

IDENTIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO DE 3 KB DEL GEN *AIDA-I* EN *BRUCELLA OVIS*

Martínez Martínez, Olga Lidia; Hernández Castro Rigoberto; Santillán Flores Marco Antonio; Díaz Aparicio Efrén; Suárez Güemes Francisco y De la Garza G. Mireya. 2007. V° Congreso de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, Mendoza, Argentina.

INIFAP CENID-MICROBIOLOGIA, CINVESTAV-IPN, FMVZ-UNAM
INIFAP CENID-MICROBIOLOGIA, Delegación Cuajimalpa,
CO. 05110 México Distrito Federal. lila23mora@yahoo.com
www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Infecciosas ovinos](#)

RESUMEN

El genoma de *Brucella* spp esta compuesto por dos cromosomas circulares de aproximadamente 2.1 y 1.2 Mpb. En el caso de *Brucella*, la adhesión, invasión, evasión de la respuesta inmune y el tráfico intracelular no está bien definido. Se han identificado en el genoma de *B. melitensis* tres marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifican para proteínas de adhesión denominados precursores de la proteína del gen *aidA-I*, sin embargo no se ha descrito bien su función. Algunos de ellos son: tres proteínas que presentan dominios homólogos a proteínas autotransportadoras, como la proteína de unión a fibronectina *shdA* de *Salmonella typhimurium*, que podrían servir como adhesinas putativas mediante la unión después de la fagocitosis. La fibronectina ha sido reportada dentro de las vacuolas endocíticas que contienen brucelas por lo que se supone que la unión a fibronectina puede facilitar la entrada a la célula. Se trabajó con las cepas de *Brucella ovis* Reo 198 y una cepa de campo. Se utilizaron unos iniciadores a partir de la secuencia del gen *aidA-I* de *Brucella melitensis* para localizar el gen por PCR. Se identificó un producto de 3 kbp que corresponde al gen *aidA-I* en *Brucella ovis* por lo que este gen podría formar parte del sistema V de secreción.

INTRODUCCIÓN

El genoma de *B. melitensis* contiene alrededor de 3,294,935 bp distribuido en dos cromosomas independientes de 2,117, 144 bp y 1,77,787 bp y presenta 3,197 marcos de lecturas (ORFs). Presentando genes para el sistema tipo III, IV flagelar y el sistema V de secreción. Con estos avances se ha provisto de importante información sobre el metabolismo, secreción, adhesión, transporte, característicos sobre la pared celular e identificación de la naturaleza de moléculas secretadas por el sistema de secreción tipo IV que podrían ayudar a entender la patogénesis de la enfermedad. El genoma de *B. melitensis*, también codifica otros tipos de factores de virulencia. Se han identificado tres marcos de lectura para el tipo V secreción, como proteasas extracelulares, un dominio de adhesina perteneciente a la familia de las autotransportadoras. Los ORFs codifican para proteínas de adhesión (*AidA-I* precursor). Un marco de lectura que es homólogo a la región C-terminal del precursor *AidA-I*. En el caso de *Brucella*, la adhesión, invasión, evasión de la respuesta inmune y el tráfico intracelular no está bien definido. Pero Se han identificado tres proteínas que presentan dominios homólogos a proteínas autotransportadoras, como la proteína de unión a fibronectina *shdA* de *Salmonella typhimurium*, que podrían servir como adhesinas putativas mediante la unión después de la fagocitosis. La fibronectina ha sido reportada dentro de las vacuolas endocíticas que contienen brucelas por lo que se supone que la unión a fibronectina puede facilitar la entrada a la célula. La interacción de las especies de *Brucella* con la superficie epitelial de las células después de la migración en el huésped es desconocida. En un estudio comparativo del genoma de *B. suis*, *B. abortus* y *B. melitensis* se identificaron 3 proteínas que contienen dominios homólogos a proteínas autotransportadoras y en la comparación de los tres se identificó el cromosoma II, genes que codifican para proteínas autotransportadoras parecidas a las *shdA* de *Salmonella* y *AidA-I* de *E. coli*. Algunos autores reportan que el gen *omaA* de *B. suis* codifica una proteína que presenta las características de una proteína autotransportadora. En *Brucella ovis* no se ha reportado este gen. El objetivo del trabajo, fue identificar la presencia de un fragmento de 3105 pb del gen *aidA-I* en *Brucella ovis*.

METODOLOGÍA

Se trabajaron con las cepas: de *B. ovis* Reo 198 y *B. ovis* de campo aislada de un borrego con epididimitis, las cepas fueron cultivadas en Agar sangre a 37° C por 48 h bajo una atmósfera de 5 % de CO₂.

Extracción de DNA de *B. ovis*

Se utilizó 567 µl de TE/NaCl (50mM Tris, 50mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0) y 30 µl de SDS al 10 % con 3 µl de proteinasa K (20mg/ml), se incubó por una h. Se adicionó 300 µl de fenol-cloroformo (v/v) y se centrifugó a 8000 xg durante 15 min. La fase acuosa se transfirió a otro tubo y se adicionó dos volúmenes de etanol frío, dejándose secar y con 100 µl de la solución TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA pH 8.0).

Técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los oligonucleótidos fueron sintetizados a partir del dominio beta de *Brucella melitensis*. 5' CCA GGC ATG GCG ACT TTT GG 3', 5' TGC GGT GAC GTT TCA GTC GG 3'. Se llevó a cabo la reacción de PCR con una solución amortiguadora de PCR (1.0mM Tris-Cl, 1.5 mM MgCl₂, 50mM KCl pH 3), 100 µM de cada dNTP, 200 nM de cada iniciador, 2 U de Taq polimerasa y 1 µl de DNA, en un volumen de 50 µl. Con una desnaturalización inicial a 94°C por 4 min, seguido de 33 ciclos a 94°C por 33 seg, 60°C por 30 seg, 72°C por 2.45 min y una extensión final a 72°C por 8 min. Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1%.

RESULTADOS

En *Brucella ovis* se amplificó un producto de 3 kbp que corresponde al fragmento de *aidA-I* esperado, comparado con el de *B. melitensis* que se utilizó como control. Con estos resultados se hace evidente que el fragmento de 3 kbp del gen *aidA-I* esta presente en *Brucella ovis*.

DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos se puede inferir que al ser identificado el fragmento del gen *aidA-I*, este puede estar implicado en la formación del poro que permite el paso de la adhesina AIDA-I en *Brucella ovis*. Se considera que el fragmento 3 kbp es una secuencia consenso que es característico del sistema V de secreción. Por lo que este gen puede estar implicado como dentro de los factores de virulencia de *B. ovis*.

LITERATURA CITADA

1. Charachon MS, Paillisson, ML, Nurit. C, Bourg G, Allardet-Sevent A and Ramuz M. Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. J. Bacteriol. 1993, 175, 701-705.
2. Identification of *Brucella* spp. genes involved in intracellular trafficking. Cell Microbiol. 2001;3:487-497.
3. DelVecchio GV, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer P, Hagijs S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkon R, Kyrpides N and Overbeek R. The genome of facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. Microbiology. 2002, 99:1, 443-448.
4. DelVecchio GV, Kapatral V, Elzer, P., Patra, G., Mujer, CV. The genome of *Brucella melitensis*. Veterinary Microbiology. 2002. 90. 587-592.
5. Cravioto A, Gross R, Scotland S, and Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. Curr. Microbiol. 1979. 3:95-99.
6. Goldhar J. Bacterial lectinlike adhesins: determination and specificity. Methods Enzymol. 1994;236:211-231.
7. Benz I and Schmidt MA. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun. 1989. 57:1506-1511.
8. Gay B, Mauss H, Sanchez-Teff S. Identification of fibronectins in peritoneal macrophages during the phagocytosis of *Brucella*. An immunocytochemical study by electron microscopy. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. 1986;52:169-176.
9. Carroll JA, Coleman SA, Smitherman LS, Minnick MF. Hemin-binding surface protein from *Bartonella quintana*. Infect Immun. 2000. 68:6750-6757.

[Volver a: Infeciosas ovinos](#)