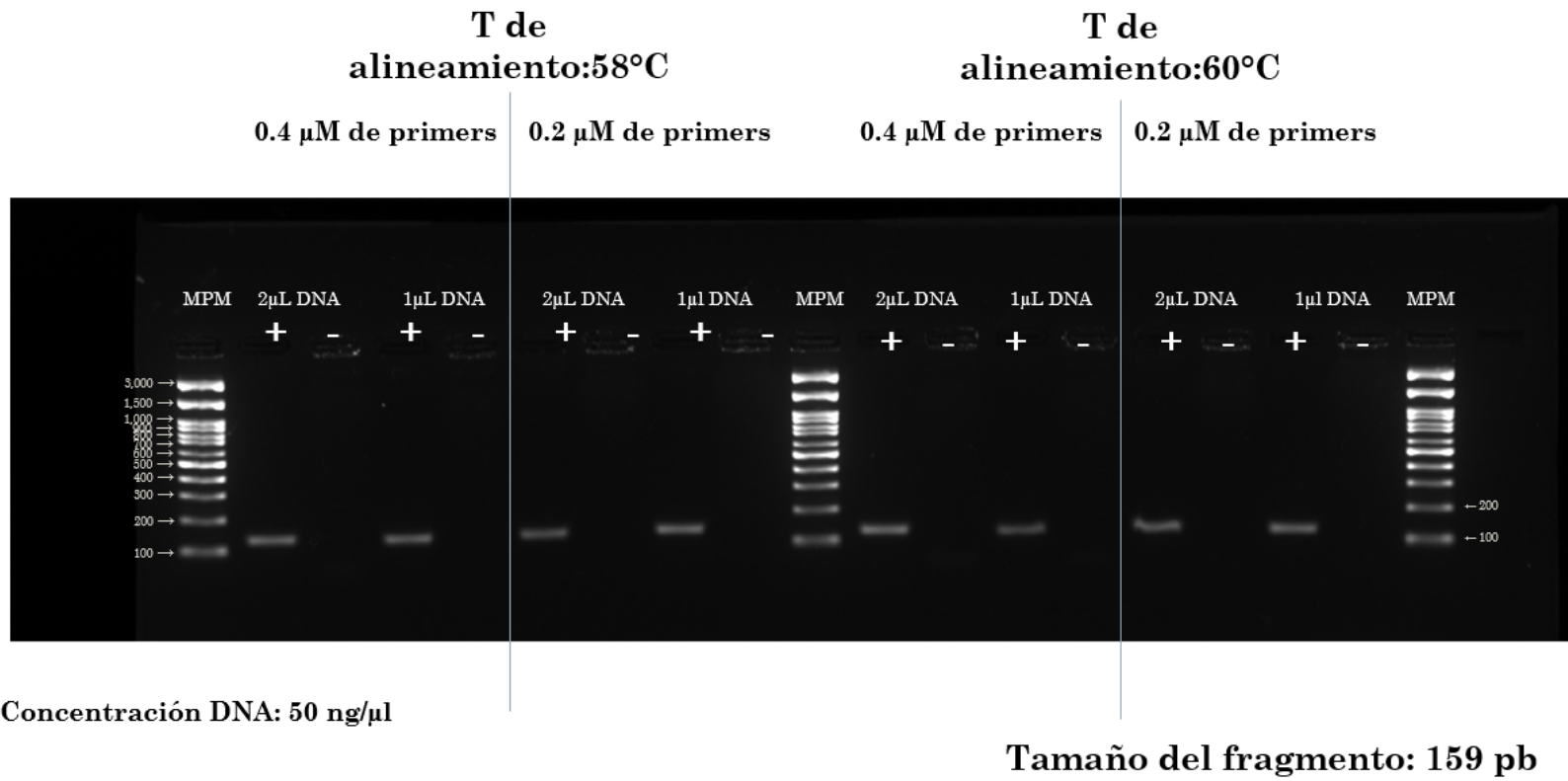
Tamaño del fragmento: 135 pb

Tamaño del fragmento: 102 pb

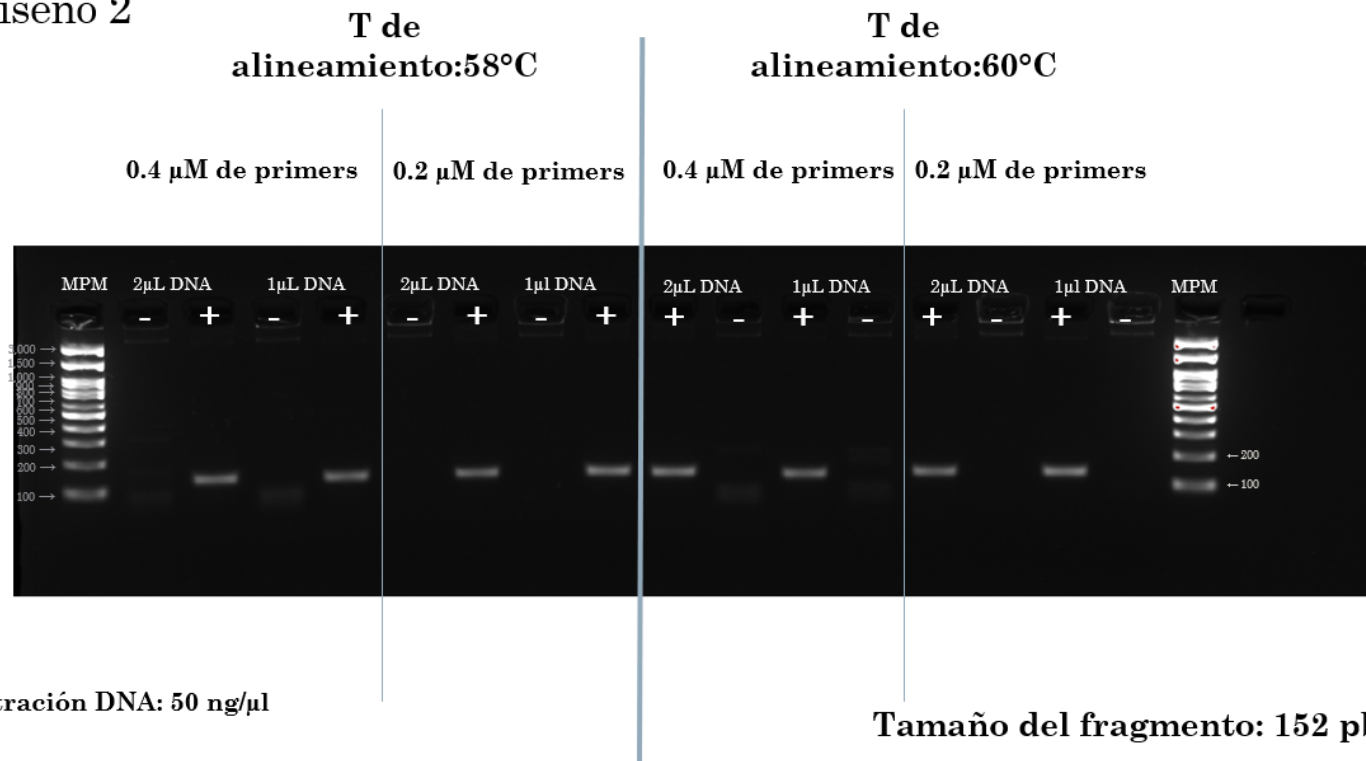
*Se trabajó a una concentración de 0.1 μ M de primers y 25 ng de DNA.

gyrA

Diseño 1



atpD
Diseño 2



fur

T de
alineamiento: 58°C

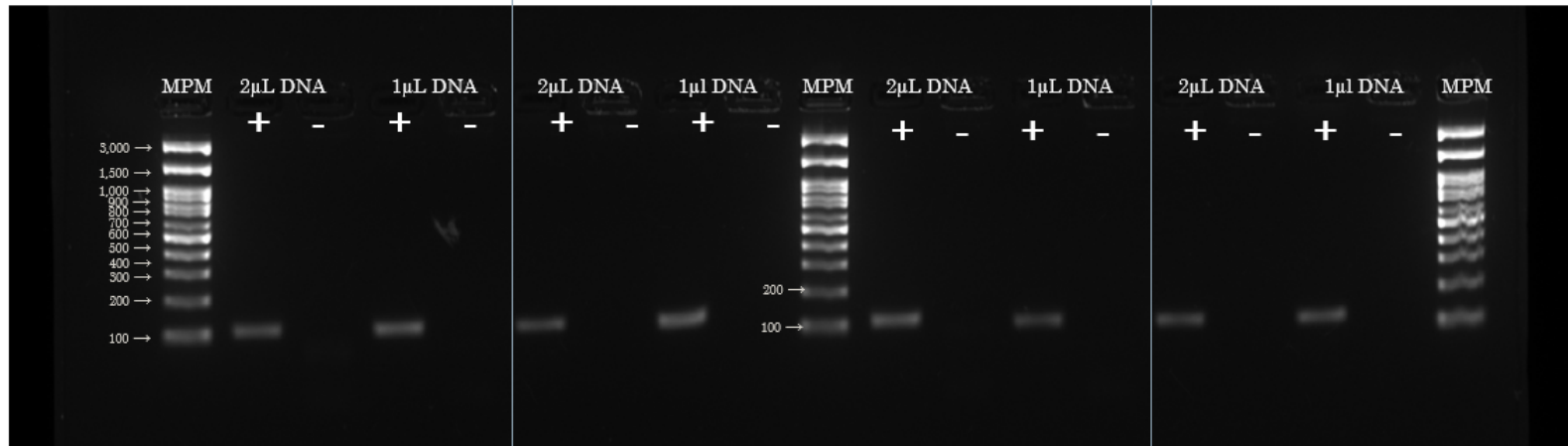
T de
alineamiento: 60°C

0.4 μM de primers

0.2 μM de primers

0.4 μM de primers

0.2 μM de primers

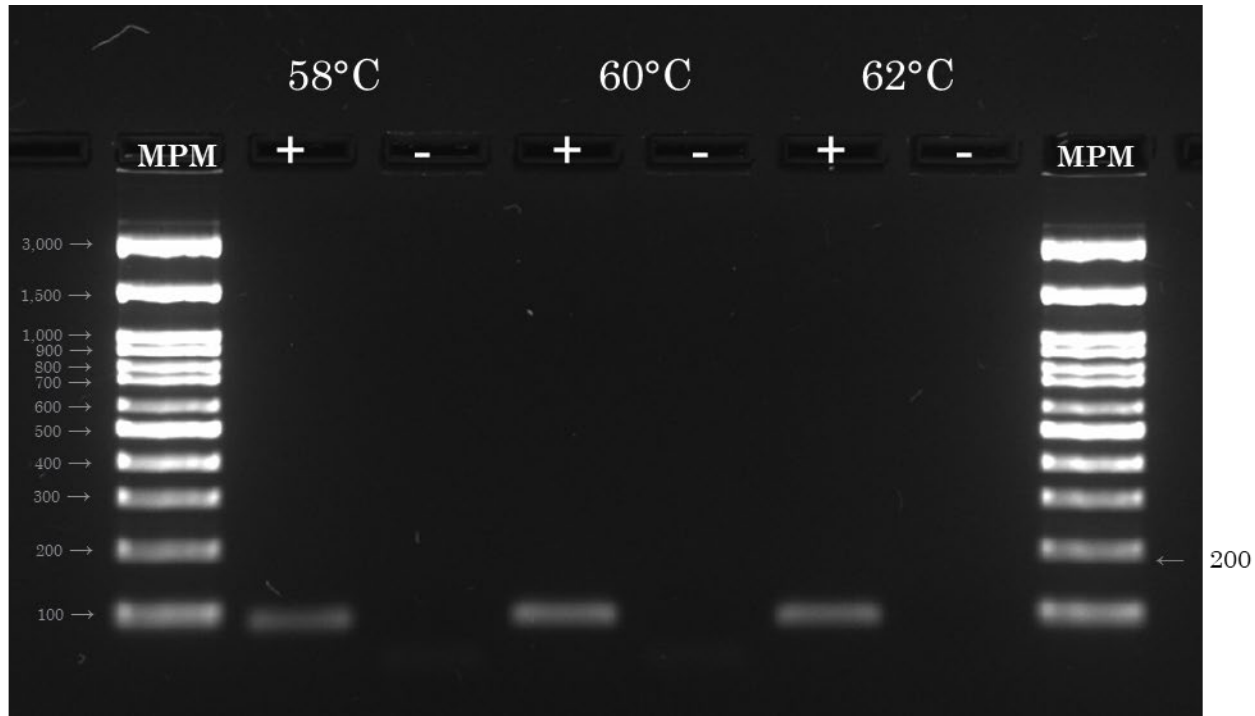


Concentración DNA: 50 ng/μl

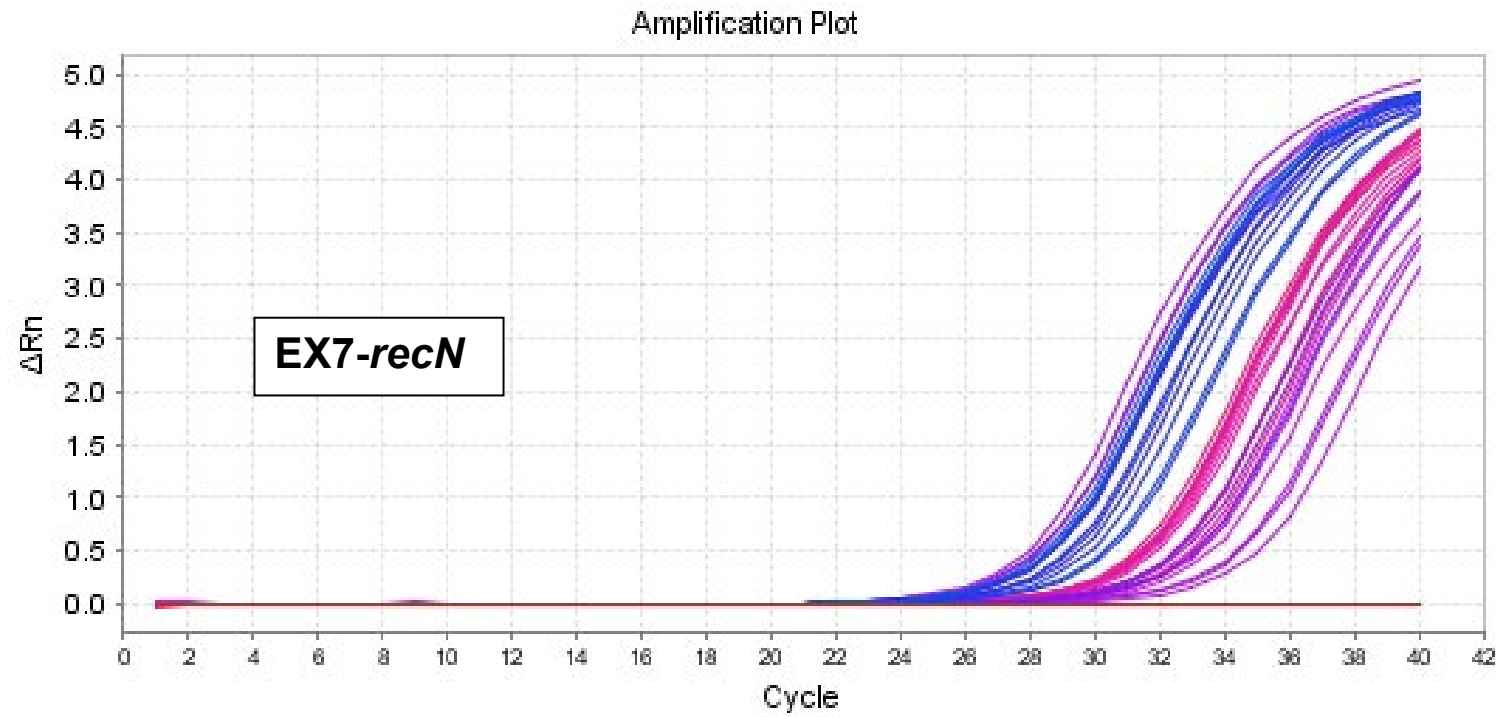
Tamaño del fragmento: 131 pb

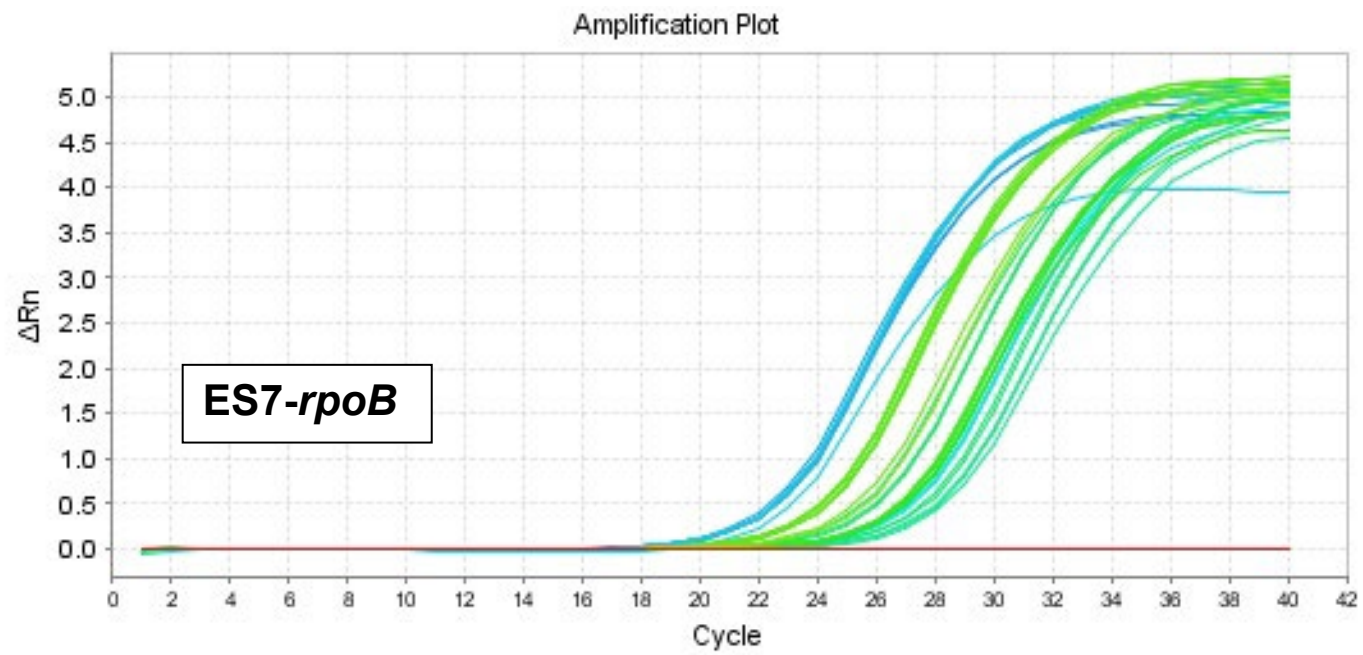
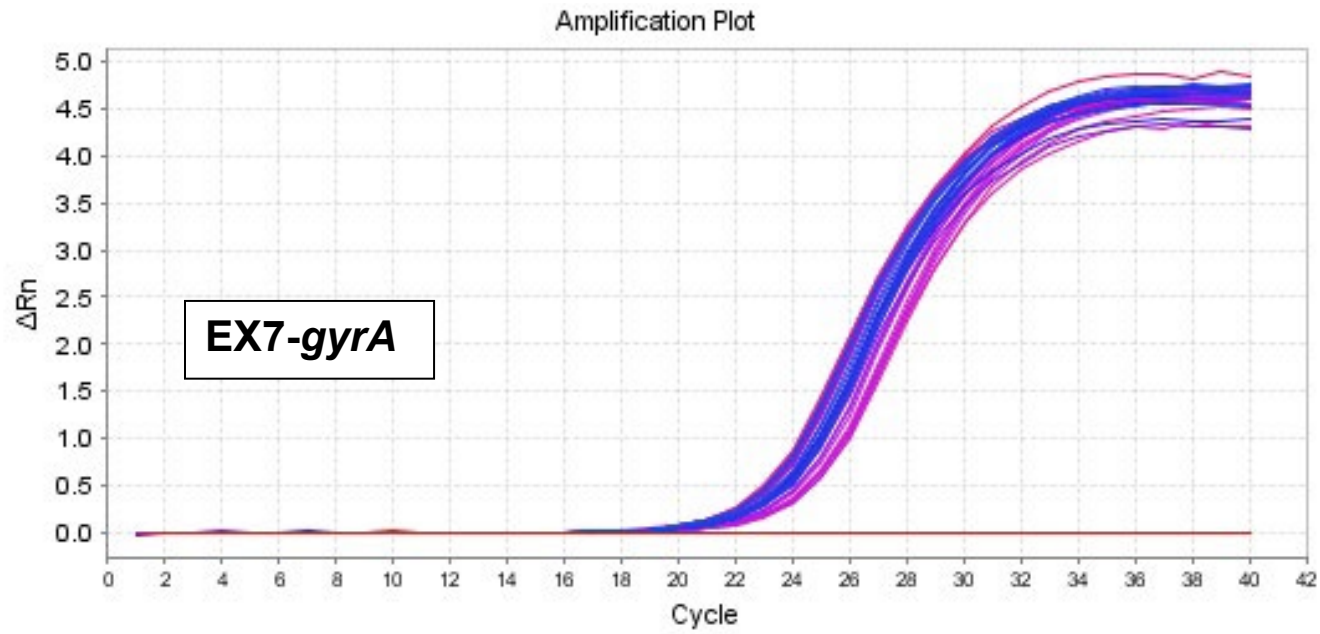


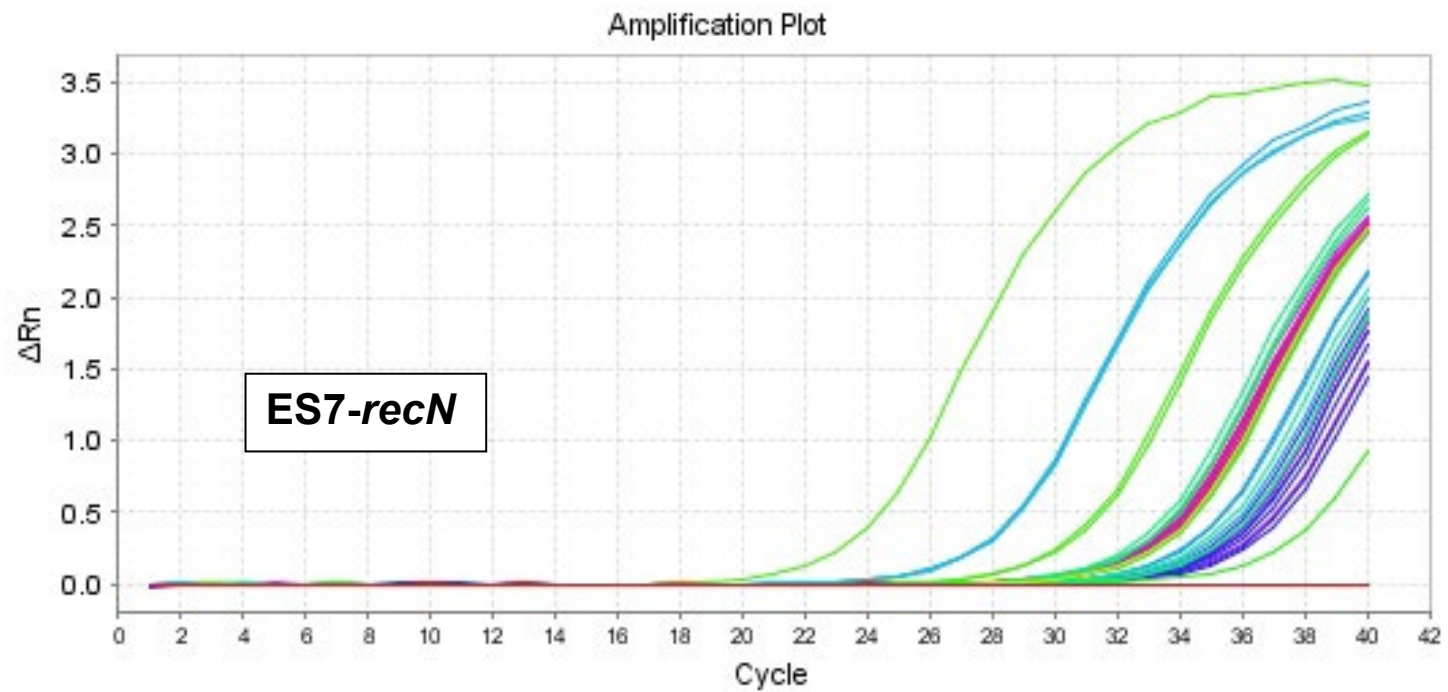
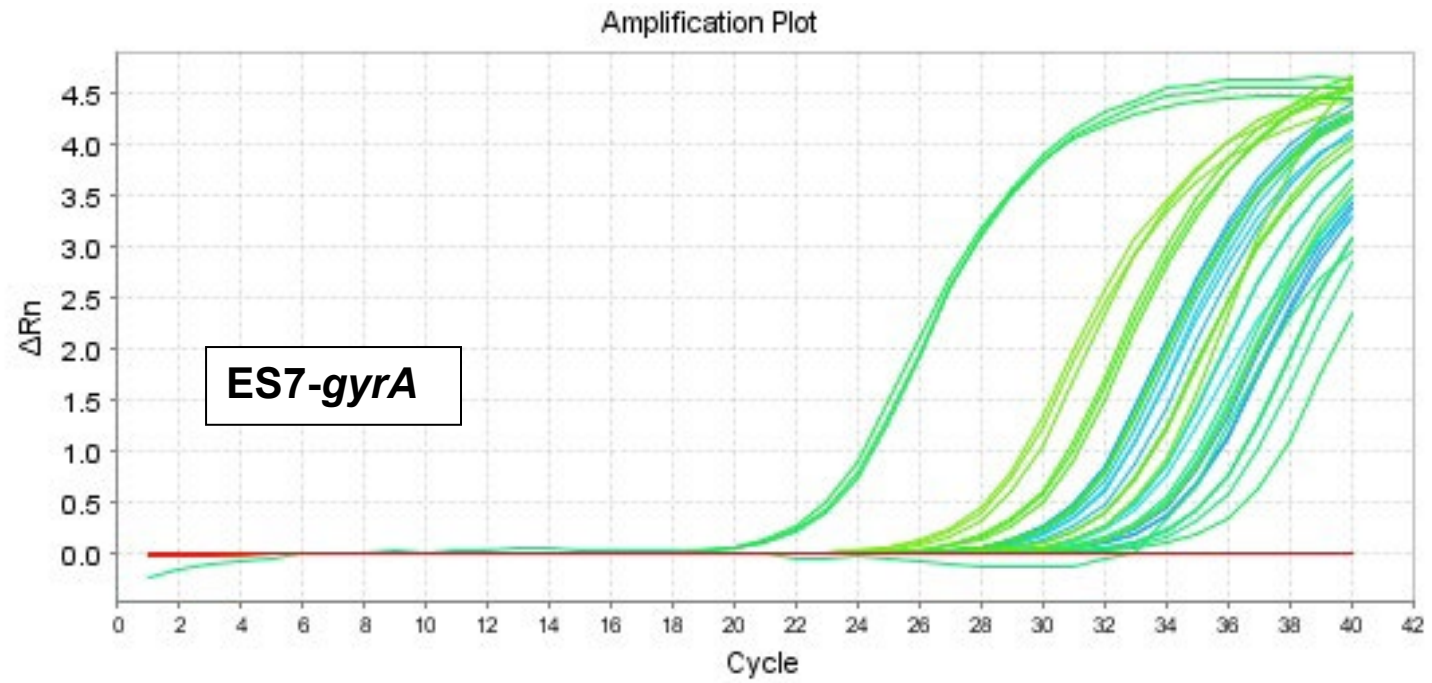
Anexo 5. Los diseños 16S, *cdtC* 2, *cdtA* 1 y *ompA* 1 presentaron dímeros en la concentración usada en los demás diseños. Estos fueron trabajados a una concentración más baja de 0.1 μ M de oligonucleótidos y 25 ng de ADN. Se muestra el resultado final del gen 16S.



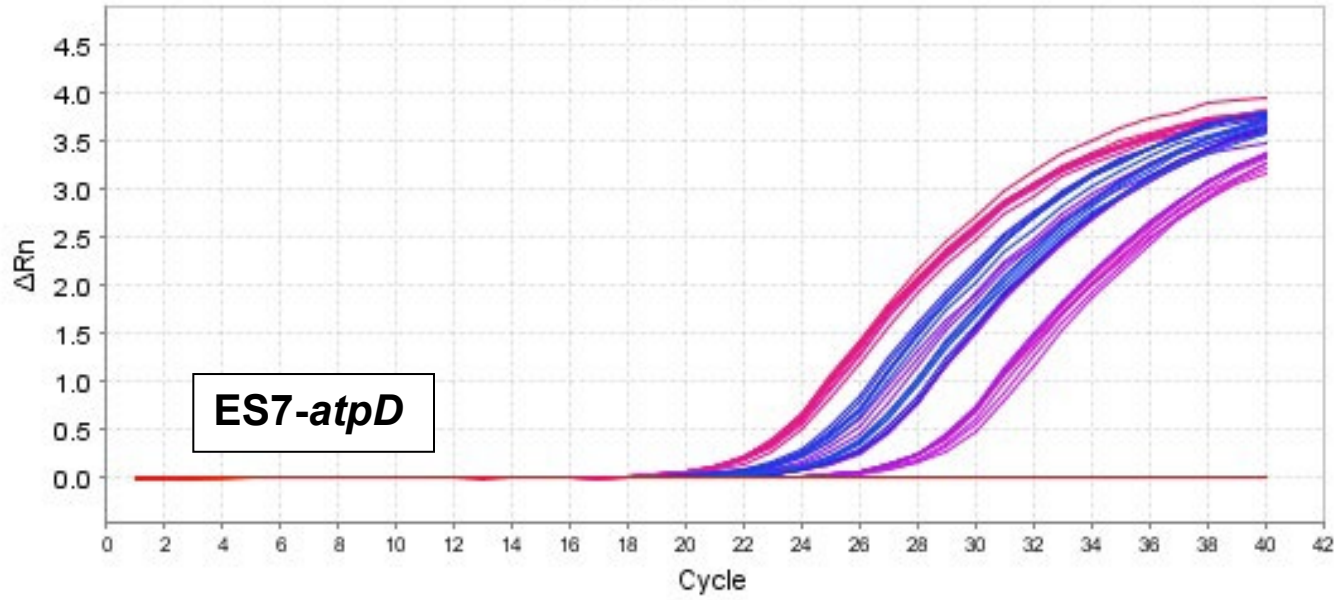
Anexo 6. Curvas de amplificación de los genes normalizadores *rpoB*, *gyrA*, *atpD* y *recN* de los grupos de muestras EX7, ES7, EX15 y ES15 para los 4 tratamientos.



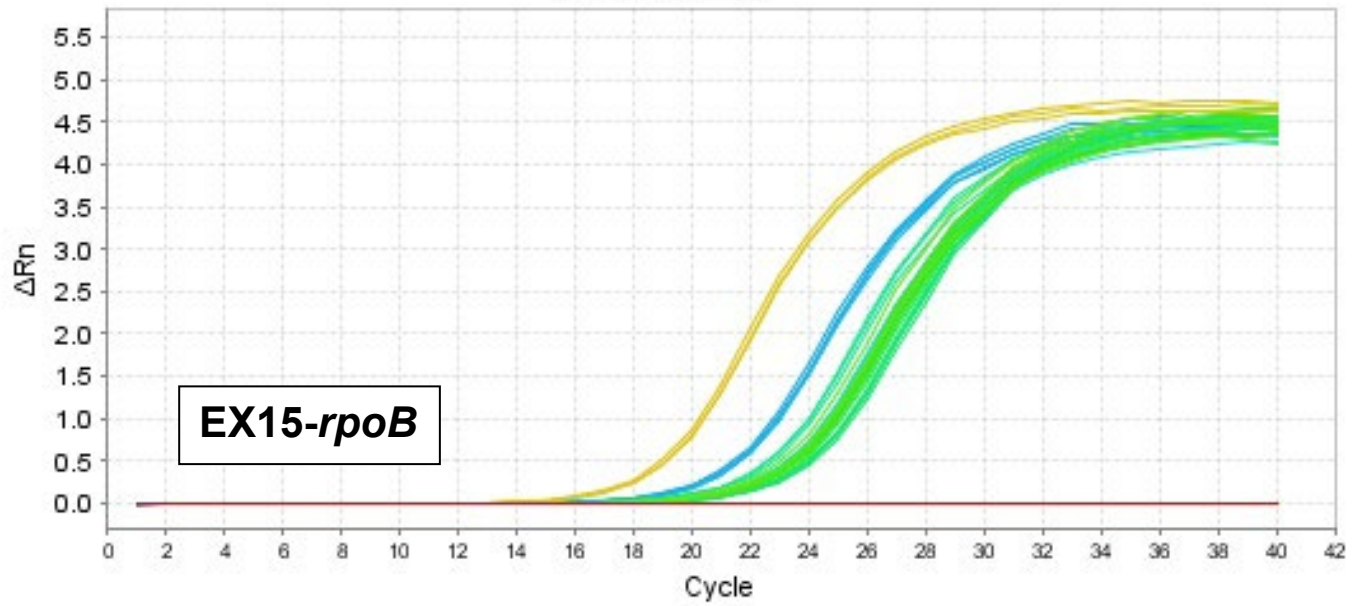


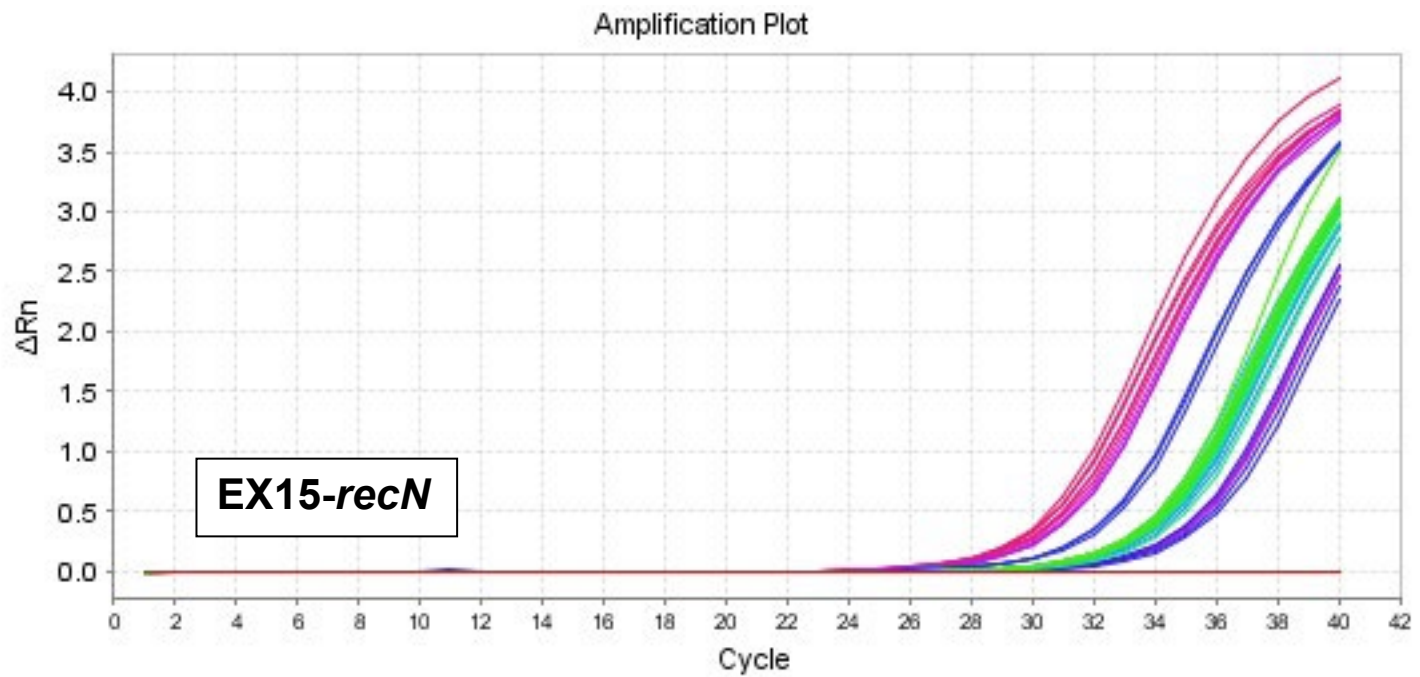
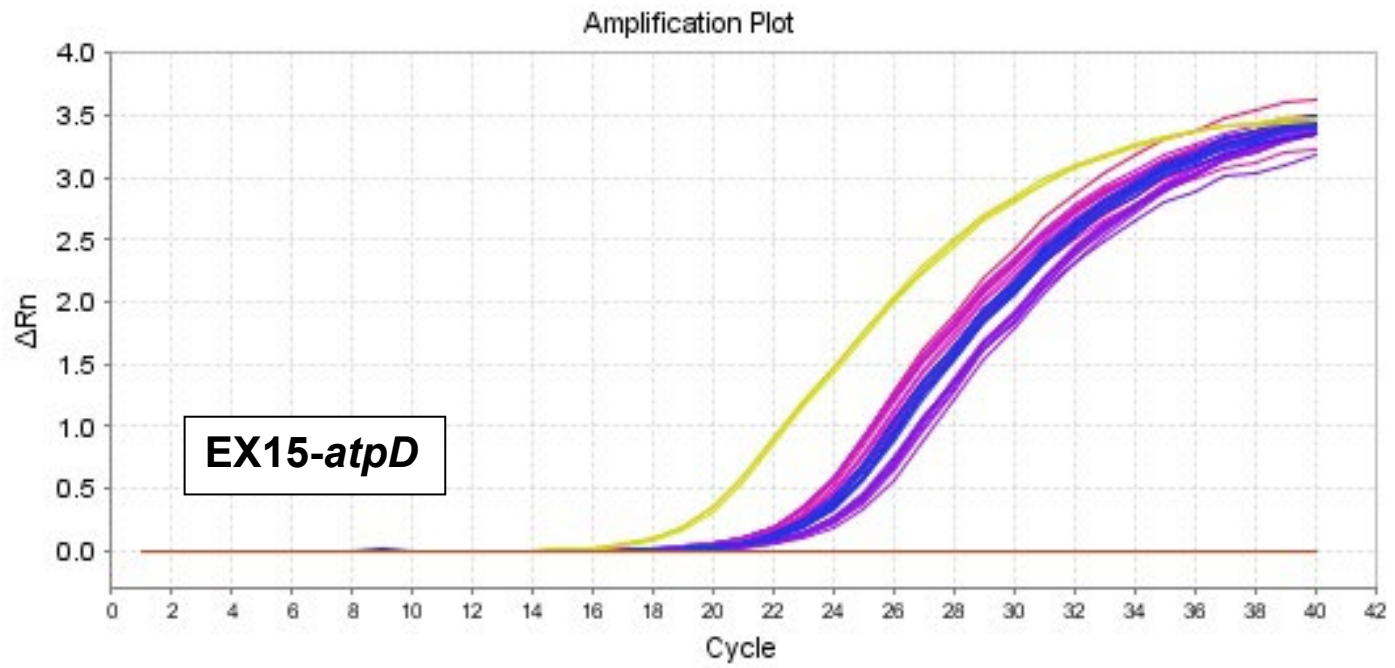


Amplification Plot

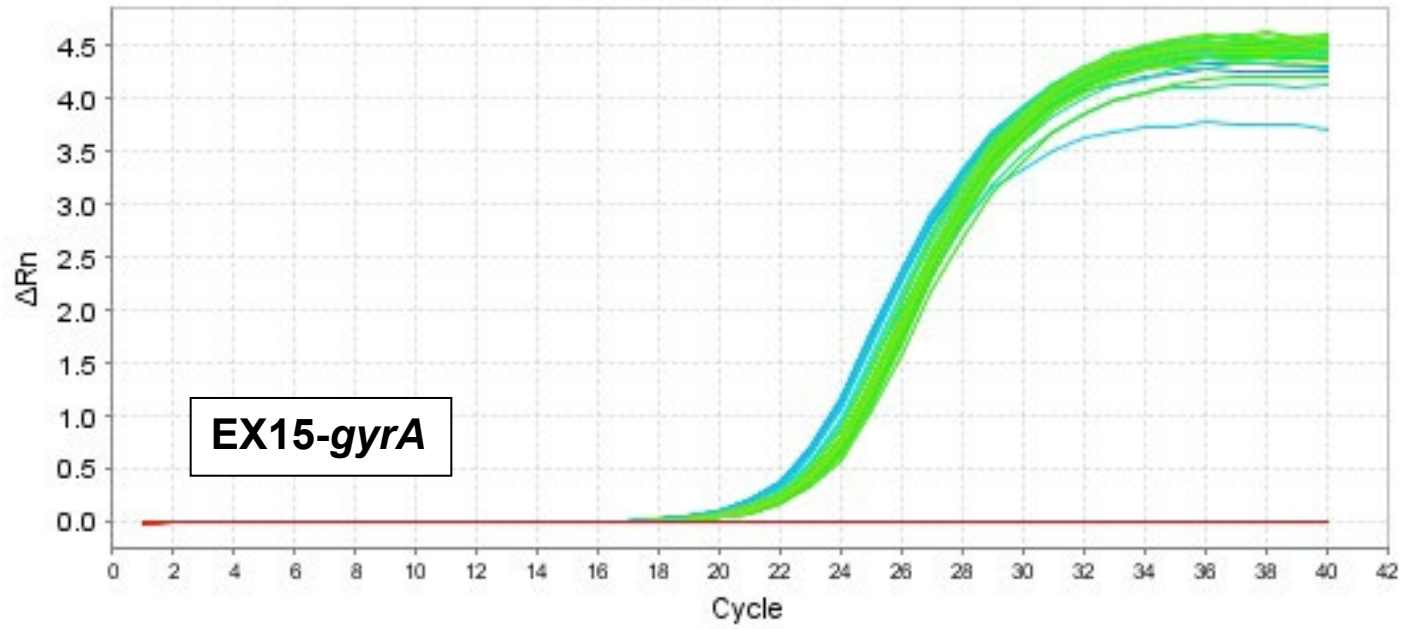


Amplification Plot

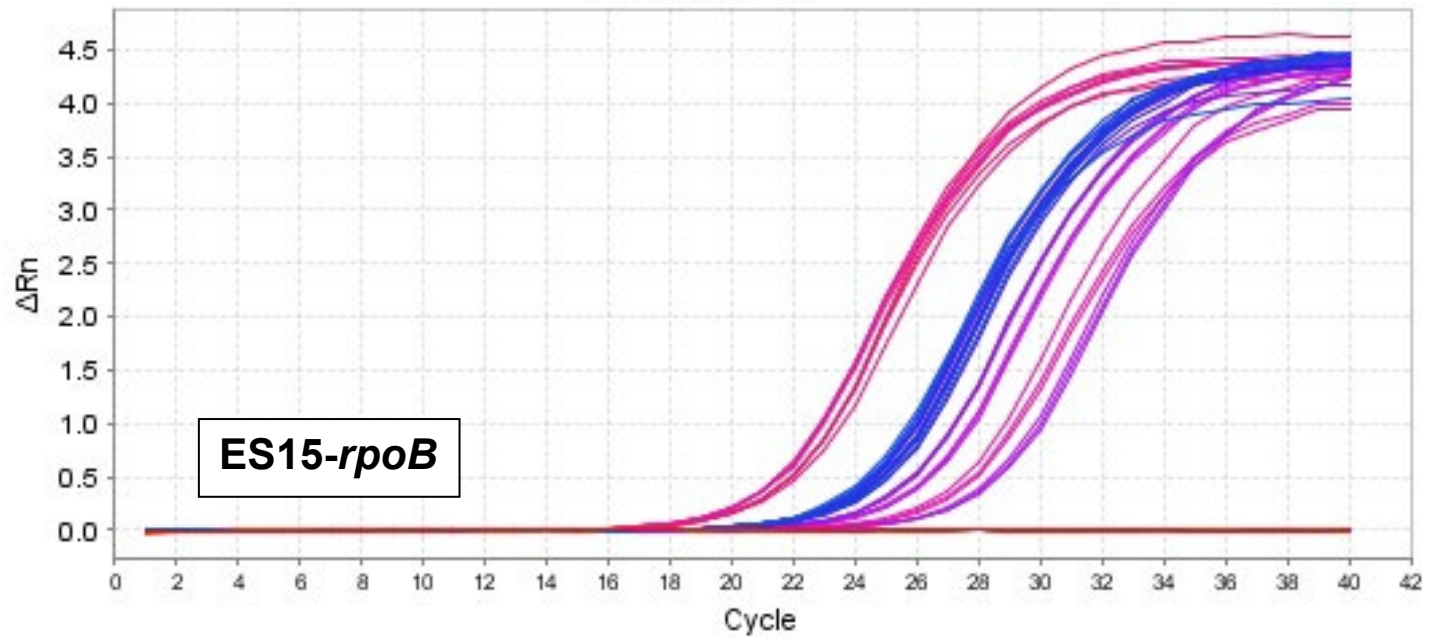




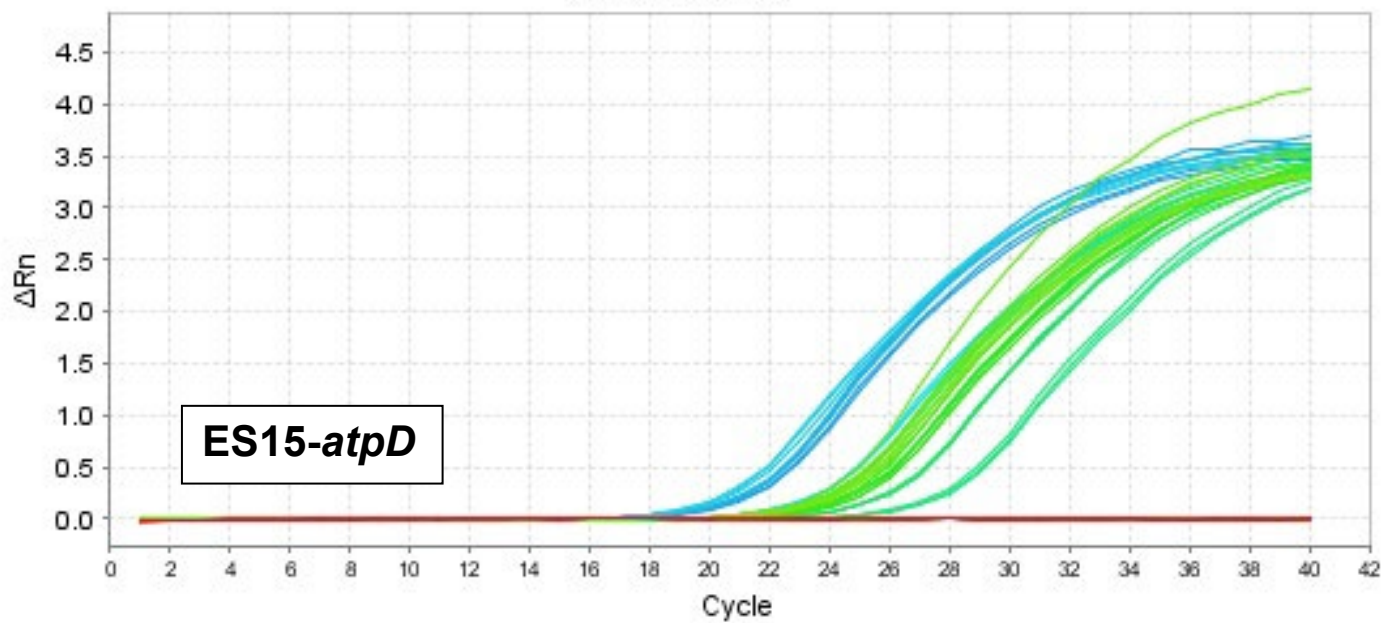
Amplification Plot



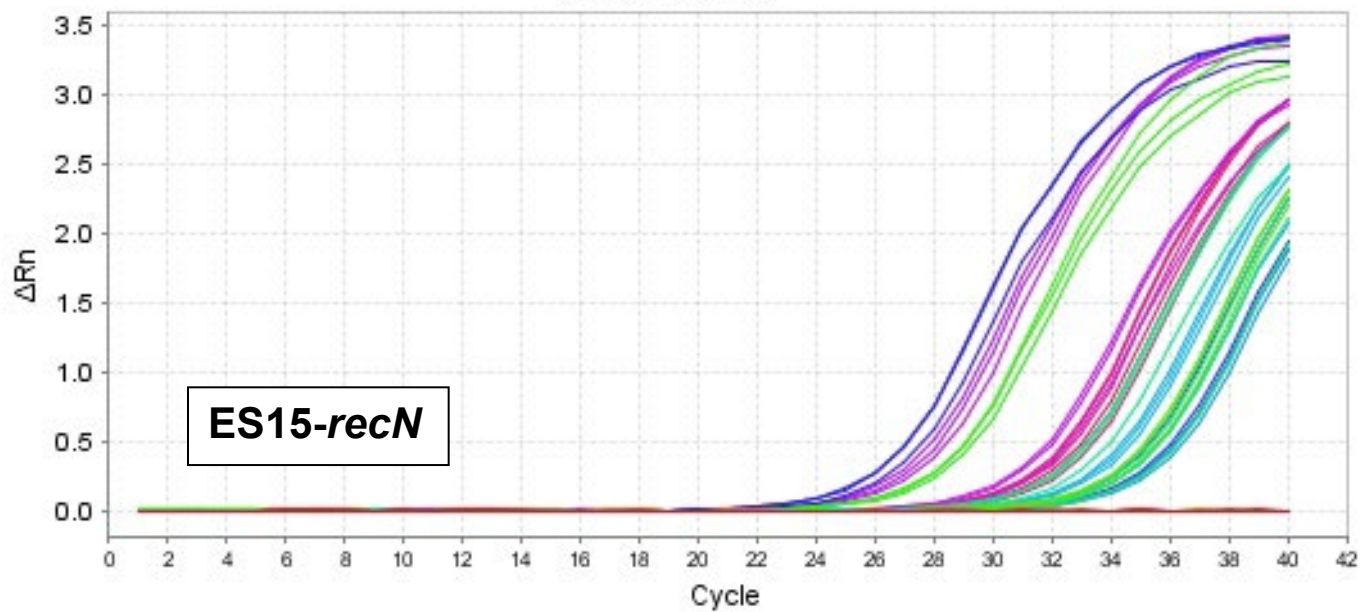
Amplification Plot

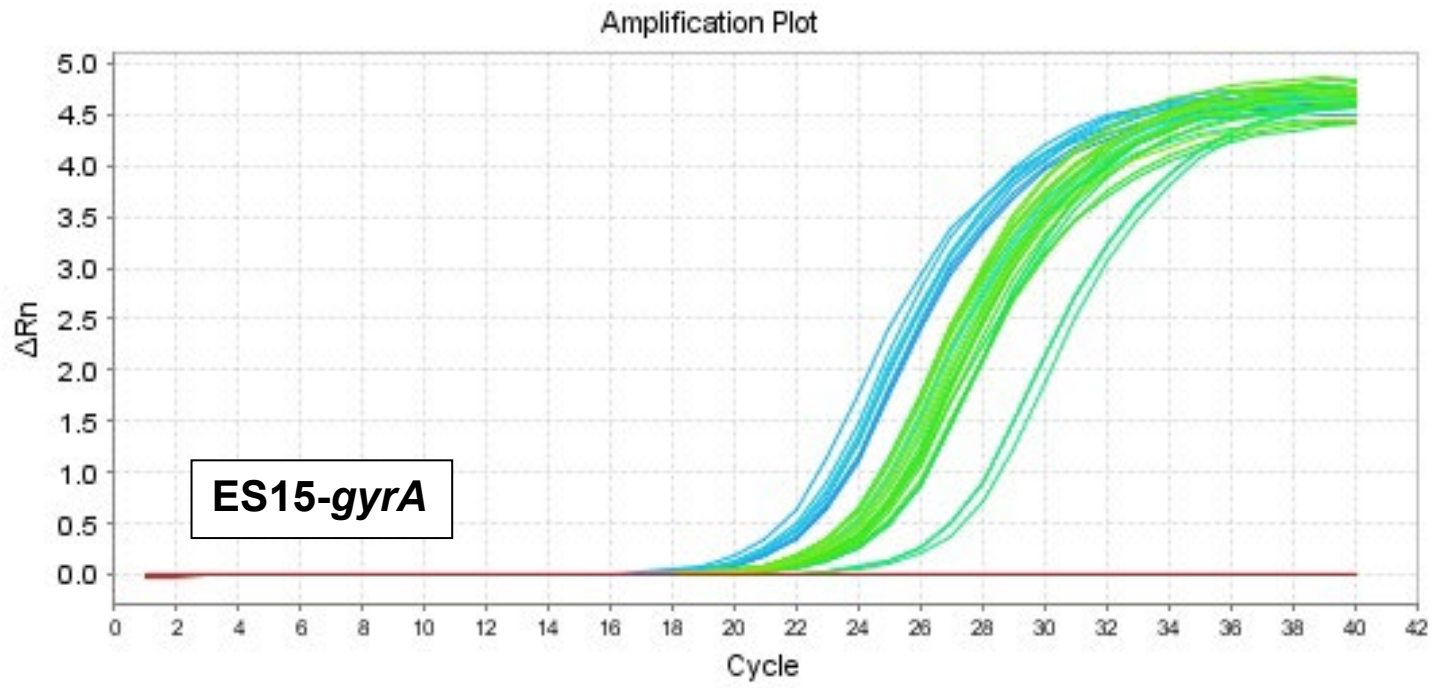


Amplification Plot

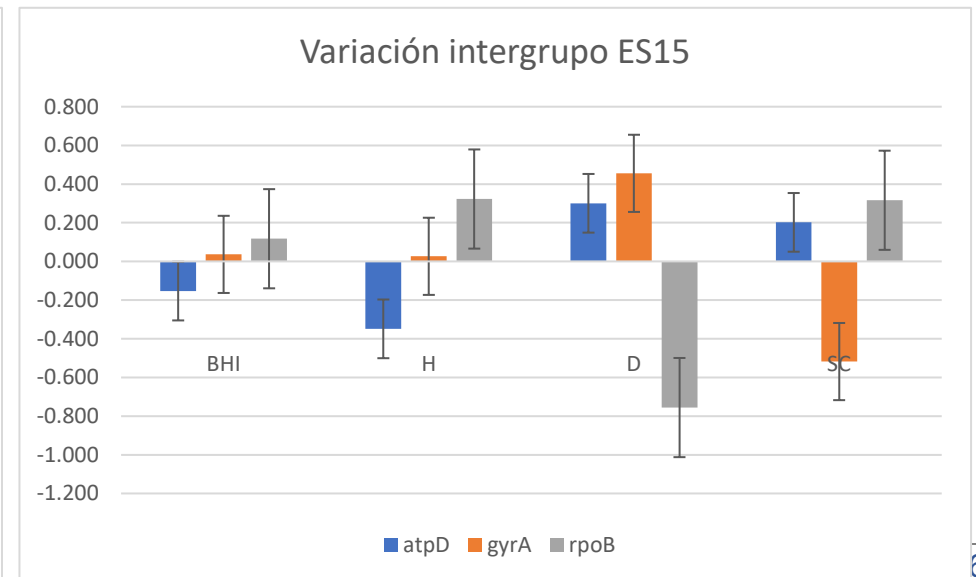
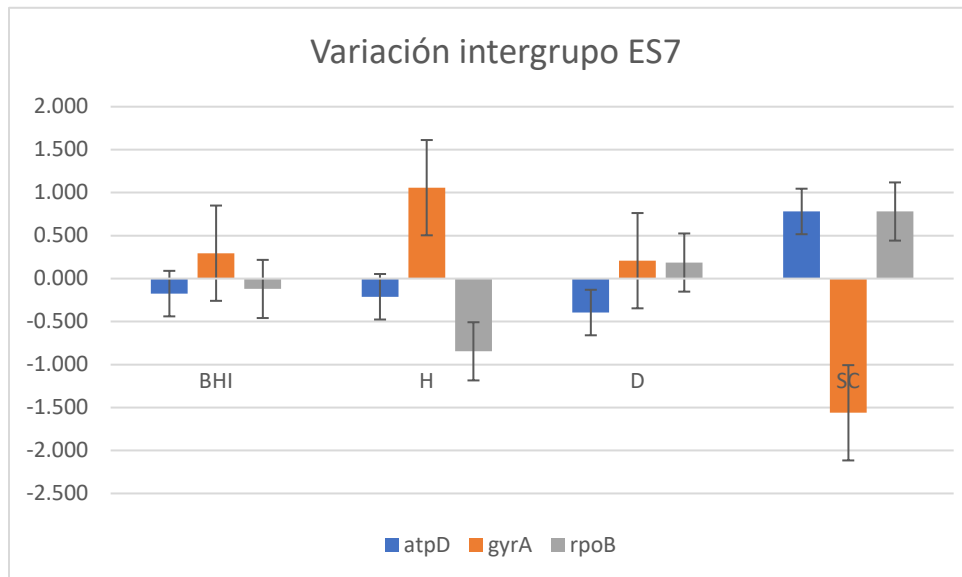
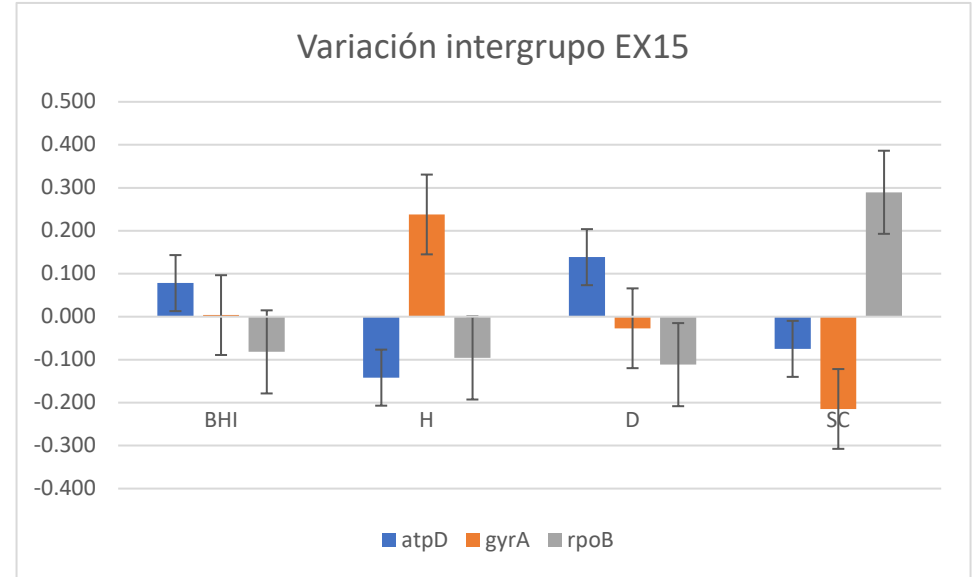
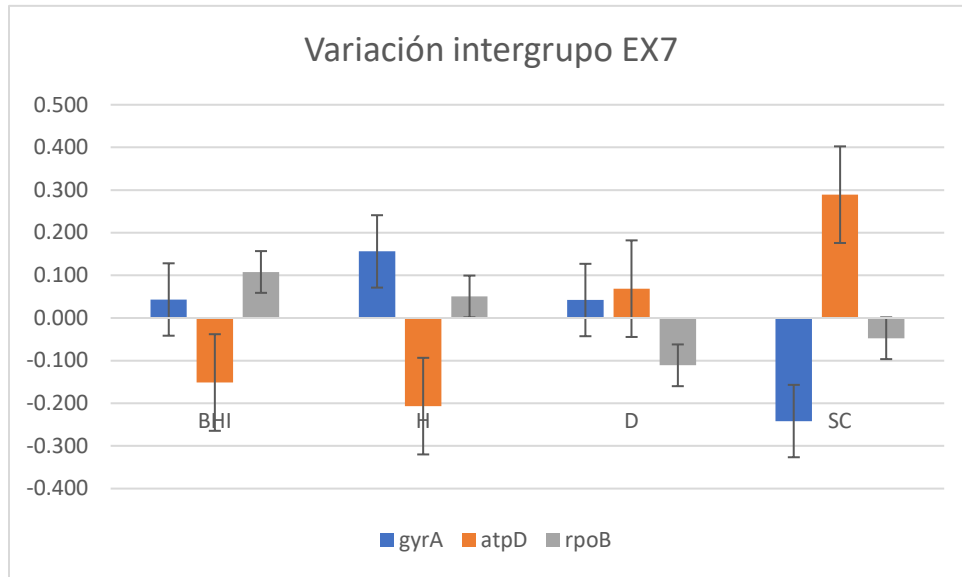


Amplification Plot

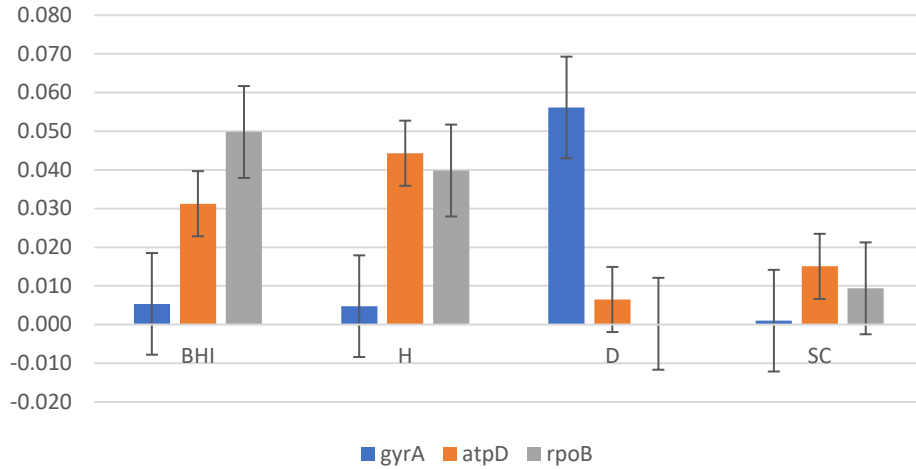




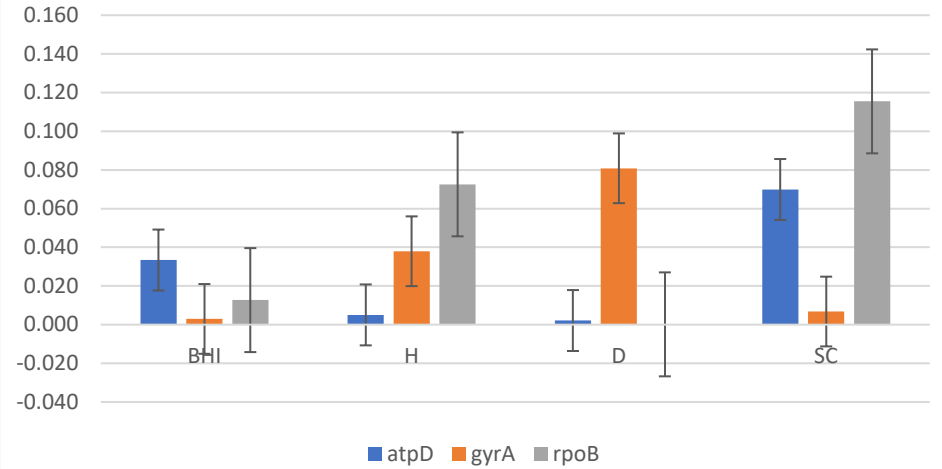
Anexo 7. Gráficas de variación intergrupo e intragrupo de los resultados obtenidos en los análisis realizados por NormFinder, excluyendo el gen *recN*. BHI: control, H: hierro suplementado, D: deficiente en hierro, SC: sulfato de condroitina.



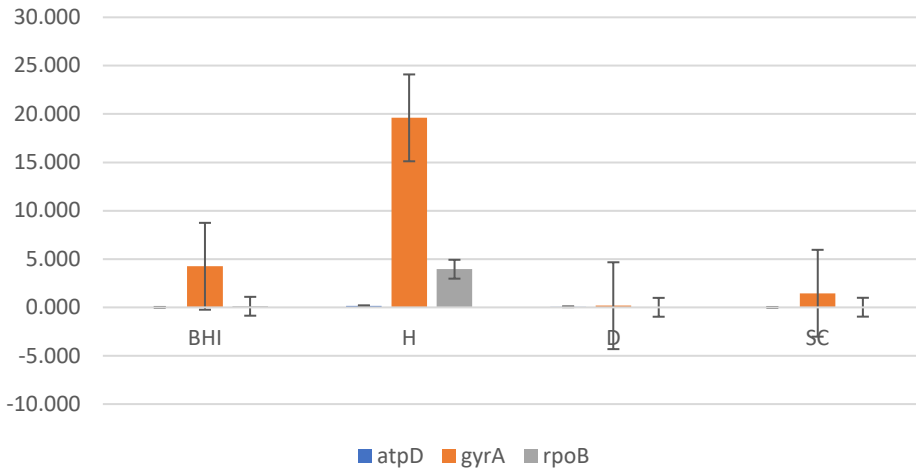
Variación intragrupo EX7



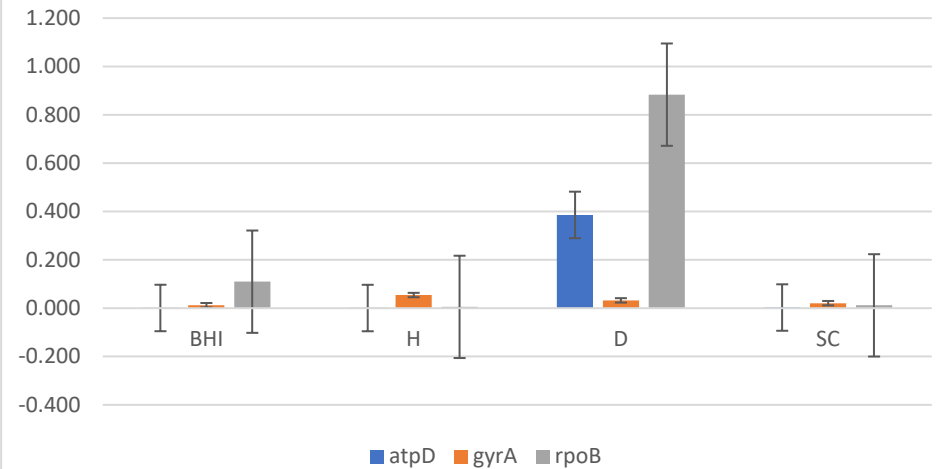
Variación intragrupo EX15



Variación intragrupo ES7

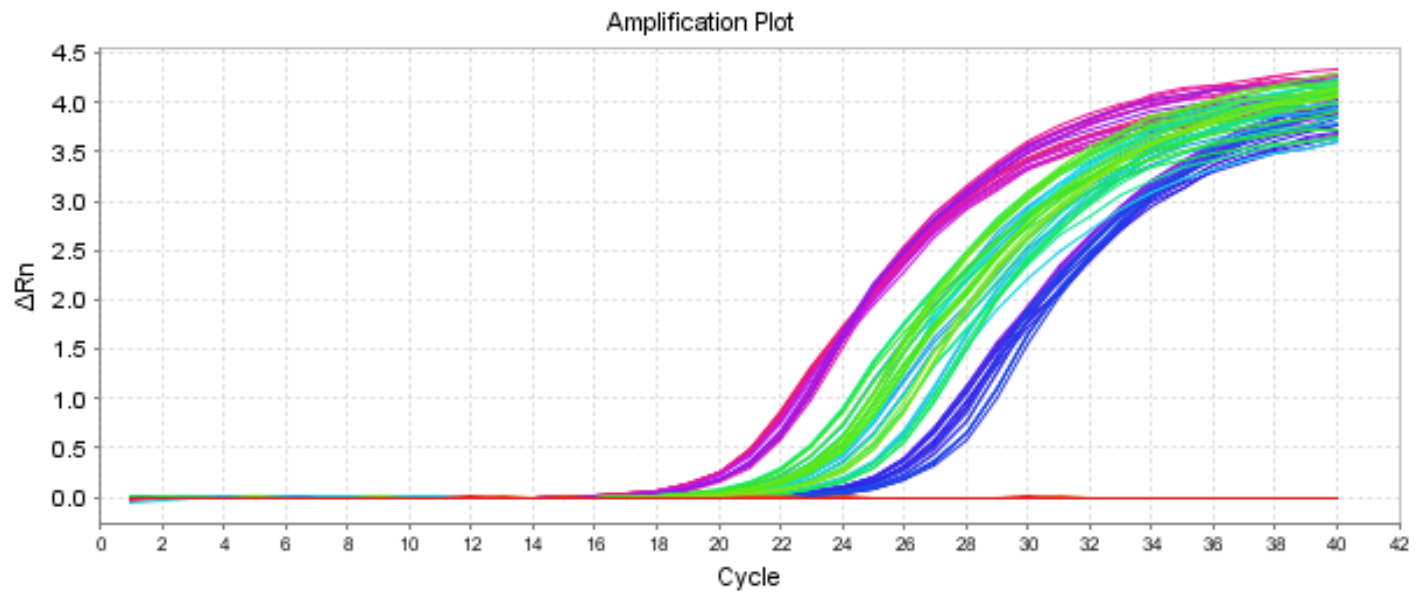


Variación intragrupo ES15



Anexo 8. Ejemplos de resultados obtenidos de las corridas de todas las muestras para los genes propuestos de virulencia.

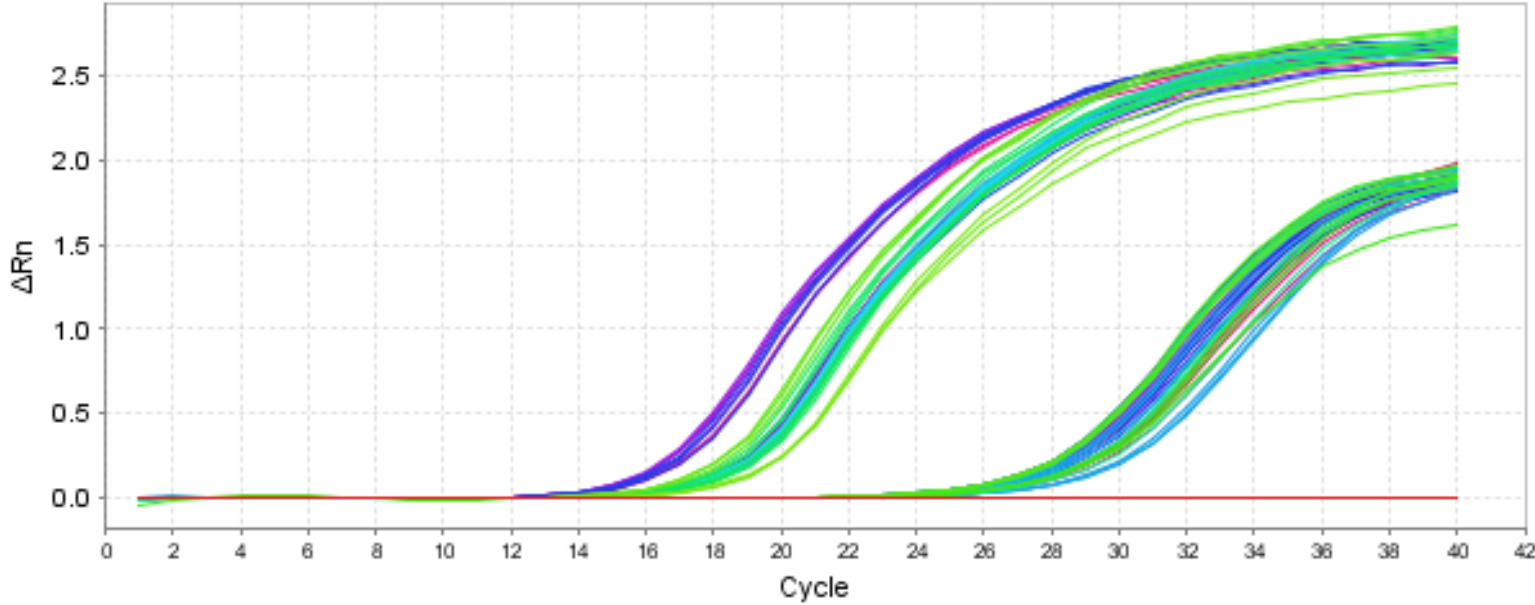
ES7 fhaB-hmtp210



EX7 fur-avxA



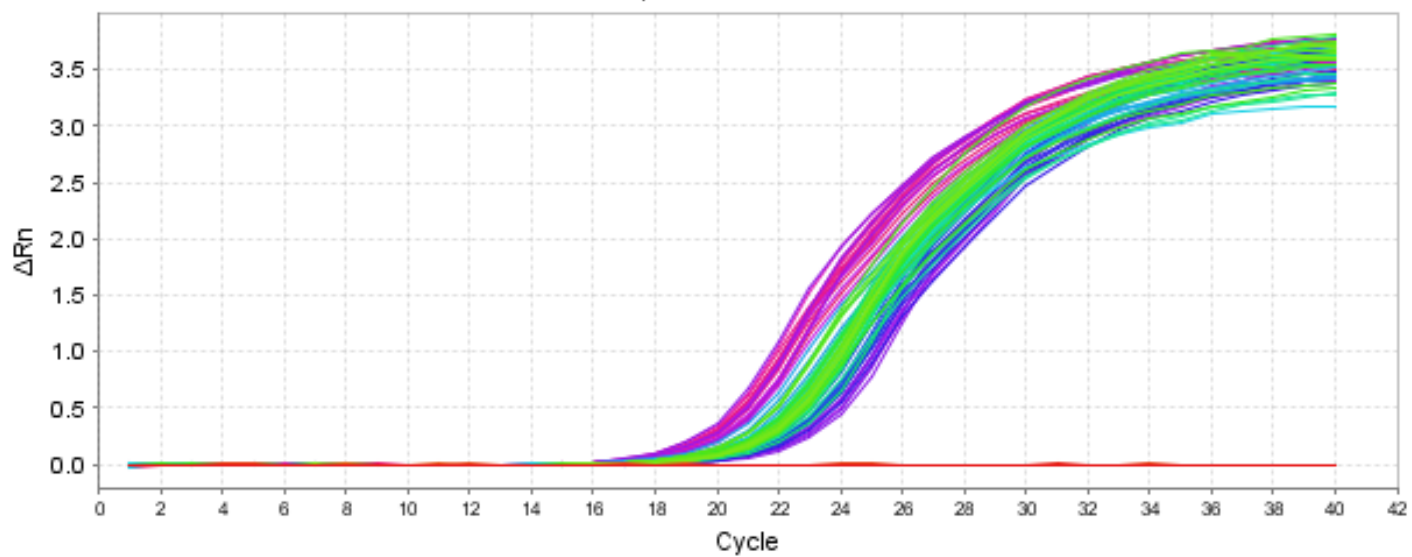
Amplification Plot



EX7 fhaB-hmtp210



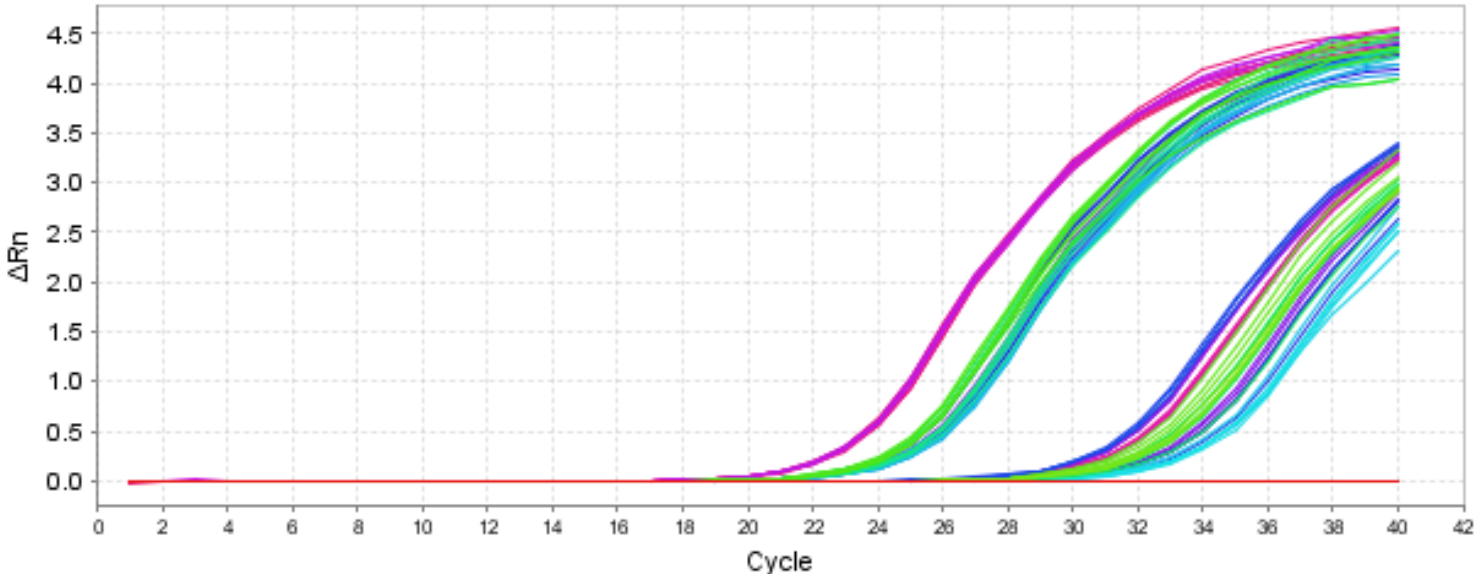
Amplification Plot



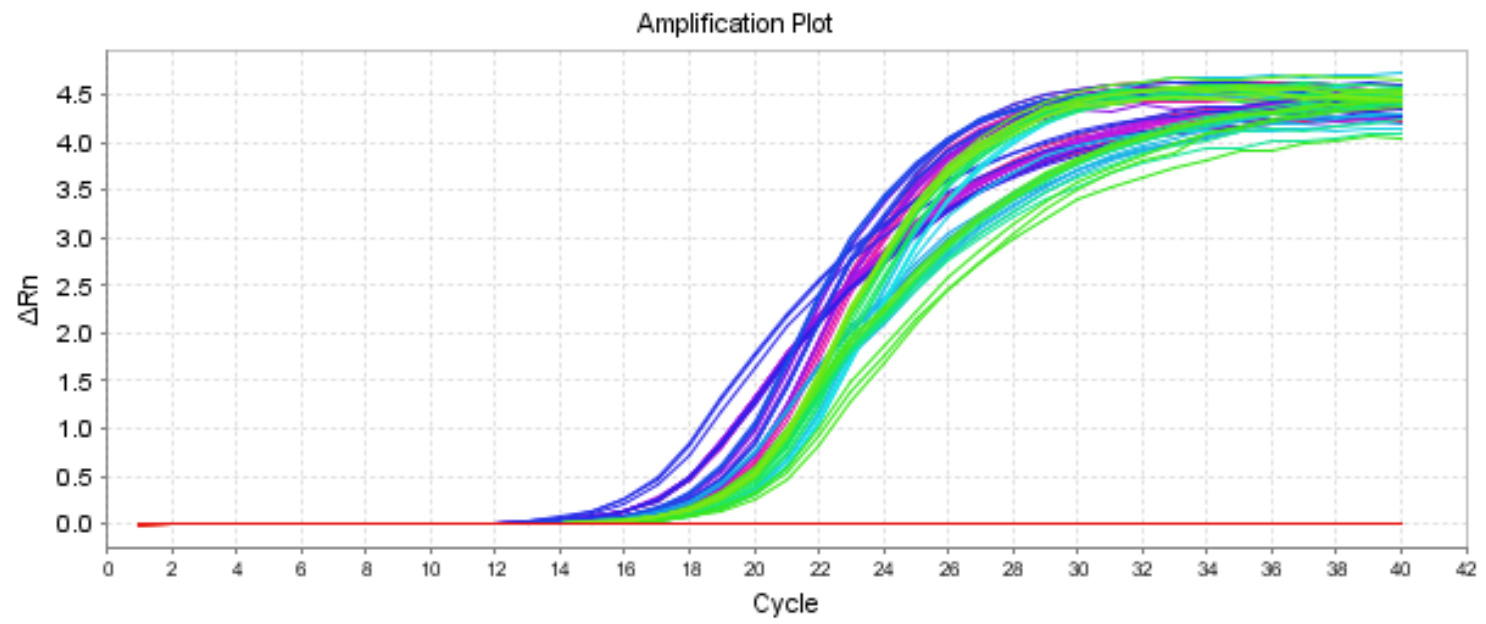
EX15 chl1-chl2



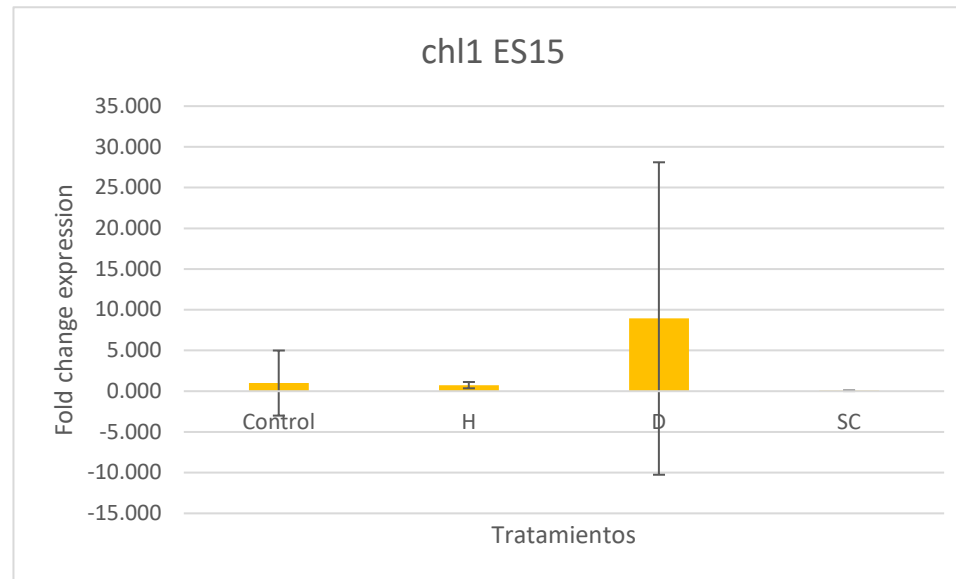
Amplification Plot



EX5 cdtC-fur



Anexo 9. Se muestra los resultados obtenidos del análisis de los resultados de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ del gen *chl1* de la fase estacionaria de la cepa 2015 de *A. paragallinarum*.



Anexo 10. Se muestra los resultados obtenidos del BLASTX en plataformas como UNIPROT y NCBI de la secuencia identificada como *fhaB* de *A. paragallinarum*.

UNIPROT



[< Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) [?](#) How to read this report? [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

Job Title NZ_LAEO01000011.1:c33712-26426 Avibacterium
RID [J9XJV4HX016](#) Search expires on 09-18 06:19 am [Download All](#)

Program BLASTX [?](#) [Citation](#)

Database nr [See details](#)

Query ID lcl|Query_82667

Description NZ_LAEO01000011.1:c33712-26426 Avibacterium paraga ...

Molecule type dna

Query Length 7287

Other reports [?](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to **E value** to **Query Coverage** to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments

[Download](#) [Select columns](#) Show [?](#)

select all 100 sequences selected

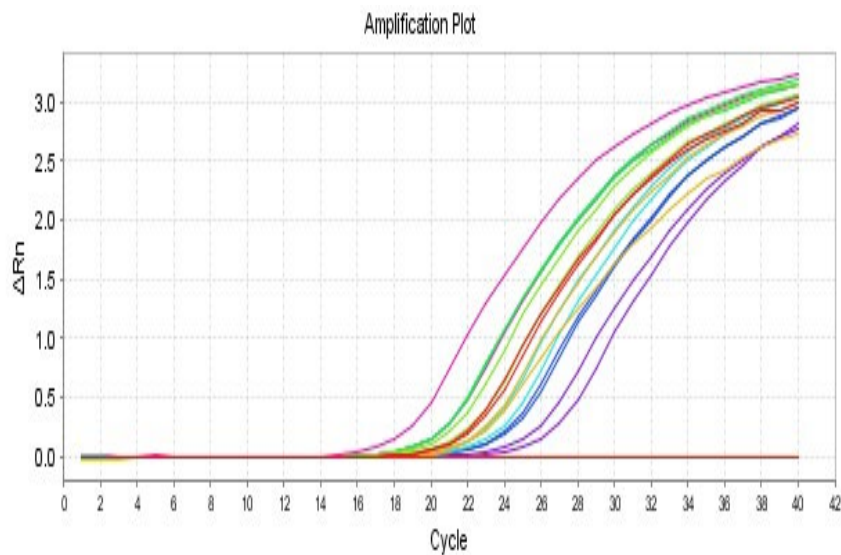
[GenPept](#) [Graphics](#)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	hemagglutinin repeat-containing protein [Avibacterium paragallinarum]	Avibacterium pa...	4761	4761	99%	0.0	100.00%	2428	WP_052716803.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hemagglutinin repeat-containing protein [Avibacterium paragallinarum]	Avibacterium pa...	4759	4759	99%	0.0	99.96%	2428	WP_168985394.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hemagglutinin repeat-containing protein [Avibacterium paragallinarum]	Avibacterium pa...	4043	4043	87%	0.0	97.98%	2288	WP_052718536.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hemagglutinin repeat-containing protein [Avibacterium paragallinarum]	Avibacterium pa...	3623	3623	77%	0.0	98.13%	1878	WP_130238563.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hemagglutinin repeat-containing protein [Avibacterium paragallinarum]	Avibacterium pa...	3509	3509	76%	0.0	98.07%	2027	WP_130230965.1
<input checked="" type="checkbox"/>	filamentous hemagglutinin N-terminal domain-containing protein [Avibacterium paragallinarum]	Avibacterium pa...	3348	3348	67%	0.0	100.00%	1667	WP_124994878.1
<input checked="" type="checkbox"/>	filamentous hemagglutinin N-terminal domain-containing protein [Avibacterium paragallinarum]	Avibacterium pa...	3345	3345	67%	0.0	100.00%	1654	WP_152436189.1
<input checked="" type="checkbox"/>	filamentous hemagglutinin N-terminal domain-containing protein [Avibacterium paragallinarum]	Avibacterium pa...	2842	2842	57%	0.0	98.22%	1407	WP_130261502.1
<input checked="" type="checkbox"/>	filamentous hemagglutinin N-terminal domain-containing protein [Avibacterium paragallinarum]	Avibacterium pa...	2825	2825	57%	0.0	97.58%	1406	WP_115615838.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hemagglutinin repeat-containing protein [Aggregatibacter sp. oral taxon 513]	Aggregatibacter ...	2568	2568	95%	0.0	60.82%	2477	WP_249113895.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hemagglutinin repeat-containing protein [Haemophilus haemolyticus]	Haemophilus ha...	2479	2479	87%	0.0	63.38%	2486	WP_118791734.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hemagglutinin repeat-containing protein [Haemophilus haemolyticus]	Haemophilus ha...	2478	2478	87%	0.0	63.34%	2486	WP_192879127.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hemagglutinin repeat-containing protein [Haemophilus haemolyticus]	Haemophilus ha...	2477	2477	87%	0.0	63.34%	2486	WP_118790166.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hemagglutinin repeat-containing protein [Haemophilus haemolyticus]	Haemophilus ha...	2455	2455	87%	0.0	62.59%	2487	WP_118805483.1
<input checked="" type="checkbox"/>	hemagglutinin repeat-containing protein [Haemophilus haemolyticus]	Haemophilus ha...	2451	2451	87%	0.0	62.84%	2483	WP_118811553.1



Feedback

Anexo 11. Se muestra los resultados obtenidos de la evaluación de la presencia de DNA en las muestras mediante el análisis de 16 muestras representativas del total de muestras, mismas que se trabajaron tanto en master mix con retrotranscriptasa y master mix sin retrotranscriptasa en un experimento de RT-qPCR. Las muestras que amplificaron fueron las que contenían la enzima retrotranscriptasa inversa y las que no contenían la enzima no amplificaron, comprobando así la ausencia de DNA en las muestras analizadas. CNA: Control Negativo de Amplificación y CNE: Control Negativo de Extracción.



Results Summary

Sample	Target	Quantity (Mean)	Quantity (Std Dev)	C (Mean)	C (Std Dev)
1ES15	atpD con RTasa			23.54	
1ES7	atpD con RTasa			24.33	
1EX15	atpD con RTasa			22.88	
1EX7	atpD con RTasa			22.60	
C1ES15	atpD con RTasa			19.29	
C1ES7	atpD con RTasa			21.26	
C1EX15	atpD con RTasa			21.21	
C1EX7	atpD con RTasa			21.16	
CNA	atpD con RTasa				
CNE	atpD con RTasa				
D1ES15	atpD con RTasa			27.22	
D1ES7	atpD con RTasa			26.32	
D1EX15	atpD con RTasa			21.78	
D1EX7	atpD con RTasa			22.61	
H1ES15	atpD con RTasa			24.74	
H1ES7	atpD con RTasa			24.91	
H1EX15	atpD con RTasa			23.63	
H1EX7	atpD con RTasa			23.42	
1ES15	atpD sin RTasa				
1ES7	atpD sin RTasa				
1EX15	atpD sin RTasa				
1EX7	atpD sin RTasa				
C1ES15	atpD sin RTasa				
C1ES7	atpD sin RTasa				
C1EX15	atpD sin RTasa				
C1EX7	atpD sin RTasa				
CNA	atpD sin RTasa				
CNE	atpD sin RTasa				
D1ES15	atpD sin RTasa				
D1ES7	atpD sin RTasa				
D1EX15	atpD sin RTasa				
D1EX7	atpD sin RTasa				
H1ES15	atpD sin RTasa				
H1ES7	atpD sin RTasa				
H1EX15	atpD sin RTasa				
H1EX7	atpD sin RTasa				