



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



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

**ANOTACIÓN DEL GENOMA DE
AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM
CEPA 5**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

con opción en:

Bioquímica y Genética Microbiana

PRESENTA:

Q.F.B. ZAIRA GUERRERO GONZÁLEZ

ASESOR:

Ph.D. CANDELARIO VÁZQUEZ CRUZ

CO-ASESOR:

Ph.D. PATRICIA SÁNCHEZ ALONSO

PUEBLA, PUE.

Febrero 2018



La realización de este proyecto (615464) ha sido posible gracias a la concesión de una Beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT (Número de becario 581414).

«La ciencia biológica [...] es realmente un dominio de infinitas posibilidades. Debemos esperar de ella los más sorprendentes esclarecimientos y no podemos adivinar qué respuesta dará, dentro de algunos decenios, a los problemas por nosotros planteados. Quizá sean dichas respuestas tales, que echen por tierra nuestro artificial edificio de hipótesis.»

Sigmund Freud, Más allá del principio del placer (1920)

Resumen

Avibacterium paragallinarum es agente causal de coriza infecciosa, una enfermedad respiratoria aguda de las aves de corral.⁷ Esta enfermedad infecciosa se produce en todo el mundo y es causa de importantes pérdidas económicas por afectación de las aves de granja, debido a la baja ganancia de peso de las aves infectadas, la caída en la producción de huevo y la mortalidad asociada a esta enfermedad y sus complicaciones. Esta especie bacteriana contiene varios factores de virulencia y antígenos que se deben considerar en la elaboración de vacunas, dada la existencia de variaciones antigénicas y la virulencia prevalente de cepas de campo. Lo anterior pone en evidencia la necesidad de llevar a cabo la investigación sobre virulencia y serovariedades de Avpg endémicas de México.

La patogénesis de la CI en aves no se conoce bien, sin embargo, se ha reconocido desde hace tiempo que la gravedad de la enfermedad y su incidencia pueden variar considerablemente dependiendo de varios factores asociados con el huésped, el medio ambiente o la cepa bacteriana. Varios factores de virulencia de Avpg se pueden citar: la cápsula, los lipopolisacáridos, las toxinas, el sistema de adquisición de hierro y algunas adhesinas.

Para comprender de mejor manera la CI se han secuenciado los genomas de varias cepas de esta bacteria; en el CICM-ICUAP ya se reportaron en GenBank dos genomas. Se disponen de cinco genomas completos de Avpg (JF4211, 72, 221, CL, 2015), con la perspectiva de anexar el genoma de Avpg5 a la base de datos.

Los informes sobre la patogenicidad de los aislados de este importante patógeno avícola en México son limitados. Como resultados de la presente tesis se reporta la anotación de un genoma y la identificación de factores de virulencia asociados a la cepa Avpg 5, la cual pertenece al serotipo A. La anotación del genoma de Avpg5 se basó en un análisis comparativo, usando como referencia secuencias completas del genoma de cinco cepas de la misma especie (JF4211, 72, 221, CL y AVPG 2015) así como las de un conjunto de cepas patógenas de animales pertenecientes a la familia *Pasteurellaceae*, de los géneros: *Pasteurella*, *Mannheimia*, *Histophilus*, *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Haemophilus* y *Gallibacterium* recuperadas de la base de datos GenBank posibilitando así el hallazgo de información relevante que pueda ser útil para el desarrollo de pruebas diagnósticas basadas en la genotipificación, que contribuya al hallazgo de nuevos antígenos para posibles vacunas contra CI. Una de las herramientas utilizadas para el análisis genómico de Avpg5 es RAST, dicha plataforma toma como entrada los contigs ordenados en formato FASTA, identifica marcos de lectura abiertos que sean probables genes y realiza una comparación con una base de datos de genes. Dicha plataforma permitió una evaluación rápida de las funciones de genes y la construcción de redes metabólicas preliminares.

Agradecimientos

A mi asesor de Proyecto, Ph.D. Candelario Vázquez Cruz.

Con quien tengo una deuda especial por brindarme las herramientas para un nuevo abordaje de las ciencias biológicas, por su visión y disposición de enseñanza, por su profesionalismo y humanidad.

A los integrantes de mi comité revisor:

- Ph.D. Patricia Sánchez Alonso
- Ph.D. Norma Elena Rojas Ruiz
- Ph.D. Erasmo Negrete Abascal
- Ph.D. Beatriz Eugenia Baca

A mis padres

De quienes aprendí a valorar, a trabajar, a vivir con convicción.

A J.C.

Por haber sido el primero en creer en mí y muchas veces el único.

A mis amigos

Muchos de los cuales partieron de una colaboración que dio inicio a una amistad científica y personal. Valoro el ambiente de intercambio y apoyo que siempre mostraron, un ambiente favorable para la investigación.

Al Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas

Por el apoyo para la impresión de este trabajo

Lista de abreviaturas

Avpg CI	<i>Avibacterium paragallinarum</i> cepa CI (Mexicana)
Avpg JF4211	<i>Avibacterium paragallinarum</i> cepa JF4211 (Europea)
Avpg2015	<i>Avibacterium paragallinarum</i> cepa 2015 (Mexicana)
Avpg221	<i>Avibacterium paragallinarum</i> cepa 221 (Asiática)
Avpg5	<i>Avibacterium paragallinarum</i> cepa 5 (Mexicana)
Avpg72	<i>Avibacterium paragallinarum</i> cepa 72 (Peruana)
BHIA	Agar Infusión Cerebro Corazón - por sus siglas en Inglés Brain Heart Infusion Agar -
bp	Par de bases
° C	Grados centígrados
CI	Coriza Infecciosa
CU	Vía Chaperona/Usher
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
FPV	Flowl pox virus o Virus de la virula aviar
Glc-NAc	N-acetil-D-glucosamina
HA	Hemaglutinina
IBV	Infectious bronchitis virus o Virus de la bronquitis infecciosa
ILT	Infectious laryngotracheitis virus o Virus de la laringotraqueitis infecciosa
kDa	kiloDalton
Mabs	Monoclonal antibodies o Anticuerpos monoclonales
mg	Miligramos
ml	Mililitros
NaCl	Cloruro de sodio
NAD	Nicotinamida Adenin Dinucleotido
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rmp	Revoluciones por minuto
Sarcosil	Lauril sarcosinato de sodio
ug	Microgramos
ul	Microlitros
V	Voltio o volt

*Dedicado a J.C., esa mente brillante y de espíritu atormentado
que me inspira, mi mayor alegría y mi mayor tormento,
penitente recuerdo... ambivalencia.*

*Con especial cariño para mi amiga Liz. cuya dolorosa partida
dejó en mi profunda desolación. Hubiese deseado más tiempo
juntas para compartir este y muchos mas logros.*

...

Índice general

Resumen	I
Agradecimientos	II
Lista de abreviaturas	III
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Coriza infecciosa (CI)	1
1.1.1 Epidemiología	1
1.1.2 Síntomas clínicos y progresión de la enfermedad	2
1.1.3 Tratamiento y control	2
1.1.4 Vacunas	3
1.2 <i>Avibacterium paragallinarum</i>	4
1.2.1 Filogenia	4
1.2.2 Características morfológicas y bioquímicas	5
1.2.3 Serotipificación	5
1.2.4 Factores de virulencia	6
Metaloproteasas	7
Cápsula	7
Lipopolisacáridos capsulares (LPS)	7
Toxina citoletal distendente (CDT)	7
Toxinas RTX	9
Hemaglutinina	9
Fimbrias	10
1.3 Antecedentes	11
2 PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO	12
2.1 Objetivo general	12
2.2 Objetivos particulares	12
2.3 JUSTIFICACIÓN	13
2.4 ESQUEMA DE TRABAJO	14
3 MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Materiales	15
3.1.1 Material biológico	15
3.1.2 Medios de cultivo	15
3.1.3 Soluciones	15
3.1.4 Reactivos	17
3.1.5 Soporte informático	17
3.2 Métodos	17
3.2.1 Análisis comparativo	17
Comparación genómica de Avpg5 inter especie	18
Comparación genómica de Avpg5 vs diferentes cepas de la familia <i>Pasteurellaceae</i>	18
3.2.2 Análisis filogenético	18
3.2.3 Diseño de oligonucleótidos	18
3.2.4 Cultivo de <i>Avibacterium paragallinarum</i>	19

3.2.5	Extracción y purificación de DNA genómico de <i>Avibacterium paragallinarum</i>	19
3.2.6	Amplificación de un fragmento de genes de interés por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	19
3.2.7	Electroforesis en gel de agarosa	20
3.2.8	Anotación del genoma de <i>Avibacterium paragallinarum</i> cepa 5	20
4	RESULTADOS	21
4.1	Análisis bioinformático de la secuencia del draft del genoma de Avpg5	21
4.1.1	Anotación del genoma de <i>Avibacterium paragallinarum</i> cepa 5	21
4.1.2	Análisis filogenético de 6 cepas de Avpg por medio de genes Housekeeping	22
4.2	Comparación <i>in silico</i> el genoma de la cepa Avpg5 con los genomas de cepas previamente anotados en GenBank e identificación de genes putativos que codifican factores de virulencia.	24
4.2.1	Comparación genómica de Avpg5	24
4.2.2	Genes que potencialmente codifican factores de virulencia en Avpg5	29
4.2.3	Verificación de la secuencia del genoma de Avpg5 por dos tecnología de secuenciación masiva	33
4.2.4	Diseño de oligonucleótidos para la verificación molecular de funciones codificadas en el genoma de Avpg5	34
4.2.5	Cultivo de <i>Avibacterium paragallinarum</i>	36
4.2.6	Análisis por PCR	36
5	DISCUSIÓN	40
6	CONCLUSIONES	42
7	PERSPECTIVAS	43
A	ANEXOS	44
A.1	Genes de mantenimiento (genes Housekeeping)	44
A.2	Coloramas	44
A.3	Geles de agarosa	44
A.4	Estadísticas de Subsistemas (RAST) de cepas de Avpg	44
A.5	Rastreo por secuencia	44
A.6	Genes de Avpg5 dentro de Subsistema RAST	45
A.7	Core del genoma de cepas de Avpg	45
	Bibliografía	46

Índice de figuras

1.1	Mapa de distribución de CI (CABI, Invasive Species Compendium) . . .	2
1.2	Signos clínicos y lesiones macroscópicas en aves infectadas con Avpg (Blackall, 1999; Ayanur <i>et.al.</i> , 2013)	3
1.3	Modelo para el mecanismo de acción de la toxina distensora citolítica (CDT). (Imágen tomada de Lara-Tejero <i>et.al.</i> , 2002).	8
1.4	Operón CDT (Imágen tomada de Jinadasa <i>et.al.</i> , 2011).	9
1.5	Organización genética del operón Avx (Imagen tomada de Küng <i>et.al.</i> , 2013).	10
2.1	Esquema de trabajo	14
4.1	Organización de genes conectados a subsistemas y su distribución en diferentes categorías dentro del genoma de Avpg5	22
4.2	Dendrograma de <i>Avibacterium paragallinarum</i>	23
4.3	Dendrograma representando las relaciones evolutivas de cepas de <i>Avibacterium paragallinarum</i>	23
4.4	Resultados de comparación <i>in silico</i> de genomas para cepas de Avpg.	24
4.5	Núcleo del genoma, genoma dispensable y número de proteínas únicas en seis genomas de Avpg.	25
4.6	Dotplot	33
4.7	Comparación del genoma completo de Avpg secuenciado con Illumina y 454 Roche usando una alineación progresiva con MAUVE.	34
4.8	Representación esquemática de los dos arreglos del operón F17 en Avpg5, Avpg2015 y AvpgCl.	35
4.9	Crecimiento de Avpg en agar BHI adicionado con 5% de sangre de carnero y NAD después de 2 días de incubación a 37°C.	36
4.10	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos (línea 1-4) para las cepas de <i>Avibacterium paragallinarum</i> usadas con un estimado de tamaño de 1500 pares de bases.	37
4.11	Amplificación por PCR de un fragmento del gen que codifica para Usher en cepas tipo Avpg5 (A), Avpg 2015 (B) y AvpgCl (C).	38
4.12	Amplificación por PCR de un fragmento del gen que codifica para Chap y Fimb, en cepas tipo Avpg5 (A), Avpg 2015 (B) y AvpgCl (C).	39
4.13	Amplificación por PCR de Fad en cepas tipo Avpg5 (A), Avpg 2015 (B) y AvpgCl (C).	39

Índice de tablas

1.1	Clasificación taxonómica de <i>A. paragallinarum</i>	5
1.3	Clasificación de acuerdo al esquema de Kume.	6
3.1	Cepas de <i>A. paragallinarum</i> NAD dependientes	15
3.3	Buffer de lisis	15
3.5	Buffer para pTaq (pH final de 8.3)	16
3.7	Buffer TBE	16
3.9	Géneros (8), especies (11) y cepas (37) incluidas en el análisis comparativo de Avpg5 vs otras especies pertenecientes a la familia <i>Pasteurellacea</i>	18
4.1	Datos del genoma de las distintas cepas de <i>Avibacterium paragallinarum</i>	21
4.3	Núcleo del genoma de Avpg (Anexo A.7). Se muestran los genes asociados a virulencia en el genoma central de cepas de <i>Av. paragallinarum</i>	26
4.4	Genes únicos de cada cepa de Avpg.	27
4.5	Factores de virulencia de <i>Avibacterium paragallinarum</i> cepa 5 resultantes del análisis comparativo del su genoma en referencia a cepas ya anotadas en bases de datos.	29
4.6	Proteínas predichas como factores de virulencia (95) por Requena et. al. presentes en las cepas de <i>Avibacterium paragallinarum</i> con una similitud de secuencia superior al 60 %. Se reportan bajo el descriptor designado por RAST.	31
4.7	Secuencias de oligonucleótidos usados para amplificar por PCR diferentes fragmentos de los genes que codifican a la proteína fimbrial F17 y de dos genes housekeeping usados como control positivo a partir de las cepas (A) Avpg5, (B) Avpg2015, (C) AvpgCL.	34
4.8	Tamaño esperado de amplicones.	37

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Coriza infecciosa (CI)

La coriza infecciosa es causada por la bacteria *Avibacterium paragallinarum* (Avpg); es una enfermedad infecciosa y altamente contagiosa que destaca entre las principales enfermedades respiratorias de las aves de corral.^{2,4,6,7} La CI es importante en la industria avícola comercial, como uno de los principales problemas que afectan tanto a lotes de pollos de engorda como a aves de postura.² En casos extremos, las medidas más drásticas del control de la enfermedad y de las pérdidas económicas llevan a un mayor número de sacrificios particularmente en granjas multi-edad.^{2,6,7,31}

La coriza infecciosa clásica se caracteriza por alta morbilidad y baja mortalidad.⁴³ Los brotes de infecciones por CI en países en desarrollo son de naturaleza compleja, donde otros agentes patógenos y / o factores de estrés son factores de complicación importantes;⁷ agentes tales como *Mycoplasma gallisepticum*, *M. 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. La enfermedad grave y prolongada puede desarrollarse en casos complicados con el cuadro clínico de una enfermedad respiratoria crónica, síndrome de la cabeza hinchada, aerosaculitis, artritis del tarso y septicemia.² A su vez, la literatura indica que la naturaleza fenotípica y serológica de Avpg ha cambiado en cierto grado en algunas regiones geográficas.⁷ El impacto de estos cambios en las medidas de control y prevención es considerablemente negativo.

1.1.1. Epidemiología

La CI ocurre en todo el mundo^{43,44} incluyendo México. Durante mucho tiempo se ha reconocido que la gravedad de la enfermedad y su incidencia pueden variar considerablemente dependiendo de varios factores. Estos incluyen las especies de aves, la edad del huésped, la línea genética del huésped, la cepa bacteriana y los factores ambientales, como el hacinamiento, el clima y las enfermedades concurrentes. El estrés nutricional también se ha sugerido como un posible factor de predisposición.¹⁵

Los serotipos de Kume A1, A2, A3, A4, B1, C1, C2, C3 y C4, muestran distribuciones geográficas específicas.²⁵ Entre las nueve serovariedades de Kume actualmente reconocidas para Avpg, el serovar B-1 es común en América Latina.³⁰

Se tienen varias referencias de aislamientos en distintas regiones del mundo: India (Kurnool),² Marruecos, Tailandia,⁷ Argentina,³⁹ Uganda,¹² Japón,⁵⁰ Alemania, Perú y México, por mencionar algunos. Se pueden obtener más detalles sobre la distribución de CI actualizada hasta julio del año en curso en:

<http://www.cabi.org/isc/datasheet/79285> (Fig.1.1).

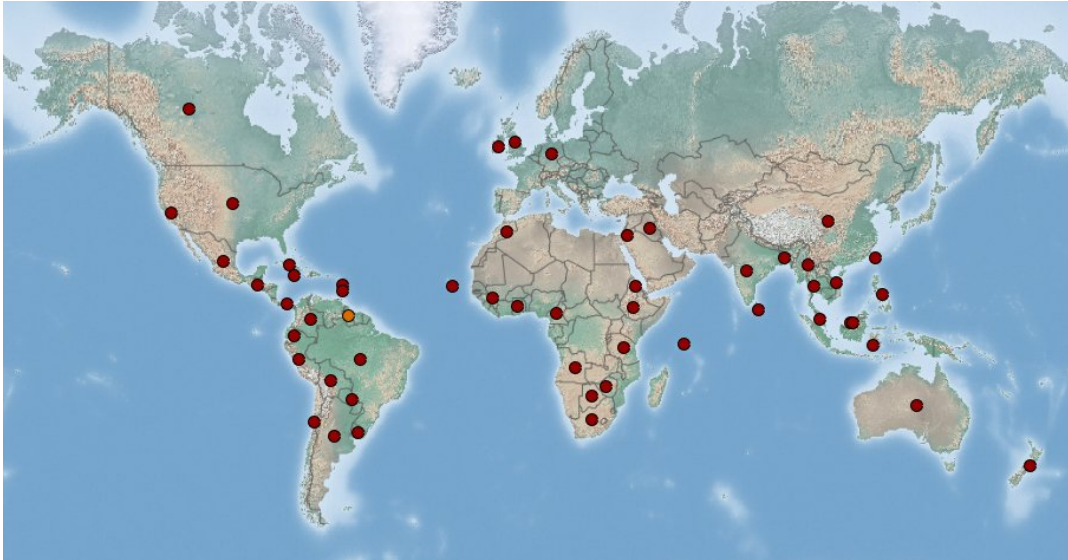


FIGURA 1.1: Mapa de distribución de CI (CABI, Invasive Species Compendium)

1.1.2. Síntomas clínicos y progresión de la enfermedad

Los signos característicos de CI incluyen secreción nasal, edema facial, inflamación de senos nasales e infraorbitales, lagrimeo, anorexia y diarrea^{2,7}(Fig.1.2). La secreción nasal es inicialmente serosa o mucosa y más tarde torna a un exudado mucopurulento denso. Algunas aves muestran conjuntivitis, lagrimación espumosa maloliente e induración del rostro. Se observan estertores respiratorios cuando las aves tienen afectado el tracto respiratorio inferior, diarrea acuosa clara e hinchazón de cresta y barbilla particularmente evidente en machos. La sintomatología lleva a una disminución del consumo de alimento y agua en las aves infectadas, retardando así el crecimiento de las poblaciones jóvenes y reduciendo la producción de huevo en las parvadas ponedoras de 10 a 40%.^{2,6,7}

Las lesiones se limitan al tracto respiratorio superior y no hay afectación sistémica,² sin embargo, signos clínicos inusuales han sido reportados en casos de CI complicada por otros patógenos y factores de estrés.⁷ Presentaciones clínicas únicas como la artritis y septicemia, presumiblemente complicadas por la presencia de otros patógenos detectados, como *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, *Pasteurella* spp., *Salmonella* spp., y el virus de la bronquitis infecciosa, se han encontrado en parvadas de pollos de engorde en Argentina. El aislamiento de Avpg de sitios no respiratorios como el hígado, el riñón y el tarso se reportó por primera vez en estos brotes.^{7,39,43} Informes de países como Argentina, India, Marruecos y Tailandia de infecciones por CI complicadas, enfatizan que los signos clínicos y el impacto económico de dichas infecciones observadas en países en desarrollo pueden ser notablemente diferentes de las infecciones no complicadas típicamente observadas en los países desarrollados.⁷

1.1.3. Tratamiento y control

En el tratamiento de CI se han empleado fármacos como estreptomicina, espectinomicina, la combinación de estreptomicina-espectinomicina o las combinaciones sulfacoropiridazina-trimetoprim y sulfadimetoxina-trimetoprim, entre otros. Las

quinolonas nicotinato de norfloxacin y enrofloxacin han dado excelentes resultados en el tratamiento de CI.⁴³



FIGURA 1.2: Signos clínicos y lesiones macroscópicas en aves infectadas con Avpg (Blackall, 1999; Ayanur *et.al.*, 2013)

(a) inflamación de senos nasales e infraorbitales, (b) edema facial, (c) inflamación de cresta y barbillas (d) secreción nasal serosa o mucosa (e) lagrimeo e induración del rostro (f) decaimiento general del ave.

Los antibióticos y fármacos usados para combatir CI podrían seleccionar cepas resistentes en Avpg. Blackall reportó en 1988 un estudio de susceptibilidad de aislados de Avpg a seis antibióticos (ampicilina, erytromicina, neomicina, penicilina, estreptomina y tetraciclina). Un total de 55 aislados (73 %) fueron sensibles a los 6 fármacos. Los 20 restantes fueron resistentes a estreptomina y una de las cepas también fue resistente a tetraciclina y otra a neomicina. Las cepas que no mostraron resistencia a antimicrobianos pertenecieron al serovar C. No se observaron plásmidos por lo que resistencias podrían deberse más bien a alguna mutación en proteínas ribosomales o a una reducción en la absorción del antibiótico. Alternativamente plasmidos, la resistencia puede estar mediada por plásmido que se integra en el cromosoma.⁶

Bragg en 2003 informó del uso de cloruro de didecildimetilamonio en programas de desinfección continuos en granjas de gallinas de postura y pollos de engorda, reduciendo el impacto de CI.⁴³

1.1.4. Vacunas

Hasta hace poco, la mayoría de estas vacunas contenían sólo los serotipos A y C de Page. Este concepto de una vacuna bivalente se basaba en la hipótesis de que el serotipo B de Page no era un verdadero serotipo y que las vacunas basadas en los serotipos A y C proporcionaban protección cruzada. Sin embargo, dado que ahora se ha demostrado de forma concluyente que el serovar B es distinto, las vacunas

trivalentes comerciales ahora están disponibles en las principales compañías internacionales de vacunas.⁷

Las bacterinas comerciales actuales, compuestas de células inactivadas de la bacteria causal mezclada con un adyuvante, son poco efectivas contra CI. Dichas vacunas protegen sólo contra los serotipos de aglutinina presentes en ellas, y si los pollos están infectados por un serotipo no incluido en la vacuna, no proporciona una protección adecuada.^{4,48}

Las principales compañías mundiales productoras de vacunas de Avpg, tienden a basar sus vacunas en cepas estándar reconocidas internacionalmente. Estas vacunas se venden en todo el mundo sobre la base de que la variación local no es suficiente para justificar la adición o eliminación de cepas. Recientemente, varios grupos de investigación, incluidos Bragg *et al.* en Sudáfrica y Terzolo *et al.* en Argentina, han sugerido que tales vacunas no proporcionan protección contra variantes locales de Avpg.⁷ Otra desventaja de vacunas convencionales contra Avpg son los requerimientos de medios complejos para el crecimiento *in vitro* de la mayoría de las cepas de esta bacteria lo que representa altos costos y dificulta su cultivo.⁴⁹ Se han reportado también que las vacunas contra CI, de células inactivadas con adyuvante oleoso pueden producir lesiones residuales de larga duración.¹⁷

En Sudáfrica, se ha sugerido que el Avpg independiente de NAD es capaz de evadir la respuesta inmune asociada con las vacunas de coriza infecciosas típicas producidas con Avpg dependiente de NAD.⁷ Estudios realizados por Jacobs y van der Werf dejan cabida a la posibilidad de que la posesión simple de la capacidad de ser independiente de NAD no signifique que un aislamiento de Avpg esté asociado con la falla de la vacuna y esta posible falla se asocie con el serovar y no con la independencia de NAD.¹⁹

1.2. *Avibacterium paragallinarum*

Avpg es el agente causal de (CI), una enfermedad del tracto respiratorio superior de pollos y aves de corral de importancia económica para zonas de crianza de aves.^{4,6} Fue aislado por primera vez en 1931 por De Blicke (1932).⁴

La enfermedad causada por esta bacteria, al igual que muchas otras enfermedades infecciosas, es el resultado de un conjunto complejo de interacciones entre el agente causal y la respuesta del huésped. Varios factores están involucrados en el establecimiento de la infección, incluida la capacidad de adherirse a las membranas mucosas y la posterior multiplicación en los tejidos del hospedador.¹²

Se han reportado grandes diferencias entre los nueve serotipos de los tres serogrupos de Avpg.^{12,43} Algunos estudios han investigado la asociación de las características de Avpg con la virulencia del organismo en las infecciones del tracto respiratorio.¹²

1.2.1. Filogenia

Los primeros investigadores identificaron el agente causal de CI como *Haemophilus gallinarum* (Elliot & Lewis, 1934), un organismo que requiere tanto del factor X (hemina) como del factor V (NAD) para su crecimiento *in vitro*.^{7,9,11} Sin embargo, desde la década de 1969 (Biberstein & White), se ha demostrado que todos los aislados del agente que producen la enfermedad requieren solo del factor V y fueron

llamados inicialmente *Haemophilus paragallinarum*^{5,21} (Ahora denominado *Avibacterium paragallinarum* (Blackall *et al.*, 2005). Aislados de *A. paragallinarum* independientes del factor V^{11,19,21,29} han sido encontrados en la república de Sudafrica desde 1989 y México.^{7,19,29}

Las relaciones filogenéticas presentadas se han modificado a medida que se han agregado nuevos datos de secuencia.¹⁵ La clasificación taxonómica actual de *A. paragallinarum* es la siguiente: Subreino, Procaryotae; Orden, Gamma Proteobacteria; Familia, Pasteurellaceae; Género, Avibacterium; Especie, *A. paragallinarum* (Tabla 1.1).

TABLA 1.1: Clasificación taxonómica de *A. paragallinarum*

Subreino	Procaryotae
Orden	Gamma Proteobacteria
Familia	Pasteurellaceae
Género	Avibacterium
Especie	<i>A. paragallinarum</i>

(Blackall *et al.*, 2005)

1.2.2. Características morfológicas y bioquímicas

Avibacterium paragallinarum, una bacteria Gram-negativa, no móvil, no hemolítico, pleomorfica porque presentan formas cocoides o bacilares (miden de 1 a 3 um de longitud por 0.4 a 0.8 um), dependiente de NAD (factor V) e independiente del factor X (hemina) como suplemento para su crecimiento.^{15,41} En la mayoría de las especies bacterianas, la síntesis de NAD se produce *de novo* partir del ácido quinolínico o por una ruta de rescate de nucleótidos de piridina a través del ácido nicotínico. Avpg no poseen ninguna de estas vías de biosíntesis de NAD y deben obtener su NAD directamente del medio o de otros precursores.¹⁹ Se han reportado aislamientos de Avpg independientes de NAD en Sudafrica^{7,19,29} y México.¹⁹

Horner *et al.* han sugerido que los aislamientos independientes de NAD pueden causar aerosaculitis más comúnmente que los aislamientos clásicos de Avpg. Además, se ha especulado que los aislados independientes de NAD pueden ser lo suficientemente diferentes como para causar fallas con vacunas basadas en el Avpg tradicional dependiente de NAD. Se necesitan ensayos de protección cruzada definitivos para determinar si este es el caso.⁷

Avpg es un microorganismo de difícil cultivo. Requiere condiciones microaerobias con la adición de suero al medio para su cultivo. El tiempo de incubación es de 16 a 24 h, luego de incubar a 37 ° C. Se requiere de la adición del cofactor factor NAD al medio. Son oxidasa positivos y catalasa negativos.^{3,43,44}

1.2.3. Serotipificación

Se han utilizado principalmente dos esquemas de serotipos diferentes para Avpg: los esquemas Page^{7,8,28} y el propuesto por Kume.⁷

El esquema de Page se desarrolló inicialmente usando una prueba de aglutinación en placa para reconocer los tres serotipos, A, B y C. Los tres serovares de Page representan distintos inmunovares, ya que las vacunas inactivadas basadas en cualquier serovar de Page no proporcionan protección contra los otros dos serovares⁷

El esquema de serotipos de Kume se basó originalmente en pruebas de inhibición de la hemaglutinación (HI) que reconocieron siete serotipos (serovars) organizado en tres serogrupos denominados I, II y III. Publicaciones posteriores han reportado la existencia de dos serotipos más y el reconocimiento de que los tres serogrupos de Kume corresponden a los tres serotipos de Page. Por lo tanto, el esquema de Kume reorganizado ahora reconoce tres serogrupos (denominados A, B y C) que corresponden a los serotipos de Page, con cuatro serotipos reconocidos en los serogrupos A y C y uno para el serogrupo B de Kume (Tabla 1.4).^{7,43}

TABLA 1.3: Clasificación de acuerdo al esquema de Kume.

Serogrupos (3)	Serovariedades (9)
A	(A-1, A-2, A-3, A-4)
B	(B-1)
C	(C-1, C-2, C-3, C-4)

Organización de nueve serotipos de aglutinina dentro de tres serogrupos (A, B y C).

Serovariedades emergentes o variantes de una región pueden ser lo suficientemente diferentes de las cepas de la vacuna serovar típica aplicada en otra zona geográfica. Existe evidencia de que los aislados del serotipo B argentino son bastante distintos de todos los demás aislamientos de Avpg, independientemente del serovar. Esto ha llevado a la especulación de que la naturaleza única de estos aislamientos del serotipo B argentino puede significar que las vacunas comerciales basadas en aislados serovar B típicos de América del Norte o Europa pueden no brindar protección. Si bien el esquema de serotipos de Kume reconoce solo un serovar, B-1, esto no debería considerarse evidencia de homogeneidad antigénica.⁷

Aún existe la necesidad de ensayos serológicos robustos y bien caracterizados, dadas las limitaciones presentes en las pruebas de aglutinación originalmente usados para la clasificación serológica de aislados de *A. paragallinarum*. En particular, el método de HI supera predominantemente el problema de aislamientos no tipables, un inconveniente importante del esquema de Page cuando se utilizan pruebas de aglutinación.⁸ Una alternativa propuesta es el uso de anticuerpos monoclonales (Mabs) para detectar diferencias antigénicas entre las cepas de Avpg usadas en vacunas contra IC, aislados de campo o aislados de aves vacunadas contra CI.¹⁰

1.2.4. Factores de virulencia

Los factores de virulencia se definen como componentes de un organismo que le dan la capacidad de causar enfermedad, y así determinar la patogenicidad de los mismos, pero son prescindibles para su viabilidad. Los factores de virulencia están implicados en muchos aspectos de la interfaz huésped-patógeno, incluida la colonización, la adquisición de nutrientes y la inmunosupresión.³⁴

Varios factores se han asociado con la patogenicidad de Avpg, incluida la cápsula, los lipopolisacáridos (LPS), hemaglutinina (HA) y toxinas,¹² incluso los elementos móviles pueden influir en la virulencia de la bacteria o conferirle ventajas como la resistencia a antibióticos¹⁶

Metaloproteasas

Avpg secreta metaloproteasas.³⁷ Estas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos en proteínas o péptidos. Estas enzimas parecen catalizar muchas funciones esenciales de las bacterias patógenas. Las metaloproteasas son una clase de proteasas que desempeñan muchas funciones importantes en la virulencia, incluida la colonización, la adquisición de nutrientes, la evasión inmune y la invasión bacteriana en la circulación sistémica.^{25,33,34} El papel de las metaloproteasas segregadas por Avpg en la patogénesis de la CI sigue siendo elucidado.³⁷

Cápsula

Las cápsulas bacterianas están compuestas de polisacáridos extracelulares, y se encuentran en una variedad diversa de patógenos Gramnegativos y Gram-positivos. La cápsula se ha asociado con la colonización (adhesión, interacciones célula-célula y evasión inmune³⁴), y se considera un factor clave en las lesiones producidas por CI; también protege el microorganismo contra la actividad bactericida del suero de pollo.²⁸

Lipopolisacáridos capsulares (LPS)

Se propone que los polisacáridos capsulares participan en la colonización del tejido del huésped.²⁵ Estos se encuentran en la superficie de muchas bacterias patógenas y pueden proteger a la bacteria de la fagocitosis y la muerte mediada por el complemento; por lo tanto, se consideran importantes para la virulencia.⁴⁸

Iritani et al. describió la presencia de dos antígenos secretados, uno estable al calor y el otro lábil al calor. El antígeno estable al calor estaba constituido por lipopolisacárido (LPS).²⁸

Toxina citoletal distendente (CDT)

Las toxinas CDT están apareciendo como factores de virulencia conservados en varias bacterias patógenas.²⁶ El análisis de secuenciación del genoma completo mostró que Avpg contiene genes *cdtABC*. Los productos de los genes *cdtABC* pueden estar implicados en la patogénesis de la enfermedad causada por *A. paragallinarum*.¹³

En la década de 1980, Johnson y Lior identificaron una nueva toxina lábil al calor llamada Toxina citoletal distendente (CDT),^{24,26} surgiendo un nuevo paradigma entre las toxinas bacterianas y los mecanismos de virulencia. Años después, Scott & Kaper en 1994, identificaron los genes codificando CDT en *E. coli*. No fue sino hasta la década de 1990 que se demostró de manera concluyente que esta citotoxina está codificada por un grupo de genes *cdt* con homología con los genes de *E. coli* previamente identificados.²⁴

Las toxinas citolíticas distendientes (CDTs) componen una subclase de genotoxinas que actúan intracelularmente producidas por muchas bacterias patógenas gramnegativas, entre estas Avpg.²⁰

La holotoxina CDT consiste de un complejo heterodimérico de tres subunidades CdtA, CdtB y CdtC.^{20,24} Actualmente, la CDT es el único miembro de las toxinas AB bacterianas que exhiben actividad DNasa; independientemente de las especies bacterianas de origen, ejerce un daño genotóxico al causar DSBs (ruptura de doble cadena).^{20,24} CdtB tiene actividad similar a DNase I, causa un daño limitado en el ADN.²⁶ CdtA y CdtC facilitan el suministro de CdtB a las células, aunque los detalles moleculares de cómo estas subunidades facilitan la unión de la superficie celular, la

captación y el transporte intracelular de CdtB siguen siendo poco conocidos.²⁰ El mecanismo de acción de CDT sugiere que la generación de daño limitado podría ser una estrategia utilizada por las bacterias patógenas para modular las funciones de la célula huésped²⁶ (Fig.1.3).

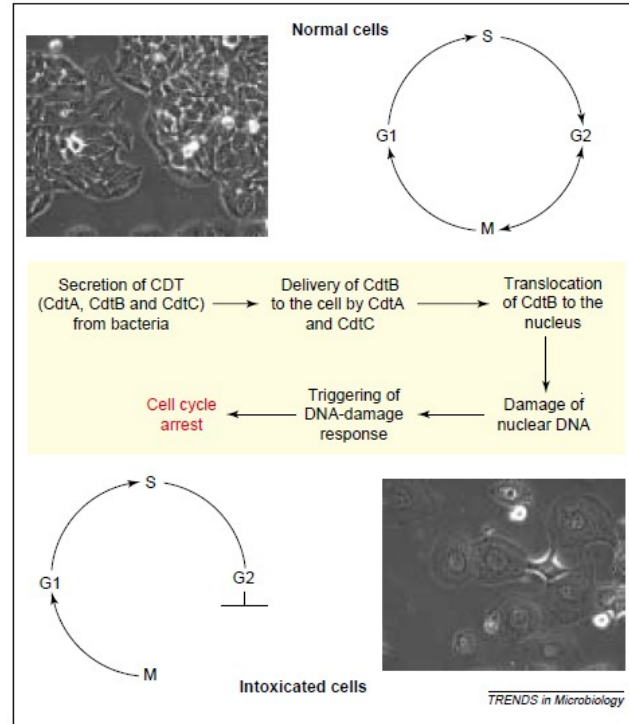


FIGURA 1.3: Modelo para el mecanismo de acción de la toxina distensora citolítica (CDT). (Imagen tomada de Lara-Tejero *et.al.*, 2002).

Un complejo de los tres componentes de CDT, CdtA, CdtB y CdtC, se segrega de la bacteria. Al unirse a un receptor celular (presumiblemente mediado por CdtA y CdtC o por todo el complejo), la toxina se conduce en la ruta endocítica. La subunidad activa de la toxina, CdtB, se transloca al núcleo para dañar el ADN. Como resultado de esta actividad, se desencadena la respuesta de daño del ADN, lo que lleva a la detención del ciclo celular.

La toxina se produce por la expresión de tres genes, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, los cuales son parte de un operón con similar pero no idéntica organización²⁶ (Fig.1.4).

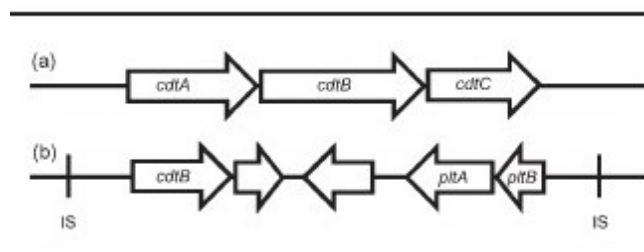


FIGURA 1.4: Operón CDT (Imágen tomada de Jinadasa *et.al.*, 2011).

a) En casi todas las bacterias productoras de CDT, el grupo de genes CDT consiste de tres genes adyacentes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC*, que codifican las proteínas CdtA, CdtB y CdtC. (b) En *S. Typhi*, los genes que codifican CdtA y CdtC están ausentes; en su lugar, la subunidad de proteína StypCdtB es codificada por el gene *cdtB* localizado rio arriba de los genes *pldA* y *pldB* los cuales codifican PltA y PltB respectivamente.

Aunque la importancia de estos diversos arreglos genéticos CDT no se comprende del todo, es probable que representen mecanismos de HGT (transferencia horizontal de genes) que en conjunto podrían desempeñar un papel en la expansión del rango de bacterias patógenas que pueden establecer una colonización persistente y potencialmente causar infección y enfermedad.²⁴

Toxinas RTX

Se descubrió que Avpg, produce una exoproteína formadora de poros AvxA. Esta toxina es codificada en una estructura clásica de operón RTX con el gen activador *avxC*, el gen estructural *avxA* de la toxina serina proteasa-RTX y los genes para un sistema de secreción tipo I apropiado *avxBD*. AvxA es un atributo de virulencia principal común de todos los serotipos de Avpg.^{25,28,34}

El estudio realizado por Kung & Frey muestra que la toxina bivalente de la serina proteasa-RTX AvxA representa el principal factor citotóxico de Avpg y muestra especificidad para los macrófagos aviares. Por lo tanto, postulan que AvxA ejerce un papel clave específico en la patogénesis CI.²⁵

La característica común de las toxinas RTX es su modo único de exportación a través de la envoltura bacteriana por medio del sistema de secreción tipo I que permite su secreción en el espacio extracelular sin una secreción periplásmica intermedia. Se ha observado que los genes de secreción de tipo I del operón *avx*, *avxB* y *avxD* son los genes más conservados comparados con otros operones RTX. AvxA pertenece a las toxinas RTX compuestas que tienen dos dominios principales en la toxina estructural y que es bastante raro en las toxinas RTX. En AvxA, el dominio N-terminal representa una serina proteasa y el dominio C-terminal una citotoxina RTX. Estos dos dominios se dividen entre sí. AvxA es similar a GtxA de *G. anatis*²⁵ (Fig.1.5).

Hemaglutinina

La hemaglutinina es el antígeno estudiado más extensamente en Avpg, su valor radica en ser la distintiva en la serología de la especie. Se ha encontrado que las hemaglutininas son importantes en la patogenicidad y el serotipado.⁴ Tiene un número considerable de regiones variables entre los diversos serotipos de Avpg, mostrando



FIGURA 1.5: Organización genética del operón Avx (Imagen tomada de Küng *et.al.*, 2013).

Vista de parte superior del operón *avxCABD*, con una señal de atenuador de transcripción entre *avxA* y *avxB*. Los genes codifican las proteínas: toxina estructural de AvxA (A); proteína AvxB, un sistema de secreción tipo I y actividad ATPasa (B); acetiltransferasa putativa AvxC (C); AvxD, proteína con función de puente a la membrana externa por secreción tipo I (D)

una región hipervariable más antigénica que otras regiones de la proteína y específica de serovar.⁴⁹ Existen informes de que el serovar B carece de hemaglutinina o tiene una hemaglutinina que es considerablemente diferente de la de los serovars A y C.²⁵ Las proteínas recombinantes que contienen la región hipervariable de la hemaglutinina protegen a los pollos contra el desafío con Avpg. Estos resultados sugieren que las proteínas recombinantes que contienen la región hipervariable pueden ser antígenos útiles para su uso en el desarrollo de una vacuna contra Avpg.⁴⁹ La proteína hemaglutinina (HA) desempeña un papel clave en la inmunogenicidad y patogenicidad de Avpg.⁴⁹ Ha sido considerada como el factor de virulencia más importante debido a su participación en la adhesión tisular y porque los mutantes que carecen de antígeno HA no son virulentos.^{12,28} Sawata, *et. al.* identificaron tres posibles hemaglutininas (HA) y las denominaron: HA-HL, una hemoaglutinina resistente a la tripsina, lábil al calor; HA-HS, una hemaglutinina termoestable, resistente a la tripsina y HA-L, una hemaglutinina sensible al calor y a tripsina.⁴

Fimbrias

Como en muchas especies bacterianas infecciosas, la adhesión es uno de los factores más importantes que influyen en la infección efectiva de Avpg.⁴ Las proteínas más comúnmente asociadas con este rol se pueden dividir en dos clases de adherencias: afimbrial y fimbrial. Las adhesinas fimbriales incluyen los pili de tipo P y IV que se encuentran en bacterias Gram-negativas tales como *Escherichia coli* y *Vibrio cholera*. Las adhesinas afimbriales incluyen las hemaglutininas de *E. coli*, *Bordetella pertussis* y *Haemophilus influenza*.⁴

Liu *et al.* reportaron la identificación de un gen *flfA* que codifica para la proteína fimbrial FlfA de Avpg.²⁷ Resultados obtenidos de dicho estudio respaldan el supuesto de que las proteínas fimbriales son un factor de virulencia y potencial antígeno vacunal de Avpg.

Las fimbrias, también conocidas como pili, son apéndices similares a los capilares que se expanden a 1-2 μm la superficie de las bacterias con diámetros que varían de 2 a 8 nm. y a menudo participan en la adhesión a las células hospedadoras.^{18,27,34} La contribución real de los pili a la virulencia se ha demostrado *in vivo* en varios casos, pero la mayoría de la evidencia de su papel en la adhesión se ha obtenido mediante estudios *in vitro* usando sistemas de cultivo celular y de órganos. Sin embargo, como la mayoría los patógenos expresan múltiples tipos de adhesinas fimbriales y / o afimbriales, la contribución de los pili individuales a la virulencia ha sido difícil de evaluar.¹⁸ Los pili pueden clasificarse en función de sus propiedades físicas, determinantes antigénicos, características de adhesión o similitudes en la secuencia de aminoácidos primaria entre sus principales subunidades de proteínas.²⁵

Las fimbrias F17-like pertenecen a un grupo de fimbrias que se unen a los receptores que contienen N-acetil-D-glucosamina (Glc-NAc) en la superficie de las células hospedadoras y, por lo tanto, se cree que participan en la adhesión de las bacterias a la mucosa superficies dentro del hospedero.³⁴ La vía Chaperona/Usher (CU) es común en el ensamble de la fimbria bacteriana, y la vía CU normalmente requiere de cuatro estructuras proteicas: la subunidad fimbrial mayor, la chaperona, la chaperona conservada Usher, y el tipo adhesina.²⁷ La chaperona y la proteína usher facilitan el plegado, ensamblaje y secreción de la proteína de la subunidad estructural, que conforman el tallo de las fimbrias. La adhesina se encuentra en la punta de la estructura fimbrial y es responsable del reconocimiento y la unión del receptor.³⁴ Estudios previos muestran que varios arreglos CU pueden presentarse en un solo genoma.²⁷

La investigación de proteínas fimbriales es importante para aumentar la comprensión sobre el papel de este factor de virulencia en los mecanismos subyacentes a la patogenicidad de Avpg.

1.3. Antecedentes

En 2015 Horta-Valerdi y colaboradores reportaron la secuencia del genoma de la bacteria *Avibacterium paragallinarum* cepa CL. El ADN genómico de la dicha cepa se extrajo y purificó a partir de un cultivo bacteriano fresco. El ADN genómico fue secuenciado por una estrategia de "shotgun" del genoma completo. A partir de la secuenciación y ensamble de las bibliotecas genómicas se obtuvieron 130 contigs, los cuales se analizaron por comparación con bases de datos para la anotación de los genes. Todo el proyecto de secuenciación "shotgun" del genoma se ha depositado en NCBI/ GenBank bajo el número de acceso NZ LAEN00000000.

Una metodología idéntica se utilizó para la anotación del genoma de Avpg2015 (marzo 2015) por Horta-Valerdi *et al.*. De esta cepa se obtuvieron 25 contigs, sugiriendo que la cepa contiene pocos elementos genéticos móviles integrados en el cromosoma. La referencia completa del genoma de la cepa Avpg2015 de Avpg se ha depositado en NCBI/ GenBank bajo el número de acceso NZLAE00000000.

Hasta el momento se tienen disponibles 5 genomas completos de Avpg (JF4211, 72, 221, 2015, C1). Usado esta información, también se han identificado algunos factores de virulencia que podrían estar involucrados con la patogenicidad de dicha bacteria. Entre los factores de virulencia se pueden citar la cápsula, lipopolisacárido, las toxinas, el sistema de adquisición de hierro y algunas adhesinas.

A pesar de contar con las anteriores referencias de *Avibacterium paragallinarum*, no se conocen los mecanismos finos de patogenicidad. El análisis del genoma brinda, en principio, el catálogo completo de genes que un organismo puede expresar; y la identificación de aquellos genes asociados a la virulencia, se puede acelerar mediante el empleo de herramientas bioinformáticas adecuadas; especialmente para cepas recientemente investigadas.

Se dispone de la secuencia genómica completa de Avpg cepa 5 serovar A. En el presente trabajo se busca identificar atributos de virulencia de la cepa 5 de *A. paragallinarum* a partir de la comparación con las secuencias genómicas de cepas previamente caracterizadas.

Capítulo 2

PLANTEAMIENTO DEL PROYECTO

Este trabajo se enfoca en la anotación del genoma de *A. paragallinarum* cepa 5 y el comienzo del estudio de algunos factores de virulencia asociados como: hema-glutinina, metaloproteasas, fimbrias F17 y toxinas RTX. Se ha incluido en el análisis comparativo de genomas a cepas pertenecientes a la misma especie y a cepas de diferentes géneros pertenecientes a la familia *Pasteurellacea* previamente anotadas en Gen Bank-NCBI.

Los objetivos planteados han sido los siguientes:

2.1. Objetivo general

Hacer la descripción de la secuencia del Draft del genoma de *Avibacterium paragallinarum* cepa Avpg5.

2.2. Objetivos particulares

- Hacer el análisis bioinformático de la secuencia del Draft del genoma de Avpg5.
- Comparar *in silico* el genoma de la cepa Avpg5 con los genomas de cepas de Avpg previamente anotados en GenBank e identificar genes putativos que codifiquen factores de virulencia.
- Comparar *in silico* el genoma de la cepa Avpg5 con los genomas de otras bacterias de la familia *Pasteurellaceae* enfocados a los factores de virulencia.

2.3. JUSTIFICACIÓN

Se conocen 5 genomas de *Avibacterium paragallinarum*, a partir de ellos se han deducido varios genes putativos asociados a factores que promueven la colonización e invasión al hospedero, sin embargo, existen diferencias en su capacidad de virulencia. Avpg es una bacteria que tiene varios factores de virulencia que sería deseable incorporar en la elaboración de vacunas dada la existencia de variaciones antigénicas relacionadas con la virulencia y prevalencia de las cepas de campo, lo que deja en claro la importancia de la actualización constante de las vacunas que se aplican en el medio productivo de granjas de pollos y la inherente búsqueda de nuevos antígenos para futuras vacunas.

La comparación de los genomas existentes de *Avibacterium paragallinarum* podría ayudar a dar una mejor visión de genes de virulencia en las diferentes cepas de esta especie bacteriana, especialmente en la cepa Avpg5 de la que se tiene la secuencia de nucleótidos en el laboratorio de Microbiología Molecular y Celular del CICM-ICUAP.

2.4. ESQUEMA DE TRABAJO

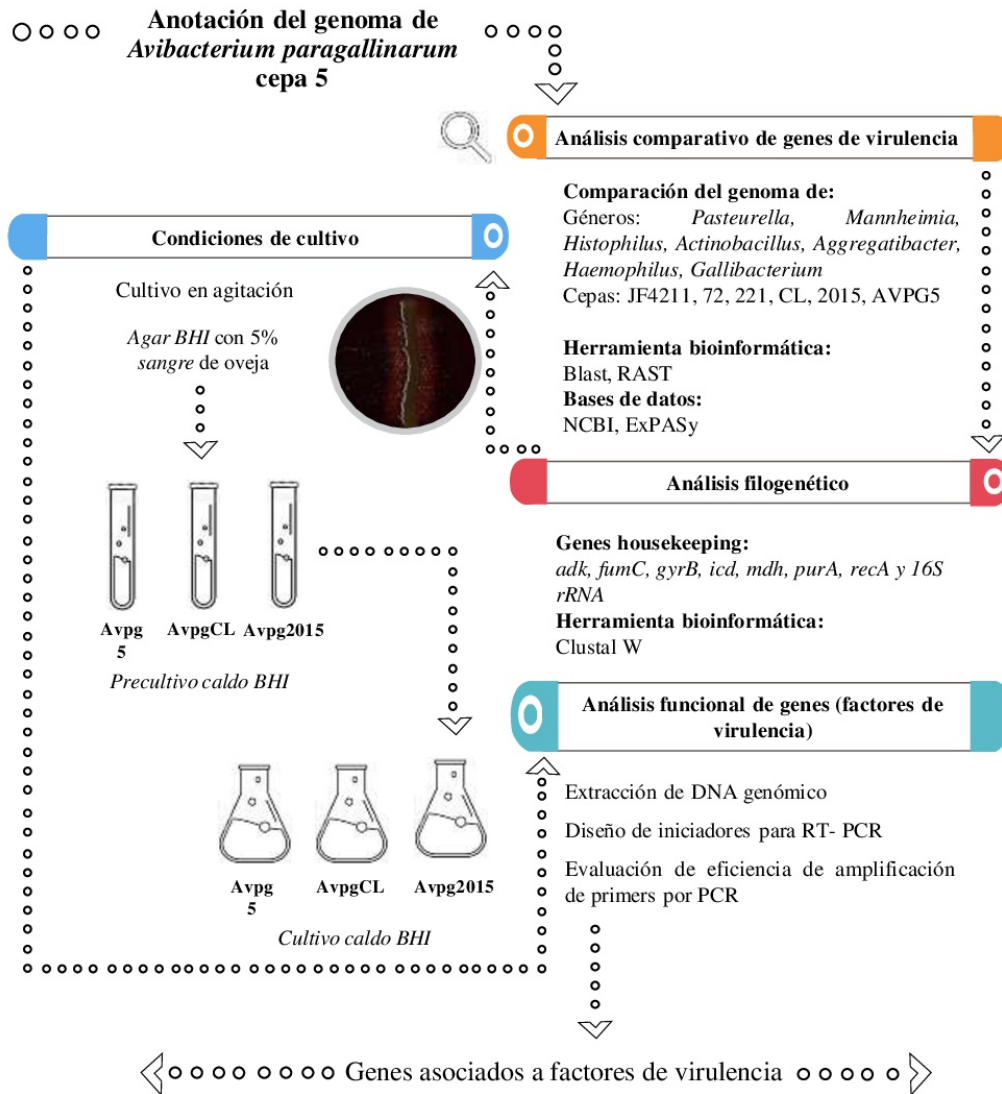


FIGURA 2.1: Esquema de trabajo

Capítulo 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Material biológico

TABLA 3.1: Cepas de *A. paragallinarum* NAD dependientes

Cepa	Serotipo	Tamaño del genoma (Mb)	Número de genes
Avpg 5	A	2.39726	2353
Avpg 2015	B	2.51445	2488
Avpg CL	C	2.41084	2532

3.1.2. Medios de cultivo

Brain Heart Infusion (BHI) Agar

Medio Infusión Cerebro Corazón para cultivo, aislamiento, resiembra y mantenimiento de cepas tipo.

Medio base suplementado con sangre de carnero al 5% (o sangre humana) y NAD a razón de 2 μ l por cada mL de medio, con adición de 1.6% de Agar para cultivo en placa sin adición de Agar para cultivo en caldo.

Se utilizó caldo BHI para el cultivo y la extracción de DNA de cepas de *A. paragallinarum*.

3.1.3. Soluciones

Buffer de lisis

Solución buffer utilizada en el proceso de extracción de DNA. Esta solución buffer para un volumen de 100 mL contiene:

TABLA 3.3: Buffer de lisis

Tris-50 mM	(20 mL Tris 250 mM)
EDTA-10 mM	(2 mL EDTA 250 mM)
NaCl-10 mM	(20.06 gr.)

Solución Tris (50mM)-lisozima (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Principal componente buffer; su función principal es la de mantener el pH del buffer en un punto estable (pH 8). El Tris y EDTA interactúan con el LPS (lipopolisacárido) de la membrana desestabilizándole aún más. La enzima hará la hidrólisis de la pared celular.

Fenol Cloroformo

Mezcla Fenol saturado con Tris (pH 8.0)/Cloroformo/Alcohol isoamílico (25:24:1). Buffer necesario para que al ácido nucleico se mantenga en la parte acuosa una solución posterior; los ácidos nucleicos insolubles en fenol y solubles en cloroformo se separaran en dos fases: la superior acuosa, donde están presentes los ácidos nucleicos, y la fase del fondo con fenol y cloroformo y las demás moléculas, como proteínas y grasas, que inhiben las enzimas y la amplificación de los ácidos nucleicos.

Cloroformo

Solvente orgánico que permite limpiar el fenol del ADN por sucesivos lavados.

Acetato de Sodio 3M

Sal adicionada para la precipitación del ADN (el ADN que está cargado negativamente va a obtener una capa iónica positiva que permite su precipitación).

Buffer para pTaq

TABLA 3.5: Buffer para pTaq (pH final de 8.3)

Tris-Cl	100 mM
KCl	500 mM

Glicerol

Es usado para el almacenamiento de cepas a bajas temperatura. Una solución al 50 % (p/v) de glicerol no se congelará a -20°C .

(1) Métodos generales de conservación de microorganismos. Available from: <https://www.researchgate.net>

Solución de bromuro de etidio

Se utiliza 10 μl de bromuro por mL de agua. compuesto intercalante. En unión al DNA produce fluorescencia de color rosado por irradiación con luz ultravioleta. Se utiliza en electroforesis para teñir el DNA y revelar su posición en el gel.

Azul de bromofenol

Compuesto coloreado y con carga, utilizado para comprobar el progreso de la electroforesis.

Buffer TBE (Tris-borato-EDTA)(5X)

TBE es usado como buffer para electroforesis de ácidos nucleicos. La solución de TBE se diluye antes de su uso. Para un litro de solución buffer (1:5):

TABLA 3.7: Buffer TBE

Ácido bórico	27.5 μl
EDTA-0.5 M (pH 8)	20 mL
Tris base	54 μl
Agua desionizada	Aforar a un litro

3.1.4. Reactivos

Sarcosil al 20 %

Detergente aniónico que permite separar las proteínas y lípidos contenidos en las muestras biológicas del ADN por su capacidad de desnaturalizar membrana y estructuras proteicas. EL procedimiento de lisis se lleva a cabo bajo condiciones de refrigeración a -20° C.

EDTA (10 mM)

El EDTA se une a cationes divalentes tales como el calcio y el magnesio. Dado que estos iones ayudan a mantener la integridad de la membrana celular, la eliminación de estos con EDTA desestabiliza la membrana.

Liozima

Uso de liozima para degradar enlaces glucosídicos de pared celular.

RNasa

La incubación con la enzima RNasa degrada el RNA, molécula contaminante generalmente presente en preparaciones de ADN.

3.1.5. Soporte informático

Plataformas y bases de datos

- RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*)
<https://rast.nmpdr.org/>
- ExPASy (*Expert Protein Analysis System*. SIB Bioinformatics Resource Portal.
<https://www.expasy.org/>
- NCBI GenBank National (*Center for Biotechnology Information*)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- IDT (*Integrated DNA Technologies*). Oligo Design and Analysis Tools.
<https://www.idtdna.com/scitools/>
- BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*)
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

Software

- ClustalX2
- SnapGen
- Mauve

3.2. Métodos

3.2.1. Análisis comparativo

El genoma de la bacteria *A.paragallinarum* cepa 5 Serovar A, está ensamblado en 46 contigs. Se realizó la comparación de genomas por pares (Pair wise) por medio de la plataforma RAST para deducir los genes putativos contenidos en los contigs. Se filtraron las secuencias peptídicas relacionadas con virulencia de las cepas de referencia y se compararan con las presentes en Avpg5.

A partir de la comparación de genomas completos, se desplegaron las diferencias y sobrelapamientos de conjuntos de genes en diagramas de Venn, los cuales proveen de óvalos representando cada cepa con regiones sobrelapadas que ilustran los clusters de gen o genes que son únicos o compartidos entre cada cepa de Avpg.

Comparación genómica de Avpg5 inter especie

Identificación de genes codificando determinantes de virulencia en Avpg5 en relación a las cepas referencia (JF4211, 72, 221, CL y 2015) de la misma especie. Se determinaron funciones asociadas a secuencia únicas y compartidas entre cepas.

Comparación genómica de Avpg5 vs diferentes cepas de la familia *Pasteurellaceae*

Análisis del draft del genoma de Avpg5 en busca de genes que son requeridos para su virulencia tomando como referencia diferentes cepas de la familia *Pasteurellaceae* (RAST):

TABLA 3.9: Géneros (8), especies (11) y cepas (37) incluidas en el análisis comparativo de Avpg5 vs otras especies pertenecientes a la familia *Pasteurellaceae*

<i>Avibacterium paragallinarum</i>	Avpg5	Avpg72	Avpg2015	AvpgCl	AvpgJF4211	Avpg221
<i>Pasteurella multocida</i>	Pm70	36950	X73	HB01		
<i>Mannheimia haemolytica</i>	M42548	D174	89010807NiktA			
<i>Haemophilus somnus (Histophilus somni)</i>	2336	129PT				
<i>Actinobacillus suis</i>	ATCC 33415	H91-0380				
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	L20 ser.5b	Femo ser.6	JL03 ser.3			
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	D11S-1	D7S-1	HK1651			
<i>Haemophilus influenzae</i>	Rd KW20	86-028NP	R2866			
<i>Haemophilus parasuis</i>	SH0165	Nagasaki	12939	ZJ0906		
<i>Haemophilus ducreyi</i>	35000HP	CLU3	GU2			
<i>Gallibacterium anatis</i>	UMN179	Avicor	12656/12	DSM 16844 =F149		

3.2.2. Análisis filogenético

Se seleccionaron ocho secuencias de genes housekeeping (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA* y *16S rRNA*) para estudiar la cercanía filogenética de Avpg5 con las cepas de *A. paragallinarum* ya reportadas. Las secuencias nucleotídicas de los genes housekeeping de las cepas Avpg5, Avpg2015 y AvpgCl fueron concatenadas y alineadas usando ClustalW para la generación del árbol filogenético y se usó a *Escherichia coli* cepa K12 para enraizarle.

3.2.3. Diseño de oligonucleótidos

Dentro de la plataforma RAST, se buscaron y extrajeron las secuencias de genes que codifican para subunidad GyrB (GyrB), la proteína reparadora RecN (RecN); las proteínas Usher (Usher), adhesina fimbrial F17-like (Fad), Chaperona DNA (Chap) y precursor de proteína fimbrial (Fimb), correspondientes a cada uno de los operones encontrados en las cepas Avpg5, Avpg2015 y AvpgCl, codificando para fimbrias F17.

Considerando estas secuencias se diseñaron juegos de oligonucleótidos (directo y reverso) con ayuda de la plataforma IDT Oligo Design and Analysis Tools.

3.2.4. Cultivo de *Avibacterium paragallinarum*

Las cepas Avpg5, Avpg2015 y AvpgCL se cultivaron en conjunto con una cepa no driza de *Staphylococcus aureus* en base agar BHI suplementado con sangre sin hemolizar al 5 % y NAD a razón 2:1 (2 μ l de NAD por cada mL de medio). La incubación se realiza a 37°C durante 48 horas bajo una atmósfera microaerófila.

Una vez obtenido el crecimiento, se seleccionó una colonia, se inoculó en 5 ml de caldo BHI suplementado con 10 μ l de NAD y suero de carnero al 5 %, durante 24 horas a 37°C. Para el cultivo en matraz de 20mL, se hizo un pase de 3 mL de pre cultivo y se adicionó igualmente, suero de bovino al 5 % y NAD a razón 2:1 (2 μ l de NAD por cada mL de medio).

3.2.5. Extracción y purificación de DNA genómico de *Avibacterium paragallinarum*

Una vez obtenidos los cultivos de Avpg5, AvpgCL y Avpg2015, se centrifugaron en tubos Eppendorf y se desechó el sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió en 500 μ l de buffer de lisis (Tabla 3.6), se agitó fuertemente para resuspender, con ayuda de un palillo se agregó una pizca de lisozima y 10 μ l de RNAsa a cada tubo; se dejó en incubación 60 min a 37°C. Se añadió 50 μ l de sarcosil a una concentración para completar la lisis; a la solución viscosa y transparente que se formó se le añadió un volumen equivalente de fenol y se mezcló varias veces, la suspensión se centrifugó 10 min a 11000 rpm y la fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo; a la fase acuosa se agregó un volumen de cloroformo, se agitó fuertemente y se centrifugó 10 min a 11000 rpm, el sobrenadante se pasó a un tubo Eppendorf nuevo y se agregó un volumen de cloroformo, se agitó y se centrifugó nuevamente; el sobrenadante se pasó a un tubo Eppendorf nuevo, a este se le agregó un volumen de etanol absoluto y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M pH7, se guardó a -20°C por 30 min y posteriormente se centrifugó 10 min a 11,000 rpm. Una vez obtenida la pastilla de DNA se lavó con 200 μ l de etanol al 70 %. Se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 70 μ l de agua inyectable marca PiSA®. El DNA se guardó a -20°C hasta su uso.

3.2.6. Amplificación de un fragmento de genes de interés por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A un tubo Eppendorf de 0.2 ml para PCR se le agregaron:

- Agua.
- Buffer para Taq DNA polimerasa/Pfx(10X).
- MgCl₂ (50mM)/MgSO₄(50mM).
- dNTP's (10mM).
- Primer forward.
- Primer reverse.
- DNA de Avpg.

- Enzima Taq polimerasa.

Se mezclaron suavemente y se ingresan al termociclador bajo el protocolo siguiente, estandarizado para todos los fragmentos de genes de interés:

1. 94°C, 4:00 min
2. 94°C, 0:30 min
3. 54.8°C, 0:30 min
4. 72°C, 1:00 min
5. step2. 28X
6. 72°C, 8:00 min
7. 12°C, ∞

3.2.7. Electroforesis en gel de agarosa

El producto amplificado mediante la técnica de PCR fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, en el que se cargaron 5 μ L de muestra de reacción. El corrimiento se hizo en una cámara electroforética horizontal durante un tiempo aproximado de 50 minutos a 80volts/cm en buffer TBE 0.5X. Los productos de PCR junto con el marcador de peso molecular fueron visualizados mediante tinción del gel con una solución acuosa de bromuro de etidio a una concentración de 5 μ g/mL durante 20 minutos. Posteriormente se colocó en un transluminador UV y se identificaron los fragmentos fluorescentes correspondiente.

3.2.8. Anotación del genoma de *Avibacterium paragallinarum* cepa 5

Se extrajo el DNA total de una cepa de campo, Avpg5. El DNA genómico fue secuenciado por tecnología 454 en LANGEBIO-CINVESTAV-Irapuato. Una segunda secuencia fue obtenida con tecnología Illumina (FES-Iztacala) bajo el hecho de que genomas de Avpg han sido reportados albergando muchas secuencias IS (secuencias de inserción). Se construyeron dos ensamblajes de genomas, uno con Mira4 y otro con Velvet. Ambas moléculas pueden ser estimadas aproximadamente con 2.4 Megabases. Así también, el genoma de Avpg5 fue comparada con secuencias de genoma de cinco cepas de la misma especie (JF4211, 72, 221, CL y Avpg2015) recuperadas de la base de datos GenBank. Estas comparaciones permitieron conocer información importante, respecto a secuencias de virulencia. Para conocer secuencias de DNA adicionales relacionadas con factores de virulencia y nutrir la información a asociar al genoma de la cepa Avpg5, realizamos el análisis comparativo con secuencias de DNA genómico de un juego de bacterias patógenas de animales, pertenecientes a la familia Pasteurellaceae. Entre éstas, de los géneros *Gallibacterium*, *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Histophilus* y *Mannheimia*. Funciones putativas de genes fueron predichas con RAST. Consecuentemente, encontramos secuencias relacionadas a hemaglutininas, toxinas Avx y CDT, factores de colonización y otros genes relacionados a metabolismo o biosíntesis de cápsula. El genoma anotado de Avpg5 se depositará en la base de datos NCBI GenBank.

Capítulo 4

RESULTADOS

4.1. Análisis bioinformático de la secuencia del draft del genoma de Avpg5

4.1.1. Anotación del genoma de *Avibacterium paragallinarum* cepa 5

El draft del genoma de Avpg5 está compuesto de 46 contigs cubriendo el tamaño de 2 397 257 pares de bases. El N_{50} es de 114663 bp y el mínimo y máximo tamaño de contig son de 1190 y 272593 bp, respectivamente.

En total, el genoma de Avpg5 comprende 2438 genes: 2353 secuencias codificantes (CDSs) y 85 genes codificando RNA (Tabla 4.1).

TABLA 4.1: Datos del genoma de las distintas cepas de *Avibacterium paragallinarum*

Aislamiento	Cepa	Genoma (bp)	GC %	Scaffolds	Genes	Proteínas
México	5	2 397 257	41.00	46	2438	2353
México	Cl	2 410 835	41.30	154	2606	2532
México	2015	2 514 449	40.90	24	2568	2488
Perú	72	2 453 490	40.80	75	2505	2452
Alemania	JF4211	2 869 246	41.10	34	3324	3250
China	221	2 668 385	41.00	135	3009	2944

La anotación con la plataforma RAST reveló 1884 genes distribuidos entre 27 subsistemas y 583 proteínas hipotéticas (Fig. 4.1). Un total de 22 proteínas putativas fueron relacionados a genes de fagos y 54 a virulencia, enfermedad y defensa (Para más detalles ver Anexo A.6.). Se encontraron ocho copias de rRNA 5S, cuatro copias predichas de genes rRNA 23s y dos copias de genes rRNA 16S.

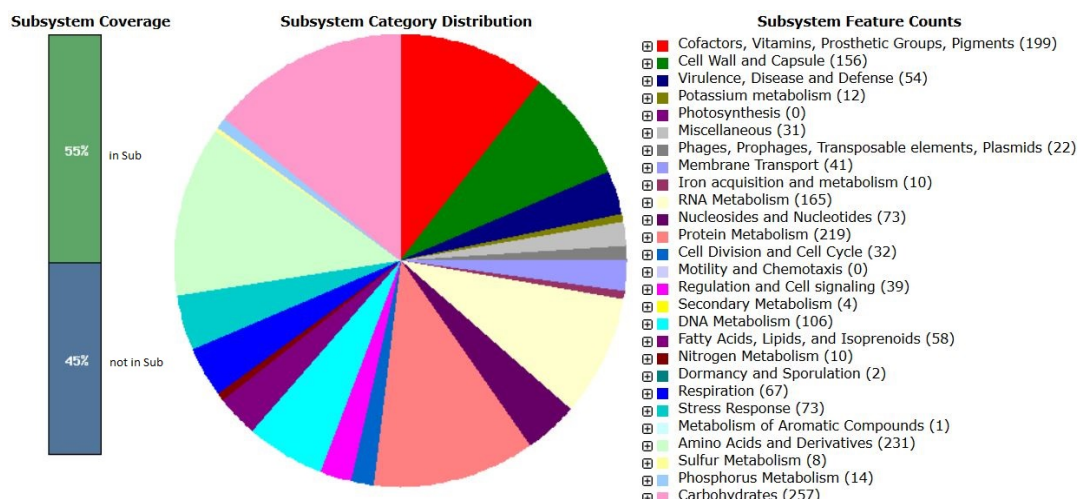


FIGURA 4.1: Organización de genes conectados a subsistemas y su distribución en diferentes categorías dentro del genoma de Avpg5

La plataforma RAST nos permitió hacer una anotación funcional inicial del draft del genoma de Avpg5. Las proteínas identificadas por genómica comparativa contribuirán a la anotación final del genoma como se indica en la tabla 4.1.

La secuencia del genoma de la cepa 5 de *A. paragallinarum* será depositada en la base de datos de NCBI/ GenBank. Actualmente, existen cinco genomas de Avpg en calidad de draft que están disponibles públicamente en GenBank (NCBI).

Con la contribución de la secuencia de Avpg5, el laboratorio de Microbiología Molecular y Celular contribuirá con el 50 % de la información referente a genomas de Avpg, depositada en GenBank.

4.1.2. Análisis filogenético de 6 cepas de Avpg por medio de genes Housekeeping

Usamos el método de neighbor joining para crear un dendrograma que incluyera la cepa Avpg5 y cinco cepas hasta ahora anotadas de Avpg. Las secuencias de genes housekeeping *adk, fimC, gyrB, icd, mdh, purA, recA* y *16S rRNA* fueron alineadas y luego concatenadas. El árbol filogenético se realizó con las secuencias concatenadas (Fig. 4.2).

Los resultados obtenidos nos muestran que existen 2 clados. El primer clado es representado por Avpg5 y 2015. Dentro de este clado, hay una relación idéntica entre el par de cepas. Un segundo clado mayor contiene a las cepas Avpg JF4211, 211, CL y 72 pero las relaciones dentro de este clado difieren.

La relación filogenética dentro de Avpg basada en los genes housekeeping sugiere que Avpg5 serovar A está más estrechamente relacionada con Avpg2015 serovar B. Avpg CL y 72 se identificaron por su única ocupación en una rama de dendrograma. Las distancias horizontales entre cada par de cepas bacterianas nos muestran el grado de divergencia o similitud de secuencia.

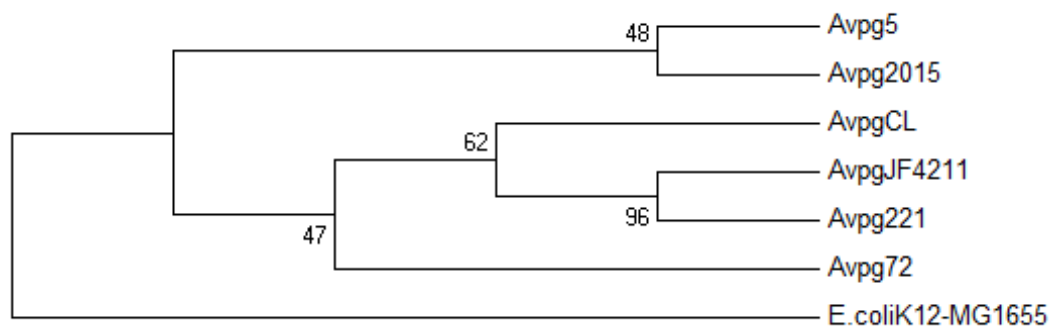


FIGURA 4.2: Dendrograma de *Avibacterium paragallinarum*.

El método Neighbor-Joining implementado en la paquetería del software MEGA7 fue usado para generar el árbol filogenético. El porcentaje de árboles replicados en el que los taxones asociados se agruparon en el bootstrap test (2000 réplicas) se muestran junto a las ramas. Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes.

Al comparar la filogenia resultante del dendrograma enraizado y del no enraizado, utilizando los mismos genes housekeeping, se observa la conservación de la topología de los taxa incluidos (Fig. 4.2 y 4.3 respectivamente).

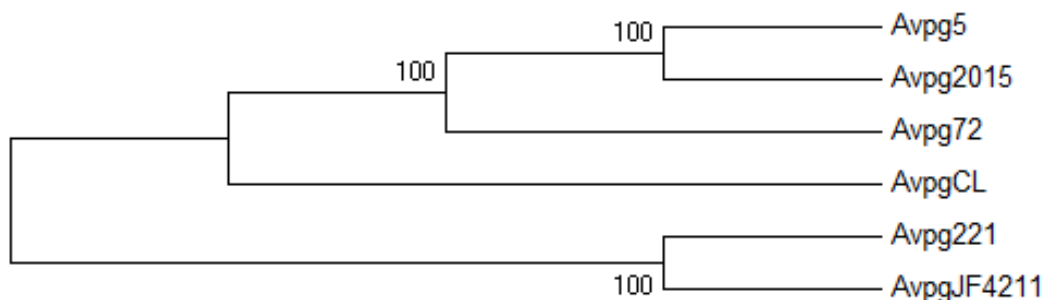


FIGURA 4.3: Dendrograma representando las relaciones evolutivas de cepas de *Avibacterium paragallinarum*.

La historia evolutiva fue inferida usando el método Neighbor-Joining. El árbol consenso inferido a partir de un bootstrap de 2000 iteraciones se toma para representar la historia evolutiva de los taxa analizados. El porcentaje de árboles replicados en el que los taxones asociados se agruparon en el bootstrap test (2000 réplicas) se muestran junto a las ramas. Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes. El análisis fue llevado a cabo usando el software Mega 7.

4.2. Comparación *in silico* el genoma de la cepa Avpg5 con los genomas de cepas previamente anotados en GenBank e identificación de genes putativos que codifican factores de virulencia.

4.2.1. Comparación genómica de Avpg5

Para investigar el contenido del genoma de Avpg5, se realizó un análisis comparativo utilizando las secuencias genómicas de cepas de Avpg ya anotadas en un primer análisis y cepas de diferentes especies de la familia *Pasteurellaceae* para la segunda parte en estudio de genómica comparativa. Se establecieron homologías entre los productos de los genes de cepas de *Avibacterium* y cepas de *Gallibacterium*, *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Histophilus*, *Aggregatibacter* y *Mannheimia* de la familia *Pasteurellaceae* para transferir información asociada al genoma de organismos ya reportados en bases de datos al genoma de Avpg5.

El número de proteínas a rastrear en Avpg5 incrementó con cada cepa adicional al análisis comparativo, pasando de un total de 1322 a 1998 genes asociados a funciones probables a rastrear en dicho genoma. Se resumen en el gráfico el total de productos génicos a asociar a cada cepa del comparativo inicial inter especie y del comparativo global final inter género. El número extrapolado de funciones nuevas se observa después de que la cantidad de genomas aumenta de 6 a 37. Todos los genes presentes fueron verificados manualmente para confirmar que eran únicos (Fig. 4.4).

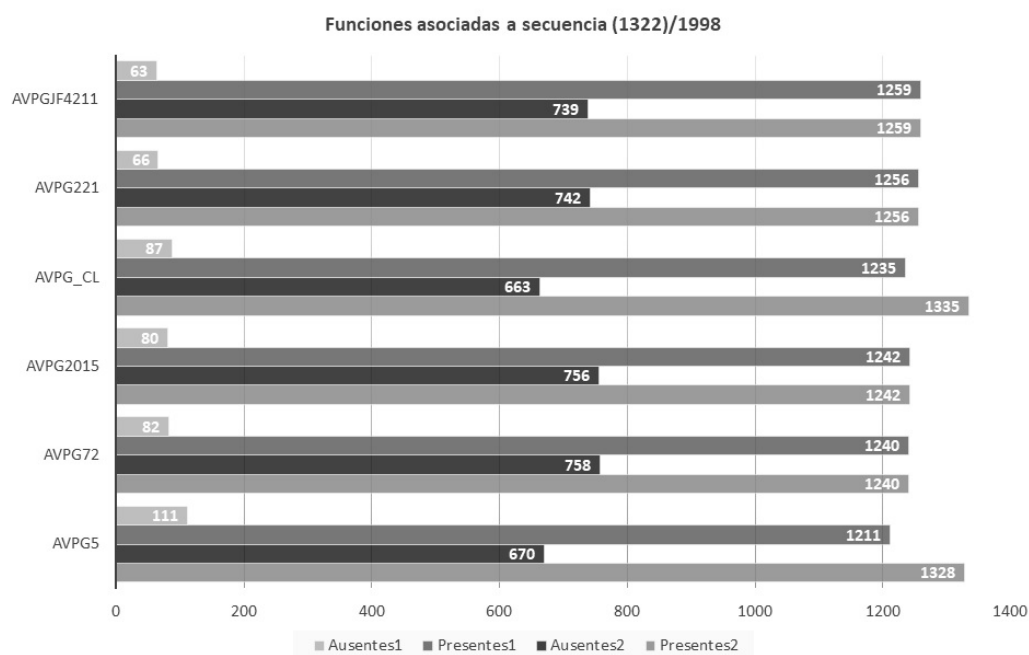


FIGURA 4.4: Resultados de comparación *in silico* de genomas para cepas de Avpg.

Se utilizaron genomas de cepas previamente anotadas en GenBank. Se esquematiza el número de genes a asociar a cada cepa; de 1322 genes resultantes en el primer comparativo pasamos a tener un total de 1998 genes a rastrear en el genoma de Avpg5, con la contribución de información asociada al genoma de las cepas incluidas en el segundo análisis comparativo.

Uno de los métodos más simples, pero más usados de comparación de ortólogos de genomas completos es el despliegado de diferencias y solapamientos en un diagrama de Venn de clusters ortólogos, en nuestro caso provee de óvalos o círculos representando cada especie con solapamiento de regiones que ilustran los conjuntos-clusters- de gen o genes. Dicho método fue utilizado dada la funcionalidad que presenta para generar visualizaciones que muestran la diferencia y la superposición para todos los clústeres dentro de los genomas de las cepas de Avpg (Fig. 4.5).

El núcleo del genoma de cepas de Avpg quedó conformado por 1159 genes asociados a funciones probables deducidas con base en la similitud de las secuencias (Fig. 4.5 (E)). Como era de esperar, el genoma central está compuesto en gran parte de secuencias codificantes esenciales para la función celular y la supervivencia (1136), así también se encuentran proteínas asociadas a virulencia (23) [Tabla 4.3]. El porcentaje de genes putativos posiblemente dispensables que están en el genoma de cepas de Avpg generalmente representa la mayor parte de la diversidad en una especie y se encuentran representados por genes compartidos entre cepas y genes particularmente presentes en una cepa específica. Genes únicos están presentes en las cepas de Avpg, con excepción de Avpg2015 y JF4211 (Tabla 4.4).

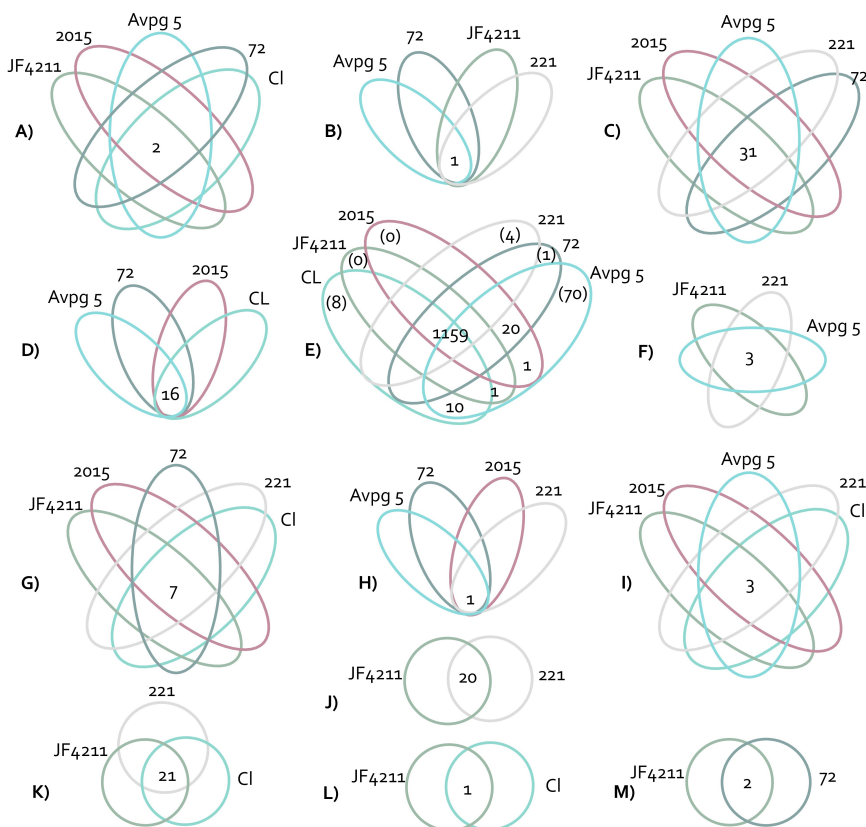


FIGURA 4.5: Núcleo del genoma, genoma dispensable y número de proteínas únicas en seis genomas de Avpg.

Diagramas de Venn que representan el análisis de agrupamiento compartido de las proteínas entre los genomas. Los números de clústeres homólogos se indican para cada intersección entre cepa y cepa.

De 1998 genes ortólogos identificados a partir de 37 cepas, 1159 estaban presentes en todas las cepas de Avpg como genoma central de la especie. De estos, 23 se encontraron asociadas a virulencia [toxinas (5), LPS (5), adhesinas (1) y proteínas de membrana externa (12)].

TABLA 4.3: Núcleo del genoma de Avpg (Anexo A.7). Se muestran los genes asociados a virulencia en el genoma central de cepas de *Av. paragallinarum*.

Factor de virulencia	Función
Toxinas	Cytolethal distending toxin subunit A Cytotoxic necrotizing factor subunit A Cytotoxic necrotizing factor subunit B Cytotoxic necrotizing factor subunit C HigB toxin protein RND efflux system, outer membrane lipoprotein CmeC Uncharacterized protein YrbK clustered with lipopolysaccharide transporters YafQ toxin protein
LPS	Lipopolysaccharide ABC transporter, ATP-binding protein LptB Lipopolysaccharide heptosyltransferase I LPS-assembly lipoprotein RlpB precursor (Rare lipoprotein B) LptA, protein essential for LPS transport across the periplasm
Adhesinas	Putative large exoprotein involved in heme utilization or adhesion of ShlA/HecA/FhaA family
Proteínas de membrana externa	Outer membrane lipoprotein carrier protein LolA Outer membrane lipoprotein LolB Outer membrane lipoprotein SmpA, a component of the essential YaeT outer-membrane protein assembly complex Outer membrane protein A precursor Outer membrane protein assembly factor YaeT precursor Outer membrane protein H precursor Outer membrane protein Imp, required for envelope biogenesis Outer membrane protein NlpB, lipoprotein component of the protein assembly complex (forms a complex with YaeT, YfiO, and YfgL) Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport Outer membrane stress sensor protease DegQ, serine protease Outer membrane stress sensor protease DegS

Genoma dispensable de Avpg conformado por genes únicos o particularmente compartidos entre cepas. El número de genes únicos en cada cepa de Avpg varió de 70 a 0 (Fig. 4.5 (E)). La cepa 5 de Avpg tiene el mayor número de genes únicos.

TABLA 4.4: Genes únicos de cada cepa de Avpg.

Cepa	Papel funcional
Avpg72	LSU ribosomal protein L14p (L23e)
AvpgCl	LsrR, transcriptional repressor of lsr operon Maltose operon periplasmic protein MalM Mlc, transcriptional repressor of MalT (the transcriptional activator of maltose regulon) and manXYZ operon Phage head maturation protease Phage minor tail protein Phage tail assembly protein Transcriptional regulatory protein UhpA UDP-galactose:(galactosyl) LPS alpha1,2-galactosyltransferase WaaW
Avpg221	Phage endolysin Phage holin Phage terminase large subunit Predicted dye-decolorizing peroxidase (DyP), encapsulated subgroup
Avpg5	Arginine deiminase Beta-galactosidase Capsular polysaccharide biosynthesis heptosyltransferase HddD capsular polysaccharide biosynthesis protein Catalase CBS domain Cytosine/purine/uracil/thiamine/allantoin permease family protein D-Lactate dehydrogenase dTDP-glucose 4,6-dehydratase Endo-1,4-beta-xylanase A precursor Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [FMN] FIG050068: DNA-binding protein Formate dehydrogenase -O, gamma subunit Gluconate dehydratase Glutathionylspermidine amidohydrolase Glutathionylspermidine synthase Glyceraldehyde-3-phosphate ketol-isomerase HtrA protease/chaperone protein Lysyl-lysine 2,3-aminomutase Membrane proteins related to metalloendopeptidases Phage lysin, 1,4-beta-N-acetylmuramidase or lysozyme Phage tail fiber assembly protein Phage-related capsid packaging protein

Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein PstS
Phosphate regulon transcriptional regulatory protein PhoB (SphR)
Phosphate transport ATP-binding protein PstB
Phosphate transport system permease protein PstC
Phosphatidylinositol-specific phospholipase C
Phosphoadenylyl-sulfate reductase [thioredoxin]
Phosphoenolpyruvate-dihydroxyacetone phosphotransferase, subunit DhaM
Phosphogluconate dehydratase
Phosphoglycerate transporter protein PgtP
Phospholipase A1 precursor
Phosphomethylpyrimidine kinase
Phosphonate ABC transporter permease protein phnE2
Polyphosphate kinase
Polysaccharide export lipoprotein Wza
Predicted dye-decolorizing peroxidase (DyP), YfeX-like sub-group
Predicted membrane fusion protein (MFP) component of efflux pump, membrane anchor protein YbhG
Predicted transcriptional regulator of pyridoxine metabolism
Programmed cell death toxin PemK
Protein co-occurring with molybdenum cofactor biosynthesis protein B
Protein TadG, associated with Flp pilus assembly
Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase
PTS system, glucitol/sorbitol-specific IIC component
PTS system, mannose-specific IID component
PTS system, N-acetylmuramic acid-specific IIC component
Putative deoxyribonuclease similar to YcfH, type 3
Putative Dihydrolipoamide dehydrogenase
Putative dihydroxyacetone kinase, dihydroxyacetone binding subunit
Putative haemolysin/cytolysin secreted via TPS pathway
Putative OMR family iron-siderophore receptor precursor
Putative predicted metal-dependent hydrolase
Putative two-domain glycosyltransferase
Pyridoxine biosynthesis glutamine amidotransferase, synthase subunit
Radical SAM family protein HutW, similar to coproporphyrinogen III oxidase, oxygen-independent, associated with heme uptake
RecD-like DNA helicase YrrC
Redox-sensing transcriptional regulator QorR
Retron-type RNA-directed DNA polymerase
Rhodanese-related sulfurtransferases
Ribose 5-phosphate isomerase B

Ribose/xylose/arabinose/galactoside ABC-type transport systems, permease component 1
 Ribosomal-protein-S5p-alanine acetyltransferase
 Ribulokinase
 RNA polymerase sigma-70 factor
 S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase
 SAM-dependent methyltransferase
 Septum site-determining protein MinD
 Tagatose-6-phosphate kinase GatZ
 Universal stress protein UspA and related nucleotide-binding proteins

4.2.2. Genes que potencialmente codifican factores de virulencia en Avpg5

En el análisis del genoma de Avpg5 se identificaron una serie de genes que codifican proteínas involucradas en una variedad de actividades relacionadas con la virulencia que incluyen toxinas CDT, factores de colonización, cápsula y LPS (Tabla 4.5).

TABLA 4.5: Factores de virulencia de *Avibacterium paragallinarum* cepa 5 resultantes del análisis comparativo del su genoma en referencia a cepas ya anotadas en bases de datos.

Factor de virulencia	Papel funcional
Toxinas	Programmed cell death toxin PemK Cytolethal distending toxin subunit A Cytolethal distending toxin subunit B Cytolethal distending toxin subunit C HigA protein (antitoxin to HigB) HigB toxin protein RelB/StbD replicon stabilization protein (antitoxin to RelE/StbE) RelE/StbE replicon stabilization toxin YafQ toxin protein
LPS	LPS-assembly lipoprotein RlpB precursor (Rare lipoprotein B) LptA, protein essential for LPS transport across the periplasm Lipopolysaccharide ABC transporter, ATP-binding protein LptB Lipopolysaccharide heptosyltransferase I
Polisacáridos capsulares	Capsular polysaccharide biosynthesis heptosyltransferase HddD capsular polysaccharide biosynthesis protein Phage-related capsid packaging protein Capsular polysaccharide ABC transporter, ATP-binding protein KpsT

	Capsular polysaccharide ABC transporter, permease protein KpsM
	Capsular polysaccharide biosynthesis/export periplasmic protein WcbC
	Capsular polysaccharide export system inner membrane protein KpsE
	Capsular polysaccharide export system protein KpsC
	Capsular polysaccharide export system protein KpsS
	Phage major capsid protein
Adhesinas	Large exoproteins involved in heme utilization or adhesion
	Putative large exoprotein involved in heme utilization or adhesion of ShlA/HecA/FhaA family
	Putative fimbrial protein
Proteínas de membrana externa	Ferric hydroxamate outer membrane receptor FhuA
	Outer membrane lipoprotein carrier protein LolA
	Outer membrane lipoprotein LolB
	Outer membrane lipoprotein SmpA, a component of the essential YaeT outer-membrane protein assembly complex
	Outer membrane protein A precursor
	Outer membrane protein assembly factor YaeT precursor
	Outer membrane protein H precursor
	Outer membrane protein Imp, required for envelope biogenesis
	Outer membrane protein NlpB, lipoprotein component of the protein assembly complex (forms a complex with YaeT, YfiO, and YfgL)
	Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport
	Outer membrane stress sensor protease DegQ, serine protease
	Outer membrane stress sensor protease DegS
	RND efflux system, outer membrane lipoprotein CmeC
	Outer membrane usher protein htrE precursor
	Putative outer membrane lipoprotein
	Outer membrane protein W precursor
	Outer membrane protein P2 precursor
	Outer membrane lipoprotein e (P4) / NMN 5'-nucleotidase, extracellular
	Outer membrane autotransporter barrel

Requena propuso que en *Avibacterium paragallinarum* cepa 72 existen 103 genes relacionados con factores de virulencia³⁵ y estas secuencias se buscaron en la cepa 5. 83 genes son funciones generales, 12 son genes supuestos de virulencia.

En la tabla 4.6 se enlistan las funciones asociadas a los genes reportados por Requena *et. al* que lograron encontrarse en el rastreo por secuencia en Avpg5, entre los cuales destacan funciones previamente asociadas a virulencia. Las secuencias asociadas a polisacáridos capsulares se marcan en color azul, las de LPS se marcan en color verde y los genes fimbriales en color rosa.

Este estudio tuvo una significativa contribución a la identificación y categorización de funciones con probable implicación en la virulencia de Avpg, en particular de Avpg5. Para más detalles ver Anexo A.5.

TABLA 4.6: Proteínas predichas como factores de virulencia (95) por Requena et. al. presentes en las cepas de *Avibacterium paragallinarum* con una similitud de secuencia superior al 60%. Se reportan bajo el descriptor designado por RAST.

Proteína	Avpg5
Capsular polysaccharide export system inner membrane protein KpsE	+
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (EC 3.4.21.92)	+
Type IV pilus biogenesis protein PilQ; Competence protein E	+
Phosphomannomutase (EC 5.4.2.8)	+
Carbon storage regulator	+
Capsular polysaccharide export system inner membrane protein KpsE	+
Ferric uptake regulation protein FUR	+
UDP-glucose 4-epimerase (EC 5.1.3.2)	+
Glutamine synthetase type I (EC 6.3.1.2)	+
GDP-mannose 4,6-dehydratase (EC 4.2.1.47)	+
Phosphoheptose isomerase 1 (EC 5.3.1.-)	+
Glutamyl-tRNA reductase (EC 1.2.1.70)	+
Porphobilinogen deaminase (EC 2.5.1.61)	+
Uroporphyrinogen III decarboxylase (EC 4.1.1.37)	+
Ferrochelataze, protoheme ferro-lyase (EC 4.99.1.1)	+
Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase (EC 5.4.3.8)	+
Coproporphyrinogen III oxidase, oxygen-independent (EC 1.3.99.22)	+
Uroporphyrinogen-III methyltransferase (EC 2.1.1.107)	+
Uncharacterized protein EC-HemY	+
Methionine ABC transporter ATP-binding protein	+
Chaperone protein HscA	+
Chaperone protein HscB	+
Lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase (EC 2.3.1.-)	+
Lipid A export ATP-binding/permease protein MsbA	+
Lipid A biosynthesis (KDO) 2-(lauroyl)-lipid IVA acyltransferase (EC 2.3.1.-)	+
DNA mismatch repair protein MutS	+
N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase (EC 5.1.3.9)	+
N-acetylneuraminase synthase (EC 2.5.1.56)	+
Outer membrane protein A precursor	+
Glucose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.9)	+
ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase (EC 5.1.3.20)	+
ADP-heptose synthase	+
tetracycline repressor protein	-
Translation elongation factor Tu	+
Enolase (EC 4.2.1.11)	+
HlyD family secretion protein	+
Capsular polysaccharide export system protein KpsS	+
Cell envelope opacity-associated protein A	+
GTP pyrophosphokinase (EC 2.7.6.5), (p)ppGpp synthetase I	+
ADP-heptose-lipooligosaccharide heptosyltransferase II (EC 2.4.1.-)	+

Tetracycline efflux protein TetA	-
Transcriptional regulator, TetR family	-
Iojap protein	+
UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (EC 2.7.7.9)	+
ADP-heptose-lipooligosaccharide heptosyltransferase II (EC 2.4.1.-)	+
Capsular polysaccharide export system protein KpsC	+
Immunoglobulin A1 protease / autotransporter domain, T5aSS type secretion	+
Mannose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.8)	+
Mobile element protein	+
Undecaprenyl-phosphate N-acetylglucosaminyl 1-phosphate transferase (EC 2.7.8.-)	+
Capsular polysaccharide ABC transporter, ATP-binding protein KpsT	+
Capsular polysaccharide ABC transporter, ATP-binding protein KpsT	+
Lipopolysaccharide biosynthesis glycosyltransferase	+
2-Keto-3-deoxy-D-manno-octulosonate-8-phosphate synthase (EC 2.5.1.55)	+
DP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] N-acetylglucosamine deacetylase (EC 3.5.1.108)	+
Heat shock protein 60 family chaperone GroEL	+
Glucosyl-3-phosphoglycerate synthase (EC 2.4.1.266)	+
Acyl-[acyl-carrier-protein]-UDP-N-acetylglucosamine O-acyltransferase (EC 2.3.1.129)	+
UDP-2,3-diacetylglucosamine diphosphatase (EC 3.6.1.54)	+
Phosphoglucosamine mutase (EC 5.4.2.10)	+
Nucleoside 5-triphosphatase RdgB (dHATP, dITP, XTP-specific) (EC 3.6.1.15)	+
Single-stranded DNA-binding protein	+
UDP-glucose dehydrogenase (EC 1.1.1.22)	-
UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] glucosamine N-acyltransferase (EC 2.3.1.191)	+
Capsular polysaccharide ABC transporter, permease protein KpsM	+
Capsular polysaccharide ABC transporter, permease protein KpsM	+
Type IV fimbrial assembly, ATPase PilB	+
Methionine ABC transporter ATP-binding protein	+
GDP-L-fucose synthetase (EC 1.1.1.271)	+
Lipid-A-disaccharide synthase (EC 2.4.1.182)	+
Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1); Acetaldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.10)	+
Manganese ABC transporter, periplasmic-binding protein SitA	+
RNA polymerase sigma factor RpoE	+
Manganese ABC transporter, inner membrane permease protein SitC	+
Manganese ABC transporter, ATP-binding protein SitB	+
Methionine ABC transporter ATP-binding protein	+
TRAP-type transport system	+
Capsular polysaccharide biosynthesis/export periplasmic protein WcbC	+
Lipopolysaccharide heptosyltransferase I (EC 2.4.1.-)	+
Sodium/glutamate symport protein	+
RNA polymerase sigma factor RpoD	+

3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase	+
Arabinose 5-phosphate isomerase (EC 5.3.1.13)	+
TRAP-type transport system	+
TonB-dependent hemin , ferrichrome receptor	+
ClpB protein	+
Phosphopantetheine adenylyltransferase (EC 2.7.7.3)	+
Porphobilinogen synthase (EC 4.2.1.24)	+
DNA repair protein RadC	+
ClpB protein	+
Tyrosine recombinase XerD	+
Transcriptional regulator, AraC family	+
Phosphomannomutase (EC 5.4.2.8)	+

4.2.3. Verificación de la secuencia del genoma de Avpg5 por dos tecnología de secuenciación masiva

Una comparación directa del genoma completo de la Avpg5 obtenido por tecnología de secuenciación Roche 454 FLX Titanium y el obtenido por Illumina Genome Analyzer (GA) tuvo como finalidad evaluar la calidad ensamblaje (Fig. 4.6).

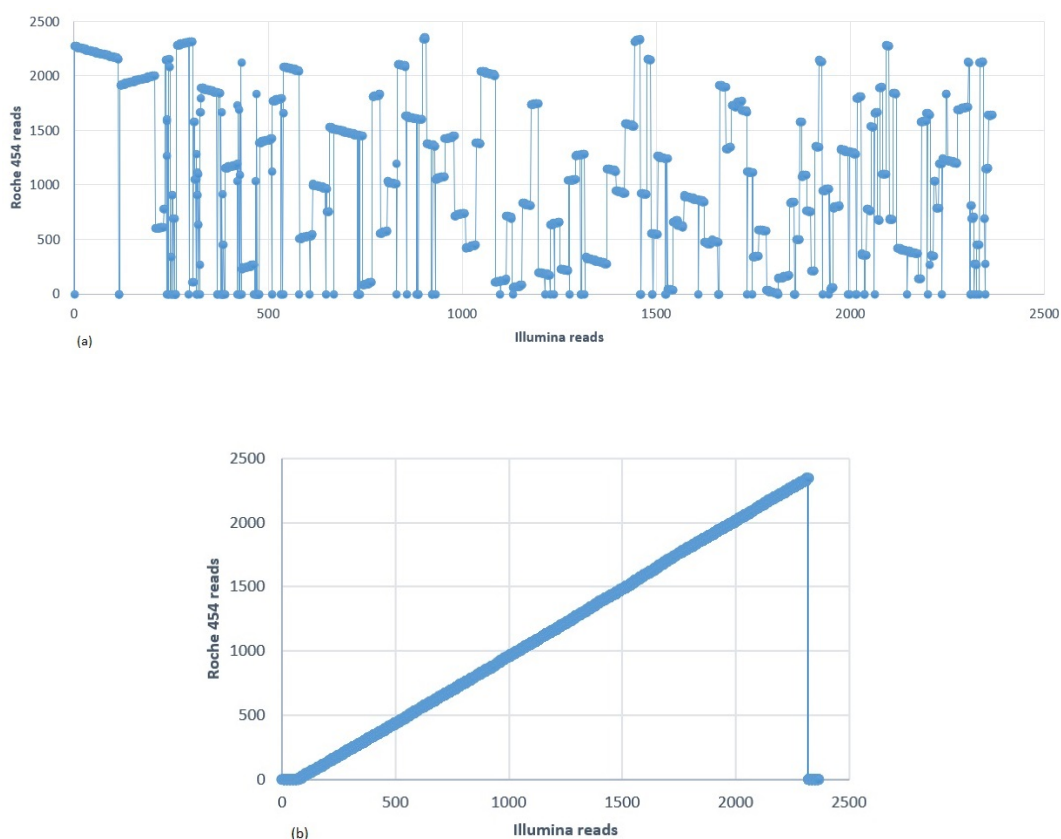


FIGURA 4.6: Dotplot

Análisis de la comparación de los resultados de secuenciación de dos procesos independientes, uno hecho con tecnología 454 Roche y otro con illumina, el primero con 46 contig y el segundo con 164 scaffolds. El primero con 2438 genes y el segundo con 2363 genes. (a) mayor muestra de dispersión antes del alineado; (b) condiciones arregladas consecutivas como dot plot.

Un alineamiento del genoma y análisis de atributos fue preformado con el software Mauve v2.3.1 (configuración predeterminada). Se utilizó para alinear los genomas de la cepa 5 y reordenar las secuencias (Fig. 4.7).

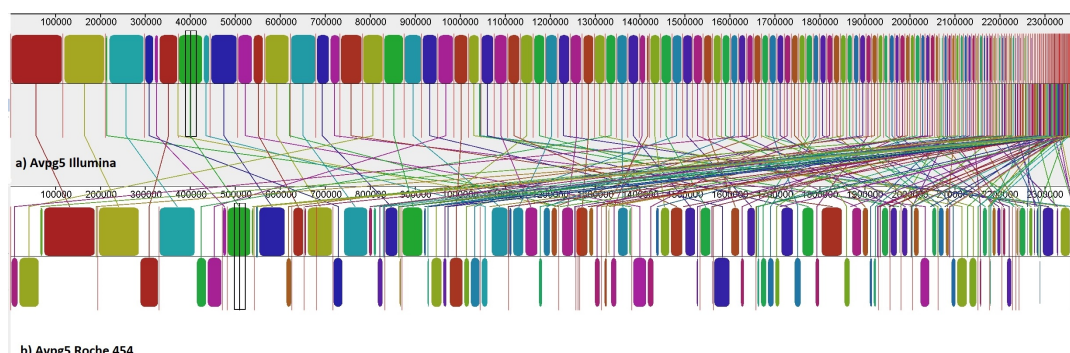


FIGURA 4.7: Comparación del genoma completo de Avpg secuenciado con Ilumina y 454 Roche usando una alineación progresiva con MAUVE.

Las regiones de similitud de secuencia está indicado por bloques de igual color. Los bloques contiguos representan la posición de los genes. a, Avpg5 Illumina; b, Avpg5 Roche 454.

4.2.4. Diseño de oligonucleótidos para la verificación molecular de funciones codificadas en el genoma de Avpg5

Para el estudio futuro de la expresión de los genes estructurales de fimbrias f17 de AVPG5 deducidos a partir del análisis *in silico* se realizó el diseño de oligonucleótidos (IDT oligo desing) ad hoc a las secuencias asociados a genes estructurales de fimbrias f17 (proteína fimbrial que resulta un importante factor de virulencia y potencial antígeno vacunal²⁷) en los aislados de *Avibacterium paragallinarum* 5, 2015 y CL (Tabla 4.7).

TABLA 4.7: Secuencias de oligonucleótidos usados para amplificar por PCR diferentes fragmentos de los genes que codifican a la proteína fimbrial F17 y de dos genes housekeeping usados como control positivo a partir de las cepas (A) Avpg5, (B) Avpg2015, (C) AvpgCL.

Proteína	Forward primer	Reverse primer
ABC GyrB	agcacctgtatcttctttg	tcaactcatgcccattagg
AB RecN	gacaaatccgcaatcccaac	tttgttctgtttcccccgc
C RecN	gcaccaatcgctcaacaag	gattgcctaaattcgctg
A Usher	cacgatgtcctctgtctacg	cgcttctaacacttcacctc
B Usher	tcgtgagattgctgttctg	ttctcctaaacaccgctg
A Chap	tgatccgaaagcttcaccag	tttggtcttttgctttgggtg
B Chap	ccgaacaaattaatgccccg	cgactacgcaaggcaattg
A Fimb	tgatgctgacaaagtgcg	tgcatggtataattcacgtag
B Fimb	caactcaaagtacgtttgcgg	gtgacactatcaagtcagagc
A Fad	tctccatcaaatacaggcacg	gcttcggcgtgctattg
B Fad	ttcgtttgactgttctggg	gcttagtattgttgcctgc
Cb Usher	gagtggatagtcttgagcc	gaatcaattgctgttcggtgg
Ca Usher	aaggcattactctcgtaacg	aataaaccactgtccccacc
Ca Fimb	caaatgtgagtgctaattggacg	tgccgttgattgtccttctg

Ca Fad gaggatggcattatgtggagg caggtgaaatagtttgtccgac

Se seleccionaron los pares de oligonucleótidos para cada uno de los cuatro genes (Subunidad fimbrial mayor (Fimb), chaperona (Chap), Usher y la tipo adhesina (Fad)) conformando operones de adhesinas fímbricas F17 de en cada una de las cepas tipo de Avpg. Se identificaron dos operones F17 tanto en Avpg5 como en AvpgCl y Avpg2015 (Fig. 4.8).

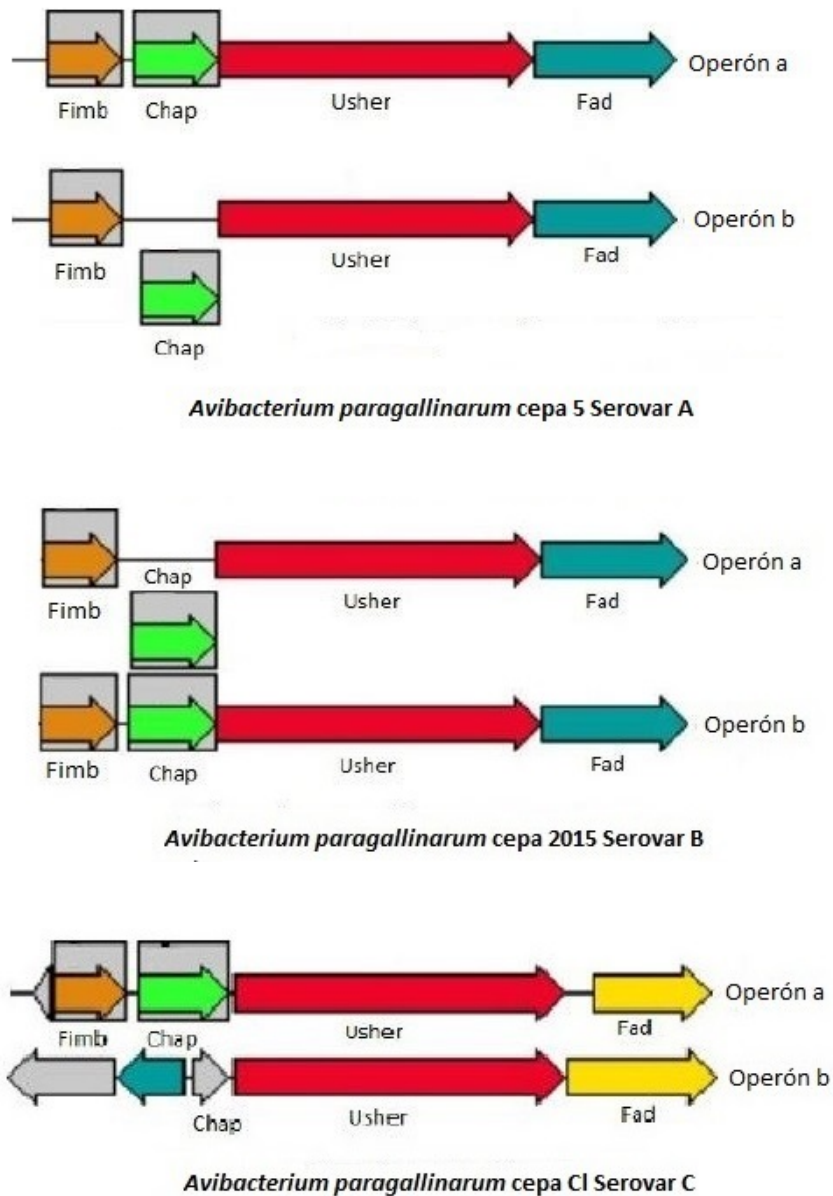


FIGURA 4.8: Representación esquemática de los dos arreglos del operón F17 en Avpg5, Avpg2015 y AvpgCl.

Se muestra un ordenamiento de cuatro genes conformando cada arreglo del operón fimbrial. Los conjuntos de genes con secuencia similar se agrupan con el mismo color. Los genes cuya posición relativa se conserva comparten cuadros de fondo gris.

4.2.5. Cultivo de *Avibacterium paragallinarum*

Después del cultivo en base agar BHI, los aislados de Avpg crecen muy débilmente, formándose colonias en forma de gotas de rocío, adyacentes a la colonia nodriza (fenómeno de satelitismo) y sólo dentro del área de la hemólisis producida por la cepa nodriza (*Staphylococcus aureus*). Las colonias son circulares, convexas, de superficie lisa, no pigmentadas o hemolíticas y se tornan más pequeñas a medida que se encuentran más alejadas de la colonia nodriza (Fig.4.9)



FIGURA 4.9: Crecimiento de Avpg en agar BHI adicionado con 5% de sangre de carnero y NAD después de 2 días de incubación a 37°C.

4.2.6. Análisis por PCR

Se extrajo el DNA genómico de tres diferentes cepas de Avpg. La corroboración de la calidad de la extracción de DNA genómico de las cepas tipo se realizó por electroforesis en gel de agarosa al .8%. Se corroboró que el ADN resultante de la extracción presenta suficiente cantidad para emplearse como molde en la amplificación por PCR de los fragmentos de genes de interés pertenecientes al operón de las fimbrias F-17 (Fig. 4.10).

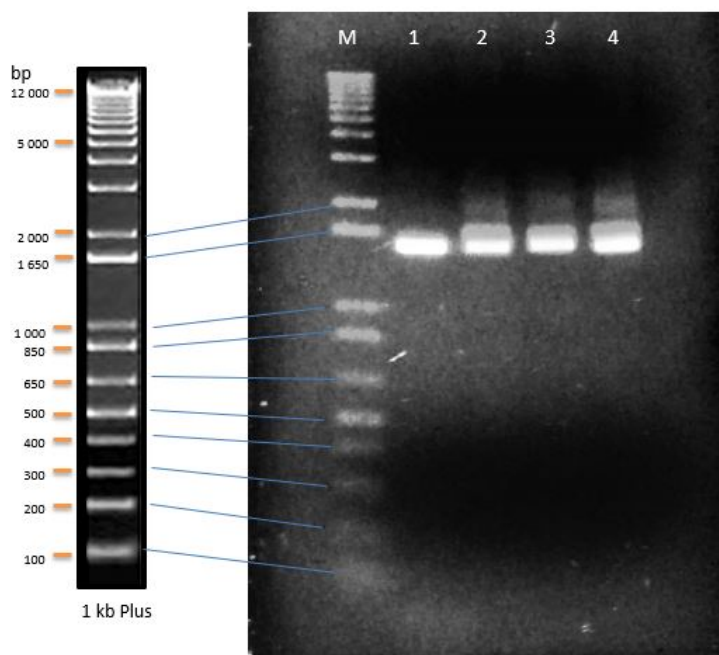


FIGURA 4.10: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos (línea 1-4) para las cepas de *Avibacterium paragallinarum* usadas con un estimado de tamaño de 1500 pares de bases.

Se observa el marcador de 1 kb (M), Avpg5 (línea 1 y 2), Avpg CI (línea 2) y Avpg 2015 (línea 4).

Se realizó la estandarización y optimación del protocolo para amplificación de fragmento de genes de interés por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y se evaluó la eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos diseñados para las diferentes secuencias diana. El tamaño de los amplicones osciló entre 185 y 300 pares de bases (Tabla 4.8).

TABLA 4.8: Tamaño esperado de amplicones.

Proteína	Amplificado esperado	Operón fimbrial
GyrB	220 bp	Control ABC
RecN	206 bp	Control AB
RecN	294 bp	Control C
Usher	300 bp	ABa
User	219 bp	ABb
User	276 bp	Ca
User	300 bp	Cb
Chap	185 bp	ABa
Chap	202 bp	ABb
Fimb	280 bp	ABa
Fimb	232 bp	ABb
Fimb	212 bp	Ca

Fad	287 bp	ABa
Fad	299 bp	ABb
Fad	219 bp	Ca

Los genes control utilizados fueron *gryB* y *recN*. Se encontraron 2 operones fimbriales F17 (a y b) tanto en Avpg5 (A) como en Avpg2015 (B) y AvpgCl (C). En el caso AcpgCl, no se encontró el elemento correspondiente a la subunidad fimbrial (Fib) en el arreglo b.

Todos los juegos de iniciadores permitieron amplificaciones de una banda única para sus respectivos genes, por lo que se deduce que la secuenciación de los genes hace certera la prueba molecular para las cepas y los iniciadores homólogos, con amplificaciones precisas. La visualización de los fragmentos Usher (Fig. 4.11), Chap, Fimb (Fig. 4.12) y Fad (Fig. 4.13) se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

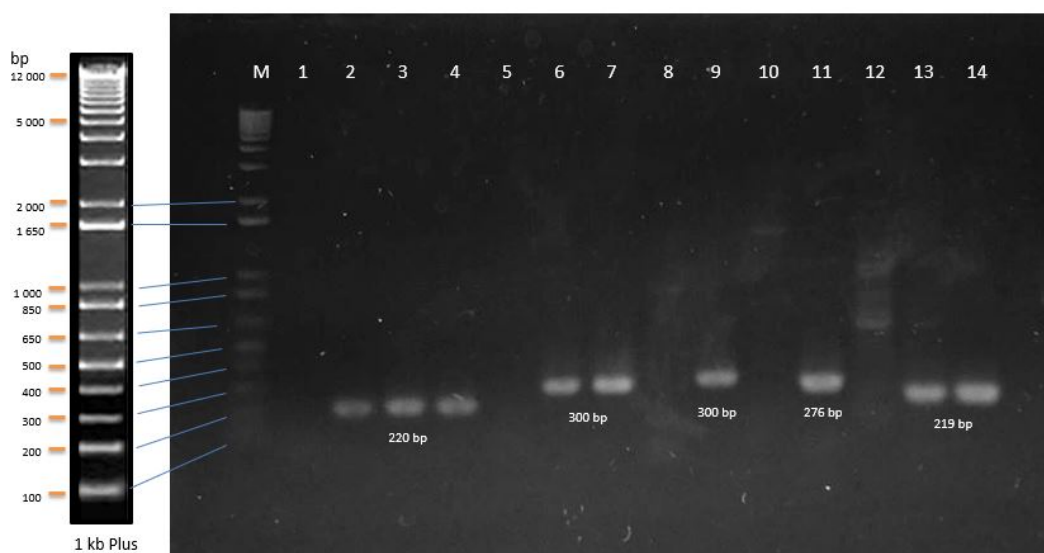


FIGURA 4.11: Amplificación por PCR de un fragmento del gen que codifica para Usher en cepas tipo Avpg5 (A), Avpg 2015 (B) y AvpgCl (C).

Evaluación de eficiencia de amplificación con iniciadores ad hoc para Fad bajo el siguiente orden: Marcador de peso molecular (M), controles negativos (1, 5, 8, 10 y 12), Control positivo GyrB (2, 3, 4), UsherAa (6) y UsherBa (7), UsherCb (9) y UsherCa (11), UsherAb (13) y UsherBb (14).

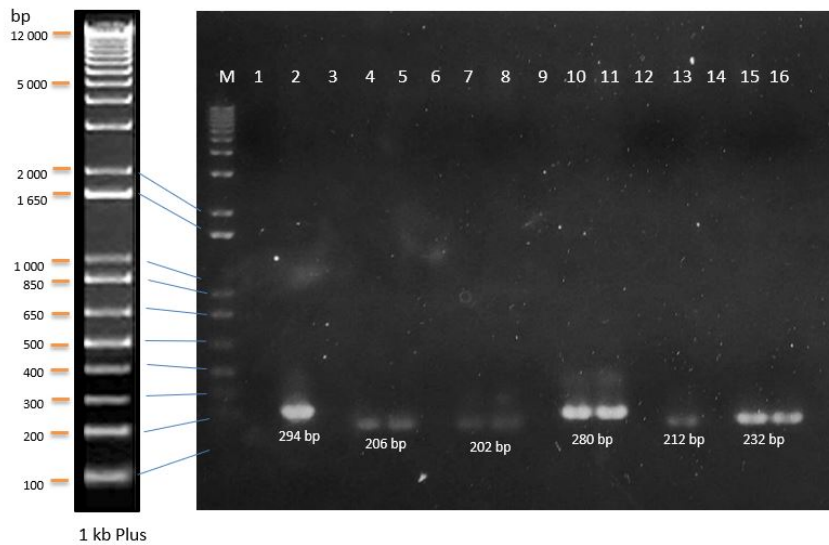


FIGURA 4.12: Amplificación por PCR de un fragmento del gen que codifica para Chap y Fimb, en cepas tipo Avpg5 (A), Avpg 2015 (B) y AvpgCl (C).

Se utilizó a RecN como control positivo para evaluación de eficiencia de amplificación de Chap: Marcador de peso molecular (M), controles negativos (1, 3, 6, 9 y 12, 14), RecNC (2), RecNAB (4 y 5), ChapAb (7) y ChapBb (8), FimbAa (10) y FimbBa (11), FimbCa (13), FimbAb (15) y FimbBb (16).

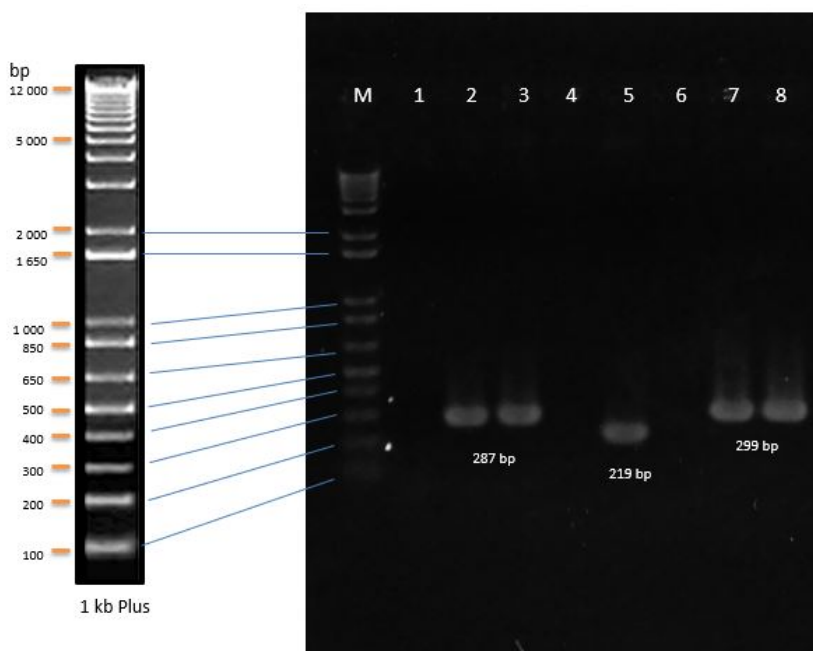


FIGURA 4.13: Amplificación por PCR de Fad en cepas tipo Avpg5 (A), Avpg 2015 (B) y AvpgCl (C).

Evaluación de eficiencia de amplificación con primers ad hoc para Fad bajo el siguiente orden: Marcador de peso molecular (M), controles negativos (1, 4 y 6), FadAa y FabBa (2 y 3), FabCa (5), FabAb y FabBb (pozo 7 y 8 respectivamente)

Capítulo 5

DISCUSIÓN

Como ha sucedido con otros agentes infecciosos, se tiene evidencia de cepas variantes de Avpg y la infección que esta bacteria ocasiona. En algunos casos las vacunas existentes no han prevenido la infección de estas cepas variantes. A pesar de su importancia como patógeno, se conoce poco acerca de los factores celulares bacterianos que rigen la especificidad hacia el hospedero y su patogenicidad. En este caso la genómica puede apoyar a clarificar la problemática.

La disponibilidad de nuevas tecnologías de secuenciación y de bases de datos biológicas nos permitió un enfoque computacional para la anotación funcional del genoma de Avpg5 y la investigación de factores de virulencia asociados al patógeno. Las bases de datos y herramientas bioinformáticas han sido, y continúan siendo, utilizadas para generar hipótesis para la posterior investigación en el laboratorio.

Para inferir la relación filogenética de Avpg5 con alineamientos de secuencias de genes housekeeping se realizó un análisis neighbour-joining. El dendrograma obtenido mediante este análisis incluyó a Avpg5 dentro de las cinco cepas previamente anotadas y asignadas a la especie. Las seis cepas de *Avibacterium paragallinarum* se separaron claramente en dos grupos correspondientes a los dos clados principales del dendrograma. La cepa Avpg5 y Avpg2015 pertenecen al grupo I. El grupo dos fue el más subdividido, con un nodo de ramificación compartido entre AvpgJF4211 y Avpg221, y dos puntos de ramificación más para AvpgCL y Avpg72. Podría inferirse una asociación de los grupos filogenéticos con el potencial de virulencia de cepas.

En cuanto al análisis comparativo, la plataforma RAST de interfaz gráfica basada en la red permitió una rápida comparación y anotación de genomas. Los datos comparativos incluyen secuencias asociadas al genoma completo. El reporte de RAST para cada cepa informa las coordenadas de cualquier gen en el genoma(s) y de la coincidencia de estos en los comparativos por pares, junto con su contexto genético. Esta herramienta se ha aplicado para identificar posibles objetivos de nuevos fármacos, como genes que codifiquen factores de virulencia y otros elementos genéticos importantes para la colonización del huésped.

La comparación genómica de Avpg5 ayuda tanto a la anotación como a la identificación rápida de datos asociados a cada genoma de Avpg incluido en el estudio. La descripción en conjuntos permitió identificar el núcleo del genoma de cepas de Avpg y el así llamado genoma dispensable compuesto por secuencias de genoma único o compartidas entre una o más cepas. Muchos de los rasgos individuales de las cepas podrían estar potencialmente involucrados en importantes procesos biológicos.

En el reporte de factores de virulencia de Avpg5 se incluyen proteínas de membrana externa, toxinas, LPS, proteínas capsulares y adhesinas, aunque RAST refiere secuencias asociadas a fagos dentro del genoma de Avpg5 a considerar como rasgos de virulencia.

La ganancia de resistencia puede afectar de manera muy variable a la virulencia. Aunque la resistencia a los antimicrobianos no puede establecerse directamente como un factor de virulencia, la propagación de los genes de resistencia ubicados en elementos móviles identificados en varias de las cepas de Avpg, incluyendo Avpg5, podrían ser importantes para la aparición de clones prevalentes, virulentos y además con escasas opciones terapéuticas. Podemos establecer por tanto que la propagación de los genes de resistencia ubicados en elementos móviles podría conducir a la comovilización de factores de virulencia y, por lo tanto, a aumentar la patogenicidad.

En el rastreo por secuencia de genes reportados por Requena et. al. como factores de virulencia para Avpg72 en Avpg5, encontramos algunas discrepancias entre genes que recibían distinto descriptor. Se corroboró su correspondencia por identidad de secuencia y se rastreó su presencia en la cepa 5 de Avpg. Las proteínas del listado reportado en el estudio de Avpg72 ayudaron a la categorización e inclusión de funciones con probable implicación en la virulencia de Avpg5.

Aún quedan por determinarse varios aspectos relacionados a los factores de virulencia identificados en el análisis *in silico* de Avpg5, como son su expresión y contribución a la patogénesis de Avpg. Sin embargo, el análisis comparativo de la secuencia del genoma y la identificación de varias proteínas (como la proteína fimbrial F17 descrita en el presente escrito) como un determinante de la enfermedad en el ave, contribuirán al bagaje hasta ahora descrito de factores definiendo una virulencia diferencial entre los aislados de Avpg de brotes de CI independientemente de su serotipificación. Por consiguiente, los factores de virulencia expresados en las cepas de Avpg pueden constituir la clave para el desarrollo de vacunas como una estrategia para el control y prevención de las infecciones de CI.

Capítulo 6

CONCLUSIONES

La participación de Avpg en los trastornos del tracto respiratorio en aves plantea un grave problema económico y de bienestar en la producción avícola.

Múltiples factores contribuyen a la virulencia de Avpg. Análisis comparativos de secuencias de genomas completos de cepas patogénicas pertenecientes a la familia de las Pasteurelaceas, para investigar las bases genómicas de la patogénesis de Avpg5, han puesto en manifiesto diversidad y diferencias funcionales como factores clave de virulencia. Se identificaron múltiples objetivos para el diseño de vacunas contra Avpg que prometen desarrollar una estrategia menos dependiente de antimicrobianos para manejar este patógeno en entornos avícolas.

La cepa Avpg5 es semejante filogenéticamente a la cepa Avpg2015, mientras que AVPGCL es semejante filogenéticamente a la cepa Europea y Asiática.

Se ha secuenciado y anotado el genoma de la cepa Avpg5 y se han encontrado genes que codifican para factores de virulencia similares a los reportados para la mayoría de las cepas de Avpg. La disponibilidad del genoma de *A. paragallinarum* representa una importante fuente de información para el desarrollo de pruebas diagnósticas, genotipado y nuevos antígenos para posibles vacunas contra la coriza infecciosa. La identificación de factores de virulencia y de posibles proteínas candidatas a la vacuna contribuyen a una mejor comprensión de la patogénesis para la prevención y el control de CI.

Capítulo 7

PERSPECTIVAS

Cada día hay más secuencias genómicas completas de un gran número de patógenos bacterianos. La disponibilidad de estas secuencias ha cambiado completamente el panorama para el desarrollo de vacunas. El análisis *in silico* de genomas completos generó rápidamente una colección de genes potencialmente responsables de la adquisición de virulencia y por tanto con implicaciones prácticas en el diseño de vacunas.

La efectividad de las vacunas actuales contra CI es baja. Los rasgos de virulencia identificados en el estudio de genomas contribuyen a fortalecer la información hasta ahora anotada en los diferentes genomas de Avpg. Los factores de virulencia reportados para Avpg5 son candidatos para producir, en un futuro, nuevas vacunas y prevenir así infecciones en el sector avícola. Se espera una nueva generación de vacunas compuestas por proteínas predichas *in silico*. Con este trabajo intentamos sentar las bases para futuras propuestas de un producto tecnológico, es decir, una vacuna mejorada.

Para poder comprender la interacción exacta huésped-patógeno causante de enfermedad y movilidad, es deseable una mayor comprensión de la expresión de factores de virulencia bajo condiciones *in vitro* que emulen la funcionalidad o comportamiento de la bacteria en el ave. Se plantea realizar un estudio de expresión de genes de Avpg5, para corroborar la expresión de los genes que codifican fimbria F-17 a evaluar en dos condiciones de cultivo, agitación y estacionario.

Anexos A

ANEXOS

A.1. Genes de mantenimiento (genes Housekeeping)

<https://www.dropbox.com/s/hnkx6h4ru7e6pyl/Genes.pdf?dl=0>

A.2. Coloramas

El catálogo de las proteínas identificadas a través de la comparación del genoma inter género de Avpg5: incluyó 37 cepas, 11 especies dentro de 8 géneros distintos de la familia Pasteurellaceae. Los colores muestran la presencia de la proteína para la comparación del genoma relacionado. Se usaron diferentes colores para cada comparación para facilitar la distinción entre los diferentes géneros.

<https://www.dropbox.com/s/00wj8tkxutry296/Comparativoesp.pdf?dl=0>

A.3. Geles de agarosa

En el trabajo se uso a concentración de 0.8 % y 1 % usando como dispersante solución (1X) de Tris-Boratos 0.045M. La suspensión se calienta para disolver el polvo, se espera a que se enfríe un poco y se vierte a la cámara. Una vez que ha gelificado se coloca en la cámara electroforética.

Para 30 ml: 0.24g de agarosa, 30 ml de TBE 0.5X

A.4. Estadísticas de Subsistemas (RAST) de cepas de Avpg

Genes conectados a subsistemas y su distribución en diferentes categorías. Las categorías son ampliables hasta el gen específico.

<https://www.dropbox.com/s/7avpb2wdcatpt58/RAST.pdf?dl=0>

A.5. Rastreo por secuencia

Rastreo por secuencia de factores de virulencia (95) encontrados en *Avibacterium paragallinarum* cepa 72,³⁵ con al menos 60 % de identidad con VFDB (Virulence Factor Database). Se proporciona una breve descripción de sus funciones, así como el descriptor bajo el cual fue anotado por la plataforma RAST.

<https://www.dropbox.com/s/njg1lvkgyrf4i3a/VF.pdf?dl=0>

A.6. Genes de Avpg5 dentro de Subsistema RAST

Genes conectados a subsistemas y su distribución en diferentes categorías. Las categorías son ampliables hasta el gen específico (compatible con archivos .xlsx).

<https://www.dropbox.com/s/w87fkpvqvj8ppl2/Subin5.tsv?dl=0>

A.7. Core del genoma de cepas de Avpg

<https://www.dropbox.com/s/8ahsl8o5yjj0b9q/Core.pdf?dl=0>

Bibliografía

- [1] Aguilar-Bultet, L., Calderon-Copete, S. P., Frey, J., & Falquet, L., (2013). Draft Genome Sequence of the Virulent *Avibacterium paragallinarum* Serotype A Strain JF4211 and Identification of Two Toxins. *Genome Announcements*, 1(4): 1-2, e00592-13. doi:10.1128/genomeA.00592-13. <http://doi.org/10.1128/genomeA.00592-13>
- [2] 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. <http://www.researchgate.net/publication/262419523>
- [3] Baltes, N., Tonpitak, W., Gerlach, G.-F., Hennig-Pauka, I., Hoffmann-Moujahid, A., Ganter, M., & Rothkötter, H.-J., (2001). *Actinobacillus pleuropneumoniae* Iron Transport and Urease Activity: Effects on Bacterial Virulence and Host Immune Response. *Infection and Immunity*, 69(1): 472-478. doi: 10.1128/IAI.69.1.472-478.2001. <http://doi.org/10.1128/IAI.69.1.472-478.2001>
- [4] Barnard, Tobias & Heerden, Esta & Bragg, Robert & Albertyn, Jacobus, (2008). *Haemophilus paragallinarum* haemagglutinin: Role in adhesion, serotyping and pathogenicity. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 75(1): 11-6. 10.4102/ojvr.v75i1.83.
- [5] Biberstein, E.L., White, D.C., (1969). A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. *J. Med. Microbiol*, 2(1): 75-78.
- [6] Blackall, P., (1988). Antimicrobial Drug Resistance and the Occurrence of Plasmids in *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Diseases*, 32(4), 742-747. doi:10.2307/1590993. <http://www.jstor.org/stable/1590993>
- [7] Blackall, P., (1999). Infectious Coryza: Overview of the Disease and New Diagnostic Options. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4): 627-632.
- [8] Blackall, P., Eaves, L., & Aus, G., (1990). Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* by the Page Scheme: Comparison of the Use of Agglutination and Hemagglutination-Inhibition Tests. *Avian Diseases*, 34(3): 643-645. doi:10.2307/1591258. <http://www.jstor.org/stable/1591258>
- [9] 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

- [10] Bragg, R., Coetzee, L., Verschoor, J.A., (1997). Effects of growth conditions and incubation times on the expression of antigens of *Haemophilus paragallinarum* which are detected by monoclonal antibodies. The Onderstepoort journal of veterinary research. 64(1): 57-63. <https://www.researchgate.net/publication/14013888>
- [11] Bragg, R.R., Greyling, J.M., Verschoor, J.A., (1997). Isolation and identification of NAD-independent bacteria from chickens with symptoms of infectious coryza, *Avian Pathology*, 26(3): 595-606. doi: 10.1080/03079459708419237. <http://dx.doi.org/10.1080/03079459708419237>
- [12] Byarugaba, D. K., Minga, U. M., Gwakisa, P. S., Katunguka-Rwakishaya, E., Bisgaard, M., & Olsen, J. E., (2007). Virulence characterization of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Uganda, *Avian Pathology*, 36(1): 35-42. doi 10.1080/03079450601102947. <http://dx.doi.org/10.1080/03079450601102947>
- [13] 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>
- [14] Chiang, Y.T., Shien, J.H., Tan, D.H., Shieh, M.K., Liu, C.C., Chen, Y.S., Chang, P.C., (2013). Identification of the lic1ABCD operon that controls the phase-variable expression of phosphorylcholine on lipopolysaccharide from *Avibacterium paragallinarum*, *Avian Pathology*, 42(1): 72-78. doi: 10.1080/03079457.2012.760840. <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2012.760840>
- [15] Christensen, J. P. & Bisgaard, M., (1997). Avian pasteurellosis: Taxonomy of the organisms involved and aspects of pathogenesis, *Avian Pathology*, 26:3, 461-483, doi: 10.1080/03079459708419228. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00152-17>.
- [16] Darmon, E., & Leach, D. R. F., (2014). Bacterial Genome Instability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 78(1): 1-39. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00035-13>
- [17] Droual, R., Bickford, A., Charlton, B., & Kuney, D., (1990). Investigation of Problems Associated with Intramuscular Breast Injection of Oil-Adjuvanted Killed Vaccines in Chickens. *Avian Diseases*, 34(2): 473-478. doi:10.2307/1591439. <http://www.jstor.org/stable/1591439>
- [18] Fernández, L. A. & Berenguer, J., (2000). Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1): 21-44. doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00531.x
- [19] García, A., Angulo, E., Blackall, P., & Ortiz, A., (2004). The Presence of Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Independent *Haemophilus paragallinarum* in México. *Avian Diseases*, 48(2): 425-429. <http://www.jstor.org/stable/1593294>
- [20] Gargi, A., Tamilselvam, B., Powers, B., Prouty, M.G., Lincecum, T., Eshraghi, A., Maldonado-Arocho, F.J., Wilson, B.A., Bradley, K.A. & Blanke, S.R., (2013). Cellular interactions of the cytolethal distending toxins from *Escherichia coli* and

- Haemophilus ducreyi*. Journal of Biological Chemistry, 288(11): 7492-7505. doi 10.1074/jbc.M112.448118
- [21] Horner, R.F., Bishop, G.C., Colleen Haw (1992). An upper respiratory disease of commercial chickens resembling infectious coryza, but caused by a V factor-independent bacterium, Avian Pathology, 21(3): 421-427. doi: 10.1080/03079459208418860. <http://dx.doi.org/10.1080/03079459208418860>
- [22] Horta-Valerdi, G., Sanchez-Alonso, M. P., Perez-Marquez, V. M., Negrete-Abascal, E., Vaca-Pacheco, S., Hernandez-Gonzalez, I., ... Vázquez-Cruz, C., (2017). The Genome Sequence of *Avibacterium paragallinarum* Strain CL Has a Large Repertoire of Insertion Sequence Elements. Genome Announcements, 5(15): 1-2, e00152-17. <http://doi.org/10.1128/genomeA.00152-17>.
- [23] Hsu, Y.M., Shieh, H.K., Chen, W.H., Sun, T.Y., Shiang, J.H., (2007). Antimicrobial susceptibility, plasmid profiles and haemocin activities of *Avibacterium paragallinarum* strains, In Veterinary Microbiology, 124(3): 209-218
- [24] Jinadasa, R.N., Bloom, S.E., Weiss, R.S. & Duhamel, G.E., (2011). Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. Microbiology, 157(1): 1851-1875. doi 10.1099/mic.0.049536-0
- [25] Küng, E. & Frey, J., (2013). AvxA, a composite serine-protease-RTX toxin of *Avibacterium paragallinarum*, In Veterinary Microbiology, 163(1): 290-298. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.12.029>.
- [26] 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. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02316-8](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02316-8)
- [27] Liu, C.C., Ou, S.C., Tan, D.H., Hsieh, M.K., Shien, J.H., Chang, P.C., (2016). The fimbrial protein is a virulence factor and potential vaccine antigen of *Avibacterium paragallinarum*. Avian Dis 60(3):649-655. <https://doi.org/10.1637/11410-031316-Reg.1>.
- [28] Mena-Rojas, E., Vázquez, C., Vaca, S., García, O., Pérez-Márquez, V., Pérez-Méndez, A., Ibarra, J., de la Garza, M., Zenteno, E., & Negrete, E., (2004). Antigenic secreted proteins from *Haemophilus paragallinarum*. A 110 kDa putative RTX-protein. FEMS Microbiol. 232: 83.87. <https://academic.oup.com/femsle/article/232/1/83/491273>
- [29] Mifflin, J., Horner, R., Blackall, P., Chen, X., Bishop, G., Morrow, C., Iritani, Y., (1995). Phenotypic and Molecular Characterization of V-Factor (NAD)-Independent *Haemophilus paragallinarum*. Avian Diseases, 39(2): 304-308. doi:10.2307/1591871. <http://www.jstor.org/stable/1591871>
- [30] Morales, V.E, Fernández, P.R, Negr1 & ete, E.A., Salazar, F.G., Blackall, P.J., & Soriano, E.V., (2014). Genotyping, Pathogenicity, and Immunogenicity of *Avibacterium paragallinarum* Serovar B-1 Isolates from the Americas. 58(2): 293-296. <http://dx.doi.org/10.1637/10693-101513-ResNote.1>
- [31] Negrete Abascal, E., Chantes Guerra, A., Serrano Vázquez, A., Tenorio, V.R., Vázquez Cruz, C., Zenteno, E., Paniagua Contreras, G., & Vaca Pacheco,

- S., (2009). Identification of iron-acquisition proteins of *Avibacterium paragallinarum*, *Avian Pathology*, 38(3): 209-213. doi:10.1080/03079450902912143. <http://dx.doi.org/10.1080/03079450902912143>
- [32] Pan, Y.C., Tan, D.H., Shien, J.H., Liu, C.C., He, Y.S., Shen, P.C., Chang, P.C., (2012). Identification and Characterization of an RTX Toxin-Like Gene and Its Operon from *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Diseases Digest: September 2012, Vol. 7, No. 3*, pp. e47-e48.
- [33] Pérez, M.V., Pérez, M.A., Ibarra, C.J., Gómez, L.G., Vázquez, C.C., Vaca, P.S., Negrete, A.E., (2008). Secreted proteins of *Avibacterium paragallinarum* are lethal for chicken embryo. *Animal biodiversity and emerging diseases. Annals of the New York Academy of sciences*. 1149: 380-383. doi: 10.1196/annals.1428.007
- [34] Persson, G., Bojesen, A.M., (2015). Bacterial determinants of importance in the virulence of *Gallibacterium anatis* in poultry. *Veterinary Research*, 46(1): 57. <http://doi.org/10.1186/s13567-015-0206-z>
- [35] Requena, D., Chumbe, A., Torres, M., Alzamora, O., Ramirez, M., Valdivia-Olarte, H., ... Fernández-Díaz, M. (2013). Genome sequence and comparative analysis of *Avibacterium paragallinarum*. *Bioinformatics*, 9(10): 528-536. <http://doi.org/10.6026/97320630009528>
- [36] Rimler, B.R., Shotts, E.B. Jr, Brown, J., & Davis, R.B., (1977). The Effect of Sodium Chloride and NADH on the Growth of Six Strains of *Haemophilus* Species Pathogenic to Chickens. *Journal of general microbiology*, 98(1): 349-54. 10.1099/00221287-98-2-349.
- [37] 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. <https://www.researchgate.net/publication/7436992>
- [38] Rocha, R.M.O., García-González, O., Pérez-Méndez, A., Ibarra Caballero, Perez Marquez, V., Vaca, S., Negrete-Abascal, E., (2006). Membrane vesicles released by *Avibacterium paragallinarum* contain putative virulence factors. *FEMS microbiology letters*. 257: 63-8. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00154.x
- [39] Sandoval, V., Terzolo, H., & Blackall, P. (1994). Complicated Infectious Coryza Outbreaks in Argentina. *Avian Diseases*, 38(3): 672-678. doi:10.2307/1592097. <http://www.jstor.org/stable/1592097>
- [40] Sawata, A., Kume, K., Nakai, T., (1984). Relationship between anticapsular antibody and protective activity of a capsular antigen of *Haemophilus paragallinarum*. *Nihon Juigaku Zasshi. Japanese Journal of Veterinary Science*, 46(4): 475-486
- [41] Sawata, A., Nakai, T., Kume, K., Yoshikawa, H., Yoshikawa, T., (1985). Lesions induced in the respiratory tract of chickens by encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*. *American journal of veterinary research*, 46(5): 1185-91.
- [42] Soriano-Vargas, E., Sánchez-Morales, J., Morales-Erasto, V., García-Sánchez, A., (2013). Aislamiento e identificación de *Avibacterium paragallinarum* NAD independiente (serovariedad C-1) en gallinas de reemplazo con coriza infecciosa. *Veterinaria México*, 44(1): 57-62. <https://goo.gl/QWw8QE>

- [43] Soriano Vargas, E., Terzolo, H.R., (2004). Epizootiología, prevención y control de la coriza infecciosa. *Veterinaria México*, 35(3): 261-279.
- [44] Soriano-Vargas, E., Terzolo, H.R., (2004). *Haemophilus paragallinarum*: Etiología de la coriza infecciosa. *Veterinaria Mexico*, 35(3): 245-259.
- [45] Terry, T.D., Yaramah, M.Z., Shannon, L.W., Blackall, P.J., Michael, P.J., (2003). Genetic analysis of a plasmid encoding haemocin production in Genetic analysis of a plasmid encoding haemocin production in *Haemophilus paragallinarum*. *Microbiology*. 149: 3177-3184. doi 10.1099/mic.0.26493-0
- [46] Terzolo, H., (2000). Coriza Infecciosa: una revisión. Propuestas de investigación para su diagnóstico y control. *Revista de medicina veterinaria*, 81: 262-269. <https://www.researchgate.net/publication/29659877>
- [47] 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):1-14. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0167736>
- [48] Wu, J.R., Chen, P.Y., Shien, J.H., Shyu, C.L., Shieh, H.K., Chang, F., Chang, P.C., (2010). Analysis of the biosynthesis genes and chemical components of the capsule of *Avibacterium paragallinarum*, In *Veterinary Microbiology*, 145(2): 90-99. doi:10.1016/j.vetmic.2010.03.002. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.002>.
- [49] Wu, J.R., Wu, Y.R., Shien, J.H., Hsu, Y.M., Chen, C.F., Shieh, H.K., Chang, P.C., (2011). Recombinant proteins containing the hypervariable region of the haemagglutinin protect chickens against challenge with *Avibacterium paragallinarum*, In *Vaccine*, Volume 29(4): 660-667. doi:10.1016/j.vaccine.2010.11.040. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.11.040>.
- [50] Xu, F., Miao, D., Du, Y., Chen, X., Zhang, P., Sun, H., (2013). Draft Genome Sequence of *Avibacterium paragallinarum* Strain 221. *Genome Announcements*, 1(3):1-2. <http://doi.org/10.1128/genomeA.00290-13>
- [51] Yamamoto, R., (1980). "Infectious Coryza" In: S.B. Hitchner, C. Charles, D. H. Granham and J. E. Williams (eds). Isolation and identification of avian pathogens 2da ed. American association of avian pathologists. Texas: 16-18.